



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Asociación de los polimorfismos *CFH*, *CFB*, *ARMS2*,
SERPINF1, *VEGFR1* y *VEGF* en la respuesta anatómica
y funcional al tratamiento con Ranibizumab en
pacientes con Degeneración Macular
Asociada a la Edad**

Estefanía Cobos Martín

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.

**Asociación de los polimorfismos *CFH*, *CFB*,
ARMS2, *SERPINF1*, *VEGFR1* y *VEGF* en la
respuesta anatómica y funcional al tratamiento
con Ranibizumab en pacientes con
Degeneración Macular Asociada a la Edad**

Estefanía Cobos Martín

Tesis doctoral, 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Medicina

**Asociación de los polimorfismos CFH,
CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1 y VEGF
en la respuesta anatómica y funcional al
tratamiento con Ranibizumab en pacientes con
Degeneración Macular Asociada a la Edad**

Estefanía Cobos Martín

Tesis doctoral

Dirigida por:

Lluís Arias Barquet

Sergio Recalde Maestre

Barcelona, septiembre de 2017



Health Universitat de
Barcelona
Campus



Barcelona
Knowledge
Campus

© 2017 Estefanía Cobos Martín

© 2017 Universitat de Barcelona

Diagramación e ilustraciones:

Ilustración Médica

www.ilustracionmedica.es

LLUÍS ARIAS BARQUET,

Doctor en Medicina y Cirugía, jefe de sección de retina del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitari de Bellvitge y profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada: **«Asociación de los polimorfismos CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1 y VEGF en la respuesta anatómica y funcional al tratamiento con ranibizumab en pacientes con degeneración macular asociada a la edad»** ha sido realizada bajo mi dirección por Estefanía Cobos Martín en el Departamento de Oftalmología del Hospital Universitari de Bellvitge, siguiendo el programa de doctorado de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Que la presente tesis reúne las condiciones necesarias para ser defendida en público y poder acceder al grado de Doctora en Medicina y Cirugía

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 25 de julio de 2017.

SERGIO RECALDE MAESTRE,

Doctor Europeo en Bioquímica, investigador colaborador del Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Clínica Universidad de Navarra y Profesor de la facultad de Medicina de la Universidad de Navarra.

CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada: **«Asociación de los polimorfismos CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1 y VEGF en la respuesta anatómica y funcional al tratamiento con ranibizumab en pacientes con degeneración macular asociada a la edad»** ha sido realizada bajo mi dirección por Estefanía Cobos Martín en el Departamento de Oftalmología del Hospital Universitari de Bellvitge, siguiendo el programa de doctorado de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Que la presente tesis reúne las condiciones necesarias para ser defendida en público y poder acceder al grado de Doctora en Medicina y Cirugía

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 25 de julio de 2017.

Agradecimientos

El trabajo en equipo siempre aporta grandes ventajas. Cada uno de sus miembros suma, y la suma de todos da siempre un resultado mayor del esperado. Los buenos equipos, ya sean profesionales, en el ámbito familiar o deportivo, siempre consiguen los mayores logros. Por este motivo soy una gran defensora del trabajo en grupo, valoro el compañerismo por encima de todo, y esa idea es la que se plasma en este trabajo.

Por tanto, quiero dar las gracias a todos los miembros de este gran equipo, a todos los que han colaborado y me han dado su soporte durante todo este intenso periodo. A Sergio Recalde, siempre disponible a cualquier hora, conectados en todo momento a pesar de la distancia, porque me ha transferido toda su experiencia y conocimientos. A Lluís Arias, excelente en todos sus proyectos, que siempre me ha transmitido su positivismo y me ha animado a conseguir mis metas, con esa vocación de enseñar y compartir su sabiduría. A Josep María Caminal, director de una orquesta con muchos componentes pero que gracias a su maestría suena acompañada. Su espíritu curioso nos motiva a dedicar esfuerzos en la investigación. A Alfredo García Layana, por compartir este proyecto con nosotros, junto con otros centros, que también han participado en el mismo. A todos vosotros, los demás miembros del equipo, os dedico mi más sincero agradecimiento.

Gracias también a los que desde el banquillo, me han apoyado, animado y dado un soporte incondicional, porque sin la ayuda de vosotros en casa, no hubiera sido posible conseguirlo.

Gracias,

Estefanía Cobos Martín

Abstract

Purpose: We sought to determine if specific genetic single nucleotide polymorphisms influence vascular endothelial growth factor inhibition response to ranibizumab in neovascular AMD.

Methods: A total of 403 Caucasian patients diagnosed with exudative AMD were included. After a three-injection loading phase, a *pro re nata* regimen was followed. Nine SNP from 6 different genes (CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1, VEGF) were genotyped. Non-genetic risk factors, (age, gender, smoking habit, and hypertension) were also assessed. Patients were classified as Good or Poor responders according to functional (visual acuity), anatomical (foveal thickness measured by OCT), and fluid criteria (fluid/no fluid measured by OCT).

Results: Hypertension was the environmental factor with the strongest Poor response association with ranibizumab in the anatomical measure after the loading phase ($p=0,0004$; OR 3,7; 95% CI, 2,4-5,8) and after 12 months of treatment ($p=10^{-5}$; OR 2,3; 95% CI, 1,5-3,4). The genetic variants rs12614 (*CFB*), rs699947 (*VEGFA*) and rs7993418 (*VEGFR1*) predisposed patients to a Good response while rs12603486 and rs1136287 (*SERPINF1*) were associated with a Poor response. The protective genotype of rs800292 variant (*CFH*) was also associated with a poor anatomical response ($p 0,0048$).

Conclusions: All these data suggest that genetics play an important role in treatment response in AMD patients.

Resumen

Objetivo: Se buscó determinar si polimorfismos genéticos específicos influyen en la respuesta de inhibición del factor de crecimiento endotelial vascular llevada a cabo por el ranibizumab en la DMAE neovascular.

Métodos: Se incluyeron un total de 403 pacientes caucásicos diagnosticados con DMAE exudativa. Después de una fase de carga de tres inyecciones, se siguió un régimen de *pro re nata*. Se genotiparon nueve SNP de seis genes diferentes (*CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGFR1*, *VEGF*). También se evaluaron factores de riesgo no genéticos (edad, género, hábito de fumar e hipertensión). Los pacientes fueron clasificados como buenos o malos respondedores según su respuesta funcional (agudeza visual), anatómica (espesor de la fovea medida por OCT), y la respuesta del fluido (fluido intrarretiniano y/o subretiniano/sin fluido, medido por OCT).

Resultados: La hipertensión fue el factor ambiental con mayor asociación con una pobre respuesta al ranibizumab en la medida anatómica después de la fase de carga ($p = 0,0004$; OR 3,7; IC del 95 %: 2,4-5,8) y después de 12 meses de tratamiento ($p = 5$, OR 2,3, IC del 95 %, 1,5 - 3,4). Las variantes genéticas rs12614 (*CFB*), rs699947 (*VEGFA*) y rs7993418 (*VEGFR1*) predisponen a los pacientes a una buena respuesta mientras que rs12603486 y rs1136287 (*SERPINF1*) se asocian con una respuesta pobre. El genotipo protector de la variante rs800292 (*CFH*) también se asoció con una respuesta anatómica deficiente ($p 0,0048$).

Conclusiones: Todos estos datos sugieren que la genética juega un papel importante en la respuesta al tratamiento en pacientes con DMAE.

Índice

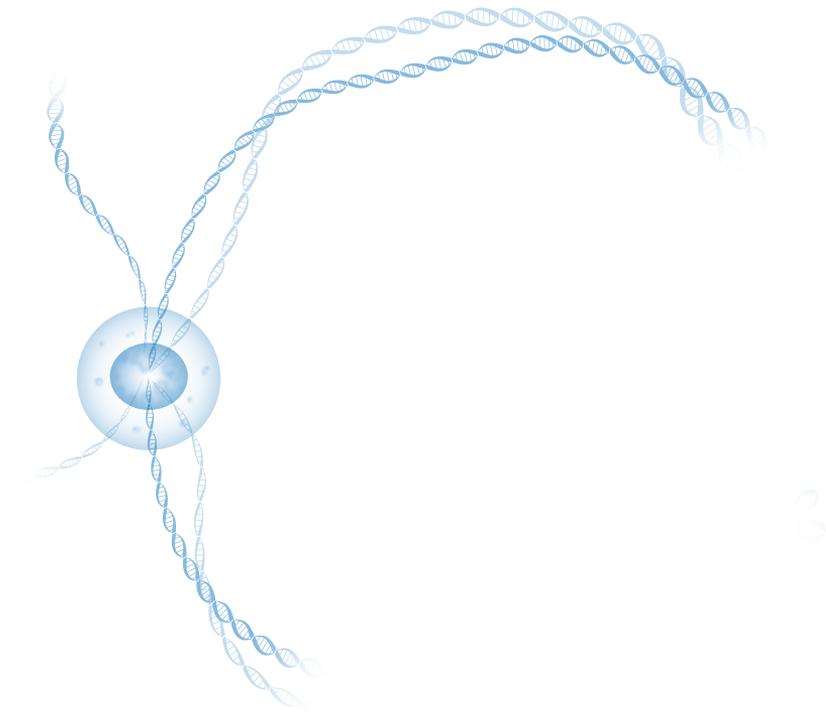
1. Glosario	19
2. Justificación	23
3. Introducción	27
3.1 Degeneración macular asociada a la edad	29
3.2 Exploraciones complementarias	37
3.2.1 Angiografía fluoresceínica y con verde de indocianina	37
3.2.2 OCT	38
3.2.3 Angio-OCT	38
3.3 Epidemiología	41
3.4 Calidad de vida	45
3.5 Etiopatogenia	47
3.6 Factores de riesgo	49
3.6.1 Factores de riesgo sociodemográficos	49
3.6.2 Factores de riesgo oculares	51
3.6.3 Factores relacionados con el estilo de vida	52
3.6.4 Factores relacionados con el sistema cardiovascular	55
3.6.5 Factores genéticos	57
3.7 Genética y DMAE	59
3.7.1 Introducción	59
3.7.2 Estudios de ligamiento y asociación en DMAE	60
3.7.3 Sistema del complemento y DMAE	60

3.7.4 <i>LOC387715/HTRA1</i> y DMAE	65
3.7.5 Otros genes y la DMAE	66
3.7.6 Consideraciones prácticas	67
3.8 Tratamiento	69
3.8.1 Bevacizumab	69
3.8.2 Ranibizumab	70
3.8.3 Aflibercept	71
3.8.4 Conclusión	72
3.9 Estudios de farmacogenética en DMAE	73
4. Hipótesis y objetivos	75
4.1 Hipótesis de trabajo	77
4.2 Objetivos	79
4.2.1 Objetivo principal	79
4.2.2 Objetivos secundarios	79
5. Aspectos éticos	81
6. Metodología	85
6.1 Diseño del estudio	87
6.1.1 Tamaño previsto de la muestra	87
6.1.2 Población de estudio	88
6.1.3 Criterios de inclusión	88
6.1.4 Criterios de exclusión	89
6.1.5 Grupos de pacientes: criterios de evaluación de respuesta	89
6.1.6 Fuente de Información	90
6.2 Estudio genético	93
6.2.1 Toma de muestra de ADN	93
6.2.2 Genotipado	94
6.2.3 Polimorfismos estudiados.	94
6.3 Análisis de los datos	95
7. Resultados	97
7.1 Características de la muestra de estudio	99
7.2 Características de los subgrupos: buenos y pobres respondedores	103
7.3 HTA, tabaquismo y sexo femenino	105

7.4 Estudio genético	107
7.4.1 Resultados funcionales	107
7.4.2 Resultados anatómicos según CFT	107
7.4.3 Resultados anatómicos según respuesta del fluido	110
7.4.4 Resultados de la regresión logística multivariable	111
8. Discusión	115
8.1 Farmacogenética	117
8.2 Propósito del estudio y escenario	119
8.3 Hipertensión arterial y respuesta al tratamiento	121
8.4 SERPINF1 y respuesta al tratamiento	123
8.5 Genes del complemento y respuesta al tratamiento	125
8.6 VEGFA y VEGFR1	127
8.7 Resultados de otros estudios de farmacogenética	129
8.8 Fortalezas y limitaciones del estudio	135
9. Conclusiones	137
10. Bibliografía	141
11. Anexos	155
1. Instrucciones para toma de muestra de saliva	157
2. Documento informativo para los pacientes	159
3. Consentimiento informado para estudio genético	162
4. Formulario de envío de muestras	164
5. Resultados funcionales completos tras la dosis de carga	165
6. Resultados funcionales completos tras 12 meses de tratamiento	166
7. Resultados completos del grosor central foveal tras la fase de carga	167
8. Resultados completos tras 12 meses de tratamiento del grosor central foveal	168
9. Resultados completos de la respuesta del fluido tras la fase de carga	169
10. Resultados completos de la respuesta del fluido a los 12 meses	170
11. Artículo aceptado en Acta Ophthalmologica	171

1

Glosario



1

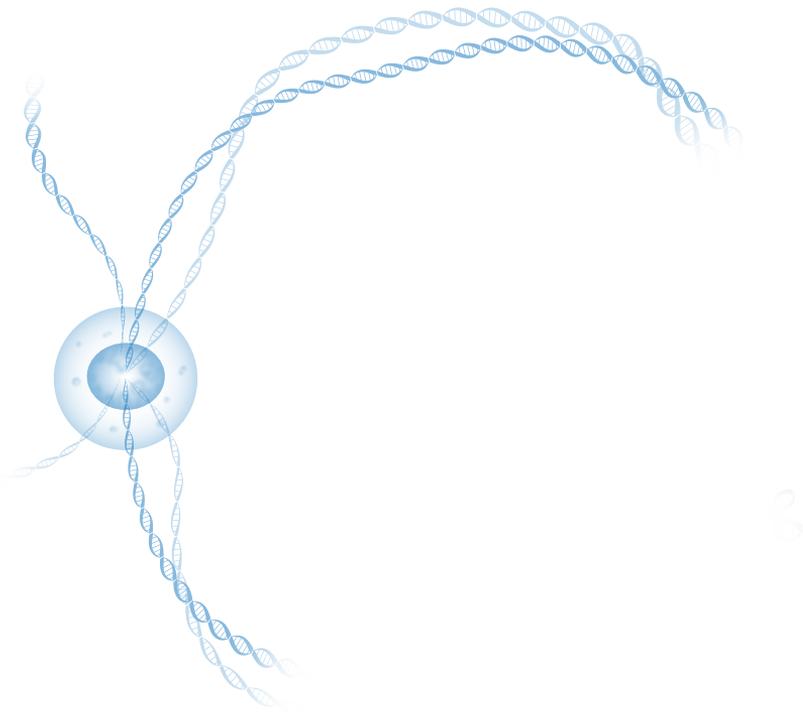
Glosario

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGF	Angiografía fluoresceínica
antiVEGF	Anti <i>vascular endothelial growth factor</i>
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease Study</i>
ARMS2	<i>Age-Related Maculopathy Susceptibility 2</i>
AV	Agudeza visual
BR	Buenos respondedores
C2	Componente 2 del complemento
C3	Componente 3 del complemento
C5	Componente 5 del complemento
CFB	Factor B del complemento
CFH	Factor H del complemento
CFI	Factor I del complemento
CFT	<i>Central Foveal Thickness</i>
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
FIR	Fluido intrarretiniano
FSR	Fluido subretiniano
HTA	Hipertensión arterial
HTRA1	<i>High temperature requirement factor A1</i>

IC	Intervalo de confianza
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> (Alelo menos común)
MNVSR	Membrana neovascular subretiniana
NVC	Neovascularización coroidea
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
OR	Odds ratio
PR	Pobres respondedores
SERPINF1	<i>Serpin Family member 1</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

2

Justificación



2

Justificación de la tesis

La DMAE es la principal causa de baja visión y ceguera legal entre la población adulta de países desarrollados. Es una enfermedad con una alta prevalencia en nuestro medio, que produce un importante impacto social y económico. El envejecimiento de la población trae consigo un aumento de esta patología, propia de personas de edad avanzada.

Los pacientes con DMAE padecen un descenso de habilidades funcionales y calidad de vida, lo que resulta en un aumento en la utilización de los recursos sanitarios. Al contrario de lo que ocurre con otras patologías oculares ligadas al envejecimiento como las cataratas que son solucionables con las terapias actuales, el pronóstico visual para los pacientes con DMAE, aunque ha mejorado notablemente en los últimos años, no es tan esperanzador y la pérdida grave de visión central puede ser rápida.

En los primeros años del 2000 el estudio genético de la DMAE se llevó a cabo por medio de estudios de ligamiento y asociación para identificar regiones genómicas que mostrasen susceptibilidad a la enfermedad. Este campo ha sido muy prolífico, habiéndose identificado múltiples polimorfismos genéticos (SNP) asociados a la DMAE (*CFH*, *CFB*, *C3*, *CFHR 1-3*, *ARMS2*...). Siguiendo esta línea, diversos estudios han intentado valorar la asociación de algunos SNP (unos de genes asociados a la DMAE y otros relacionados con la respuesta a los antiVEGF), con la respuesta al tratamiento con ranibizumab y bevacizumab. Los resultados han sido en algunos casos contradictorios.

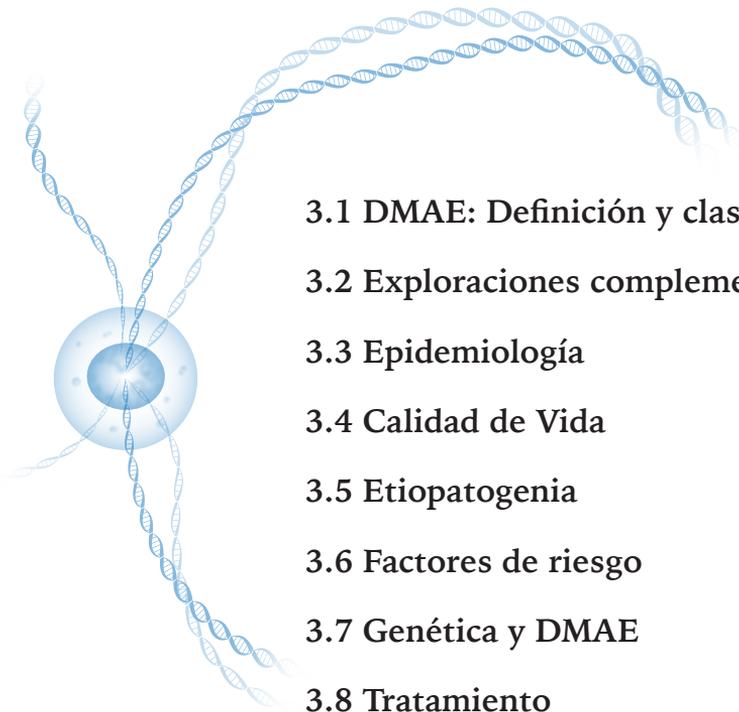
El conocimiento previo de la influencia genética sobre la DMAE y su interacción con los factores individuales que rodean a cada individuo sería importante

porque permitiría: a corto plazo, el diseño de programas de seguimiento más estrecho para pacientes con genética de riesgo con el fin de satisfacer más precozmente la necesidad de retratamiento, a medio plazo, la individualización del tratamiento (con nuevas terapias antiangiogénicas) según el perfil genético del paciente y sus características clínicas y ambientales, para evitar gastos innecesarios, efectos adversos indeseados y el desgaste psicológico de los pacientes con DMAE.

El propósito de esta tesis doctoral ha sido aumentar el conocimiento de la influencia de la genética, valorando los SNP rs1061170, rs800292, rs10490924, rs1136287, rs12603486, rs7993418, rs3025000, rs699947 y rs12614, de los genes *CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGFR1* and *VEGF*, y de algunos factores ambientales como la hipertensión arterial, el tabaquismo y la edad, en la respuesta al tratamiento con ranibizumab en los pacientes con DMAE neovascular.

3

Introducción



3.1 DMAE: Definición y clasificación

3.2 Exploraciones complementarias

3.3 Epidemiología

3.4 Calidad de Vida

3.5 Etiopatogenia

3.6 Factores de riesgo

3.7 Genética y DMAE

3.8 Tratamiento

3.9 Estudio de farmacogenómica

3.1

Introducción Degeneración macular asociada a la edad

Definición y clasificación

La mácula fue inicialmente descrita a finales del siglo XVIII por el italiano Francesco Buzzi en Milán. Otros investigadores de la época como Fragonard, Soemmering, Michaelis, Müller y Tratuféri, fueron aclarando su localización y función. Sin embargo, fue el español Santiago Ramón y Cajal, en 1894, quien estableció la relación entre los fotorreceptores y las diferentes células que conforman la retina.¹ La mácula es reconocida como la zona de la retina especializada en la agudeza visual de alta resolución y, por tanto, de vital importancia para el mantenimiento de la función visual. Debido a este motivo, cualquier patología que afecte a la mácula tendrá una gran morbilidad y una gran trascendencia en la calidad de vida del paciente.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad crónica y progresiva de la mácula que aparece principalmente en personas mayores de 50 años. Fue descrita en 1885 por el oftalmólogo suizo Otto Haab.² Fue él el primero en comunicar la existencia de unos cambios atróficos y pigmentarios en la región macular que causaban un deterioro en la visión central en pacientes mayores de 50 años. Posteriormente, Gass ayudó enormemente a comprender la patología aclarando que las drusas, la atrofia geográfica y la neovascularización, son diferentes espectros de una misma enfermedad. Ha tenido una gran cantidad de denominaciones a lo largo de la historia, como degeneración macular senil, degeneración coroidea macular senil, degeneración macular disciforme senil, degeneración de Kuhnt-Junius, drusas familiares, drusas dominantes, coroiditis guttata central de Hutchin-

son-Tays, coroiditis en panal de abeja de Doyne y coroiditis superficial de Holthouse-Batten.³

No sólo la terminología ha sido confusa y ha ido variando a lo largo de los años, también el sistema de clasificación de la patología. Han sido varias las clasificaciones llevadas a cabo para unificar criterios y terminología. Una de las principales, utilizada durante décadas, es la Escala Wisconsin de Degeneración Macular asociada a la edad.⁴ Sin embargo, este sistema de clasificación basado en las características y tamaño de las drusas, cambios pigmentarios, atrofia y neovascularización es de complejo manejo, por lo que otros sistemas de clasificación han tratado de simplificarla. Una de las más relevantes es la Clasificación Internacional de la Maculopatía asociada a la edad y la Degeneración macular asociada a la edad (tabla 1).⁵ Este grupo de trabajo estableció una clasificación de las drusas, los cambios pigmentarios, la atrofia geográfica y la neovascularización, basada en la presencia o no de estas alteraciones, su localización y su tamaño.

Tabla 1. Sistema de Clasificación Internacional

DMAE incipiente	Presencia de drusas blandas (considera drusa blanda a las drusas mayores de 63 µm) o confluentes, drusas con límites bien o poco definidos, cualquier tipo de drusa blanda que asocie despigmentación o hiperpigmentación del EPR.
DMAE avanzada	Puede ser de 2 tipos: 1) DMAE atrófica 2) DMAE neovascular
DMAE atrófica (seca)	Debe existir una zona bien definida mayor de 175 µm de diámetro con una aparente ausencia del EPR y en la que los vasos coroideos son más visibles que en las áreas colindantes
DMAE neovascular (húmeda)	Desprendimiento del EPR y cualquier otro signo de maculopatía asociada a la edad; membrana neovascular coroidea subretiniana o subepitelial, cicatriz, tejido glial, o depósitos de fibrina dentro de la retina o subretinianos, hemorragia subretiniana y exudados duros no relacionados con otra patología retiniana.

Más recientemente, en el año 2013, fue publicado un nuevo sistema de clasificación más simple que los anteriores, y que tiene en cuenta el riesgo de progresión de la enfermedad. Se llevó a cabo a través de un panel de expertos utilizando el proceso Delphi (tabla 2).⁶

Tabla 2. Tabla resumen de la nueva clasificación de DMAE⁶

Clasificación de la DMAE	Definición
Sin cambios aparentes de la edad	Sin drusas, sin cambios pigmentarios
Cambios normales para la edad	Sólo drusas (drusas pequeñas < 63 μm) pero sin cambios pigmentarios
DMAE precoz	Drusas medianas (> 63 μm y < 125 μm) y sin cambios pigmentarios
DMAE intermedia	Drusas grandes >125 μm y/o cambios pigmentarios
DMAE avanzada	Atrofia geográfica y/o DMAE neovascular

Basándonos en esta clasificación podemos decir que la DMAE es un estado avanzado de maculopatía asociada a la edad o de los cambios normales que podría haber según la edad (figura 1A). El envejecimiento se asocia a una disminución en el número de fotorreceptores en la retina externa del área macular, una disminución también de los gránulos de melanina del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y una formación de gránulos de lipofusina. Pueden haber también depósitos laminares basales entre el EPR y la membrana de Bruch, además de cambios involutivos en la coriocapilar y una disminución en el flujo sanguíneo de la coroides. Algunas pequeñas drusas pueden observarse también en pacientes sanos de edad avanzada. Las drusas son depósitos de material extracelular, principalmente proteínas insolubles y lípidos, que se forman progresivamente entre el EPR y la membrana de Bruch.^{7,8}

Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de alteraciones degenerativas progresivas en la retina del área macular. El sello distintivo de la DMAE es



Figura 1. A: retinografía de fondo de ojo con drupas dispersas en el área macular. B: retinografía de fondo de ojo con drusas blandas, algunas de ellas confluentes.

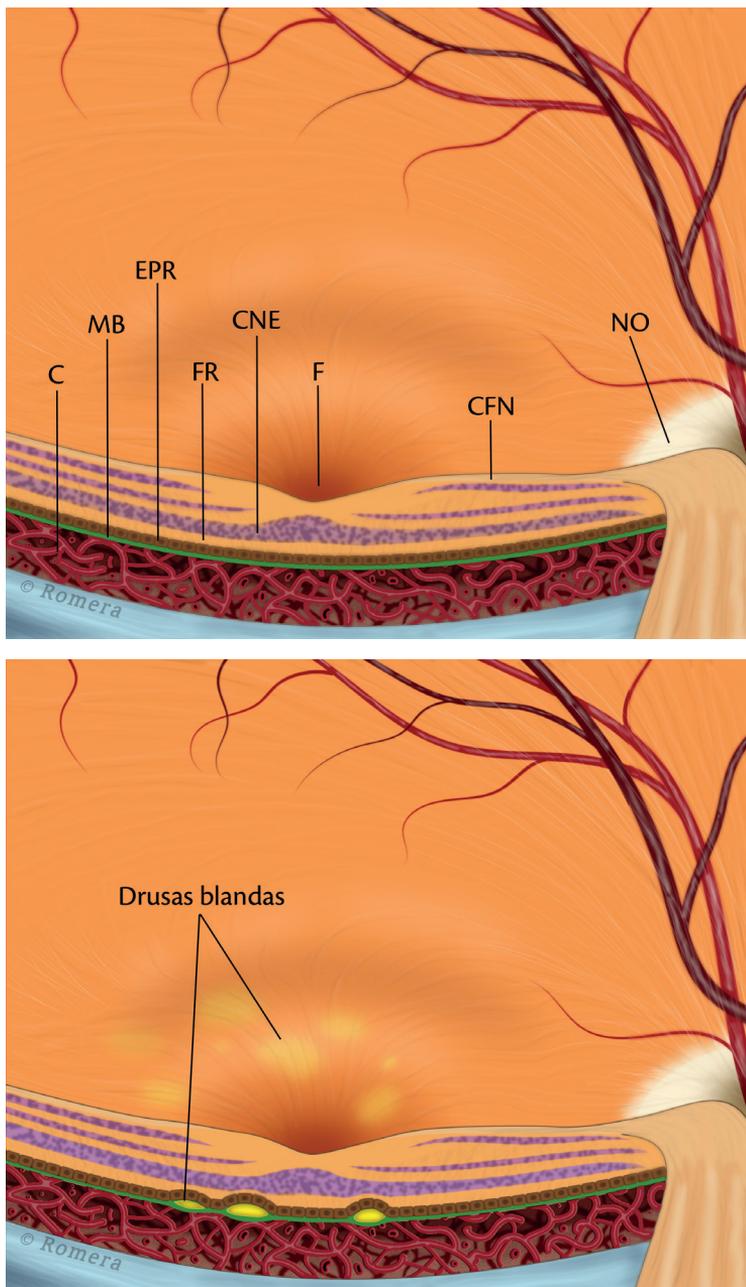


Figura 2. Anatomía de la retina normal (arriba) y la formación de drusas blandas en la fase inicial de la DMAE (abajo). C: coroides. MB: membrana de Bruch. EPR: epitelio pigmentario de la retina. FR: segmento externo de los fotorreceptores. CNE: capa nuclear externa. F: foveola. CFN: capa de fibras nerviosas. NO: nervio óptico.

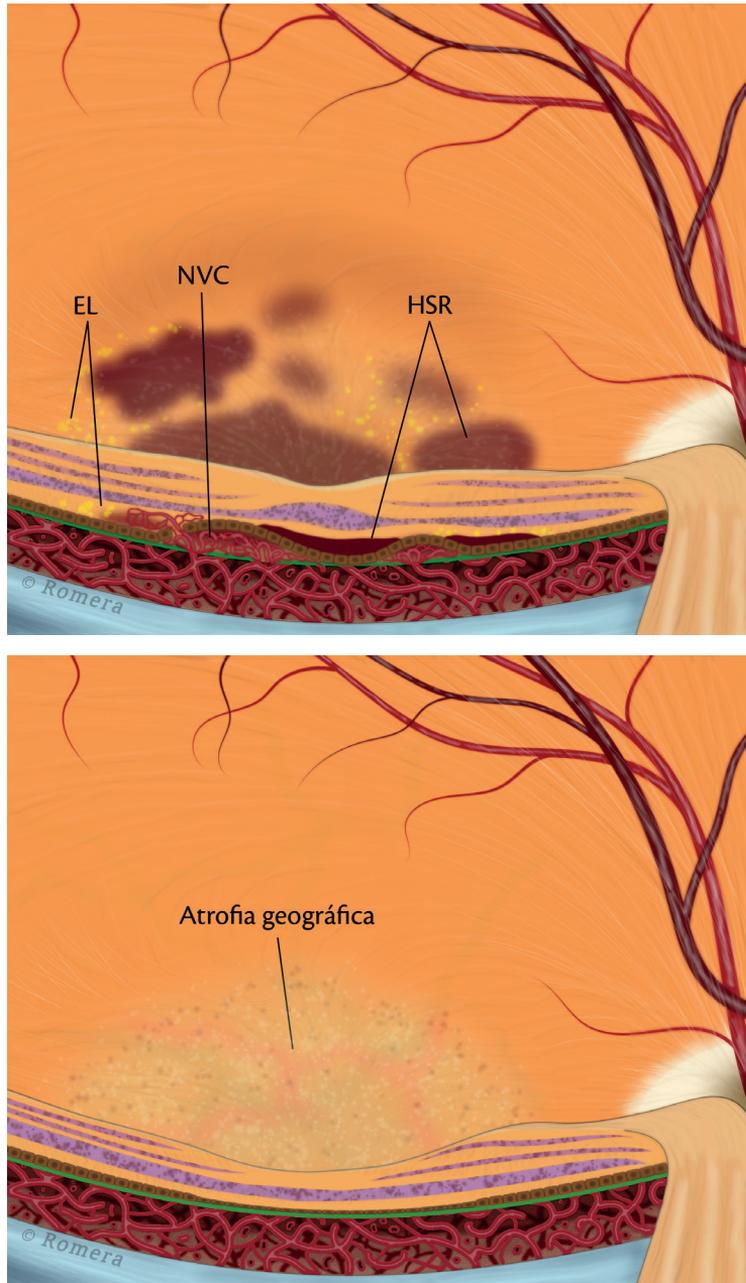


Figura 3. DMAE con neovascularización coroidea (arriba), mostrando la invasión de neovasos (NVC) por, exudación lipídica (EL) y hemorragias subretinianas (HSR). Abajo se representa la atrofia geográfica o DMAE seca, con degeneración del EPR y adelgazamiento retiniano.

la presencia de drusas en la mácula (figura 2), que se pueden clasificar anatómopatológicamente como:

- Drusas duras: depósitos globulares de material hialinizado que se encuentran entre la membrana basal del EPR y la zona colágena interna de la membrana de Bruch. El epitelio pigmentario que está sobre la drusa degenera produciendo una zona de hipopigmentación.
- Drusas blandas: suelen ser de mayor tamaño, de color amarillo pálido o blanco grisáceo, con un contenido vesicular y granular rico en lípidos. Tienen tendencia a confluir en forma de desprendimientos del EPR druse-noides o serosos de gran tamaño. Este tipo de drusas tienen un alto riesgo de desarrollo de neovascularización coroidea (NVC), dado que estimulan a los macrófagos en la coroides y coinciden con zonas de adelgazamiento de la membrana de Bruch, produciendo una activación de los capilares coroides adyacentes. Algunas características de las drusas blandas que se asocian con el desarrollo de NVC son: el número de drusas (cinco o más), el tamaño (mayores de 64 μm) y la confluencia de las mismas (figura 1B).

En su forma avanzada, la DMAE se diferencia en dos grupos:

- *DMAE neovascular o forma húmeda*, caracterizada por la aparición anómala de vasos sanguíneos inmaduros que crecen hacia la retina externa desde la coroides subyacente a través de desgarros en la membrana de Bruch, creando una membrana neovascular coroidea (figura 3) que se aprecia en la oftalmoscopia como un área poco definida en la zona macular de color verde-grisáceo (figura 4A). Las células endoteliales de estos nuevos ramilletes vasculares no poseen la función de barrera que tiene las células maduras,

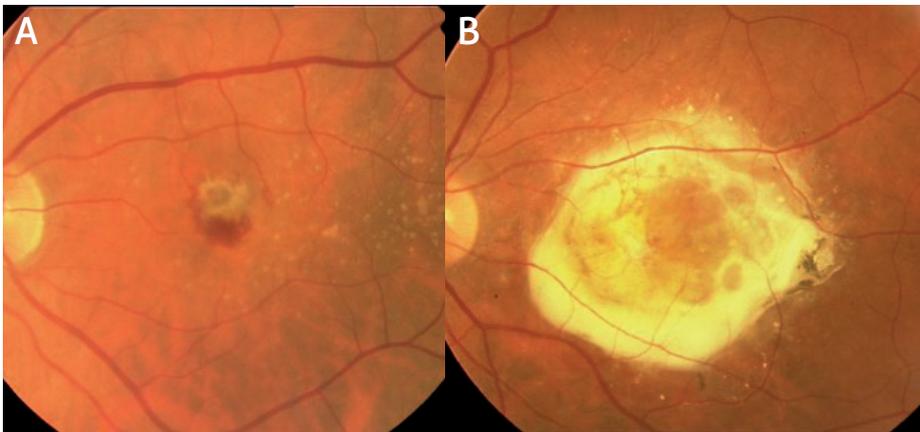


Figura 4. A: hemorragia en región macular en paciente con DMAE neovascular. B: cicatriz disciforme en paciente con antecedente de neovascularización activa.

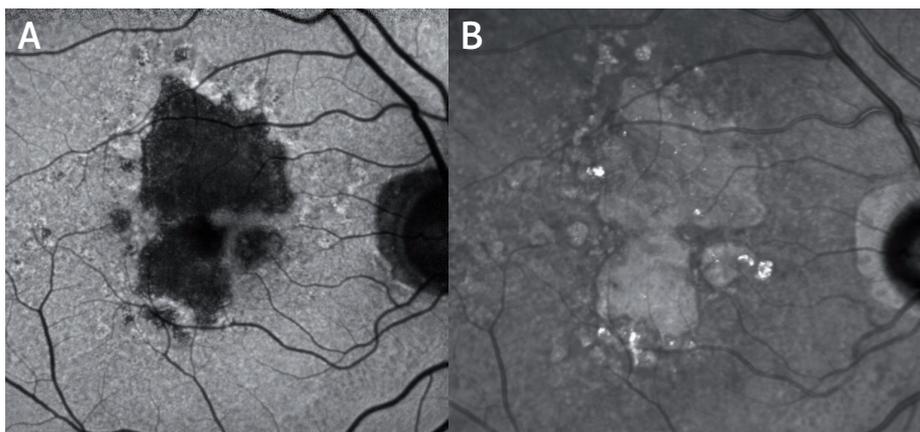


Figura 5. A: autofluorescencia que muestra área hipoautofluorescente con halo hiperautofluorescente, que corresponde con zona de atrofia del EPR en paciente con DMAE atrófica. B: imagen infrarrojo, que muestran una zona de atrofia geográfica y drusas duras de gran tamaño.

por lo que extravasan su contenido hacia las capas neurosensoriales y hacia el EPR. Además, estos vasos pueden sangrar, produciendo hemorragias sub e intrarretinianas y, finalmente, formar áreas de fibrosis subretiniana en la región macular, a las que se las conoce como cicatriz disciforme⁹ (figura 4B). La cicatriz disciforme puede ir acompañada de una hiperplasia del EPR y de cambios degenerativos quísticos en la retina suprayacente con pérdida de fotorreceptores. Estos cambios son los que justifican una sintomatología que se produce de forma súbita y dramática, dando lugar a una bajada brusca de visión, escotomas y metamorfopsias.

- DMAE *atrófica o seca*, caracterizada por áreas dispersas o confluentes de degeneración de las células del EPR y de los fotorreceptores suprayacentes de la retina que tienen su soporte trófico en el EPR¹⁰ (figuras 5A y 5B). Clínicamente se observan áreas bien definidas de despigmentación del EPR que permiten la visualización de la circulación coroidea, junto con zonas de hiperpigmentación.¹¹ Las zonas de atrofia geográfica pueden ir acompañadas de drusas duras (figura 3).

La DMAE húmeda constituye el 15% del total de casos de DMAE avanzada. A pesar de que la DMAE húmeda es minoritaria en el conjunto de la DMAE avanzada, supone una pérdida grave y brusca de la visión que da lugar a una limitación importante en la autonomía de los pacientes.

3.2

Introducción Exploraciones complementarias

El diagnóstico y seguimiento de los pacientes con DMAE está íntimamente ligado a las exploraciones complementarias. Entre ellas, la tomografía de coherencia óptica (OCT) es la prueba príncips en el abordaje de los pacientes con esta patología. Sin embargo, en un sentido más amplio podríamos hablar de técnicas de imagen multimodal, como la clave para realizar un correcto diagnóstico y seguimiento posterior del tratamiento en los pacientes con DMAE. De estas técnicas las más relevantes son la angiografía fluoresceínica (AGF), la angiografía con verde de indocianina, la OCT y la angio-OCT (AOCT).

3.2.1 Angiografía fluoresceínica y con verde de indocianina

La angiografía fluoresceínica ha sido y sigue siendo el *gold standard* en el diagnóstico de las membranas neovasculares subretinianas asociadas a la DMAE. Los vasos que conforman la membrana neovascular tienen una consistencia histológica escasa, por lo que se produce una extravasación de fluido desde estos vasos anómalos al espacio sub e intrarretiniano. Este proceso origina una difusión del contraste y da lugar a patrones de hiperfluorescencia e hipofluorescencia en los diferentes tiempos de la prueba.

La AGF permite localizar la membrana neovascular –extrafoveal, juxtafoveal o subfoveal–, medir su tamaño y conocer la composición de la misma: clásica, predominantemente clásica, mínimamente clásica u oculta.

La angiografía con verde de indocianina es útil en casos de membranas neovasculares ocultas. Muestra *hot spots* en las zonas coroideas donde se localiza la neovascularización.

3.2.2 OCT

La OCT permite obtener imágenes de sección transversal con una resolución semi-histológica. Es una herramienta fundamental en el diagnóstico y manejo de los pacientes con DMAE neovascular. Mediante esta técnica se puede localizar la membrana neovascular, valorar su extensión y determinar si tiene actividad. Además es de gran utilidad en el seguimiento de la respuesta al tratamiento; por este motivo los criterios de retratamiento de los diferentes protocolos existentes están basados en gran medida en la información que aporta la OCT.

En las fases iniciales de DMAE precoz e intermedia, permite detectar las drusas, como engrosamientos y deformaciones del EPR que producen ondulaciones localizadas en la banda hiperreflectante que corresponde con el EPR. Habitualmente las capas de la retina neurosensorial permanecen intactas. En las fases de DMAE avanzada sigue siendo de vital importancia. En la DMAE atrófica se observa una disminución del CFT y del volumen, con un incremento de la reflectividad del EPR, resultado de la menor capacidad del tejido retiniano atrófico para atenuar la luz. En la DMAE exudativa se puede localizar la membrana neovascular, y lo que es más importante, valorar su grado de actividad, visualizando la presencia de fluido intra y subretiniano (figura 6).

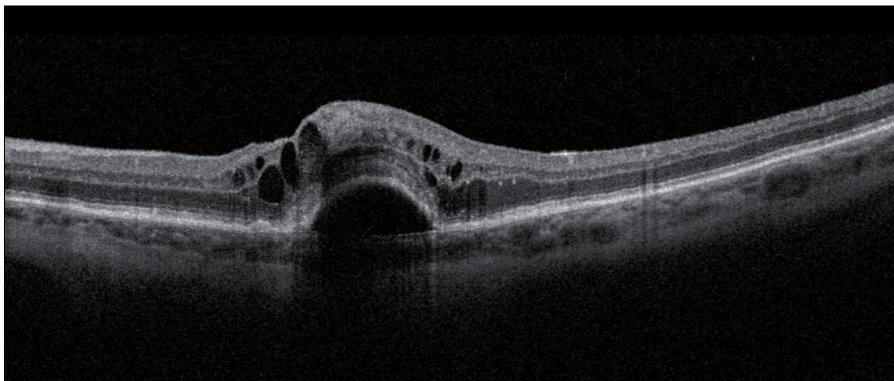


Figura 6. Imagen de OCT donde se observan signos de una membrana neovascular activa: desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina y fluido intrarretiniano.

3.2.3 Angio-OCT

Esta nueva herramienta de imagen está ganando terreno cada día más en la patología macular debido a que se trata de una prueba no invasiva, rápida y fácil de realizar. Mediante la AOCT podemos valorar el plexo capilar superficial, el plexo capilar profundo, la retina externa y la coriocalipar (figura 7).

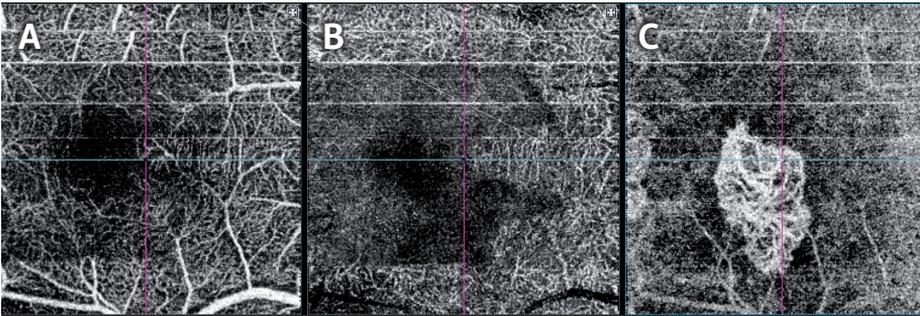


Figura 7. Imagen de AOCT en paciente con DMAE neovascular activa. A: plexo capilar superficial. B: plexo capilar profundo. C: coriicapilar. Se observa una formación de neovasos en forma de ovillo.

En los casos de DMAE intermedia es útil para valorar si existe NVC asociada a los desprendimientos del epitelio pigmentario de la retina de tipo drusenoide. En la DMAE neovascular, para localizar y medir el complejo neovascular, en especial en la NVC de tipo 2. No sustituye la AGF sino que son complementarias. Tampoco sustituye a la OCT estructural, que hasta el momento es más útil a la hora de tomar la decisión de retratamiento y valorar la actividad. Sin embargo, es cierto que a pesar de que esta nueva tecnología ha mejorado en los últimos meses, siguen siendo frecuentes los artefactos, los cuales se deben conocer y distinguir.

3.3

Introducción Epidemiología

La DMAE es actualmente la principal causa de baja visión y de ceguera legal entre la población adulta en los países desarrollados.^{12,13} Teniendo en cuenta que las principales causas de baja visión en el mundo son las cataratas y los errores refractivos no corregidos, causas ambas fácilmente tratables con recursos económicos, la DMAE cobrará en el futuro un papel aún más importante. El envejecimiento de la población también traerá consigo un aumento en la prevalencia de esta enfermedad que es característica de la población de edad avanzada. Según previsiones de la OMS, en las próximas décadas esta enfermedad triplicará su prevalencia como consecuencia del incremento en la esperanza de vida. Se calcula que en el año 2020 estarán afectados 196 millones de personas y este número aumentará hasta 288 millones en el año 2040.

Se ha realizado una gran cantidad de estudios epidemiológicos en DMAE en los últimos 30 años. En un meta-análisis¹⁴ basado en tres grandes estudios epidemiológicos de tres continentes en una población de raza blanca mayor de 45 años, *Beaver Dam Eye Study*,¹⁵ *Rotterdam Study*¹⁶ y *Blue Mountains Eye Study*,¹⁷ con un total de 14.752 pacientes, se observó una prevalencia de DMAE de 1,63% en cualquier grupo de edad, con un fuerte incremento en los diferentes subgrupos por edades: un 0% en el subgrupo < 55 años, 0,21% entre los 55-64 años, 0,85% entre los 60-74 años, 4,59% entre 75-84 años y hasta un 13% en los pacientes de 85 años o más.

La incidencia está también íntimamente ligada a la edad, siendo la incidencia acumulada durante 14 años en un estudio de población blanca europea de entre 60 y 80 años, del 38% para DMAE precoz y del 17% para DMAE tardía.¹⁸

En España, un estudio realizado en 2011 con pacientes mayores de 65 años, concluye que la prevalencia de DMAE temprana e intermedia (también llamada previamente maculopatía asociada a la edad) es de 10,3%, mientras que la prevalencia de DMAE avanzada es de 3,4%. Entre los diferentes grupos de edad, se observa que los pacientes entre 65 y 74 años tienen una prevalencia de DMAE de 1,3% y los mayores de 75 años, una prevalencia que alcanza el 5,7% (tabla 3).¹⁹ Según este trabajo, en España habría aproximadamente 255.000 pacientes con DMAE neovascular o atrófica y 773.000 con DMAE precoz o intermedia, con riesgo de desarrollar DMAE avanzada.

Tabla 3. Prevalencia DMAE en España¹⁹

Población en 2011	47 millones
> 65 años	8 millones
Presentan alguna manifestación clínica de DMAE	800.000
DMAE avanzada y ceguera legal	300.000
Riesgo alto de ceguera por DMAE (próximos 5 años)	1,5 millones

Las diferencias raciales han sido descritas sobretodo comparando población blanca y población negra. El Baltimore Eye Survey,²⁰ realizado entre 1985 y 1988, muestra como la prevalencia de drusas pequeñas (<125 µm) es similar en ambas poblaciones, sin embargo, las drusas de mayor tamaño son más prevalentes en las personas de raza blanca mayores de 70 años. La DMAE avanzada es de 9 a 10 veces más prevalente en población blanca según este estudio. Los resultados fueron ajustados por edad, sexo, hipertensión, hábito tabáquico e índice de masa corporal, para evitar posibles factores de confusión. Otro trabajo más reciente publicado en 2008²¹ llega también a conclusiones similares: las personas de raza blanca tienen con más probabilidad drusas de tamaño mediano y grande, alteraciones del EPR focales en el área macular y DMAE avanzada.

La evolución natural de la enfermedad es hacia la progresión a formas más avanzadas y, por tanto, hacia un empeoramiento de la sintomatología del paciente. Las tasas de desarrollo de formas de DMAE avanzadas aumentan con la severidad de las alteraciones maculares presentes al inicio. Por tanto, presentan de menos a más riesgo de progresión la ausencia de drusas, la presencia de drusas duras pequeñas, las drusas medianas en un ojo, drusas medianas en ambos ojos, drusas grandes en un ojo, drusas grandes bilaterales y drusas grandes en un ojo con DMAE avanzada en el otro ojo.²² En la mayor parte de estudios que valoran la incidencia de DMAE concluyen que las mayores áreas

de cualquier tipo de drusas asociadas a cambios pigmentarios se asocian a un mayor riesgo de evolución a neovascularización y atrofia geográfica.²³⁻²⁵

Otro punto importante a la hora de hablar de DMAE, es que en muchas ocasiones se trata de una enfermedad bilateral y, por tanto, sus consecuencias son aún más dramáticas. Varios estudios poblacionales han analizado el riesgo de afectación del segundo ojo en pacientes con DMAE avanzada en un primer ojo, y se cuantifica que está alrededor del 40-50% en los 5 primeros años²³⁻²⁶ y hasta de 100% en 10 años. El riesgo de que el segundo ojo se afecte por la enfermedad está asociado a la presencia y el grado de formas incipientes de DMAE. Además, el tipo de DMAE del primer ojo está fuertemente asociado al tipo de DMAE del segundo ojo (con un 89% de concordancia entre ojos).²⁵ Un interesante trabajo publicado recientemente concluye que un volumen de drusas mayor de 0,3 mm³ en los ojos adelfos en pacientes con DMAE neovascular, se asocia a cuatro veces más riesgo de desarrollar neovascularización en el segundo ojo.²⁷

Por otra parte, no existe una dicotomía excluyente entre la atrofia geográfica y la DMAE exudativa y ambas formas de la enfermedad pueden desarrollarse en el mismo ojo. Pacientes afectados de DMAE atrófica pueden desarrollar una membrana neovascular en el seguimiento. De modo similar, uno de los hallazgos observados con frecuencia en los pacientes con DMAE exudativa, es el desarrollo de atrofia del EPR y de la coriocapilar en la zona de la lesión neovascular, ya sea debido a la propia evolución natural de la enfermedad o bien al tratamiento con antiVEGF intravítreo.²⁸ Esta materia está muy presente en una gran cantidad de estudios actualmente. Estos dos fenotipos de la

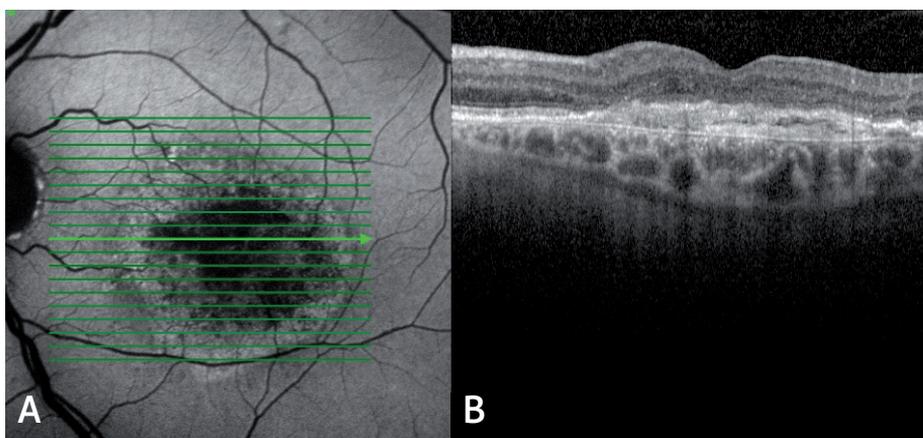


Figura 8. Imagen de autofluorescencia (A) y OCT (B) de paciente con DMAE neovascular que ha sido tratado con ranibizumab intravítreo. Se observa un área de atrofia del epitelio pigmentario de la retina en el área macular.

enfermedad comparten factores de riesgo (edad, tabaquismo, alteraciones genéticas) y por tanto pueden coexistir y solaparse. También parece cada vez más evidente que los tratamientos antiVEGF empleados en la DMAE neovascular se relacionan con la aparición y la progresión de la atrofia en el área macular (figura 8). La relación causa-efecto no ha sido probada aún, pero una gran cantidad de estudios, tanto retrospectivos como prospectivos, han señalado esta relación como probable. Sin embargo, este sigue siendo aún un tema controvertido, dado que otros trabajos no demuestran tal relación. Recientemente se publicó un trabajo que compara la aparición o la tasa de crecimiento de la atrofia geográfica en pacientes con DMAE neovascular tratados con ranibizumab mensual, pacientes en tratamiento con ranibizumab en pauta *«treat and extend»* y pacientes que no recibieron tratamiento con ranibizumab. Estos investigadores no obtuvieron una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la aparición o tasa de crecimiento de la atrofia macular en estos tres grupos de pacientes.²⁹

3.4

Introducción Calidad de vida

La DMAE es una enfermedad con elevados costes económicos para los sistemas sanitarios, pero también produce importantes costes físicos y psicológicos en los pacientes que la padecen.

La calidad de vida es una medida subjetiva influenciada por diferentes factores como las expectativas, las relaciones personales, la rutina, la salud y la discapacidad. En los estudios clínicos de DMAE que valoran la calidad de vida de los pacientes, se suelen utilizar cuestionarios, que permiten entender mejor la relación entre la fisiopatología de la enfermedad con el estado funcional del paciente.

La DMAE produce un impacto negativo en la vida de los enfermos, existiendo una importante relación entre DMAE y las caídas, la percepción del ambiente, la movilidad, el reconocimiento de caras, el uso de ordenadores, cocinar, realizar compras, limpiar, ver la televisión, leer, conducir y en algunos casos, cuidarse a uno mismo³⁰ (figura 9).

La menor calidad de vida de los pacientes con DMAE está relacionada con mayor angustia, peor percepción de su salud general y mayor dificultad en la realización de sus actividades cotidianas. Asimismo, la DMAE se asocia a una mayor tasa de depresión en la población adulta extrahospitalaria en comparación con la población adulta no afectada. Un interesante trabajo realizado con pacientes con DMAE, distrofia de Fuchs y glaucoma, concluye que los pacientes con cualquiera de estas tres enfermedades tenían más probabilidades de depresión que el grupo control.³¹ En el grupo de DMAE, un 39% presentaba síntomas de depresión, siendo la Odds Ratio (OR) ajustada por edad,

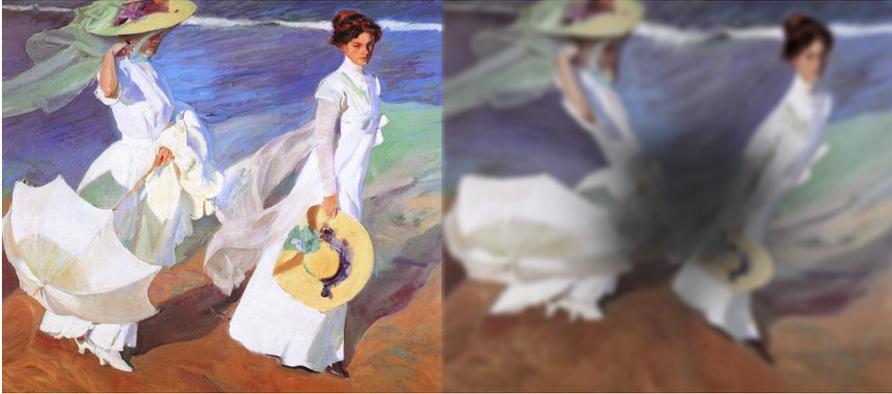


Figura 9. Imagen donde se observa la diferencia en la visión entre una persona sana y una con DMAE.

sexo, grupo étnico, nivel educativo, estado cognitivo, soporte social, opacidad de cristalino y limitación de la actividad diaria, de 4,19 (Intervalo de Confianza –IC– de 95 % 1,53 - 11,46). La pérdida de visión, sobretodo central, en pacientes de edad avanzada comporta una limitación de la movilidad, lo que agrava más aún los síntomas depresivos. De las tres patologías –DMAE, distrofia corneal de Fuchs y glaucoma– fue la primera la que mayor asociación mostró con la depresión.

Son varios los dominios afectados en la vida de las personas con DMAE: social, emocional y físico. El impacto emocional puede ser severo, aunque suele variar en el transcurso de la enfermedad debido quizás a la adaptación. Los pacientes con DMAE pueden pasar a ser dependientes en sus actividades diarias, con la repercusión que tiene también para sus familiares y cuidadores.

3.5

Introducción Etiopatogenia

La fisiopatología de la DMAE no es del todo conocida en la actualidad. El conocimiento de los mecanismos moleculares de una enfermedad facilita el traslado de ese conocimiento hacia un escenario clínico para poder adoptar medidas preventivas o tratamientos.

Está aceptado que el EPR es el núcleo de la patogénesis de la DMAE. La disfunción y la degeneración de las células del EPR son los eventos críticos en la fisiopatología de la DMAE. Cada célula pigmentaria absorbe restos de fotorreceptores degenerados y material procedente de otras células pigmentarias. Esta carga aumenta cuando lo hacen la degeneración de los tejidos, produciéndose alteraciones metabólicas en las propias células del EPR que conllevan al acúmulo de lipofuscina, que son gránulos compuestos por lípidos y proteínas procedentes de este exceso de fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Por otro lado, este proceso de acúmulo de lipofuscina está modulado por la exposición y absorción de luz del espectro visible y ultravioleta y por los niveles altos de oxígeno de la retina (la retina posee la tasa más alta de consumo de oxígeno por unidad de peso). Estos dos factores favorecen el estrés oxidativo y la formación de radicales libres que pueden dañar los fotorreceptores.

Además de las alteraciones producidas a nivel de los fotorreceptores y del EPR, a nivel de la membrana de Bruch y la coroides también se producen cambios. A nivel de la membrana de Bruch se produce un engrosamiento y un acúmulo

de residuos dentro de las capas colágenas y elásticas. A nivel de la capa coroides, se observa una disminución del flujo sanguíneo coroidal.

Estas alteraciones morfológicas se van produciendo a lo largo de la vida y conducen finalmente a la formación de depósitos basales en la membrana de Bruch que son de dos tipos³²:

- Depósitos basales laminares, formados por colágeno y proteínas que se encuentran entre la membrana plasmática y la membrana basal del EPR.
- Depósitos basales lineales, que son residuos membranosos situados entre la membrana basal del EPR y la zona colágena interna de la membrana de Bruch.

A pesar de la importancia en la evolución de la DMAE de estos depósitos difusos observados histológicamente, son difíciles de estudiar clínicamente, por lo que es de más utilidad para el diagnóstico y pronóstico el estudio clínico de las drusas. Las drusas son depósitos amarillentos de material extracelular situados por debajo del EPR y son la evolución de los depósitos laminares y lineales basales.

Otro mecanismo implicado en la fisiopatología de la DMAE neovascular es la activación del sistema inmune e inflamación local. La activación del sistema del complemento juega aquí un importante rol. Aparte de inducir la secreción de factores pro-angiogénicos como el VEGF, los factores del complemento activados C3a y C5a son potentes agentes quimiotácticos y reclutan leucocitos y macrófagos.⁹ El análisis inmunohistoquímico de las drusas revela la presencia de numerosas moléculas asociadas al sistema inmune como componentes de la cascada del complemento (en especial del factor H del complemento) y de complejos de ataque membrana.³³ Un estudio publicado en 2017, utilizando un modelo murino de DMAE, ha demostrado que deficiencias en CFH protegen de la inflamación subretiniana acelerando su resolución, mientras que algunas variantes del CFH como el H402, favorecen la inflamación mediante el acúmulo de macrófagos y la activación del CD47.³⁴

Estos procesos de inflamación y activación del sistema inmune condicionan un desequilibrio entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos que pueden conducir a la formación de una neovascularización coroidal, lesión distintiva de la DMAE neovascular.

3.6

Introducción Factores de riesgo

La DMAE es una enfermedad multifactorial influenciada por la edad, la genética y factores ambientales como el tabaquismo, obesidad, hipertensión y las enfermedades cardiovasculares.^{35,36}

3.6.1 Factores de riesgo sociodemográficos

Edad

La edad es el factor de riesgo más importante que se relaciona con la DMAE. Todos los estudios demuestran que la prevalencia, incidencia y progresión de todas las formas de DMAE aumentan conforme lo hace la edad.³⁷

En el *Beaver Dam Eye Study* encontraron una incidencia acumulada en 15 años de 14% para DMAE precoz y 3% para DMAE avanzada en el grupo de población de 43 a 86 años. Esta incidencia aumentaba progresivamente en los diferentes grupos de edad, pasando de un 7% de DMAE temprana y un 0,4% de DMAE avanzada en el grupo de edad de 43 a 54 años, hasta llegar a 24% de DMAE temprana y 8% de DMAE avanzada en los pacientes mayores de 75 años al inicio.²³

La prevalencia está también fuertemente asociada con la edad en cualquier forma de DMAE con un dramático aumento de la tasa de drusas grandes, atrofia geográfica y neovascularización tanto en hombres como mujeres mayores de 80 años.³⁸ Asimismo, la progresión de la DMAE está asociada con la edad y también con la severidad de las lesiones iniciales.

Sexo

La asociación de la DMAE con el género femenino ha sido a lo largo de la historia un tema controvertido. Las diferencias según el sexo en incidencia y prevalencia de DMAE son un hallazgo inconsistente en la mayoría de estudios poblacionales.^{14,39-41} La mayor prevalencia de DMAE entre las mujeres en algunos estudios podría deberse únicamente al hecho de que la esperanza de vida es mayor entre las mujeres. Sin embargo, pueden existir verdaderas diferencias en cuanto al sexo por lo que posiblemente estudios futuros aborden este tema y amplíen los hallazgos reportados hasta el momento.

Del mismo modo se han llevado a cabo estudios para averiguar si existe una relación entre los niveles de estrógenos y la DMAE. En el estudio *The Visual Impairment Project* (VIP)⁴² se abordó la cuestión de la relación entre estrógenos y DMAE. Se observó una relación entre DMAE temprana y avanzada con la menopausia precoz (<40 años OR: 1,73; IC 95% 1,15-2,60). Otros trabajos relacionan la menopausia precoz por ooforectomía quirúrgica con la DMAE.⁴³ Del mismo modo también se considera un factor protector de DMAE un periodo prolongado entre menarquia y menopausia.⁴⁴ Todos los datos aportados por estos estudios sugieren que los estrógenos endógenos actuarían como un factor protector, de igual modo que ocurre con la arteriosclerosis y las patologías cardiovasculares, pero esta hipótesis requiere más investigación.

Raza

Tal y como ha sido mencionado en el apartado de epidemiología, existen claras diferencias raciales en cuanto al riesgo de padecer drusas, DMAE precoz y DMAE avanzada. Estas diferencias raciales respaldan la existencia de un importante componente genético en esta enfermedad.

Un meta-análisis publicado en 2010 por Kawasaki y colaboradores⁴⁵ que analiza la prevalencia de DMAE entre asiáticos, concluye que la prevalencia de DMAE avanzada es similar a la de la población blanca, con una ligera menor prevalencia de DMAE precoz entre los asiáticos. Además se observa una mayor prevalencia de DMAE tardía en el grupo de hombres asiáticos comparado con las mujeres asiáticas y con los hombres de raza blanca. Esta diferencia se atribuye a dos factores: mayor tasa de fumadores entre los hombres asiáticos comparado con las mujeres y la predominancia por el sexo masculino de la vasculopatía polipoidea, mucho más frecuente en la raza asiática que en la raza blanca.

Tanto las personas de raza negra como las de origen hispano presentan con frecuencia drusas y cambios maculares asociados a la edad y DMAE temprana, pero tienen un menor riesgo de progresión hacia formas de DMAE avanzada.^{21,46-48} En un estudio poblacional desarrollado en Barbados se realizaron retinografías a más de 3.000 personas de raza negra de entre 40 y 84 años. Se observaron frecuentemente signos de DMAE precoz, pero con una prevalencia inferior a la observada en otros estudios predominantemente de raza blanca. Se detectaron pocos casos de DMAE exudativa (1 caso cada 200 participantes), una prevalencia también inferior a la detectada en otros estudios con participantes de raza blanca.⁴⁸

La explicación parece ser que las personas con una mayor cantidad de melanina en piel y ojos, presenta también más melanina a nivel retiniano y corioideo, siendo esto un factor protector del estrés oxidativo y la formación de radicales libres, culpables del daño a nivel de los fotorreceptores.

3.6.2 Factores de riesgo oculares

Hipermetropía

La relación de una baja longitud axial y la hipermetropía con la DMAE ha sido estudiada en múltiples ocasiones. Los resultados han sido variados, mostrando un mayor riesgo de DMAE los ojos con hipermetropía, menor riesgo los ojos miopes o no mostrando ninguna asociación.⁴⁹⁻⁵²

Uno de los mecanismos postulados sobre por qué la hipermetropía se relaciona con la DMAE es que los ojos con baja longitud axial presentan una mayor rigidez escleral lo que comporta un aumento en la resistencia vascular corioidea y una alteración en la función del epitelio pigmentario de la retina.⁵³

Coloración del iris

Los iris de color claro han sido relacionados también con un mayor riesgo de desarrollar DMAE y también con su progresión.⁵⁴ Este dato iría en concordancia con el hecho de que esta enfermedad sea más prevalente entre la población de raza blanca que en las razas más pigmentadas. De nuevo los resultados de los estudios no han sido concluyentes y muchos trabajos no demuestran que exista tal asociación.⁵¹

Las personas con iris claros y con piel clara, presentan también menor cantidad de melanina a nivel retiniano y corioideo. Se ha propuesto que la melani-

na corioidea tendría un efecto protector sobre el EPR, los fotorreceptores y la membrana de Bruch, quizás mediante un efecto antioxidante, protegiendo a la retina de los radicales libres generados por la foto-oxidación o por la capacidad de absorber los rayos de luz que dañarían la retina.

Cataratas y cirugía de cataratas

Las cataratas y la DMAE comparten uno de sus principales factores de riesgo que es la edad. En varios estudios epidemiológicos se ha buscado la asociación entre ambas patologías y también con la cirugía de cataratas. En algunos obtuvieron una asociación entre la esclerosis nuclear del cristalino con la DMAE precoz y las drusas, pero no con la DMAE avanzada, y un riesgo tres veces mayor para los pacientes operados de cirugía de cataratas.⁴⁹ Los investigadores postulan que los cristalinios afectados de catarata pueden bloquear la luz ultravioleta perjudicial, efecto que se perdería al extraer el cristalino e implantar una lente intraocular. Sin embargo, esta explicación iría en contra de que la presencia de cataratas sea un factor de riesgo de DMAE, sino que sería más bien un factor protector. Por otro lado, algunos investigadores consideran que los cambios inflamatorios ocurridos tras la cirugía, podrían favorecer la progresión de una DMAE temprana a una DMAE avanzada.

En uno de los informes de AREDS⁵⁵ publicado en 2009 con casi 5.000 pacientes seguidos durante cinco años, no se observa un aumento clínica ni estadísticamente significativo del riesgo de progresión de la DMAE después de cirugía de cataratas.

Actualmente, las cataratas y la cirugía de cataratas no se consideran factores de riesgo para el desarrollo de DMAE precoz ni tardía, pero probablemente en el futuro nuevos estudios epidemiológicos puedan dar más luz a esta relación.

4.6.3 Factores relacionados con el estilo de vida

Tabaquismo

El hábito tabáquico es, después de la edad, el factor de riesgo más importante para el desarrollo tanto de DMAE exudativa como de DMAE atrófica.

En un meta-análisis basado en 18 estudios prospectivos y transversales y seis estudios de casos y controles, con más de 113.000 pacientes con 17.000 casos de DMAE tardía,⁵⁶ se observa un incremento significativo del riesgo de DMAE comparando fumadores actuales con no fumadores. La OR para los estudios de casos y controles fue de 1,78 (IC95 % 1,52-2,09) y para los estudios transversales de 3,58 (IC95 % 2,68-4,79).

El tabaco reduce la concentración de betacaroteno plasmático⁵⁷ y de luteína y zeaxantina en la retina, moléculas con una gran capacidad antioxidante. Esto se traduce en una reducción del pigmento macular.⁵⁸ El tabaco reduce el flujo vascular de la coroides, promueve la isquemia, la hipoxia y los microinfartos, factores que pueden aumentar la susceptibilidad de la mácula a cambios degenerativos. Los pacientes fumadores tienen hasta cuatro veces más riesgo de padecer DMAE neovascular que los no fumadores.⁵⁹

Los mecanismos por los que el tabaco puede ser un factor de riesgo para la DMAE son los efectos adversos de éste sobre el metabolismo de los lípidos, aumentando los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumentando también el fibrinógeno y la agregación plaquetaria y aumentando el estrés oxidativo.³⁷

Se ha establecido que el riesgo es dosis dependiente⁶⁰ y también reversible,⁵⁹ una vez finaliza el hábito tabáquico. Los exfumadores tienen mayor riesgo de desarrollar DMAE que los que nunca han fumado, pero menos que los fumadores activos. Ha sido descrito un efecto protector según el tiempo que se ha dejado de fumar OR: 0,50 (IC 95 % 0,29-0,89) por año de no fumar.⁶¹

Combinando los resultados de estudios de tres continentes: *Beaver Dam Eye Study*, *Blue Mountains Eye Study* y *Rotterdam Study*, se observa una aparición más temprana de la DMAE en aquellos que fumaban, además de casi tres veces más riesgo de desarrollar tanto atrofia geográfica como neovascularización.⁶²

En el estudio VIP (*The Visual impairment Project*),⁴² realizado en Australia, se concluye que hasta un 14 % de los casos de DMAE son secundarios al tabaquismo, y uno de sus colaboradores extrapola que actualmente el 20 % de los casos de ceguera de ese país pueden estar en relación con el tabaco.⁶³

Como conclusión se puede afirmar que el tabaquismo es un factor de riesgo importante, independiente y evitable de todas las formas de DMAE. Por tanto, sería recomendable evitar el tabaco como prevención de esta patología y sobre todo aconsejar a los pacientes con DMAE precoz que abandonaran el hábito tabáquico dado que el efecto negativo mejora con la suspensión del mismo.

Antioxidantes, vitaminas y minerales

El papel de las vitaminas antioxidantes en la prevención de la DMAE y en la disminución de la progresión de la misma, ha sido y sigue siendo tema de continuo debate. Los antioxidantes podrían prevenir el daño oxidativo en la retina reduciendo el estrés oxidativo y la inflamación. Ambos procesos parecen participar en la fisiopatología de la DMAE.

El estudio AREDS concluyó que la administración de complementos vitamínicos a base de vitamina C, vitamina E, betacaroteno, zinc y cobre, a altas dosis (por encima de lo recomendado en Europa como dosis diaria) reduce el riesgo de desarrollar DMAE avanzada en los sujetos que presentaban signos intermedios de DMAE en al menos un ojo.⁶⁴ Sin embargo, se observó un aumento de la incidencia de cáncer de pulmón entre los fumadores que consumieron betacarotenos comparado con los que no lo hicieron.

Posteriormente, el estudio AREDS2,⁶⁵ trajo más controversia poniendo en evidencia que la luteína y la zeaxantina estaban en la línea de mejora de la reducción del riesgo y progresión de la DMAE pero sin embargo los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (ácido docosahexaenoico [DHA] y ácido eicosapentaenoico [EPA]) no lo estaban. La procedencia de estos ácidos grasos (la forma natural o sintética) es la que está generando el debate de la validez de estos resultados.

Dado que estos compuestos los encontramos ampliamente en nuestra dieta, otros estudios han tratado de evaluar si una dieta mediterránea tradicional basada en un alto consumo de frutas y verduras, consumo moderado de pescado y vino, bajo consumo de lácteos y carne, y consumo de ácidos grasos monoinsaturados como principal fuente de grasas, podrían disminuir el riesgo de progresión a DMAE avanzada.⁶⁶ Los resultados reflejan que una alta adherencia a la dieta mediterránea estaba asociada a un 26% de reducción del riesgo de progresión a DMAE avanzada. Este estudio también evaluó la interacción entre la dieta y las variantes genéticas en el riesgo de DMAE, viéndose que la reducción del riesgo de progresión de DMAE era mayor en los portadores del alelo protector (T) en el polimorfismo del gen CFH Y402H.

Como conclusión podemos decir que una dieta rica en alimentos antioxidantes y el consumo de suplementos vitamínicos y antioxidantes se asocia con una alta probabilidad de freno de la patogénesis y la progresión de la DMAE. Por tanto, la recomendación a los pacientes es la de un cambio de hábitos hacia una dieta más saludable y los aportes complementarios de antioxidantes. De la misma forma que con otros posibles factores de riesgo, nuevos estudios aclararán en qué circunstancias y a qué sujetos les pueden beneficiar más estas recomendaciones.

Consumo de alcohol

La relación entre el consumo de alcohol y la DMAE ha sido estudiada en diferentes ocasiones. Los datos que se han obtenido hasta la fecha hacen pensar que el consumo excesivo de alcohol no tiene un gran efecto sobre el desarrollo

de esta patología, y que en algunos estudios se ha observado una asociación producida por el efecto de confusión del tabaquismo.

En los últimos años ha sido ampliamente estudiada la asociación entre un consumo moderado de vino y la protección ante enfermedades relacionadas con el envejecimiento, entre ellas la DMAE. El vino contiene sustancias antioxidantes como el resveratrol, que podrían tener un papel reduciendo la foto-oxidación y la formación de radicales libres implicados en la etiopatogenia de la enfermedad.⁶⁷

Obesidad

La obesidad y la actividad física son factores de riesgo modificables que pueden alterar la incidencia y la progresión de la DMAE en un individuo. La relación entre un elevado índice de masa corporal y la DMAE ha sido demostrada en una gran cantidad de estudios epidemiológicos y meta-análisis⁴⁰ y es también un factor en el cual se puede incidir para evitar la progresión a formas más avanzadas en aquellos pacientes con formas iniciales.

Exposición a la luz solar

La bibliografía existente sobre la relación entre la exposición solar y la DMAE es contradictoria. Evaluar y analizar la exposición solar de cada individuo es una tarea compleja y en muchas ocasiones muy difícil de cuantificar y estandarizar. Los diferentes estudios poblacionales llevados a cabo en diferentes países, con diferente grado de insolación abordan resultados discordantes. En el *Beaver Dam Eye Study* desarrollado en EEUU el tiempo que la persona pasaba al aire libre en verano se asoció a un riesgo doble de DMAE avanzada. En otros estudios no se demuestra tal asociación.⁶⁸

3.6.4 Factores relacionados con el sistema cardiovascular

Hay diferentes aspectos de las enfermedades cardiovasculares que han sido estudiados. En primer lugar, el papel de la hipertensión arterial (HTA) como factor de riesgo de DMAE, en segundo lugar la DMAE en las personas que padecen patología cardio y cerebro vascular y en tercer lugar, indicadores de enfermedad cardiovascular como la arteriosclerosis. Los resultados de los diferentes estudios epidemiológicos y de casos y controles son, de nuevo, como en otros posibles factores de riesgo de la DMAE, contradictorios.

La HTA produce una disminución del flujo vascular coroideo, mecanismo que podría favorecer el daño degenerativo en la capa coroides y la retina. Ya en 1977 analizando los datos del *Framingham Eye Study* reportó una asociación entre DMAE e HTA.⁶⁹ Posteriormente otros estudios llegan a conclusiones similares⁷⁰⁻⁷² y otros no encuentran tal asociación.^{73,74}

En el estudio epidemiológico de *Los Angeles Latino Eye Study*³⁹ se observa que la presión de pulso o diferencia entre la presión sistólica y la diastólica, se asocia a una mayor incidencia de cualquier tipo de DMAE (OR 2,54; IC95 % 1,36-4,76), como un factor independiente de la HTA. El mecanismo que puede subyacer a tal relación parece ser los cambios que se producen con la edad en el colágeno y la elastina, que disminuye la distensibilidad de los vasos sanguíneos. Parece que una mayor presión de pulso podría ser un marcador de los cambios degenerativos que ocurren a nivel de la membrana de Bruch en los ojos con mayor riesgo de incidencia o de progresión de la DMAE.

Algunos estudios no encuentran significativa la asociación entre DMAE y enfermedades cardiovasculares o hipertensión arterial, pero sí con fármacos como los inhibidores de la angiotensina o los hipolipemiantes.⁴² Según los resultados de un meta-análisis publicado sobre los factores de riesgo en DMAE no existe asociación estadísticamente significativa entre hipertensión, diabetes, historia de enfermedad cardiovascular e historia de enfermedad cerebrovascular, observándose únicamente asociaciones estadísticamente significativas con HTA y enfermedad cardiovascular en estudios más pequeños de casos y controles.⁵⁶

En una revisión reciente sobre la epidemiología de la DMAE en relación con los factores de riesgo cardiovascular se resumen algunas características comunes entre las drusas, sello distintivo de la DMAE, y las placas de arteriosclerosis, punto de partida de la patología cardiovascular en muchas ocasiones.⁷⁵ Hay estudios que han investigado la génesis de las drusas y han ilustrado una gran cantidad de puntos comunes con las placas de arteriosclerosis. Según diferentes trabajos recogidos en este meta-análisis, las características representativas comunes en drusas y placas de arteriosclerosis son: depósitos de lípidos, disfunción endotelial, activación del complemento, estrés oxidativo, metaloproteinasas de la matriz extracelular, hiperhomocisteinemia, activación de macrófagos, disminución del flujo vascular, aumento de la producción del VEGF y depósito de amiloide, colesterol, calcio y lipoproteínas. Sin embargo, a pesar de que múltiples estudios sugieren una asociación significativa entre ambos procesos, la relación es ciertamente compleja y no se trata de una simple relación causa-efecto.

3.6.5 Factores genéticos

La degeneración macular asociada a la edad es una enfermedad compleja a nivel genético en la que parecen intervenir varios genes o variantes genéticas así como algunas interacciones con factores ambientales, que actúan desequilibrando el sistema fotorreceptor-epitelio pigmentario retiniano-membrana de Bruch y coriocalilar. Genes de diferentes vías están implicados en el desarrollo y progresión de la DMAE, incluidos genes asociados a la regulación de los lípidos y la matriz extracelular, relacionados con la reparación de DNA, a la respuesta inmune y la inflamación. Esto hace que sea un factor de riesgo no modificable de características especiales y que necesite un apartado completo para explicar toda su relación con la DMAE.

3.7

Introducción Genética y DMAE

3.7.1 Introducción

La influencia genética en la DMAE ha sido caracterizada desde hace años por numerosos estudios genéticos con gemelos y de segregación familiar.⁷⁶⁻⁷⁸ Algunos estudios muestran como la herencia familiar tiene una contribución relativa en la etiología de la DMAE que oscila en un rango del 46 al 71 % de los casos.⁷⁹

Estudios de mapeo genético descubrieron dos regiones cromosómicas diferenciadas con evidencias de alta susceptibilidad para el desarrollo de DMAE. Estas regiones son el 1q31 y el 10q26.⁸⁰ De estas regiones destacan los genes factor H del complemento (*CFH*) y los *LOC387715/HTRA1*, que presentan en sus secuencias polimorfismos (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) altamente asociados con la enfermedad y que relacionan al sistema inmune innato con la patogénesis de la DMAE. Los SNP son variaciones en la secuencia del DNA que ocurren cuando un único nucleótido se cambia por otro. Ocurren de forma frecuente y se encuentran aproximadamente uno cada 1250 nucleótidos. Las mutaciones son infrecuentes y afectan a una cifra inferior al 1% de la población además de derivar en una proteína defectuosa que de manera invariable conduce a la aparición de la enfermedad.^{81,82}

Existen también otros genes que regulan la actividad del complemento como son el factor B (*CFB*), el Componente 2 del complemento (*C2*) y las deleciones en los genes relacionados con el factor H (*FHR1* y *FHR3*), que parecen modificar la susceptibilidad de un individuo para desarrollar una DMAE.

Los potenciales efectos de los avances en la genética de la DMAE son múltiples e incluyen un mejor conocimiento de su patogenia, la mejoría de las técnicas diagnósticas, el potencial de la identificación preclínica de los pacientes y la aparición de nuevas estrategias de prevención y tratamiento

3.7.2 Estudios de ligamiento y asociación en DMAE

En los primeros años del 2000 el estudio genético de la DMAE se llevó a cabo por medio de estudios de ligamiento y asociación para identificar regiones genómicas que mostrasen susceptibilidad a la enfermedad. Estos estudios se realizaron por medio del reconocimiento de marcadores genéticos que se segregan junto con la enfermedad a lo largo diferentes individuos de familias afectadas. A su vez, los estudios de asociación sirvieron para identificar los alelos de riesgo de los marcadores genéticos que son causantes de la enfermedad o que están en desequilibrio de ligamiento con los verdaderos alelos causantes. Los marcadores genéticos más frecuentemente encontrados fueron los SNP.⁸³

3.7.3 Sistema del complemento y DMAE

En el año 2005, en la revista *Science*, aparecieron los primeros informes de una asociación entre una variante genética en la vía del complemento y la DMAE, cuando tres grupos de investigadores independientes, Klein, Edwards y Haines (y colaboradores)⁸⁴⁻⁸⁷ vincularon al polimorfismo rs1061170 situado en el exón 9 (nucleótido 1227) de este gen y que conlleva el cambio Tyr402His como el principal SNP de la DMAE. Desde entonces el concepto de la genética como factor de riesgo pasó a tener un gran peso, cambiando los esquemas de la forma de estudiar las causas que provocan la DMAE. A partir de ese momento, este hallazgo ha sido confirmado por numerosos estudios en diferentes poblaciones⁸⁸⁻⁹² y se ha determinado su asociación con las dos formas avanzadas de la enfermedad (neovascularización coroidea, NVC, y atrofia geográfica, AG) así como con las formas iniciales.⁹³⁻⁹⁷ Este SNP puede estar relacionado con el 58,9% de los casos en población occidental (no así en población japonesa donde no se halla relación entre Y402H y DMAE⁹⁸) y se estima que la mitad de los homocigotos para este SNP tendrán DMAE a los 85 años, frente al 22% de los no portadores. El CFH es un regulador del sistema del complemento e inhibe su activación por la vía alternativa, regulando también la vía común por medio de su unión al complejo C3b como cofactor en la proteólisis por el factor I. Esta inhibición previene la producción de C3 convertasa en la cascada de la vía alternativa, al igual que la producción de la C5 convertasa de la vía común (figura 10). En este sentido, Hageman y colaboradores mues-

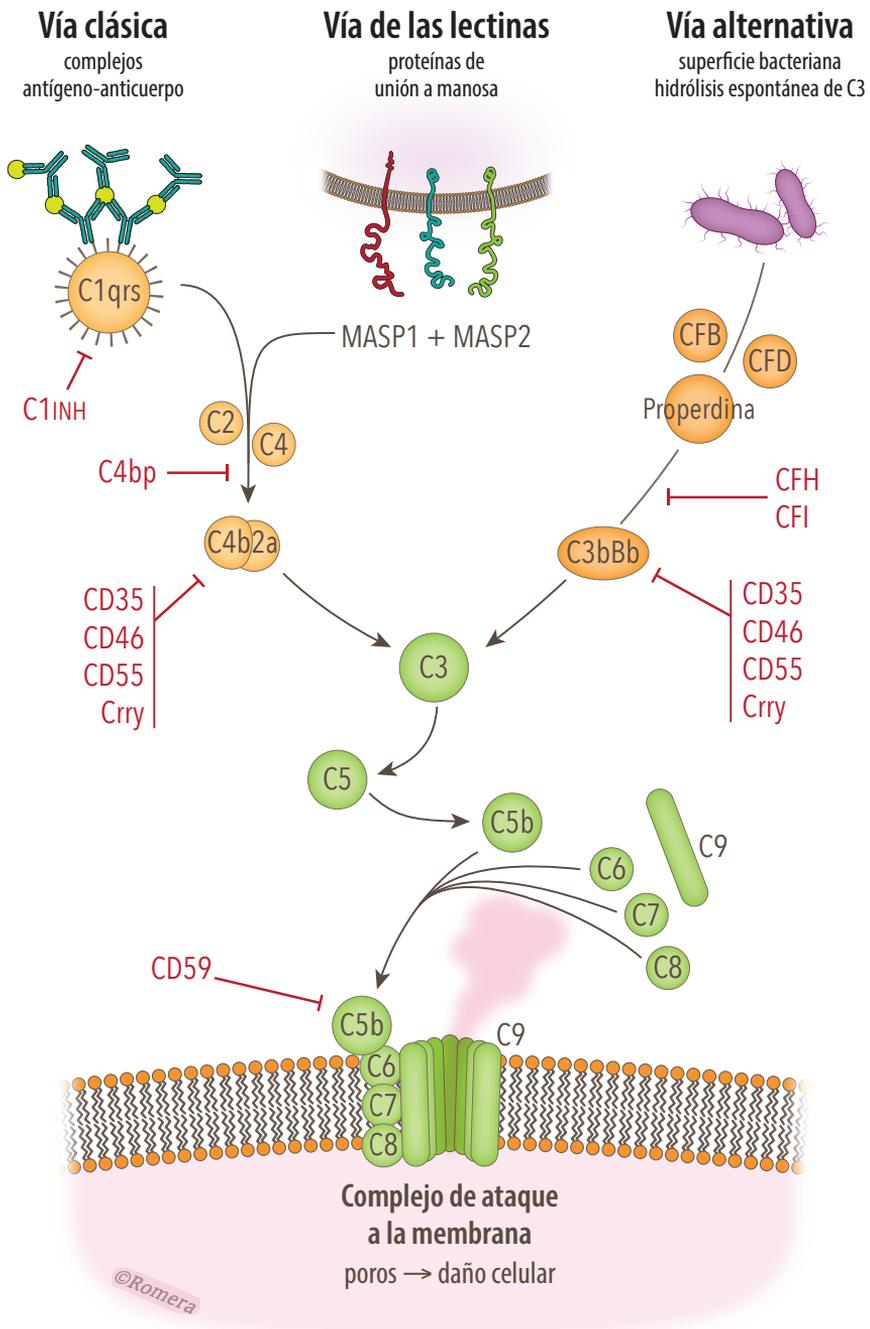


Figura 10. Diagrama que muestra la activación de las vías del complemento y las proteínas reguladoras del complemento. Los lugares de acción de estas proteínas reguladoras están señalados rojo (-). Modificado de Bora et al.¹⁰²

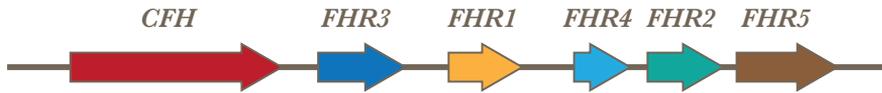


Figura 11. Distribución de genes en la región 1q32, donde destaca el gen del factor H del complemento (*CFH*) y sus genes relacionados (*FHR1-5*).

tran, por medio de inmunohistoquímica, como el *CFH* junto con el complejo C3b/iC3b están presentes en las drusas, sugiriendo la importancia del sistema del complemento en la formación de las mismas⁸⁵. En la población española la frecuencia de este polimorfismo también se encuentra elevada en los pacientes con DMAE.^{99,100} Un meta-análisis indica que poseer un alelo de riesgo multiplica la posibilidad de padecer DMAE por 2,5 mientras que los homocigotos de riesgo tienen hasta seis veces más posibilidades que la población control.¹⁰¹

La región cromosómica que incluye al gen *CFH* está compuesta por numerosos genes relacionados con el sistema del complemento (*Factor H related genes, FHR*, figura 11) y que presentan secuencias de alta homología con el *CFH*, interviniendo también en los procesos de inhibición del complemento por competitividad con el *CFH* en la unión a C3b. Cabe destacar que, aunque el Y402H haya sido clasificado como el principal SNP asociado con la DMAE, hay múltiples estudios que muestran la existencia de más alteraciones genéticas, tanto en el gen *CFH* como en otros genes del complemento, susceptibles de jugar un papel importante en el desarrollo de la DMAE (figura 12).

Polimorfismo I62V del *CFH*

Dentro del *CFH* existen otros polimorfismos que se asocian con la DMAE, presentando un claro perfil protector en población caucásica como es el SNP rs800292, que conlleva el cambio isoleucina por valina (I62V). Un estudio de casos y controles realizado en población española¹⁰⁰ comprobó la relación entre el SNP I62V y su asociación con el riesgo de padecer DMAE. Los resultados mostraban que los individuos que portan el alelo de protección A, presentaban una asociación de 2,3 veces (IC 95 % 0,2-0,7) menor frente a la DMAE que los homocigotos para el alelo G.

Genes Relacionados con el Factor H del Complemento (*FHR1-5*)

Dos de estos genes, *FHR1* y *FHR3*, presentan un patrón de delección que se ha relacionado como un factor de protección frente a la DMAE.¹⁰³⁻¹⁰⁵ La aparición de estas alteraciones relacionadas con el *CFH* así como la relación del

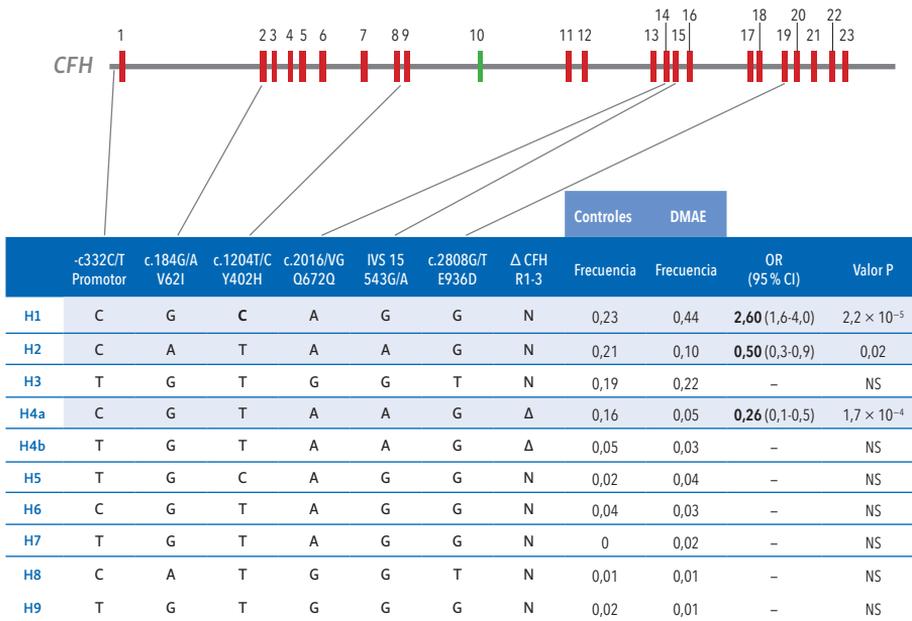


Figura 12. Estructura interna del gen *CFH* (exones en cuadrados rojos) y localización de los diferentes polimorfismos a estudio. Δ CFHR1-R3 muestra la delección de los genes *FHR1-3*. La tabla muestra los diferentes haplotipos encontrados y la frecuencia en controles y DMAE (datos no publicados).

complemento con otras enfermedades hereditarias como la glomerulonefritis proliferativa y el síndrome urémico hemolítico atípico ha conllevado el inicio de estudios haplotípicos en los diferentes grupos de investigación^{96,106}. Un haplotipo se define como una sucesión específica de variaciones en el DNA que se encuentran tan cerca unas de otras que raramente se recombinan y por tanto se heredan de manera conjunta.¹⁰⁷ Los resultados obtenidos en la población española muestran la existencia de un haplotipo de riesgo y de dos haplotipos asociados a protección donde se incluye la delección de *FHR1* y *R3* (figura 11).¹⁰⁸

Factor B (*CFB*) y Componente 2 del Complemento (*C2*) en la DMAE

Algunos estudios recientes han demostrado que la asociación del sistema del complemento con la DMAE no se debe en exclusiva al *CFH*. Así Gold y colaboradores han descrito la asociación de otros dos genes que codifican proteínas regulatorias que actúan en la misma vía que el *CFH*.¹⁰⁹ Estos genes son el Factor B del complemento (*CFB*) y el componente 2 del complemento (*C2*), localizados en el cromosoma 6p, muy cercanos a la región del complejo mayor de histocompatibilidad clase III. El *CFB* actúa para estabilizar C3bBb y por tanto activa la vía alternativa, mientras que el factor *C2* es un activador de la

			Controles	DMAE			
	c.26T>A	c.94C>T	c.95G>A	Frecuencia	Frecuencia	OR (95 % CI)	Valor P
B1	T	C	G	0,69	0,80	1,93 (1,2-3,1)	0,008
B2	T	T	G	0,13	0,14	—	NS
B3	T	C	A	0,13	0,05	0,33 (0,1-0,7)	0,008
B4	T	C	G	0,04	0,01	—	NS

c.94C>T (rs800292)
 c.95G>A (rs1061170)
 c.96

B1 C G G ⇒ Arginina → **Riesgo**
B2 T G G ⇒ Triptófano
B3 C A G ⇒ Glutamina → **Protectivo**
B4 C G G

Figura 13. Frecuencias de los haplotipos encontrados en el factor B en la población española. El cuadro inferior muestra la diferente combinación de aminoácidos que forman los SNP c.94C>T y c.95G>A en la proteína del factor B y el riesgo que se le atribuye a cada uno (datos no publicados).

vía clásica. Los cambios producidos en la actividad enzimática de estos factores pueden dar lugar a una activación mal controlada del sistema del complemento, con un daño a nivel del EPR y con la consiguiente formación de drusas.¹¹⁰ Los estudios de haplotipos de estos genes muestran un haplotipo de riesgo (OR 1,32) y dos protectores (0,36 y 0,45 respectivamente). Estos dos genes se expresan en retina y además se ha encontrado CFB en las drusas y membrana de Bruch de pacientes con DMAE.¹¹¹ En población española se han hallado haplotipos de riesgo y protección asociados con el gen *CFB* (figura 13).

Factor I del complemento (*CFI*) y Componente 3 del complemento (*C3*)

Otros genes relacionados con el sistema del complemento que presentan una fuerte asociación con la DMAE son *CFI* y *C3*. En *CFI* se han confirmado varios SNP con fuerte asociación protectora como son rs10033900T>C y

rs2285714C>T¹¹² mientras que en el gen *C3* varios estudios muestran una fuerte asociación del alelo de riesgo del polimorfismo R102G (rs2230199).¹¹³⁻¹¹⁵ Estos análisis refuerzan la gran asociación del sistema del complemento en el desarrollo de la degeneración macular asociada a la edad.

Mutación R1210C del gen *CFH*

La mutación R1210C había sido descrita inicialmente al síndrome hemolítico urémico atípico¹¹⁶ pero posteriores estudios la han vinculado también con el desarrollo de DMAE.¹¹⁷ Estudios de familias españolas con síndrome urémico hemolítico atípico y DMAE confirmaron que esta mutación está relacionada con ambas enfermedades, pero que dependiendo del patrón de polimorfismos que presente en los genes del complemento (*CFH*, *CFB*, *C2*, *C5*, *FHR*...) la persona afectada con la mutación tendrá más posibilidades de padecer una, otra o ambas patologías.¹¹⁸

Cabe destacar también la gran heterogeneidad fenotípica y genotípica que se ha encontrado en la DMAE en las diferentes etnias estudiadas. Así, estudios de frecuencias en el alelo C de riesgo del Y402H han mostrado gran diversidad de frecuencias entre las cinco etnias estudiadas indicando la complejidad genética de esta enfermedad y la necesidad de investigar otros factores genéticos desconocidos que podrían ser de importancia en el desarrollo de la DMAE.¹¹⁹

3.7.4 *LOC387715/HTRA1* y DMAE

En paralelo al descubrimiento de los genes relacionados con la DMAE en la región 1q32 se realizaron estudios en la región cromosómica 10q26 mostrando al gen *LOC387715* como el segundo gen con mayor asociación a la DMAE, con total independencia del *CFH*. Además, el gen *LOC387715* parece asociarse únicamente con las formas más avanzadas de la enfermedad, tanto con la forma neovascular como con la atrófica¹²⁰. En concreto, este estudio mostraba al SNP A69S (rs10490924) como el principal polimorfismo de esta región y al que se le atribuyó un riesgo relativo de 7,6 veces para homocigosis del alelo de riesgo (TT) respecto del protector (GG). El gen *LOC387715* era un gran desconocido, ignorándose incluso si se expresaba en forma de proteína y la función que podría ejercer en la etiología de la DMAE. Esto conllevó que varios grupos continuaran buscando genes relacionados con la DMAE en esta región cromosómica en la que destacan tres genes que se encuentran en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento, los genes *PLEKHA1*, *ARMS2* (*LOC387715*) y *HTRA1* (figura 14).

De esta forma se determinó el SNP -625G>A (rs11200638), localizado en el promotor del gen *HTRA1* y que se encuentra a tan solo 6096 pares de base

del A69S, en completo desequilibrio de ligamiento.^{121,122} El gen *HTRA1* codifica para una serinproteasa que se expresa en retina y que se activa por el estrés oxidativo interactuando con otras proteínas para el recambio de matriz extracelular. Dewang y colaboradores plantearon la hipótesis de que esta proteína sea la causante de la formación de la NVC por medio de una sobre-expresión de *HTRA1* causada por el SNP de riesgo (AA) que actuaría destruyendo un silenciador de la expresión (islote CpG) al cual se unirían los factores de transcripción *AP2α* y *SRF*.¹²¹ Sin embargo, estudios recientes han desmentido que este SNP esté causando sobre-expresión de *HTRA1*, demostrando además que la proteína resultante del gen *ARMS2/LOC387715* se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias y que de esta forma el SNP A69S, el de mayor asociación con las formas avanzadas de la DMAE, puede ser determinante en la función de esta proteína en las mitocondrias de la retina.¹²³ Este polimorfismo también se ha asociado con un mayor riesgo de DMAE avanzada en la población española pero no con las formas precoces¹⁰⁰ (figura 14).

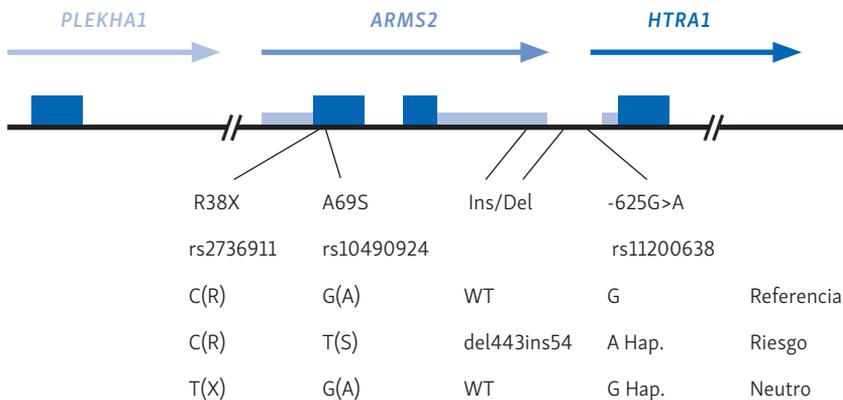


Figura 14. Distribución de los genes *PLEKHA1*, *ARMS2(LOC387715)* y *HTRA1* en la región cromosómica 10q26. La tabla inferior muestra los alelos de riesgo de los diferentes SNP estudiados en estos genes.³⁴

3.7.5 Otros genes y la DMAE

La complejidad de la DMAE ha hecho que se investiguen también otros genes y vías de señalización. Estas vías pueden parecer de menor importancia en el desarrollo de la enfermedad porque la asociación encontrada es menor que con la vía del complemento, pero sin embargo pueden llegar a ser importantes en determinadas formas de la enfermedad o en respuesta a diferentes tratamientos. Un ejemplo de ello es la vía del metabolismo de los lípidos, donde se han analizado los genes *LIPC* (localizado en el cromosoma 15) y *CETP* (en el cromosoma 16q21). Ambos están implicados en la ruta de la *High Density*

Lipoprotein (HDL), catalizan la hidrólisis de fosfolípidos y regulan en el intercambio de lípidos entre lipoproteínas. Varios estudios han demostrado que HDL es la principal lipoproteína en el transporte de los carotenos como la luteína y la zeaxantina y que la falta de estos pigmentos maculares está muy asociada con la DMAE.¹²⁴⁻¹²⁶

La homeostasis de la matriz extracelular se ha analizado mediante el estudio del SNP rs9621532 (situado en el cromosoma 22), a unas 100 kb por encima del gen *TIMP3*, situado dentro del intrón del gen de la sinapsina III (*SYN3*). La proteína *TIMP3* es un inhibidor de metaloproteinasas (MMP) de la matriz extracelular y de VEGF (un mediador en la angiogénesis). Este mismo gen también se ha visto alterado en la distrofia de Sorsby, una forma temprana de degeneración macular que aparece antes de los 40 años y que comparte características clínicas con DMAE.^{124,127}

Por otro lado, el SNP rs1999930, situado entre los genes *COL10A* y *FRK* (cromosoma 6) también se ha relacionado con efectos negativos en la estimulación de la supervivencia microvascular de la retina en desarrollo, mediando en la señalización VEGF α por la vía de Akt, por lo que es otro polimorfismo a tener en cuenta en el desarrollo de alguna variedad de la DMAE.¹²⁸

3.7.6 Consideraciones prácticas

En la DMAE ningún polimorfismo por sí mismo es causa directa de la patología. De hecho, un buen número de individuos con alguno de los alelos de riesgo nunca desarrollará la enfermedad. Además existen pacientes que acaban padeciendo la enfermedad y que no poseen los polimorfismos de riesgo de DMAE. Esto puede ser debido a factores genéticos todavía no conocidos o al mayor peso de los factores ambientales en su caso concreto. Algunos factores de riesgo modificables como el tabaco y la dieta actúan de manera independiente de algunos de los factores genéticos como los *CFH*.^{110,129,130} Pero a la vez es posible que interactúen con otros factores genéticos como el *LOC387715*, aunque a este respecto hay cierta controversia por los diferentes resultados encontrados.¹³¹

De todas formas, es sorprendente que en una enfermedad tan compleja como la DMAE las variaciones genéticas involucradas no sean tan numerosas como en un principio se podía esperar. Hasta la fecha el estudio de dos genes, el *CFH* y el *LOC387715*, junto con otros genes relacionados al sistema inmune como *C2*, *C3*, *C5*, *CFB* y *CFI* representan la mayor parte del riesgo atribuible a la DMAE desde el punto de vista genético (figura 15). Esto permite valorar la posibilidad de identificar a los individuos con mayor riesgo de desarrollar DMAE, de tal manera que se puedan emplear terapias preventivas de una manera más

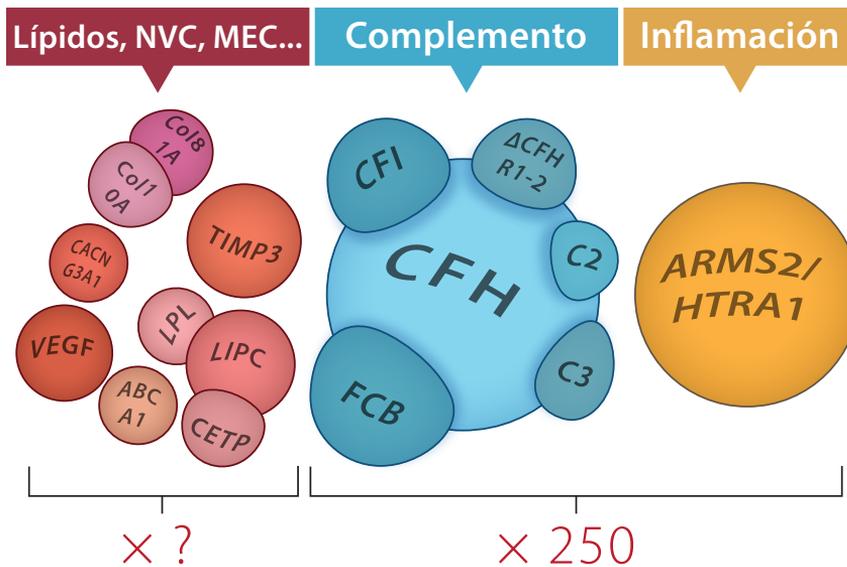


Figura 15. Representación gráfica de los principales genes relacionados con la DMAE. Es conocido el riesgo de padecer DMAE puede llegar a 250 veces al presentar todos los alelos de riesgo de los genes del complemento y ARMS2/HTRA1 frente a no presentar ninguno. Se desconoce el riesgo asociado a los alelos de riesgo del resto de genes asociados. NVC: neovascularización coroidea, MEC: matriz extracelular.

coste-efectiva que en la actualidad. Actualmente se trabaja en modelos de riesgo basados en la combinación de varios de los genes implicados. Así por ejemplo, Maller y colaboradores han elaborado un modelo de riesgo con el CFH, el factor B y el LOC387715, en el que las personas con homocigosidad para los alelos de riesgo en los tres genes (un 1% de la población) multiplican hasta por 250 su riesgo frente a la población de menos riesgo.⁹² Posiblemente la mejor manera de utilizar estos datos sea la identificación de personas de alto riesgo entre familiares de pacientes con DMAE, especialmente si ya han empezado a desarrollar características precoces de la enfermedad como son las drusas. Por otro lado, la valoración del riesgo genético de desarrollo o progresión de DMAE podría ser de utilidad a la hora de recomendar medidas preventivas como los suplementos vitamínicos basados en la fórmula AREDS.

3.8

Introducción Tratamiento

El tratamiento de la DMAE neovascular consiste en la inhibición, fundamentalmente, del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Esta molécula fue identificada en los años 80 y se dio a conocer que su sobreexpresión inducía neovascularización y un aumento de la permeabilidad vascular.¹³² Desde los años 90 el VEGF se asoció a diversas enfermedades oftalmológicas como la DMAE, el edema macular diabético, las oclusiones venosas retinianas, la miopía patológica y la retinopatía del prematuro. A partir de ese momento, el VEGF se convirtió en la principal diana terapéutica para el tratamiento de estas patologías y se inició una nueva era en la farmacoterapia ocular.

3.8.1 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin[®], Genentech/Roche, San Francisco) es un anticuerpo monoclonal humanizado completo (149 kDa) con dos sitios de unión al VEGF-A (figura 14). Este fármaco estaba aprobado por *Food and Drugs Administration* (FDA) de los Estados Unidos en 2004 para su uso en cáncer colorrectal metastásico, observándose mejoras funcionales y anatómicas en pacientes que padecían DMAE. Por ese motivo, se iniciaron los primeros estudios por parte del grupo de Rosenfeld en el *Bascom Palmer Eye Institute* de Miami, utilizando este fármaco mediante infusión intravenosa inicialmente¹³³ y a nivel intravítreo con posterioridad.¹³⁴ Estos primeros prometedores resultados inhibiendo el VEGF dieron lugar al desarrollo de otras moléculas con similares mecanismos de acción como el pegaptanib, el ranibizumab y el aflibercept. El bevacizumab no ha tenido nunca su aprobación para uso intraocular en el tratamiento

de la DMAE, pero su uso se generalizó basándose en la evidencia científica que aportaban los estudios como el ABC¹³⁵, CATT¹³⁶, IVAN¹³⁷, MANTA¹³⁸ y GEFAL¹³⁹.

3.8.2 Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis[®], Genentech, Inc, South San Francisco, CA, EE.UU./ Roche, Basilea, Suiza) es un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado (Fab) con una masa molecular de 48 kDa, que tiene una alta afinidad por VEGF y bloquea todas las isoformas de VEGF-A (figura 16). Ranibizumab es producido en células de *Escherichia coli* mediante tecnología de ADN recombinante. Su menor tamaño, debido a la ausencia del fragmento cristalizante (Fc) le confiere, en teoría, una mayor penetración en la retina a expensas de una vida media más corta.¹⁴⁰

Ranibizumab fue aprobado por la *Food and Drugs Administration* (FDA) de los Estados Unidos para el tratamiento de la DMAE neovascular en 2006 y en febrero de 2007 por la Agencia Española del Medicamento en España. Desde los ensayos clínicos pivotaes en fase III ANCHOR y MARINA, numerosos

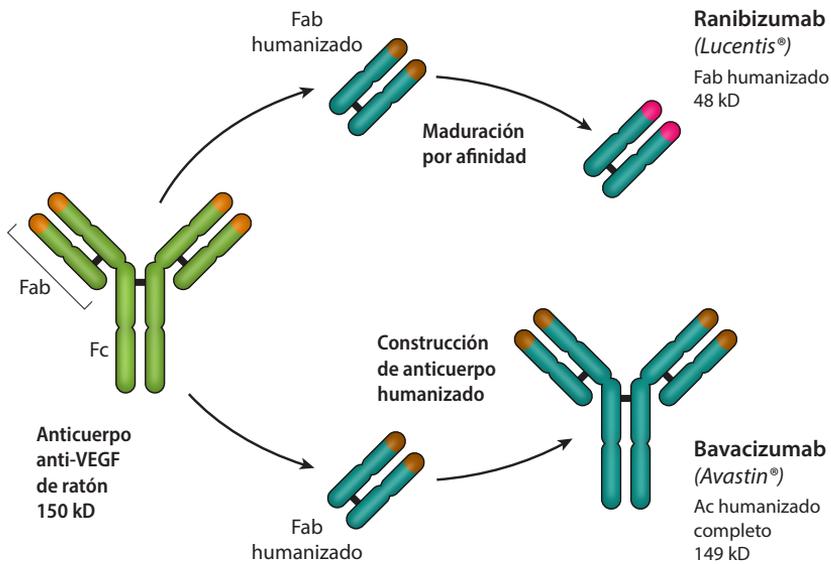


Figura 16. Diferencias entre la estructura molecular de bevacizumab y ranibizumab. Ranibizumab es un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado (Fab) con una masa molecular de 48 kDa, producido en células de *Escherichia coli* mediante tecnología de ADN recombinante. Su menor tamaño en comparación con bevacizumab se debe a la ausencia del fragmento cristalizante (Fc). Modificado de Kovach, 2012.¹⁴⁰

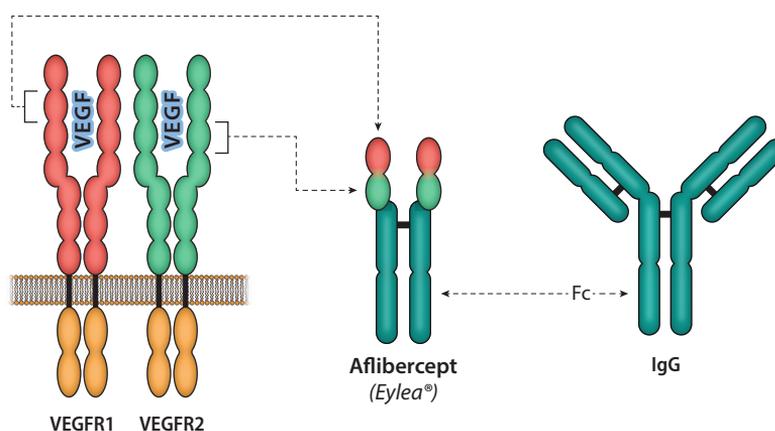


Figura 17. Estructura molecular del aflibercept (modificado de www.eylea.com).

estudios como PIER, EXCITE, PrONTO, SUSTAIN, SAILOR y HORIZON avalan la eficacia y la seguridad del ranibizumab en el tratamiento de la DMAE neovascular.¹⁴¹

3.8.3 Aflibercept

Aflibercept (Eylea[®], Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, New York, NY) es una proteína de fusión recombinante de 115 kDa, totalmente humanizada y soluble, compuesta por el segundo dominio de unión extracelular del VEGFR-1 y el tercer dominio de unión extracelular del VEGFR-2, fusionados a la porción Fc de la inmunoglobulina G (figura 17).

Aflibercept actúa como un falso receptor que se une a todas las isoformas del VEGF-A con una afinidad mayor que sus receptores, formando un complejo inerte y estable, evitando eficazmente la unión del VEGF-A a VEGFR-1 y VEGFR-2 y su posterior activación. Por otra parte, aflibercept se une con alta afinidad al VEGF-B, así como al PlGF (*placental growth Factor*).¹⁴²

En noviembre del 2011 la FDA aprobó el uso de aflibercept para el tratamiento de la DMAE neovascular. Los ensayos clínicos de fase III VIEW 1 y 2 demostraron la eficacia de aflibercept para el tratamiento de la DMAE húmeda, comprobando además que los resultados en pacientes con un régimen de tratamiento fijo bimensual no eran inferiores a los obtenidos con dosis mensuales de ranibizumab.¹⁴³

3.8.4 Conclusión

El tratamiento de la DMAE neovascular ha mejorado enormemente en la última década. A pesar de que hace más de 20 años la terapia fotodinámica demostró ser efectiva en la reducción de la pérdida visual, el desarrollo de la terapia anti-VEGF ha revolucionado el tratamiento de esta enfermedad, con unos alentadores resultados en cuanto a la prevención de la pérdida visual e incluso consiguiendo mejoras de la agudeza visual basal. Muchos pacientes consiguen mantener su agudeza visual y un tercio consiguen mejorarla. Sin embargo, un subgrupo de pacientes no solo no consigue mantener su visión, sino que su pérdida visual prosigue a pesar del tratamiento. Hasta el momento no es posible predecir qué pacientes responderán al tratamiento aunque se conocen variaciones genéticas que podrían dar respuesta a estas diferencias. Conociendo el subgrupo de pacientes que presentarán una pobre respuesta terapéutica se podría cambiar el abordaje de éstos, con una monitorización más frecuente, pautas de tratamiento proactivas o administrar, en un futuro, otras dianas terapéuticas.

3.9

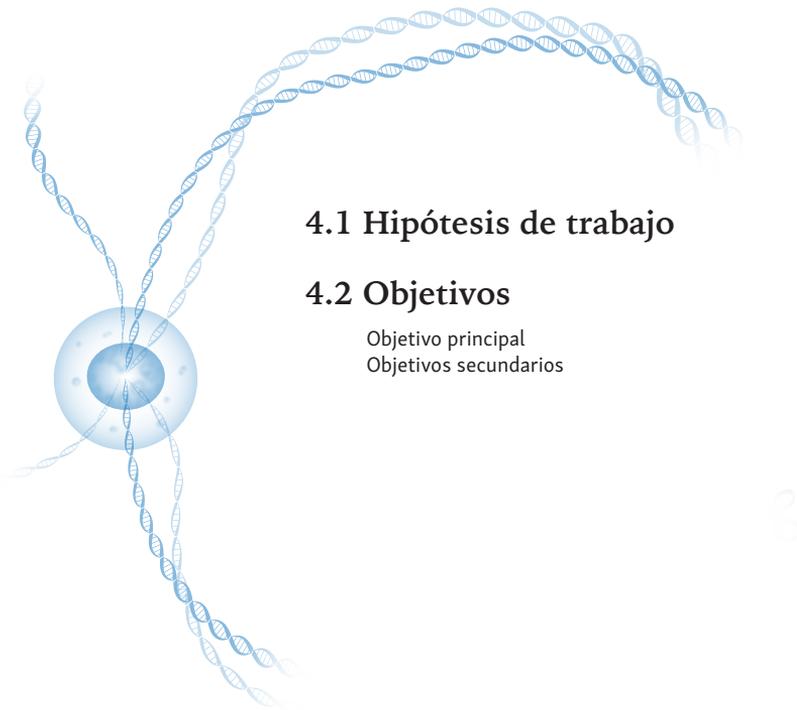
Introducción Estudios de farmacogenética en DMAE

Varios estudios han intentado determinar si los factores genéticos predisponen a los pacientes con DMAE tardía a una respuesta deficiente a la terapia anti-VEGF. Sin embargo, los resultados hasta la fecha han sido ambiguos. De hecho, en lugar de aclarar esta cuestión, la investigación disponible parece haber generado más confusión, quizás debido a las diferencias metodológicas y demográficas entre los diversos trabajos publicados. Estos estudios van desde ensayos clínicos con criterios de inclusión y exclusión altamente restrictivos que no reflejan las condiciones habituales de la práctica clínica diaria a estudios clínicos con tamaños de muestra pequeños que no evalúan genes relacionados con la respuesta antiVEGF.

Dado este contexto, se llevó a cabo el estudio retrospectivo actual, con un importante tamaño muestral de pacientes de la práctica clínica habitual, para examinar nueve SNP de seis genes diferentes previamente asociados con la DMAE, incluyendo genes de complemento y angiogénesis, así como genes relacionados con la respuesta antiVEGF.

4

Hipótesis y objetivos



4.1 Hipótesis de trabajo

4.2 Objetivos

Objetivo principal
Objetivos secundarios

4.1

Hipótesis de trabajo

Existe una susceptibilidad genética que condiciona un aumento del riesgo a padecer DMAE. Además, otros factores como la raza, el tabaquismo, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión arterial, la radiación solar y la presencia de drusas también condicionan el riesgo a padecerla. Por otro lado, la respuesta clínica del paciente al tratamiento con ranibizumab intravítreo también se encuentra en relación con los factores antes mencionados.

Por tanto, nuestra hipótesis nula es que los SNP rs1061170, rs800292, rs10490924, rs1136287, rs12603486, rs7993418, rs3025000, rs699947 y rs12614, de los genes *CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGFR1* y *VEGF* están asociados a la diferente respuesta al tratamiento con ranibizumab de los pacientes españoles con DMAE neovascular.

4.2

Objetivos

4.2.1 Objetivo principal

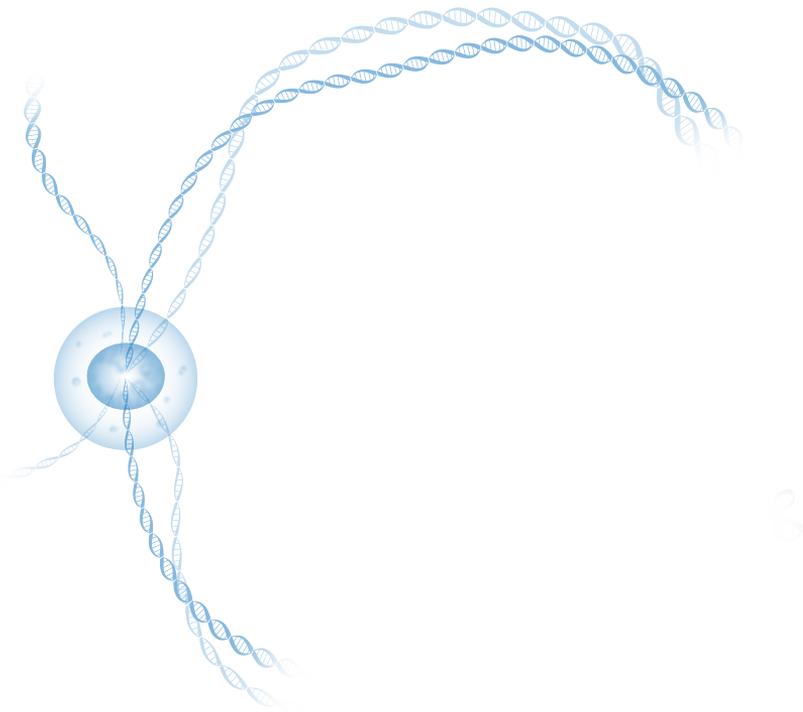
Evaluar de manera retrospectiva la influencia del genotipo mediante el estudio de nueve SNP de seis genes diferentes (*CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGFR1*, *VEGF*) y de variables clínicas como el sexo, la edad, el hábito tabáquico y la HTA, en el estudio en la respuesta al ranibizumab intravítreo en pacientes afectados de DMAE exudativa.

4.2.2 Objetivos secundarios

- Evaluar la influencia relativa de cada una de las variables estudiadas en la respuesta al ranibizumab en pacientes afectados de DMAE exudativa.
- Estudiar si existen interacciones entre las variables que puedan influir en la respuesta al ranibizumab en pacientes afectados de DMAE exudativa.

5

Aspectos éticos



5

Aspectos éticos

Las pruebas realizadas son las habituales en la práctica clínica para los pacientes con DMAE neovascular, exceptuando la extracción de saliva para el estudio genético. Ninguna de ellas supone riesgo adicional para el paciente. Este estudio se acoge a las recomendaciones de buena práctica clínica y normativa legal al respecto. El presente estudio ha sido aprobado por el comité de ética de cada uno de los centros que participan.

El paciente no recibió ninguna compensación económica. Se trata de un estudio retrospectivo, por lo que no hay posibilidad de interferencia con los hábitos de prescripción del médico. El seguimiento del paciente es previo a la inclusión de éste en el estudio y no se ha visto modificado por participar en él.

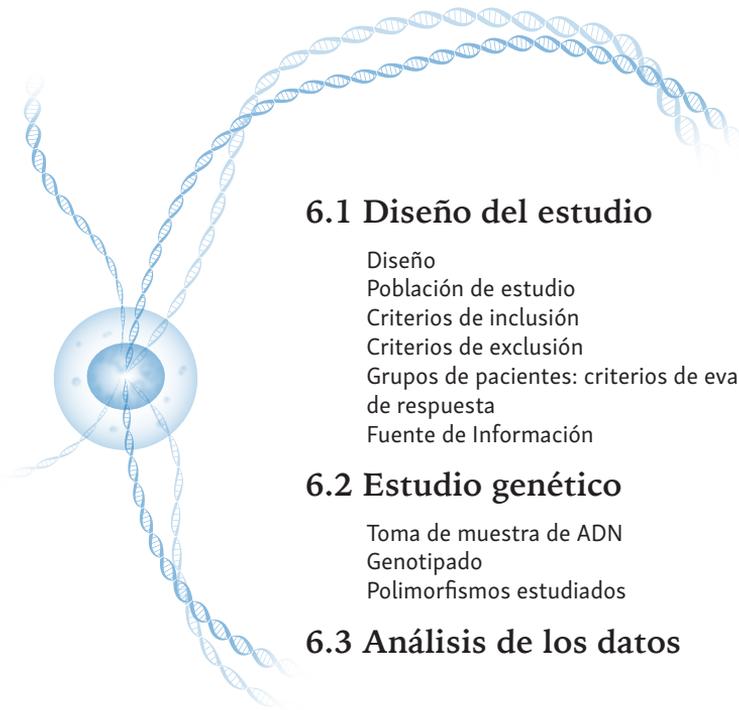
Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos; se han identificado a los pacientes del estudio con un número, de forma correlativa según el orden de inclusión. Los cuadernos de recogida de datos (CRD), informes y comunicaciones del estudio irán identificados con dicho número. Sólo tienen acceso al material identificado necesario para alcanzar los objetivos del estudio el promotor, el monitor, el investigador y su equipo de colaboradores, el Comité Ético de Investigación Clínica que tutela el estudio y las autoridades sanitarias pertinentes. El contenido de los CRD así como los documentos generados durante el estudio son custodiados de usos no permitidos por personas ajenas al estudio, y por tanto, son considerados estrictamente confidenciales y no serán revelados a terceros excepto los especificados en el párrafo anterior. El promotor y los investigadores del estudio garantizan la confidencialidad de los datos de los sujetos y velan porque se cumpla en todo momento con lo establecido en la ley 15/1999, de protección de datos de carácter personal y el RD 1720/2007.

A pesar de que se trata de un estudio retrospectivo, se ha realizado la firma del consentimiento informado de los pacientes incluidos previamente a la extracción de muestra de saliva para realizar el análisis de ADN. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ha ajustado a lo dispuesto en la Ley que regula la Investigación Biomédica (14/07) y a toda legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (ley 15/1999, de protección de datos de carácter personal y el RD 1720/2007). De acuerdo a lo que establece la legislación, los pacientes podrán ejercer sus derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberán dirigirse a su médico del estudio. Además, tendrán derecho a solicitar en cualquier momento, y sin necesidad de especificar el motivo, la eliminación total de las muestras donadas y de la información relacionada con las mismas que en ese momento estén almacenadas.

Las muestras biológicas fueron enviadas con un código numérico, que impedía la identificación directa, por el oftalmólogo responsable de cada centro a Secugen, donde fueron custodiadas hasta su análisis. De esta manera se asegura la confidencialidad de los datos. El oftalmólogo responsable de cada centro ha sido el encargado de custodiar el nexo entre código y paciente hasta la finalización del estudio. Por lo tanto, la identidad de los participantes no ha sido revelada a persona ajena al centro. Sólo se transmitirán a terceros los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente. En el caso de que se produzca esta cesión, será para fines de investigación y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país. Se garantiza la absoluta confidencialidad de los datos genéticos obtenidos del estudio y dichos resultados estarán a la disposición del paciente si así lo requiere.

6

Metodología



6.1 Diseño del estudio

- Diseño
- Población de estudio
- Criterios de inclusión
- Criterios de exclusión
- Grupos de pacientes: criterios de evaluación de respuesta
- Fuente de Información

6.2 Estudio genético

- Toma de muestra de ADN
- Genotipado
- Polimorfismos estudiados

6.3 Análisis de los datos

6.1

Metodología Diseño del estudio

Estudio post-autorización observacional retrospectivo. Se trata de un estudio multicéntrico desarrollado en seis centros de atención especializada en oftalmología miembros del Grupo Español Multicéntrico de DMAE y la Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RD07/0062). Estos centros son:

- Hospital Universitario de Bellvitge
- Clínica Universidad de Navarra
- Hospital Clínico de Madrid
- Hospital Ramón y Cajal
- Complejo asistencial Universitario de Salamanca
- Hospital Universitario Santiago de Compostela

6.1.1 Tamaño previsto de la muestra

Se realizó el cálculo del tamaño muestral para realizar un estudio que mostrara las diferencias en la agudeza visual entre un buen respondedor y un pobre respondedor al tratamiento con ranibizumab en pacientes con DMAE húmeda. Se pretendía detectar una diferencia en la agudeza visual mejor corregida entre las medias de 5 letras ($\Delta = 5$). Por un experimento previo sabemos que la dispersión de los datos ha sido de unas 22,5 letras ($\sigma = 22,5$). Suponemos que no tenemos ninguna información previa del resultado del experimento, de modo que haremos un test a dos colas, es decir, contrastaremos $H_0: \mu_1 = \mu_2$ frente a

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$. Si se trabaja con un nivel de significación del 5% y una potencia del 90% tendremos mediante la siguiente formula:

$$N = 2 \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

Y con el siguiente resultado en nuestro caso:

$$N=2 (1,96+1,28)^2 \times 22,5^2 / 5^2 = 425,15 \approx 425 \text{ pacientes.}$$

Dado que se trata de un estudio retrospectivo, no se esperan pérdidas en el seguimiento por lo que el tamaño muestral debería ser de unos 400 pacientes.

6.1.2 Población de estudio

Pacientes con DMAE de tipo exudativo que presenten neovascularización coroidea subfoveolar o yuxtafoveolar activa, que hayan sido tratados con ranibizumab intravítreo siguiendo las guías clínicas publicadas por la Sociedad Española de Retina y Vítreo (SERV): tres inyecciones mensuales en la fase de carga, seguido de una pauta *pro re nata*, con visitas mensuales de seguimiento y siguiendo los criterios de retratamiento definidos por la SERV.

Se incluyeron un total de 403 ojos de 403 pacientes de raza caucásica (230 mujeres y 173 hombres) diagnosticados de DMAE exudativa y que cumplieran todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión. Los pacientes fueron informados de las características del estudio, leyeron y firmaron el consentimiento informado y dieron permiso mediante la firma del consentimiento de protección de datos para la inclusión del cuestionario demográfico que rellenaron y la información relativa a su patología oftalmológica en la base de datos, de acuerdo con los principios éticos promulgados en la Declaración de Helsinki y el comité de ética de la Clínica Universidad de Navarra, y del resto de centros participantes.

6.1.3 Criterios de inclusión

Pacientes con DMAE avanzada con neovascularización coroidea activa subfoveolar o yuxtafoveolar confirmada por AGF y OCT en tratamiento con ranibizumab, que no hayan sido tratados previamente con terapia fotodinámica y que den su autorización para la inclusión de sus datos en una base de datos (*Data protection consent*) y consentimiento informado por escrito.

6.1.4 Criterios de exclusión

- Individuos con edad menor de 55 años.
- Tratamiento previo con terapia fotodinámica
- Tratamiento previo con otro antiVEGF diferente de ranibizumab
- Miopía mayor de 6 dioptrías o longitud axial del globo ocular > 26 mm
- Coroidosis miópica
- Presencia de anomalías en el polo posterior que puedan originar una neovascularización coroidea como:
 - Estrías angioides.
 - Coroidopatía polipoidea.
 - Coroidopatía serosa central.
 - Nevus en el área macular.
 - Cicatrices secundarias a toxoplasma.
 - Cicatrices secundarias a fotocoagulación láser en polo posterior.
- Historia de cirugía vítreo-retiniana en el ojo de estudio
- Maculopatía traccional y/o membrana epirretiniana en la OCT
- Falta de integridad de la cápsula posterior del cristalino en pseudofaquia.
- Retinopatía diabética
- Opacidad de medios que no permita valorar adecuadamente el fondo de ojo.
- Paciente con grandes posibilidades, a juicio del investigador, de no poder o no querer seguir en el estudio.

6.1.5 Grupos de pacientes: criterios de evaluación de respuesta

Los pacientes fueron clasificados en dos grupos para un cálculo binomial —buenos respondedores (BR) o pobres respondedores (PR)— dependiendo de la respuesta que tuvieran al tratamiento con ranibizumab basándonos en los criterios de estudio: agudeza visual (AV) según el criterio funcional y reducción del grosor central foveal (CFT) o presencia o ausencia de fluido intrarretiniano (FIR) y fluido subretiniano (FSR), según el criterio anatómico. El CFT se mide

en la foveola (entre la superficie interna de la retina y el EPR, mediante OCT al inicio, tras la dosis de carga y a los 12 meses de seguimiento).

- Buenos respondedores (BR): Aquellos que presenten una mejora en la AV ≥ 5 letras medida con ETDRS, reducción del CFT medido mediante OCT (CFT menor que en la OCT previa. Si se mantenía estable o aumentada, se consideraban no respondedores) ausencia de FIR y FSR en la OCT tras la dosis de carga y tras 12 meses de seguimiento.
- Pobres respondedores (PR): aquellos que no cumplan los criterios de buenos respondedores.

Los cambios en la agudeza visual fueron calculados como la diferencia que existe entre la mejor agudeza visual corregida (MAVC) basal y la agudeza visual en cada visita del seguimiento. La agudeza visual se midió con el método ETDRS y fueron convertidas a *logMAR* para el análisis estadístico.

6.1.6 Fuente de Información

La información clínica de los pacientes se documenta en base a las historias clínicas y las imágenes en las bases de datos ya realizadas, en un contexto de seguimiento habitual para esta patología. Se trata de un estudio retrospectivo ya que todos los pacientes recibieron el tratamiento antes de la inclusión en el presente estudio. Por otro lado, este tipo de estudio, al haber tratado al paciente en base a los hallazgos clínicos exclusivamente sin el conocimiento previo de la genética del individuo, evita sesgos por parte de los investigadores.

Se recupera de cada paciente los datos de interés para el estudio, como son (tabla 4):

- Edad
- Sexo
- Edad de inicio de DMAE
- Antecedentes de tabaquismo
- Antecedente de HTA
- Tipo de membrana neovascular (clásica, predominantemente clásica, mínimamente clásica u oclusa) y diámetro máximo del complejo neovascular según AGF
- Número de inyecciones de ranibizumab a los 6 y a los 12 meses de estudio
- AV medida mediante ETDRS a 4 metros de distancia: basal, tras la dosis de carga, a los 6 meses y a los 12 meses de estudio.

- CFT y presencia de FIR y/o FSR tras la dosis de carga, a los 6 meses y a los 12 meses de estudio, medido mediante SD-OCT.

Los criterios de retratamiento de los pacientes tras la dosis de carga de tres inyecciones son persistencia o recurrencia de FIR, pérdida ≥ 5 letras ETDRS en la AV, hemorragia macular reciente y aumento del CFT en $\geq 100 \mu\text{m}$.

Tabla 4. Hoja de Recogida de datos.

DATOS PACIENTE					
CÓDIGO PACIENTE					
SEXO					
EDAD PACIENTE					
AÑO DIAGNOSTICO DMAE HUMEDA					
OJO AFECTADO					
FACTORES RIESGO					
TABAQUISMO	FUMADOR SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> AÑOS <input type="checkbox"/>		CIGARROS/DIA <input type="text"/>	EX FUMADOR SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> AÑOS <input type="checkbox"/>	
HIPERTENSIÓN ARTERIAL	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>				
RESPUESTA			NÚMERO DE RANIBIZUMAB		
BUENA	MEDIA	MALA	6M	12M	TOTAL
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
AGUDEZA VISUAL					
	SNELLEN DECIMAL		ETDRS		
AV BASAL					
AV TRAS 1º INYECCIÓN					
AV TRAS FASE CARGA					
AV A LOS 6 MESES					
AV A LOS 12 MESES					
INT. CATARATA OJO AFECTO	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	FECHA		
			FECHA AGF		
AGF			EXTENSIÓN MEMBRANA (Micras)		
TIPO DE LESIÓN			<input type="text"/>		
MB CLÁSICA					
MB PREDOM CLÁSICA					
MB MINIM CLÁSICA					
MB OCULTA					
MB: MEMBRANA					
OCT					
	INICIAL		6 MESES		12 MESES
LIQUIDO INTR/SUBRET	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	SI <input type="checkbox"/>
GROSOR FOVEOLAR (MICRAS)					

6.2

Metodología Estudio genético

6.2.1 Toma de muestra de ADN

Las muestras de ADN se obtuvieron de cada participante mediante muestra de saliva, en cada centro siguiendo un protocolo que se detalla a continuación (Anexo 1), después de una explicación adecuada de la naturaleza y de las posibles consecuencias del estudio, la lectura de la hoja de información (Anexo 2) y la firma de los consentimientos informados tanto para participar en el estudio como para extracción de muestra de saliva para análisis genético (Anexo 3). Las muestras de saliva fueron recogidas con el *kit* de recogida de ADN QIAcube (QIAGEN, Valencia, CA). Todos los centros contaron con un protocolo de actuación para el correcto procesamiento, almacenamiento y envío de las muestras.

Para centralizar la recepción de las muestras, éstas fueron recogidas en cada centro participante en el proyecto y fueron enviadas a Secugen, mediante una empresa de transporte especializada en envíos de muestras biológicas y debidamente etiquetadas (Anexo 4). Los envíos de las muestras se realizaron de acuerdo a la legislación vigente sobre transporte de muestras biológicas.

Las muestras fueron analizadas en Secugen S.L., compañía española con una gran experiencia en DMAE y análisis de los genes del complemento. Después de la finalización del estudio y tras el consentimiento del paciente, las muestras de ADN fueron incorporadas al Biobanco de la Universidad de Navarra e incluidas en la colección DNAtecaDMAE, que es gestionado por la Universidad de Navarra.

6.2.2 Genotipado

La empresa Secugen S.L. se encargó de que el ADN extraído de cada paciente fuera purificado mediante plataformas robóticas y almacenado en congelación. El genotipado se realizó utilizando las técnicas de PCR y extensión (ABI Snapshot, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A los fragmentos identificados se les aplicó electroforesis en un secuenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los fragmentos resultantes fueron analizados mediante el software Applied Biosystems GeneMapper Software v4.0. Todos los polimorfismos analizados en este estudio, se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Una vez analizados los genotipos de los genes candidatos generados en este proyecto, los resultados se trasladaron a la base de datos de los pacientes generada en el estudio.

6.2.3 Polimorfismos estudiados.

Se realizó una intensa revisión de la literatura sobre las asociaciones genéticas en DMAE y la respuesta a antiVEGF para identificar los SNP que mostraban la asociación más significativa. Además se valoraron genes relacionados con el mecanismo de respuesta a los antiVEGF. Estos SNP fueron seleccionados para el estudio (tabla 5).

Tabla 5: Características de los SNP candidatos genotipados.

dbSNP ID	Gen	Región cromosómica	Major/Minor Allele	HWE
rs1061170	CFH	1q32	T/C	0,54
rs800292	CFH	1q32	G/A	0,77
rs10490924	ARMS2	10q26,13	G/C	0,54
rs1136287	SERPINF1	17p13,3	C/T	0,59
rs12603486	SERPINF1	17p13,3	G/A	0,72
rs7993418	VEGFR	13q12	C/T	0,65
rs3025000	VEGFA	6p12	C/T	0,05
rs699947	VEGFA	6p12	A/C	1
rs12614	CFB	6p21,3	C/T	0,13

SNP: *Single nucleotide polymorphism* (dbSNP1D); HWE: test exacto para el equilibrio de Hardy-Weinberg

6.3

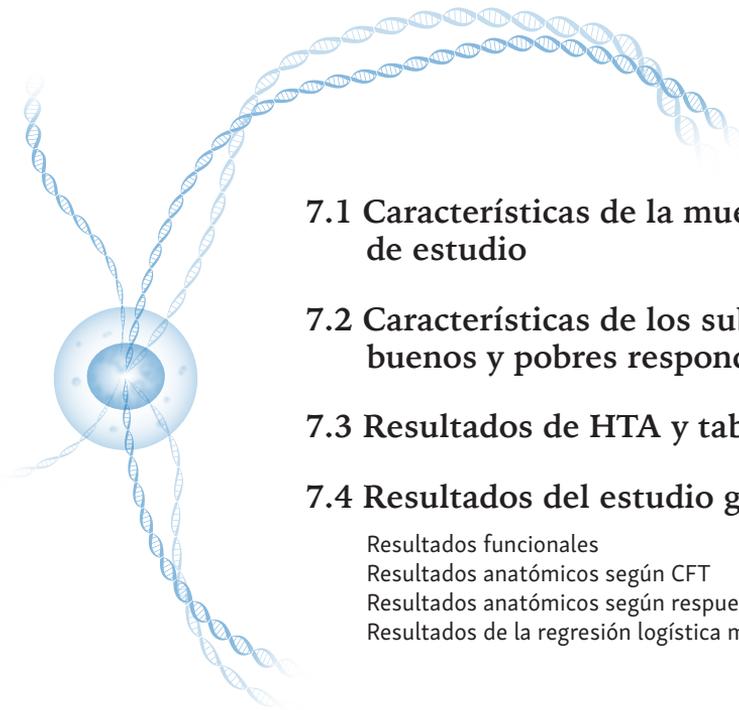
Metodología Análisis de los datos

Las variables continuas (edad actual y edad en el momento del diagnóstico) se dividieron en dos grupos y el valor mediano para estas variables se utilizó como punto de corte y se codificaron como variables categóricas. Se utilizó un modelo de regresión logística multivariable para estudiar la asociación entre los nueve SNP y la respuesta del paciente (BR o PR) a ranibizumab. El modelo se ajustó para tener en cuenta las variables ambientales, que se incluyeron como covariables en el modelo de regresión.

Se utilizó una regresión logística univariante, ajustada para todas las covariables, para estimar las *odds ratios* (OR) y los intervalos de confianza del 95 % (IC del 95 %) utilizando el software SNPtats (Sole X. *et al.*, 2006). Los análisis se realizaron para cada variante genética independientemente de otras variantes usando modelos genéticos codominantes, dominantes, recesivos y/o sobredominantes basados en los criterios de información Akaike (AIC), que selecciona el modelo de herencia que mejor se ajuste a los datos. La corrección para múltiples pruebas se realizó utilizando el método de Bonferroni. Para todos los análisis, $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Se realizó una regresión logística multivariante utilizando el software estadístico SPSS, v.20 (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU).

7

Resultados



7.1 Características de la muestra de estudio

7.2 Características de los subgrupos: buenos y pobres respondedores

7.3 Resultados de HTA y tabaquismo

7.4 Resultados del estudio genético

Resultados funcionales

Resultados anatómicos según CFT

Resultados anatómicos según respuesta del fluido

Resultados de la regresión logística multivariable

7.1

Resultados Características de la muestra de estudio

Los pacientes incluidos en el estudio fueron reclutados en distintas poblaciones españolas de seis hospitales miembros del Grupo Español Multicéntrico de DMAE y la Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RD07/0062) (tabla 6): Hospital Universitario de Bellvitge, Clínica Universidad de Navarra, Hospital Clínico de Madrid, Hospital Ramón y Cajal, Complejo asistencial Universitario de Salamanca y Hospital Universitario Santiago de Compostela.

Tabla 6. Procedencia de los pacientes de la muestra del estudio

Centro	Lugar	Casos
Complejo asistencial Universitario de Salamanca	Salamanca	140
Hospital Clínico de Madrid	Madrid	102
Clínica Universidad de Navarra	Navarra	79
Hospital Universitario de Bellvitge	Barcelona	63
Hospital Ramón y Cajal	Madrid	10
Hospital Universitario Santiago de Compostela	Santiago de Compostela	9
	Total	403

Se contó con la participación de 403 individuos. En el total de los individuos participantes se realizó toma de muestra de mucosa oral y posterior análisis del genotipo de los nueve SNP diana. Las características generales del total de los individuos estudiados se resumen en la tabla 7. De los 403 pacientes, 230

fueron mujeres (57%) y 173 hombres (43%), la media de edad era de 80,8 (media \pm desviación estándar (DE): 80,08 \pm 7,0 años), de estos individuos eran fumadores 92 (22,8%) y estaban diagnosticados de HTA 257 (63,7%). Los pacientes recibieron un total de 6,07 inyecciones (6,07 \pm DE 3,76) al cabo de los 12 meses de tratamiento. El 23% eran membranas neovasculares clásicas, un 26% predominantemente clásicas, 20% mínimamente clásicas y un 31% eran membranas neovasculares ocultas. Un 34% de los pacientes estaban intervenidos de cataratas y un 66% eran fágquicos. Ninguno de ellos se intervino de cirugía de cataratas durante los 12 meses de seguimiento. La evolución de la agudeza visual y del CFT en el total de los pacientes a lo largo de los 12 meses se muestra en la figura 18A y 18B respectivamente.

Tabla 7. Características generales de la muestra de pacientes.

Total de la muestra	
Total	403
Edad (m \pm DE)	80,08 \pm 7,0
Sexo Femenino (%)	230 (57)
Fumadores (%)	92 (22,8)
HTA (%)	257 (63,7)
Pseudofágquicos (%)	137 (34)
Nº inyecciones/año (m \pm DE)	6,07 \pm 3,76
Tipo de MNVSR (%)	Clásicas: 23 Predominantemente clásicas: 26 Mínimamente clásicas: 20 Ocultas: 31

HTA: hipertensión arterial; MNVSR: membrana neovascular subretiniana

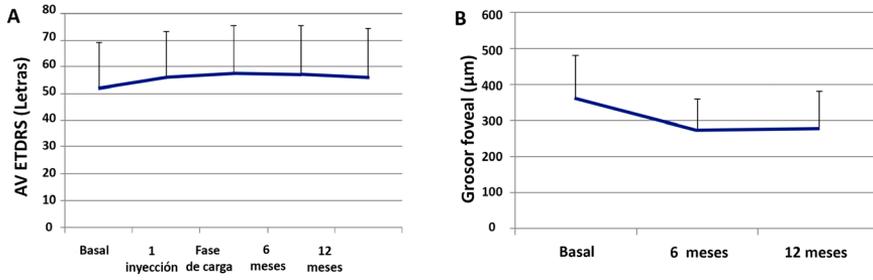


Figura 18. A. evolución de la AV a lo largo de 12 meses del total de los pacientes. B. Evolución del CFT a lo largo de 12 meses del total de los pacientes.

7.2

Resultados Características de los subgrupos: buenos y pobres respondedores

Los pacientes fueron clasificados en dos subgrupos –buenos y pobres respondedores– según su respuesta al tratamiento con ranibizumab en cada uno de los puntos de estudio, que fueron tras la fase de carga (a los 3 meses) y a los 12 meses del tratamiento, y según los criterios establecidos en el protocolo del estudio (ver 6.1.5).

No existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad o el número de inyecciones recibidas entre ambos subgrupos. Tampoco se observaron diferencias en cuanto al sexo, excepto al comparar BR y PR según criterios anatómicos (CFT) tras la fase de carga, observándose mayor número de mujeres en el grupo de los pobres respondedores ($p=0,015$; Odds Ratio (OR) 1,6 Intervalo de confianza (IC) 95 % 1,1-2,5) (tabla8, página siguiente).

Tabla 8. Características de la población de estudio y subgrupos según su respuesta al Ranibizumab.

	Total	Respuesta funcional (AV)						Respuesta anatómica (CFT)						Criterio Fluido					
		Fase de Carga			12 meses			Fase de Carga			12 meses			Fase de Carga			12 meses		
		BR	PR	OR 95%CI	BR	PR	OR 95%CI	BR	PR	OR 95%CI	BR	PR	OR 95%CI	BR	PR	OR 95%CI	BR	PR	OR 95%CI
Número	403	306	97	264	139		192	210		214	189		247	156		236	167		
Edad Media (±DE)	80,8 (±7,0)	80,8 (±6,7)	79,9 (±7,9)	81,2 (±6,9)	79,5 (±7,1)	NS	81,2 (±6,9)	79,5 (±7,1)	NS	81,1 (±7,8)	79,8 (±7,7)	NS	81,7 (±6,5)	78,9 (±7,5)	NS	81,3 (±6,5)	79,8 (±7,6)	NS	
Mujeres (%)	230 (57)	170 (55,5)	55 (56,7)	139 (52,7)	80 (57,6)	NS	101* (52,6)	136* (65,0)	1,6 (1,1-2,5)	118 (55,1)	108 (57,1)	NS	139 (56,3)	89 (57,1)	NS	123 (52,1)	101 (60,5)	NS	
Fumadores (%)	92 (22,8)	66 (21,6)	25 (25,8)	64 (24,2)	34 (24,5)	NS	53 (27,6)	51 (24,1)	NS	49 (22,9)	49 (25,9)	NS	46 (18,6)	39 (25,0)	NS	42* (17,8)	45* (26,9)	1,7 (1,1-2,7)	
HTA (%)	257 (63,7)	195 (63,7)	64 (66,0)	180 (68,2)	90 (64,7)	NS	106† (55,2)	152† (72,2)	3,7 (2,4-5,8)	110* (51,4)	137* (72,5)	2,3 (1,5-3,4)	157 (63,6)	88 (56,4)	NS	141 (59,7)	104 (62,3)	NS	

BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confianza al 95%; AV: agudeza visual; CFT: grosor central foveal.

† p < 0,05 vs. total de los pacientes; * p < 0,05 BR vs. PR; * p < 0,001 BR vs. PR

7.3

Resultados HTA, tabaquismo y sexo femenino

Nuestros datos muestran que la HTA fue un claro factor de riesgo para una respuesta anatómica deficiente. La ausencia de reducción del CFT a los 3 meses parece más frecuente entre los pacientes hipertensos que entre los que carecen de este antecedente patológico. Una comparación del grupo completo con el subgrupo de pacientes con BR después de la fase de carga ($p=0,048$, OR, 0,7, IC 95 %, 0,5-0,9) y después de 12 meses de tratamiento ($p=0,003$; OR: 0,6, IC95 % 0,4-0,8) reveló una diferencia estadísticamente significativa. Esta diferencia fue aún mayor cuando se comparó la presencia de hipertensión entre el subgrupo BR frente a PR después de la fase de carga ($p = 0,0004$, OR 3,7, IC 95 %, 2,4-5,8) y después de 12 meses de tratamiento ($p = 0,00001$, OR 2,3, IC 95 % 1,5-3,4).

El antecedente de tabaquismo se presenta como un probable factor de riesgo para no lograr una mácula seca a los 12 meses de tratamiento (BR vs. PR: $p = 0,036$, OR 1,7; IC del 95 % 1,1-2,7). No se observaron estas diferencias en la respuesta funcional y en la respuesta en cuanto al grosor central foveal. Con todos estos resultados, parece probable que el antecedente de hábito tabáquico, no sólo es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, sino también un factor implicado en una pobre respuesta al tratamiento con ranibizumab intravítreo.

Las mujeres obtuvieron una peor respuesta anatómica tras la fase de carga $p=0,015$ OR 1,6 (1,1-2,5). Estas diferencias en cuanto al sexo tampoco se observan en la respuesta de la agudeza visual, ni se observaron al año de tratamiento.

Todos los resultados en cuanto a la relación con el tabaquismo, el sexo y la HTA se muestran en la tabla 8.

7.4.1 Resultados funcionales

La tabla 9 expone los resultados farmacogenéticos más relevantes del análisis univariante tras la fase de carga en los subgrupos de BR y PR funcional. Según los resultados de agudeza visual el alelo A de rs12603486 (*SERPINF1*) se asocia con riesgo de PR (OR 2; IC 95 % 1,4-3; $p = 2 \times 10^{-4}$; p corregida = 0,0018). Según el modelo recesivo, los genotipos GG/GA vs. el genotipo AA, se asocian también con una pobre respuesta funcional (OR, 4,4; 95 % CI, 1,0-10,0; $p = 5 \times 10^{-4}$; p corregida = 0,0045).

Según el modelo sobredominante, los pacientes con el genotipo C/T vs. C/C-T/T en rs12614 (*CFB*) tuvieron mayor probabilidad de obtener mejores resultados de agudeza visual (OR 0,5; IC 95 %, 0,2-0,9; $p = 0,03$; $p = 0,27$), aunque este resultado ya no era significativo después de la corrección de Bonferroni. El anexo 5 muestra los resultados funcionales completos del análisis univariante tras la fase de carga.

Los resultados funcionales completos tras 12 meses de tratamiento se muestran en el anexo 6. Ningunos de los SNP estudiados muestra asociación alguna con la respuesta funcional de los pacientes con DMAE tras el tratamiento con ranibizumab durante un año.

7.4.2 Resultados anatómicos según CFT

La tabla 9 expone los resultados farmacogenéticos más relevantes del análisis univariante tras la fase de carga en los subgrupos de BR y PR anatómica según CFT. En cuanto a los resultados anatómicos después de la fase de carga,

Tabla 9. Resultados más relevantes tras la fase de carga.

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo *p no corregida	Alelo **p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotipo (%)	Modelo genético	*p	**p corregida	OR (IC95%)
Respuesta Funcional												
rs12614	CFB	C,T	GR:T,0,15 PR:T,0,11	0,13	0,7 (0,3-1,2)	CC/CT/TT	0,72	0,25	0,02	Ov	0,03	0,5 (0,2-0,9)
							0,82	0,14	0,04			
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR:A,0,27 PR:A,0,43	0,0002	2,0 (1,4-3,0)	GG/GA/AA	0,52	0,43	0,05	Re	5 × 10 ⁻⁴	4,4 (1,9-10,0)
							0,34	0,47	0,19			
Respuesta Anatómica												
Grosor Central Foveal												
rs1061170	CFH	C,T	GR:C,0,52 PR:C,0,43	0,096	0,7 (0,4-1,1)	CC/CT/TT	0,31	0,43	0,27	Do	0,041	0,5 (0,2-0,9)
							0,27	0,31	0,42			
rs800292	CFH	G,A	GR:A,0,13 PR:A,0,14	0,729	1,1 (0,6-2,1)	AA/GA/GG	0	0,26	0,74	Re	0,0048	NA (0,0-NA)
							0,01	0,26	0,73			
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR:A,0,37 PR:A,0,27	0,04	0,65 (0,4-1,0)	GG/GA/AA	0,5	0,4	0,05	Do	0,11	0,6 (0,3-1,3)
							0,3	0,5	0,2			
rs7993418	VEGFR1	T,C	GR:C,0,27 PR:C,0,15	0,012	0,5 (0,3-0,9)	CC/TC/TT	0,05	0,43	0,52	Do	0,01	0,4 (0,2-0,9)
							0,02	0,26	0,72			
Respuesta fluido												
rs800292	CFH	G,A	GR:A,0,12 PR:A,0,17	0,126	1,4 (0,9-2,2)	AA/GA/GG	0,03	0,19	0,78	Ov	0,03	1,78 (1,1-3,1)
							0,03	0,27	0,70			
rs999947	VEGFA	C,A	GR:A,0,49 PR:A,0,43	0,136	0,8 (0,6-1,0)	AA/CA/CC	0,23	0,52	0,25	Do	0,044	0,6 (0,4-0,9)
							0,21	0,45	0,34			

MAF: minor allele frequency; BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza;

Do: dominante; Re: recesivo; Ov: sobredominante.

* p no corregida: valor del modelo de regresión logística; Valor de p significativa < 0,05; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

Tabla 10. Resultados más relevantes tras 12 meses de tratamiento

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo *p no corregida	Alelo **p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotipo (%)	Modelo genético	*p	**p corregida	OR (IC95%)	
Respuesta Anatómica													
Grosor Central Foveal													
rs1136287	SERPINF1	T, C	GR:C, 0,27 PR:C, 0,39	0,02	0,18	1,7 (1,0-2,8)	CC/TC/TT	0,08 0,16 0,47	0,54 0,37 0,37	Do	0,03	0,27	2,1 (1,1-4,2)
							CC/TC/TT	0,03 0,07	0,42 0,26				
rs7993418	VEGFR1	T, C	GR:A, 0,24 PR:A, 0,20	0,3	0,7 (0,4-1,3)		CC/TC/TT	0,03 0,07	0,42 0,26	Ov	0,03	0,27	0,5 (0,2-0,9)
							CC/TC/TT	0,03 0,07	0,42 0,26	0,55 0,68			
Respuesta fluido													
rs800292	CFH	G, A	GR:A, 0,11 PR:A, 0,17	0,022	0,19	1,7 (1,0-2,7)	AA/GA/GG	0,02 0,04	0,19 0,27	Do	0,028	0,25	1,8 (1,1-3,1)
							AA/GA/GG	0,02 0,04	0,19 0,27	0,79 0,69			

MAF: *minor allele frequency*; BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza; Do: dominante; Re: recesivo; Ov: sobredominante.

* p no corregida: valor del modelo de regresión logística; Valor de p significativa < 0,05; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

el alelo G de rs1136286 (*SERPINF1*) se asoció con menos reducción de CFT (OR 1,5; IC del 95 %, 1,1-2,0; $p = 0,02$; p corregida = 0,18), pero sin alcanzar significación estadística tras la corrección de Bonferroni. Los genotipos T/C-C/C vs. T/T de rs1061170 (*CFH*) y rs7993418 (*VEGFRI*) se asociaron con una mejor respuesta anatómica en el modelo dominante ($p = 0,04$ y $p = 0,02$, respectivamente). En el modelo recesivo, AA vs. GG/GA de rs800292 (*CFH*) se asoció con una pobre respuesta anatómica ($p = 0,0048$, corregido $p = 0,043$).

La tabla 10 resume los resultados farmacogenéticos más relevantes según la respuesta anatómica de CFT del análisis univariante después de 12 meses de tratamiento. El alelo C de rs1136287 (*SERPINF1*) se asoció con menor reducción de CFT (OR 1,7, IC 95 %, 1,1-2,8, $p = 0,02$, p corregida = 0,18). En el modelo dominante, los pacientes con genotipos C/T y C/C presentaban 2,1 veces (IC 95 %, 1,1-4,2, $p = 0,03$, p corregida, 0,27) mayor probabilidad de tener una respuesta anatómica deficiente que los pacientes portadores del genotipo T/T. En el modelo sobredominante, el genotipo C/T de rs7993418 (*VEGFRI*) se asoció con una buena respuesta anatómica (OR 0,5, IC 95 %, 0,2-0,9; $p = 0,03$), pero este hallazgo no fue estadísticamente significativo después de la corrección de Bonferroni (p corregida = 0,27).

Los anexos 7 y 8 muestran los resultados farmacogenéticos de la respuesta anatómica según el grosor central foveal tras la fase de carga y tras 12 meses de tratamiento.

7.4.3 Resultados anatómicos según respuesta del fluido

La tabla 9 presenta los resultados farmacogenéticos más relevantes del análisis univariante tras la fase de carga en los subgrupos de BR y PR anatómica según la presencia o ausencia de fluido en la OCT. Según el modelo dominante, los genotipos A/A y G/A de rs800292 (*CFH*) se asocian a una persistencia de fluido en la OCT (OR 1,7, IC 95 % 1,01-2,85, $p = 0,047$, p corregida = 0,42). Sin embargo, los genotipos A/A y C/A del rs69947 (*VEGFA*), se asocian con una mejor respuesta y una ausencia de fluido en la OCT (OR 0,59, IC 95 % 0,36-0,99, $p = 0,044$, p corregida = 0,39).

En cuanto a la presencia o ausencia de fluido intrarretiniano en la OCT a los 12 meses, el alelo A de rs800292 (*CFH*) fue más prevalente en pacientes que no habían logrado una mácula seca (OR 1,7; IC del 95 %, 1,1-2,7; $p = 0,02$, p corregida = 0,19). De manera similar que tras la fase de carga, G/A y A/A fueron los genotipos más prevalentes en este grupo de líquido intrarretiniano persistente según el modelo dominante presentando un riesgo de 1,8 respecto

del genotipo GG (OR 1,8, IC 95 %, 1,1-3,1, $p = 0,028$, p corregida = 0,25 (tabla 10).

Los anexos 9 y 10 muestran los resultados completos de la respuesta anatómica según la presencia o ausencia de fluido intra y subretiniano en la OCT.

7.4.4 Resultados de la regresión logística multivariable

En las tablas 11 y 12 se resumen los resultados del análisis de regresión logística multivariable, que confirmó los resultados obtenidos en los análisis univariantes. Después de la fase de carga, las variantes de los genes *SERPINF1*, *VEGFR1* y *VEGFA* se asociaron fuertemente con la respuesta al ranibizumab. Los factores ambientales como el tabaquismo y la hipertensión, así como el sexo femenino, también se asociaron con peores resultados del tratamiento. Los pacientes ancianos (edad media del grupo > 80 años) parecen tener mejores resultados con el tratamiento con ranibizumab en comparación con los no ancianos.

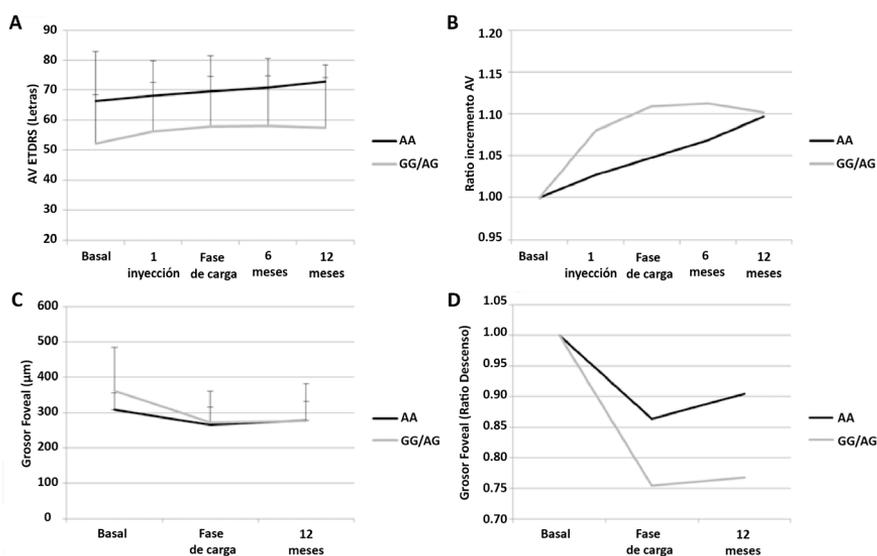


Figura 19. A. Evolución de AV en los pacientes con genotipo AA y genotipo GG/GA de rs800292 (CFH). B. Incremento de la AV en los pacientes con genotipo AA y los pacientes con genotipo GG/GA. Durante los primeros meses de tratamiento la pendiente del incremento de AV es mayor en el subgrupo de pacientes con genotipo GG/GA en comparación con los pacientes del genotipo protector AA. C. Evolución del CFT en los pacientes con genotipo AA y genotipo GG/GA. D. Disminución del CFT en los pacientes con genotipo AA y los pacientes con genotipo GG/GA. Durante los primeros meses de tratamiento la pendiente del descenso del CFT es mayor en el subgrupo de pacientes con genotipo GG/GA en comparación con los pacientes del genotipo protector AA.

Tabla 11. Análisis de regresión logística multivariable tras la fase de carga.

	B	Sig.	OR	IC 95%	
				Inferior	Superior
Respuesta Anatómica					
Edad (ancianos)	-0,45	0,048	0,64	0,41	0,99
rs12603486 (SerpínF1)		0,089			
rs12603486 (G/G)	-0,86	0,046	0,43	0,19	0,98
rs12603486 (G/A)	0,52	0,224	1,69	0,72	3,92
rs7993418 (VEGFR1)		0,036			
rs7993418 (T/T)	1,00	0,27	2,72	0,46	16,04
rs7993418 (C/T)	0,07	0,94	1,07	0,17	6,65
Constante	-0,33	0,73	0,72		
Respuesta Funcional					
rs12614 (CFB)		0,054			
rs12614 (C/C)	-0,74	0,330	0,48	0,11	2,11
rs12614 (C/T)	-1,57	0,058	0,21	0,04	1,05
rs12603486 (SerpínF1)		0,001			
rs12603486 (G/G)	-1,75	0,000	0,17	0,07	0,43
rs12603486 (G/A)	-1,16	0,010	0,31	0,13	0,75
Constante	1,09	0,205	2,96		
Respuesta Fluido					
HTA (si)	0,43	0,075	1,53	0,95	2,46
rs699947 (VEGFA)		0,089			
rs699947 (C/C)	0,58	0,083	1,79	0,92	3,5
rs699947 (C/A)	0,03	0,924	1,03	0,56	1,89
Edad (ancianos)	-0,80	0,001	0,45	0,28	0,72
Constante	-0,05	0,880	0,95		

Referencia: Buena Respuesta; B: valor de la regresión logística multivariable; Sig: Significancia P-valor (< 0,05); IC95%: 95% intervalo de confianza. Edad (ancianos)= pacientes >80 años (edad media de la muestra).

Tabla 12. Análisis de regresión logística multivariable tras 12 meses de tratamiento.

	B	Sig.	OR	IC 95%	
				Inferior	Superior
Respuesta Anatómica					
Edad (ancianos)	-0,74	0,036	0,48	0,24	0,95
HTA (sí)	1,10	0,003	3,01	1,45	6,21
rs1136287		0,065			
rs1136287 (C/C)	1,15	0,044	3,16	1,03	9,65
rs1136287 (C/T)	0,65	0,077	1,92	0,93	3,97
Constante	-0,96	0,009	0,38		
Respuesta Funcional					
Constante	-0,57	0,000	0,56		
Respuesta Fluido					
Sexo (femenino)	0,69	0,011	1,98	1,17	3,35
Tabaquismo (sí)	0,82	0,01	2,29	1,22	4,30
Constante	-0,98	0,000	0,38		

Referencia: Buena Respuesta; B: valor de la regresión logística multivariable; Sig: Significancia P-valor (< 0,05); IC95%: 95% intervalo de confianza.

También se analizó la asociación entre estos SNP y variables continuas como CFT y agudeza visual. Curiosamente, los pacientes que tenían un genotipo protector (AA) de rs800292 (*CFH*) para la DMAE neovascular tenían mejor agudeza visual antes del tratamiento que los pacientes con otros genotipos (AG/GG), pero su respuesta al ranibizumab fue significativamente inferior en términos de AV después la primera inyección y después de la fase de carga. Mejoran más gradualmente que los pacientes con genotipos AG/GG, que tienen una respuesta intensa durante los primeros 3 meses de tratamiento, con una estabilización final. Sin embargo, su agudeza visual final a los 12 meses fue peor que la de los pacientes con genotipo AA (figuras 19, página anterior, y 20, próxima página).

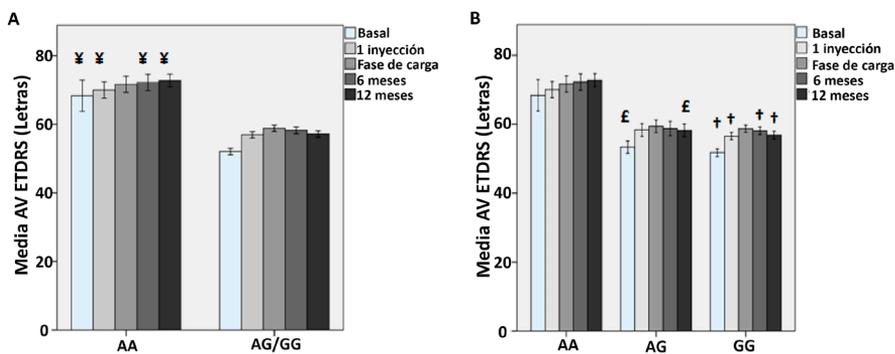
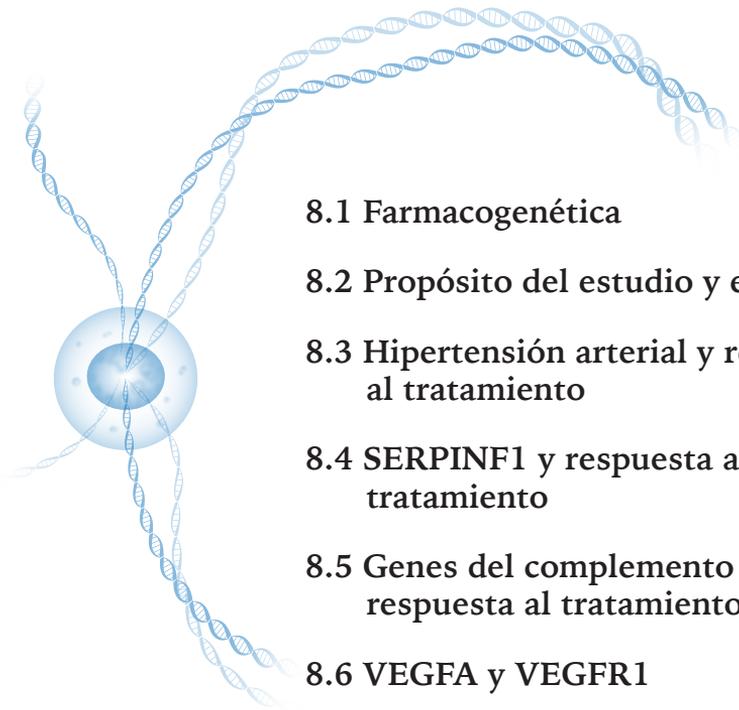


Figura 20. Comparación de los resultados funcionales de los pacientes con genotipo AA frente a AG y GG de rs800292 (CFH). Se observan diferencias estadísticamente significativas en la AV basal, en AV tras la primera inyección, a los 6 meses y a los 12 meses del tratamiento.

8

Discusión



8.1 Farmacogenética

8.2 Propósito del estudio y escenario

8.3 Hipertensión arterial y respuesta al tratamiento

8.4 SERPINF1 y respuesta al tratamiento

8.5 Genes del complemento y respuesta al tratamiento

8.6 VEGFA y VEGFR1

8.7 Resultados de otros estudios de farmacogenética

8.8 Fortalezas y limitaciones del estudio

8.1

Discusión Farmacogenética

El investigador británico Archibald Garrod fue el primero en reconocer una tendencia familiar o genética en la variabilidad de la respuesta a fármacos. Su hipótesis se basaba en que las drogas son metabolizadas por diferentes vías, y que defectos en los enzimas que las componen puede resultar en diferencias en las concentraciones, y por tanto, del efecto de la sustancia.¹⁴⁴ En 1940 esta teoría fue validada tras la observación de una alta incidencia de hemólisis entre los pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa tras la exposición a antimaláricos. Otros estudios con gemelos homocigotos y gemelos dicigotos mostraron la fuerte tendencia hereditaria en la metabolización de los fármacos.¹⁴⁵

Actualmente, los estudios de farmacogenética se han extendido entre las diferentes especialidades de la medicina, y así son frecuentes en el estudio de la patología respiratoria como el asma, en la psiquiatría, en la patología cardiovascular y en el estudio del cáncer.

8.2

Discusión Propósito del estudio y escenario

Dadas las diferencias existentes entre la respuesta al tratamiento de los pacientes con DMAE neovascular tratadas con ranibizumab planteamos la hipótesis de que esta variabilidad en la respuesta observada en la práctica clínica podría ser explicada por las diferencias en el genotipo.

Es bien conocido que los factores genéticos tienen un papel fundamental en el riesgo de desarrollo y progresión de los diferentes subtipos de DMAE. En los últimos años, los estudios de genética han centrado su atención en la respuesta anatómica y funcional al tratamiento con antiVEGF de los pacientes con DMAE neovascular.¹⁴⁶⁻¹⁶⁵ Son varios los factores que han hecho centrar la investigación en la respuesta al tratamiento de los pacientes con DMAE. El primer factor es la prevalencia de la enfermedad, que tal y como se comentó previamente, es elevada y se prevé su aumento en los próximos años dado el envejecimiento que sufre la población. El segundo factor es el elevado coste del tratamiento, tanto en términos de tiempo empleado por los oftalmólogos como en términos de costes de los fármacos antiVEGF, entre ellos ranibizumab, ya que la administración es en muchos caso mensual y el tratamiento puede durar varios años.

Además, aunque los resultados de los fármacos antiVEGF en la DMAE neovascular son mejores que los conseguidos previamente con terapia fotodinámica y mucho mejores que en la era pre-tratamiento, hasta un 15 % de los pacientes empeoran a pesar del tratamiento. Es por todo ello que es de gran interés poder predecir la respuesta de los pacientes con DMAE al tratamiento con ranibizumab.

Algunos de los estudios de farmacogenética en DMAE son ensayos clínicos,⁴⁶ con todos los beneficios e inconvenientes que ello conlleva:

- No reflejan las condiciones habituales de la práctica clínica diaria.
- Poseen estrictos criterios de inclusión y exclusión, por tanto tienen una alta homogeneidad, pero son menos representativos de la población general y con un posible sesgo genético.

Otros trabajos son estudios clínicos con tamaños de muestra pequeños y que en muchos casos sólo estudian genes asociados con el riesgo de desarrollo de DMAE y no genes relacionados con la respuesta antiVEGF. Los resultados han sido ambiguos y contradictorios en muchos de ellos. De hecho, en lugar de aclarar esta cuestión, la investigación disponible parece haber generado más confusión, tal vez debido a las diferencias metodológicas y demográficas entre los diversos estudios.

También es posible que las discrepancias farmacogenéticas que se observan se deban a diferencias genéticas entre las diferentes cohortes de pacientes de diferentes países y continentes, y también a diferencias en la prevalencia de factores ambientales con la HTA.

Nuestro estudio, por el contrario, se trata de un estudio retrospectivo de la práctica clínica diaria que incluye una gran muestra de pacientes con DMAE, altamente representativa de la población de DMAE neovascular en España y en el que se evalúan no solo genes relacionados con el riesgo de DMAE sino genes relacionados con la respuesta a los antiVEGF.

Después de un primer estudio piloto realizado con un pequeño tamaño de muestra y analizando únicamente tres SNP (*ARMS2* rs10490923, *CFH* rs1410996 y *HTRA1* rs11200638), donde no se encontró asociación con la respuesta al ranibizumab,¹⁴⁷ decidimos realizar un estudio aumentando el tamaño de la muestra y estudiando genes no solo relacionados con riesgo de padecer DMAE, sino también con el VEGF, su receptor y moléculas antagonistas como serpina o PEDF. Se agruparon a los pacientes en uno de los dos grupos —buenos o malos respondedores— según su respuesta (agudeza visual y anatómica) al tratamiento con ranibizumab en dos momentos: después de la dosis de carga y después de 12 meses de seguimiento. Debido a que la agudeza visual puede ser una medida subjetiva y puede no correlacionarse bien con los cambios en la anatomía macular detectados por OCT, se evaluó la respuesta al tratamiento utilizando tanto las medidas de agudeza visual como los resultados tomográficos. Por esta razón, se utilizó, además de la respuesta funcional medida mediante AV, el CFT y la presencia o ausencia de líquido intrarretiniano y subretiniano como medidas cuantitativas objetivas.

8.3

Discusión Hipertensión arterial y respuesta al tratamiento

La hipertensión arterial es un conocido factor de riesgo para el desarrollo de DMAE. Además de ciertas asociaciones genéticas, los factores ambientales como la hipertensión, la edad, el género y el hábito de fumar también se han relacionado con el desarrollo y progresión de la DMAE.

De acuerdo con nuestros resultados, no sólo la hipertensión es el factor ambiental más fuertemente asociado con el desarrollo de DMAE, sino que se asocia con una respuesta pobre al ranibizumab, hallazgo que no se ha descrito previamente. Los pacientes hipertensos presentaron una peor respuesta a nivel anatómico que los pacientes que carecían de este antecedente, es decir tuvieron menor reducción en el CFT, aunque esta repercusión no se tradujo en peores agudezas visuales. Estas diferencias fueron patentes tras la fase de carga (OR 3,7; IC 95 % 2,4-5,8; $p < 0,001$) y también tras el año de tratamiento (OR 2,3; IC95 % 1,5-3,4; $p < 0,001$).

Hasta donde conocemos nunca antes se había publicado en la literatura que la respuesta al tratamiento con antiVEGF en los pacientes con DMAE pudiera estar influida por la presencia de HTA. Este factor ambiental podría explicar las discrepancias farmacogenéticas entre las cohortes de pacientes de diferentes países.

La explicación de por qué la HTA puede producir peores resultados en el tratamiento antiVEGF no resulta fácil. Los pacientes hipertensos y con arteriosclerosis, tienen alteraciones en la circulación coroidea, con una reducción del flujo vascular además de un aumento de los depósitos a nivel de la membrana de Bruch, lo que ocasiona una disminución de la permeabilidad.⁷⁵ Esto parece estar relacionado con la susceptibilidad de estos individuos a sufrir DMAE,

y parece también ser la razón por la que la respuesta de los neovasos frente al ranibizumab sea inferior. Además, tal y como se ha visto en los resultados, la peor respuesta se observa a nivel anatómico, lo que encajaría con esta teoría de la reducción de la permeabilidad.

Sin embargo, se abren dudas sobre el papel que un buen control de la tensión arterial podría tener en el tratamiento de los pacientes con DMAE neovascular. Hasta ahora, ha sido de interés la HTA en su relación con la retinopatía diabética, pero si nuestros resultados son confirmados por otros estudios, quizás también cobre un papel importante en los pacientes DMAE.

8.4

Discusión SERPINF1 y respuesta al tratamiento

SERPINF1 (o PEDF) es una proteína de 50kDa de la superfamilia de los inhibidores de las serínproteasas, secretada por células del epitelio pigmentado de la retina. Es un factor neurotrófico y neuroprotector, que promueve la diferenciación neuronal. Además, se ha demostrado que es un potente angiogénico en cultivo celular y en modelos animales, inhibiendo la migración de las células endoteliales y promoviendo su apoptosis. SERPINF1 también contribuye a la regulación del crecimiento de los vasos sanguíneos en el ojo mediante la creación de un ambiente permisivo para la angiogénesis cuando el oxígeno es limitado (como en tumores tipo retinoblastoma o en retinopatías) y un entorno inhibitorio cuando la concentración de oxígeno es normal o alto.¹⁴⁸

Algunos estudios demuestran el balance crítico que existe entre el VEGF y el PEDF. La deficiencia de este último crearía un ambiente permisivo para la neovascularización asociada a la DMAE. Se han observado niveles bajos de este factor en vítreo, retina y coroides de pacientes con DMAE.¹⁴⁹ Se observa también en estudios de inmunohistoquímica una disminución de la inmunorreactividad del PEDF en células del EPR y en la membrana de Bruch en ojos con DMAE neovascular.¹⁴⁹

En el estudio de Lin y colaboradores publicado en el año 2008 se observó una asociación del genotipo TT del SNP rs1136287 del gen *SERPINF1* con la DMAE neovascular.¹⁵⁰ El potencial terapéutico de esta molécula ha sido incluso estudiado en modelos animales, con inyección subretiniana, intravítrea o periocular de un vector adenovírico que codifica el PEDF, produciendo una supresión de la neovascularización coroidea.¹⁵¹

Dado el importante papel de SERPINF1 en la vía de la angiogénesis y probablemente también en el desarrollo de la NVC en la DMAE, no es sorprendente

que esta proteína pueda ser un biomarcador importante en la farmacogenética de la DMAE.

Varios autores han estudiado la asociación entre *SERPINF1* (rs1136287) y los resultados visuales tras el tratamiento con bevacizumab o ranibizumab intravítreo.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Park y colaboradores publicaron en 2014 dos estudios, en el primero analizando veintitrés SNP en 273 pacientes¹⁵² y el segundo analizando diecisiete SNP en 394 pacientes.¹⁵³ En este último estudio se analizó, no solo la respuesta funcional en cuanto a mejora de AV, sino los resultados anatómicos medidos por OCT. En ninguno de los dos estudios encontraron asociación alguna del SNP rs1136287 con la respuesta al tratamiento con ranibizumab y bevacizumab. Imai y colaboradores por su parte analizaron cuatro SNP del *SERPIN* (rs12150053, rs12948385, rs9913583, rs1136287) en 83 pacientes, encontrando una asociación con la respuesta funcional a bevacizumab a los 3 meses con rs1136287.

En nuestro estudio dos SNP de *SERPINF1* fueron incluidos, rs116287 y rs12603486. Nuestro trabajo es el primer estudio de farmacogenética de DMAE que incluye el SNP rs12603486 y muestra, además, la fuerte asociación estadística de éste con la respuesta funcional. El otro SNP estudiado de esta familia, rs1136287 muestra una asociación, aunque no tan intensa, con la respuesta anatómica. Los pacientes presentaron una menor reducción del CFT al año de tratamiento.

Resulta muy razonable pensar que las variantes genéticas de este importante gen relacionado con la angiogénesis puedan no solo favorecer el desarrollo de esta enfermedad sino también modular la eficacia de los fármacos antiVEGF.

8.5

Discusión Genes del complemento y respuesta al tratamiento

La teoría de la inflamación en la fisiopatología de la DMAE está apoyada por la existencia de múltiples alelos de riesgo relacionados con el complemento.^{36,92,115} Tal y como se resumió en el apartado de genética y DMAE, la vía del complemento está íntimamente relacionada con el desarrollo de esta patología, y concretamente el *CFH* fue el primer gen asociado a la DMAE, un importante descubrimiento que fue el inicio del desarrollo de importantes estudios de genética en este campo.

En nuestro estudio tres SNP de dos genes relacionados con el complemento fueron incluidos en el análisis: rs1061170 y rs800292 del gen *CFH* y rs12614 del gen *CFB*. *CFH* es un regulador de la activación basal de la vía alternativa de la cascada del complemento, y por lo tanto tiene un papel antiinflamatorio.¹⁰¹ El *CFB* sintetiza una proteína regulatoria que actúa para estabilizar C3bBb y por tanto activa la vía alternativa. Los cambios producidos en la actividad enzimática de estos factores pueden dar lugar a una activación mal controlada del sistema del complemento, con un daño en el epitelio pigmentado de la retina y con la consiguiente formación de drusas.¹¹⁰ Los estudios de haplotipos de estos genes muestran haplotipos de riesgo y haplotipos protectores.

En nuestro estudio se mostró una asociación entre la respuesta funcional tras la fase de carga y rs12614 (*CFB*), mostrando los pacientes una mejor respuesta visual. Esta asociación no se observa al año de tratamiento y tampoco mantiene la significación estadística tras la corrección de Bonferroni. Park y colaboradores incluyeron el polimorfismo rs641153 (*CFB*) en sus dos estudios de farmacogenética, sin encontrar relación funcional ni anatómica con la respuesta al tratamiento.^{152,153} Otro estudio desarrollado en Suiza por Kloeckener-Gruissem,¹⁵⁵ analizó también el mismo SNP y tampoco encontró asociación con

la respuesta farmacológica. Este gen ha sido estudiado en pocos trabajos de farmacogenética y el SNP rs12614 es la primera vez que se analiza. Nuestro trabajo es, por tanto, el primero en estudiar otro de los SNP del gen *CFB* y ha encontrado además una discreta tendencia a la mejora de los resultados con antiVEGF en sus portadores afectos de DMAE.

Por el contrario, el gen *CFH*, dada su gran importancia como factor de riesgo de DMAE, se ha añadido en prácticamente todos los estudios de farmacogenética llevados a cabo hasta el momento. Nuestro estudio incluye dos de los SNP principales de este gen en DMAE que son rs1061170 y rs80029.

Obtuvimos que el genotipo CC de rs1061170 (el genotipo de riesgo principal) se asoció significativamente con una mejor respuesta anatómica tras la fase de carga. Nuestros resultados sugieren que los pacientes con DMAE que portan el alelo de riesgo responden inicialmente mejor al ranibizumab en términos de resultados anatómicos que los pacientes sin este alelo. Este hallazgo parece contradecir otros estudios en los que los resultados en cuanto a agudeza visual y número de inyecciones fueron peores en pacientes con el genotipo de riesgo de *CFH*.^{145,154-156} Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con los reportados Por McKibbin.¹⁵⁷ Estos autores plantearon la hipótesis de que los pacientes portadores de alelos de riesgo de DMAE se beneficiarían más de la terapia anti-VEGF. En nuestro caso, únicamente se encontró que el genotipo de riesgo se asocia con una mejor respuesta anatómica, pero no a una mejor respuesta funcional. Sin embargo, después de la corrección de Bonferroni, este resultado no fue estadísticamente significativo y no se confirmó a los 12 meses de seguimiento.

El otro de los SNP del *CFH* estudiado, rs800292, muestra también un comportamiento similar al observado por el rs1061170. Los pacientes con el genotipo AA (genotipo protector) presentaron una agudeza visual significativamente mejor y menos CFT antes del tratamiento y la fase de carga, pero también tenían líquido intrarretiniano persistente después de 12 meses de tratamiento. Los pacientes con este genotipo parecen mostrar un mejor perfil inicial, pero tienen una mejora de AV sostenida, comparado con la respuesta intensa de los pacientes con un perfil de alto riesgo (genotipos GA / GG). En estos pacientes sospechamos que el genotipo protector de rs800292 podría hacer que los pacientes con DMAE desarrollen una forma menos agresiva de DMAE húmeda, y por lo tanto la respuesta anti-VEGF (especialmente después de la fase de carga) puede ser menos eficaz.

8.6

Discusión VEGFA y VEGFR1

El *VEGFA* es otro de los genes importantes en DMAE. El tratamiento de la DMAE neovascular se basa fundamentalmente en la inhibición de todas las isoformas de VEGF, y por tanto resulta plausible entender que diferentes variantes de este gen puedan dar lugar a diferentes respuestas al tratamiento antiVEGF.

Nuestro estudio incluye dos SNP del *VEGFA*, rs3025000 y rs699947. El genotipo AA de este último se asocia a una ausencia de fluido intra y subretiniano en la OCT tras la fase de carga. Esta mejor respuesta al tratamiento fue reportada también por otros autores. Uno de los trabajos en los que abordó de manera más profunda el estudio del *VEGFA* y su asociación con la respuesta terapéutica en DMAE fue el de Abedi y colaboradores.¹⁴⁶ Estudiaron siete polimorfismos de este gen, y fue precisamente el rs3025000 el que fue más frecuente entre los buenos respondedores comparado con los malos respondedores tanto a los 3 como a los 6 y a los 12 meses de tratamiento. Estos autores concluyen que los portadores del genotipo TC o TT consiguen resultados más positivos que los homocigotos para el alelo C, con un mejor resultado coste-efectividad.

Otros investigadores como Boltz y colaboradores, centraron su investigación en el VEGF, estudiando siete SNP e incluyendo el rs699947.¹⁵⁸ Concluyeron que estos polimorfismos no tenían un rol importante en la respuesta al tratamiento dado que sus resultados no llegaron a la significación estadística. Sin embargo, en el trabajo de Imai y colaboradores sí muestran una asociación entre el polimorfismo de riesgo de rs699947 y la respuesta visual de los pacientes con DMAE.¹⁵⁴ Por otra parte, otros autores confirman también esta relación, proponiendo un posible efecto acumulativo de los alelos de riesgo en

el gen *VEGFA*, *CFH* y *ARMS2*, lo que conduce a una pobre respuesta al tratamiento y a un debut más temprano de la enfermedad.¹⁵⁹

Otro gen importante relacionado con los anti-VEGF es *VEGFR1*. Este gen codifica para un receptor de tirosina quinasa (TKR) y transmite la señalización de varios miembros de la familia VEGF. La ruta de señalización de VEGFR1 desempeña también un papel importante en la angiogénesis, particularmente en condiciones patológicas tales como la DMAE.¹⁶⁰

En nuestro estudio rs7993418 (*VEGFR1*) se asoció con un buen resultado anatómico después de la fase de carga y después de 12 meses de tratamiento. La asociación entre este gen y la respuesta al tratamiento fue previamente estudiado por Hermann¹⁶¹ sin encontrar ninguna relación.

Teniendo en cuenta que es un receptor donde se unen las diferentes isoformas del VEGF, parece posible su implicación en la respuesta al tratamiento. De hecho, otro de los fármacos utilizados en DMAE, el aflibercept, simula un fragmento de este receptor así como del VEGFR2, para captar y bloquear las moléculas de VEGFA e impedir su acción.

Uno de los estudios más recientes, que evalúa 126 SNP de diferentes genes asociados a la respuesta tratamiento (*VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFR3*, *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *PGF* y *PEDF* o *SERPINF1*), solo encontró asociación estadísticamente significativa tras la corrección por comparaciones múltiples de Bonferroni, con dos SNP del VEGFR2 (rs4576072 y rs6828477).¹⁶¹ En este estudio la respuesta fue evaluada únicamente según la agudeza visual sin valorar la respuesta anatómica. Sin embargo, evalúa un importante número de SNP en una muestra de 366 pacientes.

Nuestro trabajo pone en evidencia una posible relación entre las diferentes variantes genéticas del VEGFA y VEGFR1, con la respuesta al tratamiento con ranibizumab. Esta relación parece plausible conociendo el mecanismo de acción de los fármacos utilizados en DMAE neovascular, pero deberá ser contrastada en investigaciones futuras.

8.7

Discusión Resultados de otros estudios de farmacogenética

Existen alrededor de veinte estudios de farmacogenética publicados hasta la fecha. Los principales estudios con sus resultados más significativos se encuentran resumidos en la tabla 13. Los resultados fueron valorados según la ganancia o pérdida de agudeza visual en todos ellos, excepto en ocho, en los que tuvieron en cuenta también los resultados en la mejora anatómica por OCT. La importancia de valorar los cambios en la OCT en cuanto a grosor central foveal y presencia de fluido intra y subretiniano radica en que se trata de medidas más objetivas que las obtenidas con la toma de agudeza visual. Por otra parte, muchos de los genes que se estudian están relacionados con vías de respuesta a los fármacos antiVEGF, y posiblemente los cambios anatómicos sean más evidentes que los cambios en AV.

De estos estudios, los de Park,¹⁵³ Kitchens,¹⁶² Matsumiya¹⁶³ y Lotery¹⁶⁴ encontraron resultados significativos en la respuesta anatómica. En el estudio de Park los genes *ARMS2* y *HTRA1* se relacionaron con una buena respuesta en cuanto a reducción del CFT. Kitchens y colaboradores obtuvieron que el genotipo TT del SNP rs10490924 del gen *LOC387715* era más frecuente entre los no respondedores. El grupo de Matsumiya observó una pobre resolución del fluido intrarretiniano en los pacientes con la combinación de las variantes *CFH* I62V + *CFH* Y402H. En el estudio IVAN, Lotery y colaboradores no encontraron ninguna asociación estadísticamente significativa entre los casi 500 SNP evaluados y la respuesta anatómica, aunque el que obtuvo una relación más fuerte fue rs9679290 en *EPAS1*. Este gen se expresa en el adulto en tejidos altamente vascularizados, dado que es un importante regulador de la vascularización en situaciones de hipoxia. Estos autores sugieren el estudio de este polimorfismo

Tabla 13. Resumen de los estudios más recientes de farmacogenética en DMAE neovascular.

Autores	Diseño / N	Origen cohorte	SNP	SNP asociados con respuesta funcional	SNP asociados con respuesta anatómica
Nuestro estudio	R / 403	España	9	SERPINF1 rs12603486 (GA/GG): asociados con una pobre respuesta. CFB rs12614 y SERPINF1 rs1136287 (alelo C): asociados con buena respuesta.	Buena respuesta: SERPINF1 rs 1136287(alelo G), CFH rs1061170 y VEGFR1 rs7993418 (genotipos TC/CC). CFHrs800292(GA/AA): asociado a mácula seca a los 12 meses,
Hermann et al. ¹⁶¹	R, SC / 366	Alemania Holanda	126	rs4576072 y rs6828477 del gen VEGFR2: independientemente asociados con una mejora de AV significativa al año.	No estudiado
Park et al. ⁵²	Coh, P / 273	Corea	23	VEGFA rs699947(AA) y rs833061(CC): resultado visual favorable. CFH rs1329428(AG/AA) y rs1410996(CT/TT):pobre respuesta.	Ninguno
Park et al. ¹⁵³	Coh, P / 394	Corea	17	VEGFA rs3025039(TT): asociado con una mejora > 15letras	ARMS2 rs10490924(GG) y HTRA1 rs11200638(GG): mayor reducción de CFT
Matsumiya et al. ¹⁶³	R / 120	Japón	2	No estudiado	Pobre resolución anatómica a los 3 meses asociada con la combinación de las variantes CFH I62V + CFH Y402H
Imai et al. ¹⁵⁴	R / 83	Japón	11	CFH rs1061170(CT), VEGF rs699947 y PEDF rs1136287: más frecuentes entre los no respondedores.	Ninguno
Kitchens et al. ¹⁶²	R / 101	EEUU	10	VEGFA rs699947(CC), VEGFA rs833061(CT) y VEGFA rs1570360(GG): más frecuentes entre los no respondedores.	LOC387715 rs10490924 (TT): más frecuente en los no respondedores.
Hagstrom et al. ¹⁶⁵	EC, Estudio CATT/ 834	EEUU	4	Ninguno	Ninguno
Abedi et al. ¹⁶⁶	Coh, P / 201	Australia	7	VEGFA rs3025000 (TC/TC): asociado con mejores resultados de AV.	No estudiado

P: prospectivo; R: retrospectivo; SC: serie de casos; Coh: estudio de cohortes; EC: ensayo clínico; MA: meta-análisis.

Tabla 13. Continuación.

Autores	Diseño / N	Origen cohorte	SNP	SNP asociados con respuesta funcional	SNP asociados con respuesta anatómica
Lotery et al. ¹⁶⁴	P, EC IVAN / 509	Gran Bretraña	3 482	No estudiado	CFH, FZD4, and HTRA1/ARMS2: no se encontraron asociados con la respuesta. Ninguno de los 482 SNP obtuvo una asociación estadísticamente significativa, pero la asociación más fuerte fue con rs9679290 en EPAS1.
Dikmetas et al. ¹⁶⁷	P / 193	Turquía	1	CFH Y402H: genotipo CC era más frecuente en los malos respondedores. Genotipo TT más frecuente entre los buenos respondedores.	No estudiado
Chen et al. ¹⁶⁸	MA / 1510	Estudio basado en revisión bibliográfica	1	CFH rs1061170 mostró una significativa OR total de 1,68 (95% CI, 1,09 to 2,60; p = 0,020; CC vs. TT para la respuesta al tratamiento (terapia fotodinámica y antiVEGF).	No estudiado
Smailhodzic et al. ¹⁵⁶	SC, R / 397	Canadá Alemania Holanda	8	CFH rs1061170: genotipo de riesgo está asociado con peores resultados de AV. Efecto acumulativo de los alelos de alto riesgo enCFH, ARMS2, y VEGFA: peor respuesta y edad más joven de inicio.	No estudiado
McKibbin et al. ⁵⁷	Coh, R / 104	Gran Bretraña	3	Mejor resultado visual en pacientes portadores de los polimorfismos de riesgo de DMAE en los genes CFH, VEGF y HTRA1.	No estudiado
Bolt et al. ¹⁵⁸	Coh, P / 141	Austria	7	Genotipo G/G de rs3024997 y rs2010963 mostraron una significativa peor agudeza visual en el estudio univariado. Ninguno de los SNP estudiado estaba asociado con la respuesta al tratamiento en el análisis multivariado.	No estudiado

P: prospectivo; R: retrospectivo; SC: serie de casos; Coh: estudio de cohortes; EC: ensayo clínico; MA: meta-análisis.

Tabla 13. Continuación.

Autores	Diseño / N	Origen cohorte	SNP	SNP asociados con respuesta funcional	SNP asociados con respuesta anatómica
Kloeckner et al. ¹⁵⁵	R / 215	Suiza	8	CFH rs1061170(CC): asociado con una pobre respuesta. Efecto aditivo para una buena respuesta: CFH rs1061170 y FZD4 rs10898563.	No estudiado
Nischler et al. ¹⁶⁹	P / 197	Austria	1	Significativo peor resultado para AV lejana y de lectura en los pacientes portadores de CFH 402HH. Menos pacientes con pérdidas de AV >3 líneas entre los del grupo de CFH 402YY.	No estudiado
Teper et al. ¹⁷⁰	P / 90	Polonia	2	Correlación entre el genotipo de ARMS2 y la eficacia de ranibizumab: pobres respuestas en los homocigotos para la variante 69S.	Ninguno
Brantley et al. ¹⁷¹	R / 86	EEUU	2	Pacientes con genotipo CC en CFH (Y402H) tuvieron peores resultados que aquellos con los genotipos TC y TT.	No estudiado

P: prospectivo; R: retrospectivo; SC: serie de casos; Coh: estudio de cohortes; EC: ensayo clínico; MA: meta-análisis.

en otras cohortes, dado que no obtuvo resultados estadísticamente significativos tras la corrección de Bonferroni debido, probablemente, al gran número de SNP que fueron evaluados.

Nuestro estudio encontró asociación con cuatro SNP de los genes *CFH*, *SERPINF1*, *VEGFR1* y *VEGFA*. Los pacientes portadores de estas variaciones genéticas, presentaban una mejor respuesta anatómica tras el tratamiento y una mayor resolución del fluido intrarretiniano.

La tabla 13 da una visión clara de los genes que hasta ahora han ofrecido resultados más robustos en los diferentes estudios de farmacogenética desarrollados en DMAE neovascular. A nivel de la respuesta funcional, *VEGFA* y *CFH* son los genes cuyos SNP han sido relacionados en mayor número de ocasiones con la agudeza visual de los pacientes tratados con ranibizumab y bevacizumab. El hecho de que diferentes variantes de *VEGFA* den lugar a diferentes respuestas a los antiVEGF resulta comprensible, y es por este motivo por el que casi todos los estudios de farmacogenética lo incluyen en su análisis. El *CFH* es el gen más asociado al riesgo de padecer DMAE, con lo cual, sus variaciones

pueden dar lugar a diferentes fenotipos de la misma patología, y por tanto, una diferente respuesta al tratamiento.

Nuestro trabajo señala un gen que parece implicado en la respuesta terapéutica y que debe tenerse en cuenta como objetivo de investigación en próximos estudios, que es *SERPINF1*. Este gen parece tener una gran implicación en los resultados tras el tratamiento, por lo que podría ser evaluado de manera individual en futuras cohortes para comprobar si se replican los resultados e incluso aumenta la asociación estadística sin realizar la corrección para múltiples pruebas de Bonferroni. Según nuestros resultados, otros genes como *CFB*, *CFH* y *VEGFR1*, deberían también tenerse en cuenta como dianas farmacogenéticas.

8.8

Discusión Fortalezas y limitaciones del estudio

Fortalezas y limitaciones del estudio

El tamaño de la muestra (403 pacientes) de nuestro estudio es uno de los más grandes de todos los estudios farmacogenéticos de DMAE realizados hasta la fecha. Sin embargo, esta muestra todavía resulta insuficiente para lograr resultados estadísticos sólidos en algunas medidas, sobretodo después de la corrección por mediciones múltiples de Bonferroni.

Una segunda limitación es que evaluamos únicamente cinco SNP (rs3025000, rs699947, rs7993418, rs1136287 y rs12603486) de tres genes (*VEGFA*, *VEGFR* y *SERPINF1*) relacionados con la respuesta al ranibizumab. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que estos genes desempeñan un papel importante en las diferencias en la respuesta al tratamiento y habría sido útil evaluar más SNP relacionados con estos genes.

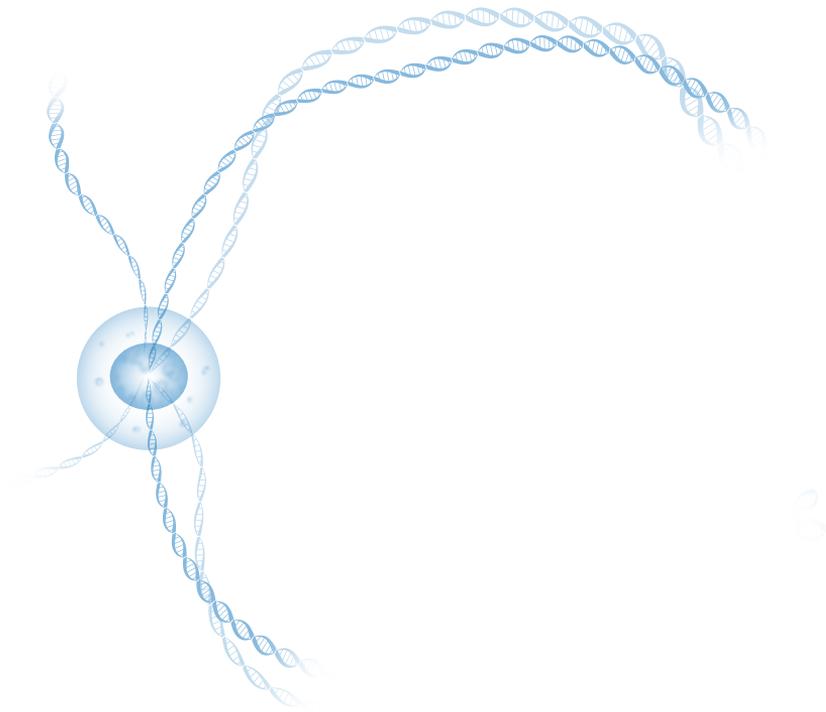
Por otro lado, tal y como se ha mencionado previamente, la buena o mala respuesta al tratamiento fue valorada no solo según la AV de los pacientes sino según los resultados de grosor central foveal medido por OCT y según la capacidad para conseguir una mácula seca tras el tratamiento o por el contrario persistía el fluido. Estas medidas tomográficas hacen que la respuesta al tratamiento sea valorada de una manera más amplia y objetiva que únicamente mediante la AV.

Nuestro estudio es un estudio de práctica clínica real. Las características de la muestra son similares a las observadas en poblaciones de pacientes con DMAE neovascular en cuanto a la edad, número de inyecciones durante el primer año y agudeza visual inicial y final. El seguimiento es retrospectivo, por lo que

se minimizan los posibles sesgos genéticos con los estrictos criterios de inclusión y exclusión de los ensayos clínicos o de los estudios de cohortes prospectivos. Los pacientes muestran las características habituales de los pacientes de la consulta.

9

Conclusiones



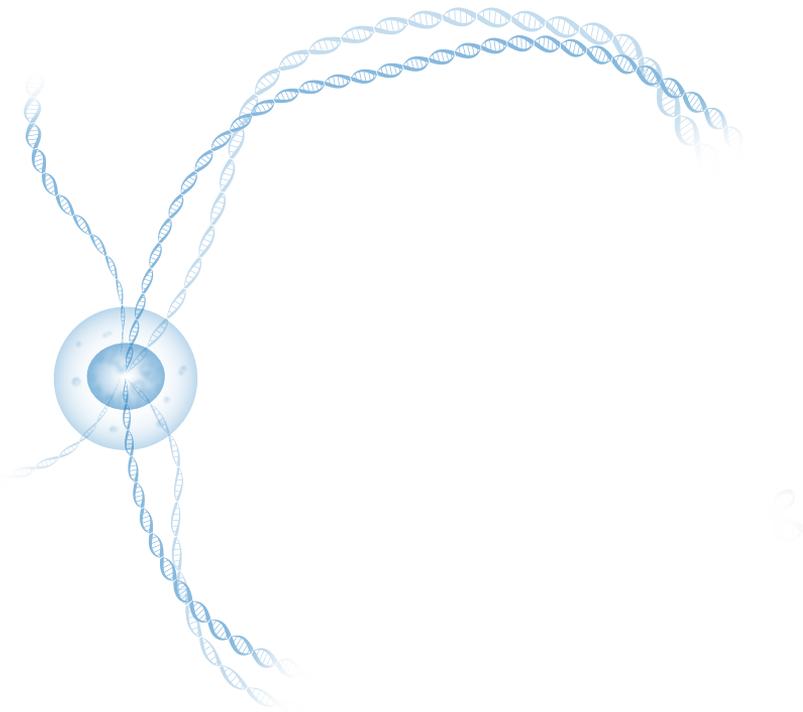
9

Conclusiones

1. Nuestro estudio confirma la hipótesis nula, comprobando que existe una asociación genética y ambiental con la respuesta al tratamiento con ranibizumab en los pacientes con DMAE neovascular.
2. La hipertensión se asocia con una peor respuesta terapéutica de los pacientes con DMAE neovascular tratados con ranibizumab.
3. En el estudio de asociación de polimorfismos con la respuesta terapéutica en los pacientes con DMAE neovascular, *SERPINF1* ha sido el gen con una asociación estadística más robusta. Los pacientes portadores de los polimorfismos rs12603486 y rs1136287 presentaban una peor respuesta funcional y anatómica al tratamiento.
4. El estudio muestra que los genes del complemento *CFH* (rs1061170 y rs800292) y *CFB* (rs12614) muestran una asociación con una buena respuesta al tratamiento, sobretodo valorando la respuesta anatómica de los mismos.
5. Los polimorfismos rs7993418 de *VEGFA* y rs7993418 de *VEGFR1* se relacionan con buenas respuestas anatómicas.
6. Los hallazgos obtenidos sugieren que la genética juega un importante papel en la respuesta al tratamiento de los pacientes con DMAE. Las variantes genéticas de genes relacionados con la DMAE y sus vías de respuesta a los antiVEGF, podrían explicar las diferencias observadas en los resultados con ranibizumab entre los pacientes que padecen esta enfermedad.

10

Bibliografía



1. Amalric, P. The macula: 50 years of study: from clinical aspects to genetics. *Points Vue* 39, 4-20 (1998).
2. Haab, O. Erkrankungen der Macula lutea. *Centralblatt für praktische Augenheilkunde*. (1885).
3. Agarwal, A. *Gass' Atlas of Macular Diseases*. (2012).
4. Klein, Ronald, Matthew D. Davis, Yvonne L. Magli, Paul Segal, Barbara E.K Klein, L. H. The Wisconsin Age-related Maculopathy Grading System. *Ophthalmology* 98, 1128–1134 (1991).
5. Bird, a. C. *et al.* An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 39, 367–374 (1995).
6. Ferris, F. L. *et al.* Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 120, 844–851 (2013).
7. Abdelsalam, A., Priore, L. Del & Zarbin, M. A. Drusen in Age-Related Macular Degeneration : Pathogenesis , Natural Course , and Laser Photocoagulation – Induced Regression. *Surv. Ophthalmol.* 44, 1–29 (1999).
8. Sarks, S. H., Arnold, J. J., Killingsworth, M. C. & Sarks, J. P. Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. *Br. J. Ophthalmol.* 83, 358–368 (1999).
9. Ambati, J. & Fowler, B. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75, 26–39 (2012).
10. Holz, F. G. *et al.* Progression of Geographic Atrophy and Impact of Fundus Autofluorescence Patterns in Age-related Macular Degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 143, (2007).

11. Green, W. & Enger, C. Age-related macular degeneration histopathologic studies: the 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Retina* 25, 1519–35 (2005).
12. Pascolini, D. & Mariotti, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 614–618 (2012).
13. Resnikoff, S. *et al.* Policy and Practice Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 12831, 844–51 (2004).
14. Smith, W. *et al.* Risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 108, 697–704 (2001).
15. Klein, R., Klein, B. E. . & Linton, K. L. . Prevalence of Age-related Maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 99, 933–943 (1992).
16. Vingerling, J. R. *et al.* The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 102, 205–210 (1995).
17. Mitchell, P., Smith, W., Attebo, K. & Wang, J. J. Prevalence of Age-related Maculopathy in Australia. *Ophthalmology* 102, 1450–1460 (1995).
18. Buch, H. *et al.* 14-Year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: The Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology* 112, 787–798 (2005).
19. Spanish Eyes & Epidemiological Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Spain. *Br. J. Ophthalmol.* 95, 931–936 (2011).
20. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, T. J. Racial Differences in the Prevalence of Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 106, 1049–1055 (1999).
21. Bressler, S. B. & Munoz, Beatriz, Sharon D. Solomon, S. K. Racial Differences in the Prevalence of Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol.* 126, 241–245 (2008).
22. Chew, E. Y. *et al.* Ten-Year Follow-up of Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study. *JAMA Ophthalmol.* 132, 272 (2014).
23. Klein, R. *et al.* Fifteen-Year Cumulative Incidence of Age-Related Macular Degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 114, 253–262 (2007).
24. Wang, J. J. *et al.* Ten-Year Incidence and Progression of Age-Related Maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 114, 92–98 (2007).
25. van Leeuwen, R., Klaver, C. C. W., Vingerling, J. R., Hofman, A. & de Jong, P. T. V. M. The risk and natural course of age-related maculopathy: follow-up at 6 1/2 years in the Rotterdam study. *Arch Ophthalmol* 121, 519–526 (2003).
26. Owen, C. G. *et al.* The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 752–6 (2012).
27. Abdelfattah, N. S. *et al.* Drusen volume as a predictor of disease progression in patients with late age-related macular degeneration in the fellow eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 1839–1846 (2016).

28. Gemenetzi, M., Lotery, A. J. & Patel, P. J. Risk of geographic atrophy in age-related macular degeneration patients treated with intravitreal anti-VEGF agents. *Eye* 1–9 (2016). doi:10.1038/eye.2016.208
29. Abdelfattah, N. S. *et al.* Macular Atrophy in Neovascular Age-Related Macular Degeneration with Monthly versus Treat-and-Extend Ranibizumab. *Ophthalmology* 1–9 (2016). doi:10.1016/j.ophtha.2016.10.002
30. Taylor, D. J., Hobby, A. E., Binns, A. M. & Crabb, D. P. How does age-related macular degeneration affect real-world visual ability and quality of life? A systematic review. *BMJ Open* 6, e011504 (2016).
31. Popescu, M. L. *et al.* Explaining the relationship between three eye diseases and depressive symptoms in older adults. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 2308–13 (2012).
32. Sarks, S., Cherepanoff, S., Killingsworth, M. & Sarks, J. Relationship of basal lamellar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 968–977 (2007).
33. Armada, F. *et al.* *Patología y Cirugía de la Mácula.* (2010).
34. Calippe, B. *et al.* Complement Factor H inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity* 46, 261–272 (2017).
35. Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G. & Wong, T. Y. Series Ophthalmology 1 Age-related macular degeneration. *Lancet* 379, 1728–1738 (2012).
36. Sobrin, L. & Seddon, J. M. Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 40, 1–15 (2014).
37. Ryan, S. J. & Schachat, A. P. *Retina.* Retina (2009).
38. Friedman, D. S., Colmain, B. J. & Munoz, B. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 122, 564–565 (2004).
39. Choudhury, F., Varma, R., McKean-Cowdin, R., Klein, R. & Azen, S. P. Risk factors for four-year incidence and progression of age-related macular degeneration: The Los Angeles Latino eye study. *Am. J. Ophthalmol.* 152, 385–395 (2011).
40. Chakravarthy, U. *et al.* Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 10, 31 (2010).
41. Evans, J. R. Risk factors for age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 227–253 (2001).
42. McCarty, C. A. *et al.* Risk Factors for Age-Related Maculopathy. *Arch Ophthalmol* 119, 1455–1462 (2001).
43. Vingerling, J. R. *et al.* Macular degeneration and early menopause : a case-control study. *BMJ* 310, 1570–1571 (1995).
44. Smith, W., Mitchell, P. & Wang, J. Gender, oestrogen, hormone replacement and age-related macular degeneration: results of the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 25, 13–5 (1997).

45. Kawasaki, R. *et al.* The Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Asians. *Ophthalmology* 117, 921–927 (2010).
46. Hagstrom, S. a *et al.* Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology* 120, 593–9 (2013).
47. Klein, R. *et al.* Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol* 129, 75–80 (2011).
48. Schachat, A. P., Hyman, L. & Leske, M. C. Features of Age-Related Macular Degeneration in a Black Population. *Arch Ophthalmol* 113, 728–735 (1995).
49. Fraser-Bell, S., Choudhury, F., Klein, R., Azen, S. & Varma, R. Ocular Risk Factors for Age-related Macular Degeneration: The Los Angeles Latino Eye Study (LALES). *Am. J. Ophthalmol.* 140, 735–740 (2010).
50. Wang, J. J., Mitchell, P. & Smith, W. Refractive error and age-related maculopathy: The blue mountains eye study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2167–2171 (1998).
51. Klein, R., Klein, B. E., Jensen, S. C. & Cruickshanks, K. J. The relationship of ocular factors to the incidence and progression of age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 116, 506–513 (1998).
52. The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk Factors for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 110, 1701–1708 (1992).
53. Ikram, M. K., van Leeuwen, R., Vingerling, J. R., Hofman, A. & de Jong, P. T. V. M. Relationship between refraction and prevalent as well as incident age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3778–3782 (2003).
54. Mitchell, P., Smith, W. & Wang, J. J. Iris color, skin sun sensitivity, and age-related maculopathy: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 105, 1359–1363 (1998).
55. Chew, E. Y. *et al.* Cataract Surgery in the Age-Related Eye Disease Study : *Ophthalmology* 116, 297–303 (2009).
56. Chakravarthy, U. *et al.* Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 10, 31 (2010).
57. Stryker, W. *et al.* The relation of diet, cigarette smoking, and alcohol consumption to plasma beta-carotene and alpha-tocopherol levels. *Am J Epidemiol* 127, 283–96 (1988).
58. Hammond, B. R., Wooten, B. R. & Snodderly, D. M. A. X. Cigarette Smoking and Retinal Carotenoids : Implications for Age-related Macular Degeneration. *Vision Res.* 36, 3003–3009 (1996).
59. Thornton, J. *et al.* Smoking and age-related macular degeneration : a review of association. *Eye* 19, 935–944 (2005).

60. Brandl, C. *et al.* Features of age-related macular degeneration in the general adults and their dependency on age, sex, and smoking: Results from the German KORA study. *PLoS One* 11, 1–19 (2016).
61. Neuner, B. *et al.* Smoking history and the incidence of age-related macular degeneration- results from the Muenster Aging and Retina Study. (MARS) cohort and systematic review and meta-analysis of observational longitudinal studies. *Addict Behav* 34, 938–947 (2009).
62. Tomany, S. C. *et al.* Risk Factors for Incident Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 111, 1280–1287 (2004).
63. Mitchell, P. Smoking is a major cause of blindness. *Med J Aust* 171, 173–174 (1999).
64. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss: AREDS Report No. 8. *Arch Ophthalmol.* 119, 1417–1436 (2001).
65. The Age-related Eye Disease Study 2 Research Group. Lutein + Zeaxanthin and Omega-3 Fatty Acids for Age-Related Macular Degeneration The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol.* 309, 2005–2015 (2013).
66. Merle, B. M. J., Silver, R. E., Rosner, B. & Seddon, J. M. Adherence to a Mediterranean diet , genetic susceptibility , and progression to advanced macular degeneration : a prospective cohort. *Am J Clin Nutr* 102, 1196–1206 (2015).
67. Kang, J.-H. & Choung, S.-Y. Protective effects of resveratrol and its analogs on age-related macular degeneration in vitro. *Arch. Pharm. Res.* 39, 1703–1715 (2016).
68. Khan, J. *et al.* Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight. *Br J Ophthalmol* 90, 29–32 (2006).
69. Kahn HA, Leibowitz HM, Ganley JP, Kini MM, Colton T, Nickerson RS, *et al.* The Framingham Eye Study. II. Association of ophthalmic pathology with single variables previously measured in the Framingham Heart Study. *Am J Epidemiol.* 106, 33–41 (1977).
70. Cougnard-gr, A., Malet, F., Goff, L., Colin, J. & Barberger-gateau, P. Long-Term Blood Pressure and Age-Related Macular Degeneration : The ALIENOR Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 1905–1912 (2013).
71. Klein, R., Barbara, E. K., Klein, K., Tomany, S. C. & Cruickshanks, K. J. The Association of Cardiovascular Disease with the Long-term Incidence of Age-related Maculopathy The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 110, 1273–1280 (2003).
72. Joseph Thomas, MD, Sohail Mohammad, MD, Richard Charnigo, PhD, Judit Baffi, MD, Ahmed Abdel-Latif, MD, PhD, and Khaled M. Ziada, M. Age-Related Macular Degeneration and Coronary Artery Disease in a VA Population. *South Med J* 108, 502–506 (2015).

73. Klein, R. *et al.* Early Age-related Maculopathy in the Cardiovascular Health Study. *Ophthalmology* 110, 25–33 (2003).
74. Delcourt, C. *et al.* Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol* 8, 237–249 (2001).
75. Pennington, K. L. & DeAngelis, M. M. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis.* 3, 34 (2016).
76. Heiba, I. M., Elston, R. C., Klein, B. E. & Klein, R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Genet. Epidemiol.* 11, 51–67 (1994).
77. Seddon, J. M., Ajani, U. A. & Mitchell, B. D. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 123, 199–206 (1997).
78. Gorin, M. B. *et al.* The genetics of age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 5, 29 (1999).
79. Seddon, J. M., Cote, J., Page, W. F., Aggen, S. H. & Neale, M. C. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch. Ophthalmol.* (Chicago, Ill. 1960) 123, 321–7 (2005).
80. Fisher, S. A. *et al.* Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2257–2264 (2005).
81. Sabeti, P. C. *et al.* Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature* 449, 913–918 (2007).
82. International HapMap Consortium *et al.* A second generation human haplotype map of over 3,1 million SNP. *Nature* 449, 851–61 (2007).
83. Wang, D. G. *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280, 1077–82 (1998).
84. Edwards, A. O. *et al.* Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308, 421–4 (2005).
85. Hageman, G. S. *et al.* A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7227–32 (2005).
86. Haines, J. *et al.* Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Sci. (New York, NY)* 308, 419–421 (2005).
87. Klein, R. J. *et al.* Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385–9 (2005).
88. Sepp, T. *et al.* Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 536–40 (2006).

89. Fisher, S. a *et al.* Assessment of the contribution of CFH and chromosome 10q26 AMD susceptibility loci in a Russian population isolate. *Br. J. Ophthalmol.* 91, 576–8 (2007).
90. Baird, P. N. *et al.* Analysis of the Y402H variant of the complement factor H gene in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4194–8 (2006).
91. Mori, K. *et al.* Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5315–9 (2007).
92. Maller, J. *et al.* Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 38, 1055–1059 (2006).
93. Zarepari, S. *et al.* Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 149–53 (2005).
94. Despret, D. D. G. *et al.* Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *JAMA* 296, 301–309 (2006).
95. Lau, L. I. *et al.* Association of the Y402H polymorphism in complement factor H gene and neovascular age-related macular degeneration in Chinese patients. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3242–3246 (2006).
96. Li, M. *et al.* CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 38, 1049–54 (2006).
97. Souied, E. H. *et al.* Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population. *Mol. Vis.* 11, 1135–40 (2005).
98. Tong, Y. *et al.* LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Mol. Vis.* 16, 1958–81 (2010).
99. de la Fuente, M. *et al.* Complement factor H. *Ophthalmology* 114, 193.e1-2 (2007).
100. Recalde, S., Fernandez-Robredo, P., Altarriba, M., Salinas-Alaman, A. & García-Layana, A. Age-related macular degeneration genetics. *Ophthalmology* 115, 916–916.e1 (2008).
101. Thakkinstian, A. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the association between complementary factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2784–2790 (2006).
102. Bora, N. S., Matta, B., Lyzogubov, V. V. & Bora, P. S. Relationship between the complement system, risk factors and prediction models in age-related macular degeneration. *Mol. Immunol.* 63, 176–183 (2015).

103. Rodríguez de Córdoba, S., Esparza-Gordillo, J., Goicoechea de Jorge, E., Lopez-Trascasa, M. & Sánchez-Corral, P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol. Immunol.* 41, 355–67 (2004).
104. Spencer, K. L. *et al.* Haplotypes spanning the complement factor H gene are protective against age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4277–4283 (2007).
105. Spencer, K. L. *et al.* Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 17, 971–7 (2008).
106. Pickering, M. C. *et al.* Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *J. Exp. Med.* 204, 1249–56 (2007).
107. Daly, M. J., Rioux, J. D., Schaffner, S. F., Hudson, T. J. & Lander, E. S. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat. Genet.* 29, 229–32 (2001).
108. Martínez-Barricarte, R. *et al.* Relevance of complement factor H-related 1 (CFHR1) genotypes in age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 1087–1094 (2012).
109. Gold, B. *et al.* Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 38, 458–62 (2006).
110. Lotery, A. & Trump, D. Progress in defining the molecular biology of age related macular degeneration. *Hum. Genet.* 122, 219–36 (2007).
111. Zarbin, M. A. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* (Chicago, Ill. 1960) 122, 598–614 (2004).
112. Wang, Q., Zhao, H. & Li, L. Association between complement factor I gene polymorphisms and the risk of age-related macular degeneration: a Meta-analysis of literature. *Int. J. Ophthalmol.* 9, 298–305 (2016).
113. Spencer, K. L. *et al.* C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1821–4 (2008).
114. Scholl, H. P. N. *et al.* Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* 3, e2593 (2008).
115. Francis, P. J., Hamon, S. C., Ott, J., Weleber, R. G. & Klein, M. L. Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *J. Med. Genet.* 46, 300–7 (2009).
116. Martínez-Barricarte, R. *et al.* The complement factor H R1210C mutation is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 639–46 (2008).
117. Raychaudhuri, S. *et al.* A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 43, 1232–6 (2011).

118. Recalde, S. *et al.* Molecular Basis of Factor H R1210C Association with Ocular and Renal Diseases. 1305–1311 (2016). doi:10.1681/ASN.2015050580
119. Grassi, M. A. *et al.* Ethnic variation in AMD-associated complement factor H polymorphism p.Tyr402His. *Hum. Mutat.* 27, 921–5 (2006).
120. Rivera, A. *et al.* Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3227–36 (2005).
121. Dewan, A. *et al.* HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314, 989–92 (2006).
122. Yang, Z. *et al.* A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314, 992–3 (2006).
123. Kanda, A. *et al.* A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16227–32 (2007).
124. Chen, W. *et al.* Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7401–6 (2010).
125. Wang, D. *et al.* CETP Gene may be Associated with Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Chinese Population. *Ophthalmic Genet.* 36, 303–8 (2015).
126. Neale, B. M. *et al.* Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7395–400 (2010).
127. Li, Z., Clarke, M. P., Barker, M. D. & McKie, N. TIMP3 mutation in Sorsby's fundus dystrophy: molecular insights. *Expert Rev. Mol. Med.* 7, 1–15 (2005).
128. Yu, Y. *et al.* Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3699–709 (2011).
129. DeAngelis, M. M. *et al.* Cigarette smoking, CFH, APOE, ELOVL4, and risk of neovascular age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 125, 49–54 (2007).
130. Cho, E. *et al.* Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 209–18 (2001).
131. Schmidt, S. *et al.* Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 852–64 (2006).
132. Leung, D., Cachianes, G., Kuang, W., Goeddel, D. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* (80-.). 8, 1306–1309 (1989).

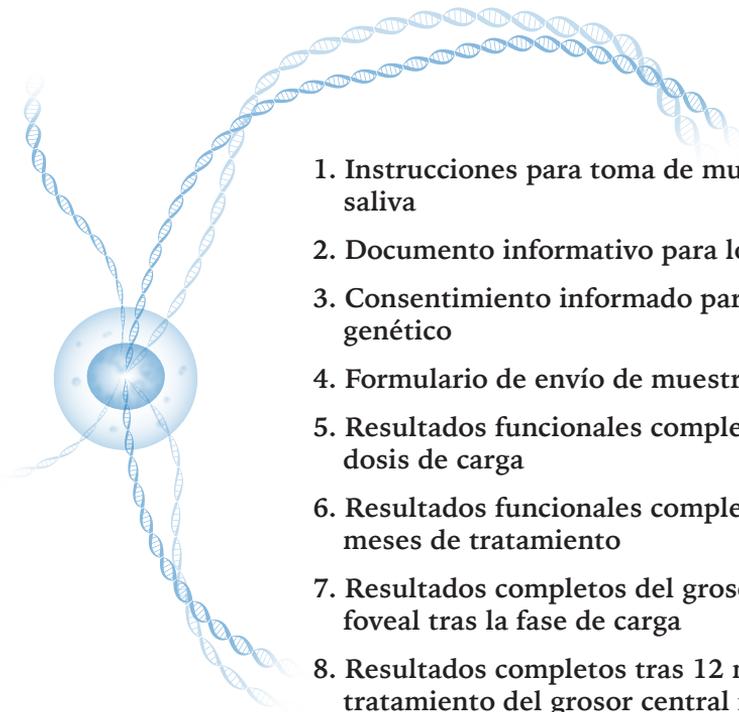
133. Michels, S., Rosenfeld, P. J., Puliafito, C. A., Marcus, E. N. & Venkatraman, A. S. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: Twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 112, 1035–1047 (2005).
134. Rich, R. M. *et al.* Short-term safety and efficacy of intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular Age-related Macular Degeneration. *Retina* 26, 495–511 (2006).
135. Tufail, A. *et al.* Bevacizumab for neovascular age related macular degeneration (ABC Trial): multicentre randomised double masked study. *BMJ Br. Med. J.* 340, c2459 (2010).
136. Martin, D. F. *et al.* Ranibizumab and Bevacizumab for Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: 2-Year Results. *Ophthalmology* 119, 1388–1398 (2012).
137. Chakravarthy, U. *et al.* Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. *Lancet* 382, 1258–1267 (2013).
138. Krebs, I. *et al.* A randomised double-masked trial comparing the visual outcome after treatment with ranibizumab or bevacizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 97, 266–71 (2013).
139. Kodjikian, L. *et al.* Ranibizumab versus bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration: Results from the GEFAL noninferiority randomized trial. *Ophthalmology* 120, 2300–2309 (2013).
140. Kovach, J. L., Schwartz, S. G., Flynn, H. W. & Scott, I. U. Anti-VEGF treatment strategies for wet AMD. *J. Ophthalmol.* 2012, (2012).
141. Rosenfeld, P. J., Rich, R. M. & Lalwani, G. A. Ranibizumab: Phase III Clinical Trial Results. *Ophthalmol. Clin. Noth Am.* 19, 361–372 (2006).
142. Frampton, J. Aflibercept for Intravitreal Injection: In Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Drugs Aging* 29, 839–846 (2012).
143. Heier, J. S. *et al.* Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119, 2537–2548 (2012).
144. Motulsky AG, Harper PS, Bobrow M, S. C. Pharmacogenetics. New York Oxford Univ. Press (1997).
145. Francis, P. J. The influence of genetics on response to treatment with ranibizumab (Lucentis) for age-related macular degeneration: the Lucentis Genotype Study (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 109, 115–56 (2011).
146. Abedi, F. *et al.* Variants in the VEGFA gene and treatment outcome after anti-VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 120, 115–121 (2013).

147. Cruz-Gonzalez, F. *et al.* Influence of CFH, HTRA1 and ARMS2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet age-related macular degeneration in a Spanish population. *Int. J. Ophthalmol.* 9, 1304–1309 (2016).
148. Dawson, D. W. *et al.* Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* (80-.). 285, 245–248 (1999).
149. Bhutto, I. A. *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 82, 99–110 (2006).
150. Lin, J.-M. *et al.* Pigment epithelium-derived factor gene Met72Thr polymorphism is associated with increased risk of wet age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 145, 716–721 (2008).
151. Campochiaro, P. *a et al.* Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 17, 167–176 (2006).
152. Park, U. C. *et al.* Genetic factors associated with response to intravitreal ranibizumab in Korean patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 34, 288–97 (2014).
153. Park, U. C. *et al.* Pharmacogenetic associations with long-term response to anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular AMD patients. *Mol. Vis.* 20, 1680–1694 (2014).
154. Imai, D. *et al.* CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration. *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.* 3, 53–59 (2010).
155. Kloeckener-Gruissem, B. *et al.* Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4694–702 (2011).
156. Smailhodzic, D. *et al.* Cumulative Effect of Risk Alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the Response to Ranibizumab Treatment in Age-related Macular Degeneration. *Ophtha* 119, 2304–2311 (2012).
157. McKibbin, M. *et al.* CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 208–212 (2012).
158. Boltz, A. *et al.* Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in the treatment success in patients with wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119, 1615–20 (2012).
159. Smailhodzic, D. *et al.* Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119, 2304–11 (2012).
160. Huang, H., Shen, J. & Viores, S. A. Blockade of VEGFR1 and 2 suppresses pathological angiogenesis and vascular leakage in the eye. *PLoS One* 6, (2011).

161. Hermann, M. M. *et al.* Polymorphisms in vascular endothelial growth factor receptor 2 are associated with better response rates to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 121, 905–910 (2014).
162. Kitchens, J. W. *et al.* A pharmacogenetics study to predict outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration. *Clin. Ophthalmol.* 7, 1987–93 (2013).
163. Matsumiya, W. *et al.* Evaluation of clinical and genetic indicators for the early response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* 15, 833–843 (2014).
164. Lotery, A. J. *et al.* Pharmacogenetic associations with vascular endothelial growth factor inhibition in participants with neovascular age-related macular degeneration in the ivan study. *Ophthalmology* 120, 2637–2643 (2013).
165. Hagstrom, S. a. *et al.* Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the comparison of AMD treatments trials (CATT). *Ophthalmology* 120, 593–599 (2013).
166. Abedi, F. *et al.* Genetic influences on the outcome of anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 120, 1641–1648 (2013).
167. Dikmetas, O., Kadayıfçılar, S. & Eldem, B. The effect of CFH polymorphisms on the response to the treatment of age-related macular degeneration (AMD) with intravitreal ranibizumab. *Mol. Vis.* 19, 2571–8 (2013).
168. Chen, H., Yu, K. Da & Xu, G. Z. Association between variant Y402H in age-related macular degeneration (AMD) susceptibility gene CFH and treatment response of AMD: A meta-analysis. *PLoS One* 7, (2012).
169. Nischler, C. *et al.* Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 89, 344–349 (2011).
170. Teper, S. J., Nowinska, A., Pilat, J., Palucha, A. & Wylegala, E. Involvement of genetic factors in the response to a variable-dosing ranibizumab treatment regimen for age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 16, 2598–2604 (2010).
171. Brantley, M. a. *et al.* Association of Complement Factor H and LOC387715 Genotypes with Response of Exudative Age-Related Macular Degeneration to Intravitreal Bevacizumab. *Ophthalmology* 114, 2168–2173 (2007).

11

Anexos



1. Instrucciones para toma de muestra de saliva
2. Documento informativo para los pacientes
3. Consentimiento informado para estudio genético
4. Formulario de envío de muestras
5. Resultados funcionales completos tras la dosis de carga
6. Resultados funcionales completos tras 12 meses de tratamiento
7. Resultados completos del grosor central foveal tras la fase de carga
8. Resultados completos tras 12 meses de tratamiento del grosor central foveal
9. Resultados completos de la respuesta del fluido tras la fase de carga
10. Resultados completos de la respuesta del fluido a los 12 meses

Anexo 1. Instrucciones para toma de muestra de saliva.

Sequencing and molecular diagnostics

Av. Ramiro Maeztu, 9, C.I.B, 28040
Madrid, España
Teléfono: 918046601
Fax: 918047293
laboratorio.diagnostico@secugen.es

Análisis retrospectivo de la influencia de factores clínicos y genéticos en la respuesta a Ranibizumab en Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)

INSTRUCCIONES PARA SOLICITUD DE ANÁLISIS Y TOMA DE MUESTRA DE SALIVA**Antes realizar la solicitud de análisis y la toma de muestra lea detenidamente estas instrucciones****MATERIAL**

1. Una hoja de solicitud de análisis (para 5 muestras).
2. Consentimiento informado del paciente (3 copias).
3. Kit de recogida de muestra de saliva, que incluye tres etiquetas con códigos de barras.
4. Cuaderno de recogida de muestras.

TOMA DE MUESTRA DE SALIVA

1. Para la toma de muestras siga estrictamente las instrucciones que figuran al dorso. Asegúrese que el paciente entiende el procedimiento de recogida de muestra de saliva.
2. Es importante que el tubo para recoger la muestra sólo sea manipulado por el paciente hasta que finalice el proceso para evitar contaminación.

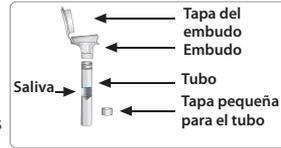
SOLICITUD DE ANÁLISIS Y RECOGIDA DE MUESTRAS

1. Rellene los campos con la información que se solicita en la hoja de solicitud de análisis.
2. Adhiera una de las tres etiquetas de las incluidas en el kit en la hoja de solicitud de análisis. Otra etiqueta es para el cuaderno de recogida de datos de los pacientes. La tercera etiqueta adhiérala al tubo.
3. Cada muestra va trazada por 3 etiquetas que tienen que llevar el mismo código. Asegúrese de esta correspondencia: 1 solicitud, 1 cuaderno de recogida de datos y 1 tubo muestra.
4. Introduzca cada tubo de muestra etiquetada en la caja original del kit y almacene éstos hasta llegar a los 5 de la hoja de solicitud del estudio, en ese momento ya podrá realizar el envío de los 5 kits junto con la hoja de solicitud.
5. Los consentimientos informados deberán ser debidamente cumplimentados por los pacientes y por el oftalmólogo autorizado en este estudio. Una de las copias se le entregará al paciente y las otras dos se guardarán en el centro (una para el centro y otra para el biobanco de la Universidad de Navarra). La copia del biobanco se recogerá en la monitorización final de cada centro.
6. Póngase en contacto con el servicio de mensajería Nacex para la recogida de la muestra, indicando el número de cliente de Secugen.

Recogida de muestras:**Teléfono: 914593399****Código de cliente de Secugen: 2854/1762.**



Kit de recolección de ADN•Oragene®
Instrucciones para el usuario



Instrucciones: No coma, beba, fume ni mastique chicle en los 30 minutos previos a entregar su muestra de saliva.

NO quite la película de plástico de la tapa del embudo.

Preparación: La mayor parte de la gente tarda entre 2 y 5 minutos para proporcionar una muestra de saliva siguiendo los pasos 1 a 5. Antes de escupir, relájese y frótese las mejillas suavemente durante 30 segundos, para producir saliva. Si encuentra difícil producir saliva, coloque ¼ de cucharadita de azúcar blanca de mesa en su lengua.

1		<p>Llene el recipiente con saliva líquida (sin contar la espuma) hasta alcanzar el límite que aparece en la figura número 1.</p>
2		<p>Mantenga el tubo en posición vertical con una mano. Cierre la tapa con la otra mano, como se muestra, empujando con firmeza la tapa hasta que escuche un clic fuerte. El líquido en la tapa se liberará en el tubo para mezclarse con la saliva. Asegúrese de que la tapa esté bien cerrada.</p>
3		<p>Mantenga el tubo en posición vertical. Desenrosque el tubo del embudo.</p>
4		<p>Tome la tapa pequeña para el tubo. Use la tapa pequeña para cerrar bien el tubo.</p>
5		<p>Agite el tubo tapado durante 5 segundos. Deseche o recicle el embudo.</p>

Uso específico: este producto fue diseñado para tomar, de manera segura, una muestra de saliva humana.

Advertencia: si el líquido entra en contacto con los ojos o la piel, lave con agua. No lo ingiera.

Almacenamiento: guárdese a temperatura ambiente, entre 15-30 °C.

⚠ **Advertencia:** Tapa pequeña, riesgo de asfixia.

PD-PR-118-C Issue 1.0 (Español)



Manufactured by DNA Genotek Inc.
 Ottawa, ON, Canada K2K 1L1
www.dnagenotek.com

Anexo 2. Documento informativo para los pacientes.



Clínica
Universidad
de Navarra

Hoja de información al paciente

Título del estudio: Análisis retrospectivo de la influencia de factores clínicos y genéticos en la respuesta a Ranibizumab en Degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

Investigador responsable: Dr. Alfredo García Layana, Laboratorio de Oftalmología Experimental, Departamento de Oftalmología, Clínica Universitaria de Navarra.

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar si quiere o no participar en este estudio. Para ello, lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

En la actualidad las enfermedades degenerativas de la retina son la principal causa de ceguera en países industrializados, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la principal causa en personas mayores de 60 años, afectando al 25% de personas mayores de 80 años. Actualmente, el tratamiento de la forma húmeda de DMAE consiste en inyecciones intraoculares de determinados fármacos como Ranibizumab (Lucentis®). Existen diferencias interindividuales en la respuesta al tratamiento, aunque la razón es desconocida. Usted ha recibido este tratamiento, por lo que le invitamos a participar en el estudio. El objetivo del presente estudio es conocer en pacientes ya tratados que variables y en que proporción influyen en la respuesta al tratamiento. Esto permitiría en un futuro poder optimizar el protocolo de seguimiento y tratamiento en DMAE húmeda.

En el caso en el que decida participar voluntariamente, rellenará un cuestionario de salud en el que se le solicitarán datos relacionados con sus antecedentes familiares, su historia médica y su lugar de procedencia y de residencia. Rellenar la encuesta le supondrá unos 15 minutos.

El resto de los datos necesarios para el estudio serán obtenidos de la historia oftalmológica correspondientes a las visitas ya realizadas. Los datos recopilados se codificarán y se enviarán al centro de análisis de datos en la Universidad de Navarra.

También se le solicitará una muestra de saliva de la que se extraerá su ADN de modo que podremos estudiar los marcadores genéticos que podrían dar lugar a las diferencias que existen en la respuesta al tratamiento en diferentes pacientes. La toma de la muestra y la entrega y verificación de la cumplimentación del cuestionario de salud tendrán lugar en el centro en el que habitualmente le realizan revisiones oftalmológicas.

Las muestras de saliva serán enviadas de forma codificada a SECUGEN, una empresa encargada de realizar los análisis de ADN, situada en Madrid..

Con este documento se le solicita su consentimiento para:

- 1.- Estudiar en su muestra los marcadores genéticos relacionados con la respuesta al tratamiento con Ranibizumab (Lucentis®) en la DMAE húmeda avanzada.
- 2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes y moléculas que puedan estar también involucrados en el desarrollo de la DMAE. Por ello, se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra codificada para futuros estudios en el Biobanco de la Universidad de Navarra.
- 3.- Utilizar su información clínica generada durante el tratamiento con Lucentis® y en sus revisiones posteriores, en la medida que sea necesaria para llevar a cabo este estudio.
- 4.- Contactar con usted en el futuro en el caso de que se requiera nueva información sobre la evolución de su enfermedad.

CONSIDERACIONES EN RELACIÓN CON EL BIOBANCO

De acuerdo con la ley de investigación biomédica (14/2007) y con el RD 1716/2011 que regula los biobancos, usted debe saber que la muestra de saliva será enviada a Secugen para su análisis. Posteriormente se guardará el sobrante en el biobanco de la Universidad de Navarra, si usted nos da permiso.

El biobanco ofrece la posibilidad de que sus muestras sean empleadas posteriormente en otros estudios de Investigación Biomédica realizados por otros centros, nacionales o extranjeros, siempre que hayan sido considerados de interés científico y que cumplan los requisitos establecidos por un Comité de Ética.

CONSIDERACIONES EN RELACIÓN CON LOS ANÁLISIS GENÉTICOS

Usted tiene derecho a ser informado de los resultados del estudio y de las pruebas genéticas que se realizarán en su muestra de saliva, para lo cual deberá solicitar esta información al oftalmólogo que le está siguiendo.

Los resultados de estos estudios pueden no ser concluyentes y requerir una confirmación por otros investigadores, por lo que seguramente no tendrán interés en el seguimiento de su enfermedad actual.

Los resultados pueden dar lugar a patentes o desarrollos comerciales, aunque usted no tendrá derecho de naturaleza económica sobre los resultados o potenciales beneficios que puedan derivarse de manera directa o indirecta que se lleven a cabo con la muestra donada.

RIESGOS Y BENEFICIOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

El raspado bucal no conlleva ningún riesgo para su salud ni presenta ningún efecto secundario.

La información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser en un futuro fuente de beneficios para la salud de la población, aunque no de forma individual en su caso.

Su participación en este estudio no le supondrá ningún gasto, el estudio está financiado en su totalidad por el promotor, que ha establecido un convenio económico con el laboratorio farmacéutico Novartis para poder llevarlo a cabo.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley 15/1999 sobre protección de datos de carácter personal. De acuerdo con esta normativa, usted consiente expresamente a la inclusión de los datos de su historia clínica así como los resultantes del estudio en un fichero de datos personales bajo la responsabilidad del centro.

Usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

El acceso a la información personal quedará restringido al médico del estudio y sus colaboradores, a las autoridades sanitarias, al comité ético de investigación clínica y a los monitores o auditores del promotor. Todos ellos estarán sometidos al confidencialidad cuando precisen conocer su identidad para comprobar los datos y procedimientos del estudio, de acuerdo con la legislación vigente.

Tiene derecho a solicitar en cualquier momento, y sin necesidad de especificar el motivo, la eliminación total de las muestras donadas y de la información relacionada con las mismas que en ese momento estén almacenadas.

Las muestras biológicas y el cuestionario serán enviados con un código numérico, que no le identifique directamente, por el Oftalmólogo responsable de cada centro al Departamento de Oftalmología de la Universidad de Navarra, donde serán custodiadas. De esta manera se asegura la confidencialidad de sus datos. El Oftalmólogo responsable de cada centro será el encargado de custodiar el nexo entre código y paciente hasta la finalización del estudio.

Sólo se transmitirán a terceros los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente. En el caso de que se produzca esta cesión, será para fines de investigación y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son susceptibles de publicación en revistas científicas manteniendo la confidencialidad de sus datos.

Gracias por su colaboración.

Anexo 3. Consentimiento informado para estudio genético.



Universidad
de Navarra
Biobanco

Consentimiento informado

Título del estudio: Análisis retrospectivo de la influencia de factores clínicos y genéticos en la respuesta a Ranibizumab en Degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

Declaraciones y firmas

CODIGO

Declaración del paciente/representante/tutor/control/testigo (marcar lo que proceda):

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado:

- Sobre las ventajas e inconvenientes de este estudio.
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Sobre el fin para el que se utilizarán las muestras y datos personales.
- Que las muestras y datos personales serán proporcionados de forma codificada a los investigadores que trabajen con ellas.
- Que en cualquier momento puedo revocar este consentimiento y solicitar la eliminación de los datos personales y muestras que permanezcan archivados, sin que ello implique cambios en mi seguimiento médico habitual.
- Que tengo derecho de acceso a los datos personales archivados.
- Que tengo derecho a saber o no saber el resultado de las pruebas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Accedo a que el médico que le ha informado en el presente estudio contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos en el cuestionario de salud.

Sí No

Conozco y comprendo que las alternativas con respecto a la donación de muestras biológicas para la realización de estudios genéticos y de Investigación Biomédica son las siguientes:

Deseo que se destruyan las muestras a la finalización del proyecto Sí No

Doy mi consentimiento para la incorporación de las muestras al Biobanco Universidad de Navarra
Sí No

Nombre paciente: _____ Firma: _____ Fecha: _____

Nombre representante o testigo: _____ Firma: _____ Fecha: _____

Profesional que ha informado debidamente al participante.

Nombre: _____ Firma: _____ Fecha: _____



DONACIÓN AL BIOBANCO DE DATOS Y MUESTRAS OBTENIDAS PARA LA REALIZACIÓN DE UN PROYECTO

Yo, D./Dña _____ con DNI _____
 _____ declaro que **HE SIDO INFORMADO** de lo siguiente:

- El Biobanco de la Universidad de Navarra, es una unidad que almacena y distribuye muestras y datos con fines de investigación biomédica, en condiciones de máxima seguridad y bajo las normas éticas y legales que protegen la confidencialidad de mis datos.
- Los datos personales que custodia el Biobanco están integrados en un fichero con titularidad de CLÍNICA UNIVERSIDAD DE NAVARRA cuya finalidad es gestionar las muestras del Biobanco. Podré ejercer mis derechos de acceso, rectificación, cancelación y/o oposición, remitiendo un escrito con la referencia "Protección de Datos" a la siguiente dirección: Av. Pío XII nº 36, 31008 de Pamplona, o al Biobanco.
- Tengo derecho a recibir información sobre el empleo de las muestras que cedo al Biobanco y puedo retirar este consentimiento en cualquier momento solicitándolo a mi médico, al servicio que me atiende o al Biobanco según consta en la información escrita que me han dado.
- Sé que puedo realizar esta donación, libre y voluntariamente y que mi decisión no afectará nunca a la atención clínica y personal que recibo.

He comprendido la información y AUTORIZO que se integren en el Biobanco el **material sobrante de mis muestras y datos asociados** a la finalización del proyecto titulado

- He recibido un documento con toda la información sobre la donación de muestras al Biobanco para su uso en investigación.
- He recibido respuesta a las preguntas que he querido hacer.
- Relleno y firmo por triplicado** este esta hoja de consentimiento, firmado por la persona que me ha informado, para quedarme una copia.

Pamplona, a _____ de _____ de 20__

Firma del médico informante

Firma del paciente informado

Firma representante legal o testigo

D./Dña.

.....

Coleg. N: °

DNI:

DNI:

A causa de

Anexo 4. Formulario de envío de muestras.



Sequencing and molecular diagnostics

Av. Ramiro Maeztu, 9, C.I.B, 28040
 Madrid. España
 Teléfono: 918046601
 Fax: 918047293
 laboratorio.diagnostico@secugen.es

Análisis retrospectivo de la influencia de factores clínicos y genéticos en la respuesta a Ranibizumab en Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)

INFORMACION DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL (IP)

Nombre completo IP: Dr. Luis Arias

Nombre del Centro: Hospital de Bellvitge, Barcelona

e-mail: luisariasbarquet@gmail.com

Nº de paciente	Fecha toma de la muestra	Nombre responsable de la toma de la muestra	Firma responsable de la toma de la muestra	ETIQUETAS	OBSERVACIONES
				ADHIERA AQUÍ EL CÓDIGO DE BARRAS	
				ADHIERA AQUÍ EL CÓDIGO DE BARRAS	
				ADHIERA AQUÍ EL CÓDIGO DE BARRAS	
				ADHIERA AQUÍ EL CÓDIGO DE BARRAS	
				ADHIERA AQUÍ EL CÓDIGO DE BARRAS	

INFORMACION DEL ENVÍO DE LA MUESTRA

Firma de la persona que realiza el envío de la muestra _____

Fecha de envío de la muestra _____

Asegúrese de pegar una etiqueta de código de barras a este formulario y otra al tubo de la muestra correspondiente. Adjunte este formulario junto con las muestras debidamente cumplimentado.

INFORMACION DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA (a rellenar por SECUGEN)

Firma de la persona que recibe la muestra _____

Fecha de recepción de la muestra _____

SECUGEN S.L., V.A.T. B 84524438 Registered in the Industrial Registry of Madrid state. Book 22138 Page 64 Section 8 Sheet M394960

Anexo 5. Resultados funcionales completos tras la dosis de carga.

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo* p no corregida	Alelo** p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotípica (%)	Modelo genético	*p-valor corregida	**p corregida	OR (IC95%)
rs1061170	CFH	C,T	GR: T,0,49 PR: T,0,49	0,50		1,0 (0,7-1,5)	CC/TC/TT	GR: 0,28/0,47/0,26 PR: 0,29/0,43/0,28				
rs800292	CFH	G,A	GR: A,0,13 PR: A,0,13	0,46		1,1 (0,6-1,8)	GG/GA/AA	GR: 0,76/0,22/0,02 PR: 0,76/0,24/0,01				
rs1040924	ARMS2	G,T	GR: T,0,43 PR: T,0,41	0,38		0,9 (0,6-1,3)	TT/GT/GG	GR: 0,18/0,49/0,33 PR: 0,15/0,52/0,33				
rs12614	CFB	G,A	GR: T,0,15 PR: T,0,11	0,13		0,69 (0,3-1,2)	CC/CT/TT	GR: 0,72/0,25/0,02 PR: 0,82/0,14/0,04	Ov	0,03	0,27	0,5 (0,22-0,97)
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR: A,0,27 PR: A,0,43	0,0002	0,0018	2,04 (1,39-3,0)	GG/GA/AA	GR: 0,52/0,43/0,05 BR: 0,34/0,47/0,19	Re	5x10 ⁻⁴	0,0045	4,4 (1,92-10,07)
rs1136287	SERPINF1	T,C	GR: C,0,32 PR: C,0,24	0,05	0,45	0,68 (0,45-1,05)	TT/CT/CC	GR: 0,48/0,4/0,11 PR: 0,57/0,37/0,05				
rs7993418	VEGFR1	T,C	GR: C,0,25 PR: C,0,21	0,16		0,7 (0,5-1,23)	CC/CT/TT	GR: 0,05/0,4/0,55 PR: 0,05/0,31/0,64				
rs3025000	VEGFA	C,T	GR: T,0,30 PR: T,0,22	0,05	0,45	0,7 (0,44-1,04)	CC/CT/TT	GR: 0,48/0,45/0,07 PR: 0,58/0,39/0,03				
rs69947	VEGFA	C,A	GR: A,0,48 PR: A,0,47	0,46		0,9 (0,67-1,4)	AA/AC/CC	GR: 0,23/0,51/0,26 PR: 0,21/0,52/0,27				

MAF: *minor allele frequency*; BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza; Do: dominante; Re: recesivo; Ov: sobredominante;
* p no corregida: valor del modelo de regresión logística; valor de p significativa < 0,05; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

Anexo 6. Resultados funcionales completos tras 12 meses de tratamiento.

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo* p no corregida	Alelo** p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotípica (%)	Modelo genético
rs1061170	CFH	C,T	GR: T,0,48 PR: T,0,48	0,52		1,00 (0,7-1,4)	CC/TC/TT	GR: 0,29/0,46/0,26 PR: 0,29/0,45/0,26	
rs800292	CFH	G,A	GR: A,0,13 PR: A,0,13	0,5		0,97 (0,6-1,6)	GG/GA/AA	GR: 0,76/0,22/0,03 PR: 0,76/0,22/0,02	
rs1040924	ARMS2	G,T	GR: T,0,44 PR: T,0,4	0,16		0,82 (0,6-1,2)	TT/GT/GG	GR: 0,2/0,49/0,32 PR: 0,14/0,51/0,35	
rs12614	CFB	G,A	GR: T,0,14 PR: T,0,11	0,17		0,7 (0,4-1,3)	CC/CT/TT	GR: 0,75/0,23/0,02 PR: 0,81/0,17/0,02	
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR: A,0,29 PR: A,0,32	0,22		1,1 (0,8-1,7)	GG/GA/AA	GR: 0,48/0,45/0,06 PR: 0,47/0,41/0,12	
rs1136287	SERPINF1	T,C	GR: C,0,33 PR: C,0,26	0,05	0,45	0,7 (0,5-1,05)	TT/CT/CC	GR: 0,47/0,4/0,13 PR: 0,54/0,4/0,06	
rs7993418	VEGFR1	T,C	GR: C,0,26 PR: C,0,23	0,23		0,8 (0,5-1,2)	CC/CT/TT	GR: 0,05/0,42/0,53 PR: 0,06/0,34/0,6	
rs3025000	VEGFA	C,T	GR: T,0,27 PR: T,0,29	0,3		0,76 (0,8-1,7)	CC/CT/TT	GR: 0,51/0,45/0,04 PR: 0,5/0,42/0,08	
rs69947	VEGFA	C,A	GR: C,0,49 PR: C,0,43	0,08		0,77 (0,55-1,1)	AA/AC/CC	GR: 0,23/0,53/0,24 PR: 0,17/0,52/0,31	

MAF: *minor allele frequency*; BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; Do: dominante; Re: recesivo; Ov: sobredominante;

* p no corregida: valor del modelo de regresión logística; valor de p significativa <0,05; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

Anexo 7. Resultados completos del grosor central foveal tras la fase de carga.

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo* p no corregida	Alelo** p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotípica (%)	Modelo genético	*p-valor genético	**p corregida	OR (IC95%)
rs1061170	CFH	C,T	GR: C, 0,52 PR: C, 0,43	0,096		0,7 (0,4-1,1)	CC/CT/TT	GR:0,31/0,43/0,27 PR:0,27/0,31/0,42	Do	0,04	0,36	0,5 (0,2-0,9)
rs800292	CFH	G,A	GR:A,0,13 PR:A,0,14	0,729		1,1 (0,6-2,1)	AA/GA/GG	GR:0,0,26/0,74 PR:0,01/0,26/0,73	Re	0,0048	0,043	NA (0,0-NA)
rs1040924	ARMS2	G,T	GR:T,0,41 PR:T,0,44	0,639		1,1 (0,7-1,7)	GG/GT/TT	GR:0,31/0,56/0,14 PR:0,33/0,47/0,2				
rs12614	CFB	G,A	GR:A,0,06 PR:A,0,07	0,74		1,1 (0,5-2,7)	AA/GA/GG	GR:0,01/0,1/0,89 PR:0,01/0,12/0,87				
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR:C,0,28 PR:C,0,35	0,133		1,4 (0,9-2,2)	CC/TC/TT	GR:0,08/0,39/0,53 PR:0,14/0,43/0,43				
rs1136287	SERPINF1	T,C	GR:A,0,37 PR:A,0,27	0,066		0,6 (0,4-1,0)	AA/GA/GG	GR:0,13/0,48/0,39 PR:0,06/0,43/0,51				
rs7993418	VEGFR1	T,C	GR:C,0,27 PR:C,0,15	0,012	0,10	0,5 (0,3-0,9)	CC/TC/TT	GR:0,05/0,43/0,52 PR:0,02/0,26/0,72	Do	0,01	0,13	0,4 (0,2-0,9)
rs3025000	VEGFA	C,T	GR:T, 0,27 PR:T,0,26	0,764		0,9 (0,6-1,5)	CC/CT/TT	GR:0,48/0,49/0,02 PR:0,54/0,41/0,05				
rs69947	VEGFA	C,A	GR:A,0,47 PR:A,0,51	0,527		1,1 (0,7-1,7)	AA/CA/CC	GR:0,23/0,49/0,28 PR:0,24/0,52/0,23				

MAF: *minor allele frequency*; BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confianza; Do: dominante; Re: recesivo; Ov: sobredominante;
* p no corregida: valor del modelo de regresión logística; valor de p significativa < 0,05; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

Anexo 8. Resultados completos de la respuesta anatómica del grosor central foveal tras 12 meses de tratamiento.

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo* p no corregida	Alelo** p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotípica (%)	Modelo genético	*p-valor corregida	**p corregida	OR (IC95%)
rs1061170	CFH	C,T	GR: T, 0,45 PR: T, 0,49	0,565		1,138(0,73- 1,76)	CC/CT/TT	GR:0,31/0,47/0,22 PR:0,3/0,42/0,27	Re	0,017		NA(0,0-NA)
rs800292	CFH	G,A	GR:A,0,13 PR:A,0,16	0,548		1,211(0,64- 2,26)	AA/GA/GG	GR:0,0,27/0,73 PR:0,05/0,21/0,74	Re			
rs1040924	ARMS2	G,T	GR:T,0,44 PR:T,0,42	0,654		0,902(0,57- 1,41)	GG/GT/TT	GR:0,31/0,49/0,2 PR:0,33/0,5/0,17				
rs12614	CFB	G,A	GR:A,0,06 PR:A,0,08	0,671		1,207(0,5- 2,87)	AA/GA/GG	GR:0,0,13/0,87 PR:0,01/0,12/0,86				
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR:C,0,27 PR:C,0,39	0,023	0,18	1,739(1,07- 2,81)	CC/TC/TT	GR:0,08/0,37/0,54 PR:0,16/0,47/0,37	Do	0,03	0,27	2,1(1,1-4,2)
rs1136287	SERPINF1	T,C	GR:A,0,34 PR:A,0,25	0,085		0,65(0,39- 1,06)	AA/GA/GG	GR:0,1/0,48/0,42 PR:0,06/0,39/0,55				
rs7993418	VEGFR1	T,C	GR:C,0,24 PR:C,0,20	0,3		0,754(0,44- 1,28)	CC/TC/TT	GR:0,03/0,42/0,55 PR:0,07/0,26/0,68	Ov	0,03	0,27	0,5(0,2-0,9)
rs3025000	VEGFA	C,T	GR:T, 0,30 PR:T,0,28	0,777		0,93(0,56- 1,51)	CC/CT/TT	GR:0,45/0,5/0,05 PR:0,49/0,45/0,06				
rs69947	VEGFA	C,A	GR:A,0,45 PR:A,0,45	1		0,988(0,63- 1,54)	AA/CA/CC	GR:0,19/0,53/0,28 PR:0,23/0,44/0,33				

MAF: *minor allele frequency*; BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; Do: dominante; Re: recesivo; Ov: sobredominante;
* p no corregida: valor de p de regresión logística; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

Anexo 9. Resultados completos de la respuesta del fluido tras la fase de carga.

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo* p no corregida	Alelo** p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotípica (%)	Modelo genético	*p-valor corregida	**p corregida	OR (IC95%)
rs1061170	CFH	C,T	GR:T,0,49 PR:T,0,50	0,806		1,039 (0,76-1,41)	CC/CT/TT	GR:0,27/0,48/0,25 PR:0,27/0,46/0,27				
rs800292	CFH	G,A	GR:A,0,12 PR:A,0,17	0,126		1,407 (0,9-2,18)	AA/GA/GG	GR:0,03/0,19/0,78 PR:0,03/0,27/0,70	Do	0,047	0,423	1,69 (1,01-2,85)
rs1040924	ARMS2	G,T	GR:T,0,39 PR:T,0,44	0,208		1,223 (0,89-1,67)	GG/GT/TT	GR:0,38/0,46/0,16 PR:0,29/0,54/0,17				
rs12614	CFB	G,A	GR:A,0,07 PR:A,0,08	0,446		1,269(0,69-2,27)	AA/GA/GG	GR:0,01/0,1/0,88 PR:0,0/0,16/0,84				
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR:C,0,31 PR:C,0,30	0,841		0,96 (0,68-1,36)	CC/TC/TT	GR:0,1/0,41/0,49 PR:0,1/0,39/0,5				
rs1136287	SERPINF1	T,C	GR:A,0,29 PR:A,0,33	0,267		1,209 (0,86-1,69)	AA/GA/GG	GR:0,06/0,46/0,48 PR:0,12/0,43/0,45				
rs7993418	VEGFR1	T,C	GR:C,0,23 PR:C,0,24	0,92		1,019 (0,7-1,46)	CC/TC/TT	GR:0,05/0,37/0,58 PR:0,05/0,38/0,57				
rs3025000	VEGFA	C,T	GR:T,0,28 PR:T,0,32	0,298		1,196 (0,85-1,67)	CC/CT/TT	GR:0,48/0,47/0,05 PR:0,45/0,47/0,09				
rs69947	VEGFA	C,A	GR:A,0,49 PR:A,0,43	0,136		0,8 (0,6-1,0)	AA/CA/CC	GR:0,23/0,52/0,25 PR:0,21/0,45/0,34	Do	0,044	0,396	0,59 (0,36-0,99)

MAF: *minor allele frequency*; BR: *buenos respondedores*; PR: *pobres respondedores*; OR: *Odds ratio*; IC: *intervalo de confianza*; Do: *dominante*; Re: *recesivo*; Ov: *sobredominante*;
* p no corregida: valor del modelo de regresión logística; valor de p significativa <0,05; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

Anexo 10. Resultados completos de la respuesta del fluido a los 12 meses.

SNP	Gen	Alelos	MAF	Alelo* p no corregida	Alelo** p corregida	Alelo OR (IC95%)	Genotipo	Frecuencia genotípica (%)	Modelo genético	*p-valor corregida	**p corregida	OR (IC95%)
rs1061170	CFH	C,T	GR: T, 0,48 PR: T, 0,52	0,516		1,1104 (0,80-1,52)	CC/CT/TT	GR:0,27/0,5/0,23 PR:0,29/0,41/0,3	Do	0,028	0,252	1,80 (1,06-3,06)
rs800292	CFH	G,A	GR:A,0,11 PR:A,0,17	0,022	0,198	1,6901 (1,07-2,66)	AA/GA/GG	GR:0,02/0,19/0,79 PR:0,04/0,27/0,69	Do	0,028	0,252	1,80 (1,06-3,06)
rs1040924	ARMS2	G,T	GR:T,0,40 PR:T,0,43	0,516		1,112 (0,80-1,53)	GG/GT/TT	GR:0,36/0,48/0,16 PR:0,33/0,49/0,18				
rs12614	CFB	G,A	GR:A,0,07 PR:A,0,07	0,823		0,935 (0,50-1,72)	AA/GA/GG	GR:0,02/0,12/0,87 PR:0/0,14/0,86				
rs12603486	SERPINF1	G,A	GR:C,0,31 PR:C,0,32	0,841		1,034 (0,73-1,46)	CC/TC/TT	GR:0,11/0,4/0,49 PR:0,1/0,44/0,46				
rs1136287	SERPINF1	T,C	GR:A,0,30 PR:A,0,31	0,689		1,072 (0,75-1,51)	AA/GA/GG	GR:0,07/0,44/0,48 PR:0,08/0,46/0,46				
rs7993418	VEGFR1	T,C	GR:C,0,26 PR:C,0,21	0,117		0,741 (0,5-1,07)	CC/TC/TT	GR:0,06/0,4/0,54 PR:0,03/0,36/0,61				
rs3025000	VEGFA	C,T	GR:T,0,29 PR:T,0,32	0,543		1,113 (0,78-1,57)	CC/CT/TT	GR:0,47/0,48/0,05 PR:0,45/0,46/0,09				
rs69947	VEGFA	C,A	GR:A,0,47 PR:A,0,46	0,887		0,978 (0,71-1,34)	AA/CA/CC	GR:0,21/0,51/0,28 PR:0,22/0,48/0,3				

MAF: minor allele frequency; BR: buenos respondedores; PR: pobres respondedores; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; Do: dominante; Re: recesivo; Ov: sobredominante;
* p no corregida: valor de p significativa < 0,05; ** valor de p corregida para test múltiples usando el método de Bonferroni

Anexo 11. Artículo aceptado en Acta Ophthalmologica, 2017 (pendiente de publicación).

ACTA OPHTHALMOLOGICA 2017

Association between *CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGF1* and *VEGF* polymorphisms and anatomical and functional response to ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration

Estefania Cobos,^{1,‡} Sergio Recalde,^{2,3,†,‡} Jaouad Anter,⁴ Maria Hernandez-Sanchez,^{2,3,†} Carla Barreales,⁵ Leticia Olavarrieta,⁶ Alicia Valverde,^{7,†} Marta Suarez-Figueroa,^{8,†} Fernando Cruz,⁹ Maximino Abinales,^{10,†} Julian Pérez-Pérez,⁶ Patricia Fernández-Robredo,^{2,3,†} Luis Arias^{1,†,§} and Alfredo García-Layana^{2,3,†,§}

¹Department of Ophthalmology, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain

²Ophthalmology Experimental Laboratory, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

³Department of Ophthalmology, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

⁴Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas and Ciber de Enfermedades Raras, Madrid, Spain

⁵Department of Ophthalmology, Hospital Virgen del Camino, Pamplona, Spain

⁶Secugen SL, Madrid, Spain

⁷Department of Ophthalmology, Hospital Clínico de Madrid, Madrid, Spain

⁸Department of Ophthalmology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

⁹Department of Ophthalmology, Complejo asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

¹⁰Department of Ophthalmology, Hospital Universitario Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT.

Purpose: We sought to determine if specific genetic single nucleotide polymorphisms (SNPs) influence vascular endothelial growth factor inhibition response to ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration (AMD).

Methods: A total of 403 Caucasian patients diagnosed with exudative AMD were included. After a three-injection loading phase, a pro re nata regimen was followed. Nine SNPs from six different genes (*CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGF1*, *VEGF*) were genotyped. Non-genetic risk factors (gender, smoking habit and hypertension) were also assessed. Patients were classified as good or poor responders (GR or PR) according to functional (visual acuity), anatomical (foveal thickness measured by OCT) and fluid criteria (fluid/no fluid measured by OCT).

Results: Hypertension was the environmental factor with the strongest poor response association with ranibizumab in the anatomical measure after the loading phase ($p = 0.0004$; OR 3.7; 95% CI, 2.4–5.8) and after 12 months of treatment ($p = 10^{-5}$; OR 2.3; 95% CI, 1.5–3.4). The genetic variants rs12614 (*CFB*), rs699947 (*VEGFA*) and rs7993418 (*VEGF1*) predisposed patients to a good response, while rs12603486 and rs1136287 (*SERPINF1*) were associated with a poor response. The protective genotype of rs800292 variant (*CFH*) was also associated with a poor anatomical response ($p 0.0048$).

Conclusion: All these data suggest that genetics play an important role in treatment response in AMD patients.

Key words: age-related macular degeneration – choroidal neovascularization – pharmacogenetic study – ranibizumab

Acta Ophthalmol.

© 2017 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation. Published by John Wiley & Sons Ltd

doi: 10.1111/aos.13519

[†]Member of Red Temática de Investigación Cooperativa, RETICS, RD07/0062 and RD12/0034.

[‡]These authors contributed equally to this work.

[§]These authors contributed equally to this work.

Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is a chronic, progressive disease of the central retina. Macular changes related to ageing are typically classified into one of four categories: normal age-related changes, early AMD, intermediate AMD or late AMD (Ferris et al. 2013). Most visual loss happens in late AMD due to neovascular (i.e., wet AMD) or geographic atrophy (dry AMD; Lim et al. 2012). Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of low vision and legal blindness in adults in developed countries, and its prevalence is expected to increase in the next few decades. While no good treatments have yet been found for dry AMD, effective treatments—primarily the use of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) inhibitors—are available for wet AMD (Rasmussen et al. 2017). However, these require repeated and expensive intravitreal injections that cannot be delayed (Real & Luna 2016) and frequent ophthalmological examinations,

thus making treatment costly and time consuming, so AMD is likely to become an increasingly challenging problem for healthcare systems worldwide (Rein et al. 2006; Kume et al. 2016; Wu et al. 2016).

Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial disease influenced by age, genetic and environmental factors, such as smoking, obesity, hypertension and cardiovascular disease (Sobrin & Seddon 2014). Numerous reports have found that certain genetic variants are strongly associated with a high risk of developing AMD, concluding that AMD heritability is as high as 71% (Edwards et al. 2005; Haines et al. 2005; Klein et al. 2005; Seddon et al. 2005; Holliday et al. 2013; The AMD Gene Consortium 2013; Dietzel et al. 2014; Lechanteur et al. 2015). It is a polygenic disease and multiple common genetic variants contribute to its development (Chen et al. 2010; Arakawa et al. 2011; Almeida et al. 2013; Holliday et al. 2013; Fritsche et al. 2014; Black & Clark 2016). Genetic loci from several different pathways may be involved in the development and progression of AMD, including genes associated with lipid and extracellular matrix dysregulation, DNA repair, immune response and inflammation. One of the most important pathways associated with AMD are the complement cascade genes (Klein et al. 2005; Patel et al. 2008; Recalde et al. 2008; Gorin 2012; Martínez-Barricarte et al. 2012; Sobrin & Seddon 2014; Grassmann et al. 2015; Hall et al. 2015). Many genome-wide association studies have been performed in this field in recent years, and as a result the number of SNPs associated with the risk of developing AMD has increased (Neale et al. 2010; Arakawa et al. 2011; Fritsche et al. 2016).

Age-related macular degeneration (AMD) treatments have improved greatly in recent decades. Although photodynamic therapy was proven effective in reducing the rate of visual loss nearly 20 years ago (American Academy of Ophthalmology 2000), the development of anti-VEGF therapy revolutionized the treatment of AMD due to the encouraging outcomes in preventing visual loss and increasing visual acuity (VA) (The Eyetech Study Group 2003). Many patients are now able to maintain their vision, with a

third of patients gaining 15 letters or more (Rosenfeld et al. 2006), and with less visits thanks to new treatment regimens (Kvannli & Krohn 2017). However, despite the good results for most patients, there is a subgroup of patients that not only fail to recover their vision, but also continue losing VA despite treatment (Kanoff & Miller 2013).

At present, it is not possible to predict which patients will respond to treatment. If we could predict the likely response to ranibizumab before treatment, it would be possible to alter the treatment approach in patients expected to be poor or non-responders. In such cases, we could monitor the patients more closely, use more active treatment regimens or administer (in the future) new targeted drugs. Several studies have attempted to determine if genetic factors predispose patients with late AMD to a poor response to anti-VEGF therapy (McKibbin et al. 2012; Abedi et al. 2013a,b; Kanoff & Miller 2013; Park et al. 2014a). However, the results to date have been ambiguous. Indeed, rather than clarifying this issue, the available research appears to have generated more confusion, perhaps due to methodological and demographic differences among the various studies. These studies range from clinical trials with highly restrictive inclusion and exclusion criteria that do not reflect the usual conditions of daily clinical practice to clinical studies with small sample sizes that do not evaluate genes related to anti-VEGF response.

Given this context, particularly the scant data in real-life clinical samples, we carried out the current retrospective study to examine nine SNPs from six different genes previously associated with AMD, including complement and angiogenesis genes as well as genes related to anti-VEGF response. The main aim was to determine whether the presence of these SNPs was associated with anatomical and functional response to ranibizumab treatment in a cohort of Spanish patients treated in real-life clinical practice.

Materials and Methods

Study subjects

This study included 403 eyes from 403 consecutive Caucasian patients (230 women and 173 men) diagnosed with

unilateral exudative AMD. It is a retrospective, observational, multicenter, cohort study conducted between January 2015 and May 2016. All patients were treated with intravitreal ranibizumab injections according to the Spanish Vitreo Retinal Society (SERV) guidelines (three-injection loading phase followed by a *pro re nata* [PRN] treatment regimen). Our study population was retrospectively recruited from six Spanish tertiary care Hospitals (all members of the Spanish Multicenter Group on AMD and the "Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud," RD07/0062).

General inclusion criteria were as follows: diagnosis of AMD with active subfoveal or juxtafoveal choroidal neovascularization (CNV) confirmed by fluorescence angiography (FA) and optical coherence tomography (OCT) and treated with ranibizumab. Exclusion criteria were as follows: previous treatment with photodynamic therapy or another anti-VEGF drug; previous vitrectomy in the study eye; tractional maculopathy and/or epiretinal membrane on the OCT; corneal or lens opacities; lack of integrity of the posterior lens capsule; presence of other retinal diseases associated with CNV; and presence of central serous chorioretinopathy. All patients completed a demographic questionnaire and gave permission for inclusion in a database (Data protection consent) and written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and with the institutional ethics review boards of the Clínica Universidad de Navarra.

Clinical data collection

Patients underwent a complete ophthalmic examination at every consultation, including determination of best corrected visual acuity (BCVA) measured with ETDRS charts at 4 m distance, slit-lamp examination, fundus examination and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT). Central foveal thickness (CFT) and the presence of persistent or recurrent intraretinal or subretinal fluid were assessed by SD-OCT. At the initial consultation, a FA was performed to determine the type of lesion and the size of the neovascular complex. Angiographic subtypes were defined as follows: predominantly classic, minimally classic or occult. Re-treatment

criteria in the monthly consultations after the first three injections were as follows: persistent or recurrent fluid on SD-OCT, loss of >5 letters, new macular haemorrhage or CFT increase >100 μm .

Response evaluation criteria

Patients were classified into two groups—good or poor responders (GR or PR)—for a binomial calculation, according to their response to ranibizumab treatment on the study criteria. Good responders were defined as follows: patients with a gain of ≥ 5 letters of VA measured by ETDRS (functional criteria); reduction of CFT measured by OCT (anatomical criteria); and absence of fluid on OCT (fluid criteria). Poor responders (PR): patients with a gain of less than 5 letters, without reduction in CFT and persistence of fluid on OCT.

Central foveal thickness was measured at the foveola (between retinal inner surface and retinal pigment epithelium) by OCT at baseline, after the loading phase and after 12 months of treatment. Patients with stable CFT or with an increase in CFT were classified as non responders. Patients with a reduction in CFT were classified as good responders.

Non-genetic risk factors (gender, age, age of diagnostic, tobacco and hypertension) were also assessed. Smoking was defined as active and ex-smokers of <20 years.

Genotyping

We reviewed the published literature on genetic associations in AMD and VEGF response to identify the SNPs that showed the most significant associations with AMD (*CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGFR1* and *VEGFA*) and genes that play an important role in the angiogenesis pathway and were good candidates to explain difference in treatment response. These SNPs were selected for this study.

Genomic DNA was extracted from oral swabs using QIAcube (QIAGEN, Valencia, CA). DNA samples were genotyped using nine SNPs from six different genes (*CFH*, *CFB*, *ARMS2*, *SERPINF1*, *VEGFR1* and *VEGFA*) to assess their influence on response to ranibizumab. Genotyping was performed by multiplex PCR and minisequencing. All SNPs analysed in this

Table 1. Characteristics of the candidate SNPs genotyped.

dbSNP ID	Gene	Chromosome region	Major/Minor allele	HWE
rs1061170	<i>CFH</i>	1q32	T/C	0.54
rs800292	<i>CFH</i>	1q32	G/A	0.77
rs10490924	<i>ARMS2</i>	10q26.13	G/C	0.54
rs1136287	<i>SERPINF1</i>	17p13.3	C/T	0.59
rs12603486	<i>SERPINF1</i>	17p13.3	G/A	0.72
rs7993418	<i>VEGFR</i>	13q12	C/T	0.65
rs3025000	<i>VEGFA</i>	6p12	C/T	0.05
rs699947	<i>VEGFA</i>	6p12	A/C	1
rs12614	<i>CFB</i>	6p21.3	C/T	0.13

SNP = Single nucleotide polymorphism (dbSNP ID); HWE = exact test for Hardy-Weinberg equilibrium.

report were in Hardy-Weinberg equilibrium. The characteristics of the candidate polymorphisms are listed in Table 1.

Statistical analysis

The continuous variables (current age and age at diagnosis) were divided into two groups, and the median value for these variables was used as a cut-off point and codified as categorical variables. A multivariable logistic regression model was used to study the association between the nine SNPs and patient response (good or poor responder) to ranibizumab. The model was adjusted to account for environmental variables, which were included as covariates in the regression model.

A univariate logistic regression, adjusted for all covariates, was used to estimate the odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) using SNPStats software (Sole et al. 2006). Analyses were performed for each genetic variant independently of other variants using codominant, dominant, recessive and/or overdominant genetic models based on Akaike information criteria (AIC), which chooses the inheritance model that best fits the data. Correction for multiple testing was performed using the Bonferroni method. For all analyses, $p < 0.05$ was considered statistically significant. A multivariate logistic regression was also performed.

Results

The study included 403 patients (230 women and 173 men). The demographic and clinical characteristics of the study population are summarized in Table 2. Patients were classified into two groups

according to their response (good or poor response) to ranibizumab on the following variables: VA (functional criteria), macular thickness measured by OCT (anatomical criteria) and presence or absence of fluid measured by OCT (fluid criteria). There was no statistical significant difference between groups in the number of injections received in 12 months ($p > 0.05$).

Our data show that hypertension was a clear risk factor for a poor anatomical response. A comparison of the whole group to the good responder group subset after the loading phase ($p = 0.048$; OR, 0.7; 95% CI, 0.5–0.9) and after 12 months of treatment ($p = 0.003$; OR, 0.6; 95% CI 0.4–0.8) revealed a significant statistical difference. This difference was even greater when comparing the presence of hypertension in good responders versus poor responders after the loading phase ($p = 0.0004$; OR 3.7; 95% CI, 2.4–5.8) and after 12 months of treatment ($p = 0.00001$; OR 2.3; 95% CI, 1.5–3.4).

Smoking was found to be a risk factor for not achieving a dry macula at 12 months of treatment (GR versus PR: $p = 0.036$; OR, 1.7; 95% CI, 1.1–2.7). Females were more likely to present a poor anatomical response at 12 months of treatment (GR versus PR: $p = 0.036$; OR, 1.7; 95% CI, 1.1–2.7).

Table 3 shows the pharmacogenetic results of the univariate analysis after the loading phase. On VA measures, the A allele of rs12603486 (*SERPINF1*) was associated with a risk of poor response (OR 2; 95% CI, 1.4–3; $p = 2 \times 10^{-4}$; corrected p , 0.0018). In the recessive model, the GG/GA genotypes versus AA genotype were associated with a poor functional response (OR, 4.4; 95% CI, 1.0–10.0; $p = 5 \times 10^{-4}$; corrected p , 0.0045).

Table 2. Characteristics of the study population and subgroups according to their Ranibizumab response.

	Functional response (VA)						Anatomical response (CFT)						Fluid criteria						
	Loading phase			12 months			Loading phase			12 months			Loading phase			12 months			
	GR	PR	OR 95%CI	GR	PR	OR 95%CI	GR	PR	OR 95%CI	GR	PR	OR 95%CI	GR	PR	OR 95%CI	GR	PR	OR 95%CI	
Total	403	306	79.9	97	264	139	192	210	189	214	189	247	156	236	167	236	167	236	167
Number	80.8	80.8	79.9	79.9	81.2	79.5	81.2	79.5	79.8	81.1	79.8	81.7	78.9	81.3	78.8	81.3	78.8	81.3	78.8
Mean age (±SD)	230	170	(±6.7)	(±7.9)	(±6.9)	(±7.1)	(±6.9)	(±7.1)	(±7.7)	(±7.8)	(±7.7)	(±6.5)	(±7.5)	(±6.5)	(±7.6)	(±6.5)	(±7.6)	(±6.5)	(±7.6)
Female (%)	57	66	(55.5)	(56.7)	(52.7)	(56.7)	(52.6)	(56.7)	(57.1)	(55.1)	(57.1)	(56.3)	(57.1)	(52.1)	(60.5)	(52.1)	(60.5)	(52.1)	(60.5)
Smoke (%)	257	195	(21.6)	(25.8)	(24.2)	(24.5)	(27.6)	(24.1)	(22.9)	(22.9)	(25.9)	(18.6)	(25.0)	(17.8)	(26.9)	(17.8)	(26.9)	(17.8)	(26.9)
Hypertension (%)	63.7	63.7	(66.0)	(66.0)	(68.2)	(64.7)	(55.2)*†	(72.2)*†	(72.2)*†	(51.4)*†	(51.4)*†	(63.6)	(56.4)	(59.7)	(62.3)	(59.7)	(62.3)	(59.7)	(62.3)

GR = good responders; PR = poor responders; OR = odds ratio; CI = confidence interval; VA = visual acuity; CFT = central foveal thickness.

* p < 0.05 versus General Data.

† p < 0.05 GR versus BR.

‡ p < 0.001 GR versus BR.

In the overdominant model, patients with the C/T versus the C/C-T/T genotype at rs12614 (*CFB*) were more likely to achieve better VA results (OR 0.5; 95% CI, 0.2–0.9; p = 0.03; corrected p, 0.27), although this result was no longer significant after the Bonferroni correction.

In terms of anatomical outcomes after the loading phase, the G allele of rs1136286 (*SERPINF1*) was associated with less reduction in CFT (OR 1.5; 95% CI, 1.1–2.0; p = 0.02; corrected p, 0.18), but without reaching significance after the Bonferroni correction. The T/C-C/C versus T/T genotypes of rs1061170 (*CFH*) and rs7993418 (*VEGFR1*) were both associated with a better anatomical response in the dominant model (p = 0.04 and p = 0.02, respectively). In the recessive model, AA versus GG/GA of rs800292 (*CFH*) was associated with a poor anatomical response (p 0.0048; corrected p, 0.043).

Table 4 summarizes the pharmacogenetic results of the univariate analysis after 12 months of treatment. The C allele of rs1136287 (*SERPINF1*) was associated with less reduction in CFT (OR 1.7; 95% CI, 1.1–2.8; p = 0.02; corrected p, 0.18). On the dominant model, patients with C/T-C/C genotypes were 2.1 times (95% CI, 1.1–4.2; p = 0.03; corrected p, 0.27) more likely to have a poor anatomical response than patients carrying the T/T genotype. On the overdominant model, the C/T genotype of rs7993418 (*VEGFR1*) was associated with a good anatomical response (OR 0.5, 95% CI, 0.2–0.9; p = 0.03; corrected p, 0.27), but this finding was not statistically significant after Bonferroni correction.

In terms of the presence or absence of intraretinal fluid in the OCT at 12 months, the A allele of rs800292 (*CFH*) was more prevalent in patients that had not achieved a dry macula (OR 1.7; 95% CI, 1.1–2.7; p = 0.02; corrected p, 0.19). G/A and A/A were the most prevalent genotypes in this group of persistent intraretinal fluid according to the dominant model (OR 1.8; 95% CI, 1.1–3.1; p = 0.028; corrected p, 0.25).

None of the other SNPs evaluated in this study showed any statistically significant association with ranibizumab response.

Table 5 summarizes the results of the multivariate logistic regression analysis.

Table 3. Relevant results after de loading phase.

SNPs	Gene	Alleles	MAF	Allele Uncorrected p-value*	Allele Corrected p-value**	Allele OR (95%CI)	Genotype	Genotype freq (%)	Genetic model	p-value*	Corrected p-value**	OR (95%CI)
Functional response												
rs12614	<i>CFB</i>	C,T	GR:T,0.15 PR:T,0.11	0.13		0.7 (0.3–1.2)	CC/CT/TT	0.72 0.25 0.04	Ov	0.03	0.27	0.5 (0.2–0.9)
rs12603486	<i>SERPINF1</i>	G,A	GR:A,0.27 PR:A,0.43	0.0002	0.0018	2.0 (1.4–3.0)	GG/GA/AA	0.52 0.43 0.05	Re	5×10^{-4}	0.0045	4.4 (1.9–10.0)
Anatomical response												
Central Foveal thickness												
rs1061170	<i>CFH</i>	C, T	GR:C,0.52 PR:C,0.43	0.096		0.7 (0.4–1.1)	CC/CT/TT	0.31 0.43 0.27	Do	0.041	0.36	0.5 (0.2–0.9)
rs800292	<i>CFH</i>	G,A	GR:A,0.13 PR:A,0.14	0.729		1.1 (0.6–2.1)	AA/GA/GG	0 0.26 0.74	Re	0.0048	0.043	NA (0.0–NA)
rs12603486	<i>SERPINF1</i>	G,A	GR:A,0.37 PR:A,0.27	0.04	0.36	0.65 (0.4–1.0)	GG/GA/AA	0.01 0.26 0.73	Do	0.11	–	0.6 (0.3–1.3)
rs7993418	<i>VEGFR1</i>	T,C	GR:C,0.27 PR:C,0.15	0.012		0.5 (0.3–0.9)	CC/TC/TT	0.3 0.5 0.2	Do	0.01	0.13	0.4 (0.2–0.9)
Fluid response												
rs800292	<i>CFH</i>	G,A	GR:A,0.12 PR:A,0.17	0.126		1.4 (0.9–2.2)	AA/GA/GG	0.03 0.19 0.78	Ov	0.03	0.34	1.78 (1.1–3.1)
rs699947	<i>VEGFA</i>	C,A	GR:A,0.49 PR:A,0.43	0.136		0.8 (0.6–1.0)	AA/CA/CC	0.23 0.52 0.25	Do	0.044	0.39	0.6 (0.4–0.9)

Genotype freq = genotype frequency; MAF = minor allele frequency; GR = good responders; PR = poor responders; OR = odds ratio; CI = confidence interval; Do = dominant; Re = recessive; Ov = overdominant.

* Uncorrected p-value: value from logistic regression model; p-value significance <0.05; ** p-value corrected for multiple testing using Bonferroni method.

which confirmed the results obtained on the univariate analyses. The multivariate analysis was adjusted to account for environmental variables and all the analysed SNPs, which were included as covariates in the regression model. After the loading phase, variants of the *SERPINF1*, *VEGFR1* and *VEGFA* genes were strongly associated with ranibizumab response. Environmental factors such as tobacco smoking and hypertension, and also female gender and age, were also associated with treatment results. Elderly patients (>group mean age: 80 years old) appear to have better outcomes with ranibizumab treatment compared to non-elderly.

We also analysed the association between these SNPs and continuous variables such as CFT and VA. Interestingly, patients who had a protective genotype (AA) for neovascular AMD of rs800292 (*CFH*) had better pre-treatment VA than patients with other genotypes (AG/GG), but their response to ranibizumab was significantly inferior in terms of VA after the first injection and after the loading phase. They improve more gradually than patients with AG/GG genotypes, who have an intense response during the firsts 3 months of treatment, with a final stabilization. Nevertheless, their final VA at 12 months was worse than patients with AA genotype.

Discussion

The number of patients evaluated in the present pharmacogenetic study is among the highest reported to date. We hypothesized that the variable response to anti-VEGF treatment observed in clinical practice could be explained by genotype. We analysed not only AMD risk genes, but also genes associated with VEGF regulation such as *SERPINF1*, *VEGFA* and *VEGFR*. We found—for the first time—that the presence of *SERPINF1* is associated with poor outcomes in terms of VA and decreased CFT. *CFH*, *VEGFA* and *VEGFR1* genes, are associated with treatment response. Finally, our data confirm that certain environmental factors, particularly hypertension, have an important influence on treatment outcomes.

It is well-known that genetic factors play an important role in the pathogenesis of AMD. In recent years, many

Table 4. Relevant results at 12 months.

SNPs	Gene	Alleles	MAF	Allele Uncorrected p-value*	Allele Corrected p-value**	Allele OR (95%CI)	Genotype	Genotype freq (%)	Genetic model	p-value*	Corrected p-value**	OR (95%CI)
Anatomical response												
Central Foveal thickness												
rs1136287	<i>SERPINF1</i>	T,C	GR:0,27 PRC:0,39	0,02	0,18	1,7 (1,0-2,8)	CC/TC/TT	0,08 0,16 0,03	Do	0,03	0,27	2,1 (1,1-4,2)
rs7993418	<i>VEGFR1</i>	T,C	GR:0,24 PRC:0,20	0,3		0,7 (0,4-1,3)	CC/TC/TT	0,07 0,26 0,68	Ov	0,03	0,27	0,5 (0,2-0,9)
Fluid response												
rs800292	<i>CFH</i>	G,A	GR:A,0,11 PR:A,0,17	0,022	0,19	1,7 (1,0-2,7)	AA/GA/GG	0,02 0,04 0,27	Do	0,028	0,25	1,8 (1,1-3,1)

Genotype freq = genotype frequency; MAF = minor allele frequency; GR = good responders; PR = poor responders; OR = odds ratio; CI = confidence interval; Do = dominant; Re = recessive; Ov = overdominant.

* Uncorrected p-value; value from logistic regression model; p-value significance <0.05; ** p-value corrected for multiple testing using Bonferroni method.

studies have investigated the impact of genetic variants on anatomical and functional response to treatment in AMD patients (Brantley et al. 2007; Imai et al. 2010; Kloeckener-Gruissem et al. 2011; Boltz et al. 2012; Smail-hodzic et al. 2012; Hagstrom et al. 2013; Kitchens et al. 2013). Naturally, given the high prevalence of AMD and its corresponding high treatment-related costs on healthcare systems (Hernandez-pastor et al. 2008; Kume et al. 2016; Wu et al. 2016), retinal specialists are eager to ascertain if it is possible to predict treatment outcomes.

Most studies of AMD are clinical trials, with all the benefits and drawbacks that entails: strict inclusion and exclusion criteria, high homogeneity but less representative of general population, and with a possible genetic bias. By contrast, this was a retrospective study of daily clinical practice that included a large sample of AMD patients that is highly representative of the neovascular AMD population in Spain. As a result, the external validity of our study is high.

After a first pilot study conducted with a small sample size and analysing only three SNPs (*ARMS2* rs10490923, *CFH* rs1410996 and *HTRA1* rs11200638), where no association with ranibizumab response was found (Cruz-Gonzalez et al. 2016), we decided to conduct a study increasing sample size and studying genes not only related with AMD risk, but also with VEGF and their receptor. We grouped patients into one of two groups—good or poor responders—according to their response (VA and anatomical) to ranibizumab treatment at two time points: after the loading dose and after 12 months of follow-up. Because VA can be a subjective measure and may not correlate well with changes in macular anatomy detected on OCT, we evaluated treatment response using both VA measures and tomographic results. For this reason, we used CFT and the presence or absence of intraretinal and subretinal fluid as objective measures.

SERPINF1 (or *PEDF*) is a protein secreted by human retina pigment epithelial cell. It is a potent antiangiogenic agent that inhibits the migration of endothelial cells. *SERPINF1* also contributes to the regulation of blood vessel growth in the eye by creating a permissive environment for angiogenesis

Table 5. Multivariable logistic regression analysis at loading phase and 12 months.

Loading phase		12 months						
Variable	Gene	Genotype/values	B	Sig	OR	Lower	Upper	95% CI
FUNCTIONAL RESPONSE								
rs12614	<i>CFH</i>	C/T	-1.57	0.058	0.21	0.04	1.05	
rs12603486	<i>SERPINF1</i>	G/G	-1.75	0.000	0.17	0.07	0.43	
Constant			1.09	0.205	2.96			
ANATOMICAL RESPONSE								
Central Foveal Thickness								
Age (old)		>80.8 years	-0.45	0.048	0.64	0.41	0.99	
rs12603486	<i>SERPINF1</i>	G/G	-0.86	0.046	0.43	0.19	0.98	
Constant			-0.33	0.73	0.72			
Fluid Response								
Hypertension		Yes	0.43	0.075	1.53	0.95	2.46	
rs699947	<i>VEGFA</i>	C/C	0.58	0.083	1.79	0.92	3.5	
Age (old)		>80.8 years	-0.80	0.001	0.45	0.28	0.72	
Constant			-0.03	0.880	0.95			

Reference: Good response. B = multivariate logistic regression value; Sig = p-value significance (<0.05); CI 95% = 95% confidence interval. Age (old): patients with >80.8 years old (mean age of the group).

when oxygen is limited and an inhibitory environment when oxygen concentration is normal or high (Dawson et al. 1999). Given the important role of *SERPINF1* in the angiogenesis pathway, it is not surprising that this protein could be an important biomarker in AMD pharmacogenetics. Several authors have studied the association between *SERPINF1* (rs1136287) and visual outcomes after intravitreal bevacizumab or ranibizumab (Imai et al. 2010; Park et al. 2014a,b), without finding any significant association between this SNP and post-treatment functional and/or anatomical outcomes. However, ours is the first pharmacogenetic study of AMD to include rs12603486. Ours is the first study to find a statistically significant association between both *SERPINF1* SNPs (rs12603486 and rs1136287) and visual and tomographic outcomes after ranibizumab treatment.

CFH is a regulator of the basal activation of the alternative pathway of the complement cascade, and thus, it has an anti-inflammatory role (Thakkinstian et al. 2006). The inflammatory pathogenesis theory is supported by the existence of multiple complement-related AMD risk alleles (Maller et al. 2006; Francis et al. 2009; Sobrin & Seddon 2014). The rs1061170 of *CFH* has been associated with all forms of AMD in various populations worldwide (Edwards et al. 2005; Haines et al. 2005; Leveziel et al. 2011). We found that the CC genotype of rs1061170 in *CFH* (the principal risk genotype) was significantly associated (before Bonferroni correction) with a better anatomical response after the ranibizumab loading phase. Our results suggest that AMD patients who carry the risk allele will respond initially better to ranibizumab in terms of anatomical outcomes than patients without this allele. This finding seems to contradict the results of other studies in which outcomes (VA, number of injections) were worse in patients carrying the risk genotype of *CFH* rs1061170 (Brantley et al. 2007; Lee et al. 2009; Imai et al. 2010; Francis 2011; Kloekener-Gruissem et al. 2011; Nischler et al. 2011; Smailhodzic et al. 2012; Shah et al. 2016). Nevertheless, our findings are consistent with those reported by McKibbin et al. (2012). Those authors hypothesized that patients carrying AMD risk alleles

would benefit most from anti-VEGF therapy. We found that risk genotype is associated with better anatomical response but not better functional response. However, after Bonferroni correction, this result was not statistically significant and was not confirmed at 12 months of follow-up.

Figure 1A–D show the differences in VA and CFT between genotypes of rs800292 in *CFH*. Patients with the AA genotype (protective genotype) presented significantly better VA and less CFT before treatment and the loading phase, but also had persistent intraretinal fluid after 12 months of treatment. Patients with this genotype appear to show a better initial profile, but they have a sustained VA improving after treatment, comparing with the intense response of the patients with a high-risk profile (GA/GG genotypes). In these patients, we suspect that the protective genotype of rs800292 could cause AMD patients to develop a less aggressive form of wet AMD, and thus, the anti-VEGF response (especially

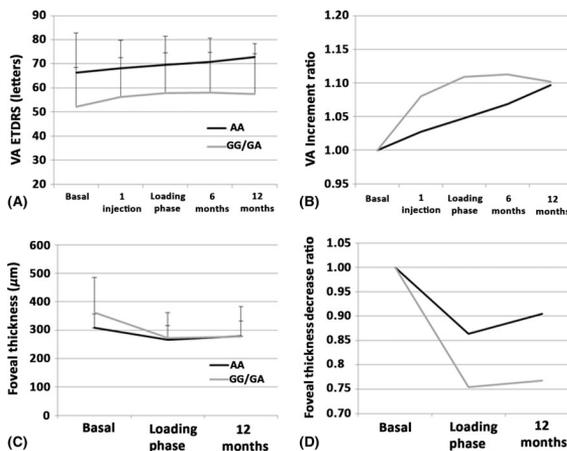


Fig. 1. (A) Evolution of VA in patients carrying the protective genotype (AA) and risk genotypes (AG/GG). (B) Change in relative VA in AA group versus AG/GG group. (C) Evolution of CFT in patients carrying the protective genotype (AA) and risk genotypes (AG/GG). (D) Change in relative CFT in AA group versus AG/GG group.

Table 6. Summary of the recent pharmacogenetic studies in wet AMD.

Authors	Study Design/ Number of patients	Cohort origin	SNPs studied	SNPs associated with functional response	SNPs associated with anatomical response
Our study	Retrospective/403	Spain	9	- <i>SERPINF1</i> rs12603486(GA/GG): associated with a poor response - <i>CFB</i> rs12614 and <i>SERPINF1</i> rs1136287 (C allele): associated with good response	- Good response: <i>SERPINF1</i> rs 1136287(G allele), <i>CFH</i> rs1061170 and <i>VEGFR1</i> rs7993418 (TC/CC genotypes) - <i>CFH</i> rs800292(GA/AA): associated with dry macula at 12 months
Hermann et al. (2014)	Retrospective/366	Multicenter, Europe	126	rs4576072 and rs6828477 in the <i>VEGFR2</i> gene that were independently associated with a significantly better visual outcome	Not studied
Park et al. (2014a)	Prospective cohort study/273	Korea	23	- <i>VEGFA</i> rs699947(AA) and rs833061 (CC): favourable visual outcome - <i>CFH</i> rs1329428(AG/AA) and rs1410996 (CT/TT):poor response	None
Park et al. (2014b)	Prospective cohort study/394	Korea	17	<i>VEGFA</i> rs3025039(TT) associated with visual improvement of >15 letters	<i>ARMS2</i> rs10490924(GG) and <i>HTRA1</i> rs1200638(GG): greater CFT reduction
Matsumiya et al. (2014)	Retrospective/120	Japan	2	Not studied	Poor anatomical resolution at 3 months was associated with the combination of <i>CFH</i> I62V + <i>CFH</i> Y402H variants
Imai et al. (2010)	Retrospective study/83	Japan	11	<i>CFH</i> rs1061170(CT), <i>VEGF</i> rs699947 and <i>PEDF</i> rs1136287: more frequently in non responder group	None
Kitchens et al. (2013)	Retrospective study/101	USA	10	<i>VEGFA</i> rs699947(CC), <i>VEGFA</i> rs833061(CT) and <i>VEGFA</i> rs1570360(GG): more likely to be non responders	<i>LOC387715</i> rs10490924(TT): more likely to be non responders

Table 6. (Continued).

Authors	Study Design/ Number of patients	Cohort origin	SNPs studied	SNPs associated with functional response	SNPs associated with anatomical response
Hagstrom et al. (2013)	Clinical Trial CATT study/834	USA	4	None	None
Abedi et al. (2013b)	Prospective cohort study/201	Australia	7	<i>VEGFA</i> rs3025000(TC/TC): associated with better VA outcomes	Not studied
Lotery et al. (2013)	Prospective Clinical Trial IVAN/509	United Kingdom	3 482	Not studied	- <i>CFH</i> , <i>FZD4</i> , and <i>HTRA1</i> / <i>ARMS2</i> genes were not found to be significantly associated with responder status - None of the 482 SNPs have significant association, but the strongest association was for rs9679290 in <i>EPAS1</i>
Dikmetas et al. (2013)	Prospective/193	Turkey	1	<i>CFH</i> Y402H: CC genotype more frequent in bad responders. TT genotype more frequent in good responders	Not studied
Chen et al. (2012)	Meta-analysis/1510	Literature based study	1	<i>CFH</i> rs1061170 showed a significant summary OR of 1.68 (95% CI. 1.09 to 2.60; p = 0.020; CC versus TT for treatment response to photodynamic therapy and antiVEGF	Not studied
Smallhodzic et al. (2012)	Retrospective case series study/397	Canada Germany Holland	8	<i>CFH</i> rs1061170 high-risk genotype is associated with worse VA outcomes Cumulative effect of high-risk alleles in <i>CFH</i> , <i>ARMS2</i> , and <i>VEGFA</i> : worse response and younger age of onset	Not studied
McKibbin et al. (2012)	Retrospective Cohort study/104	United Kingdom	3	Better visual acuity outcome in <i>CFH</i> , <i>VEGF</i> and <i>HTRA1</i> AMD risk polymorphisms.	Not studied
Boltz et al. (2012)	Prospective cohort study/141	Austria	7	- G/G genotype of rs3024997 and rs2010963 showed significantly lower visual acuity in the univariate analysis. - None of the SNPs studied were associated with treatment response in the multivariate analysis.	Not studied
Kloekener-Gruissem et al. (2011)	Retrospective study/ 215	Switzerland	8	<i>CFH</i> rs1061170(CC): associated with poor responders Additive effect for better response: <i>CFH</i> rs1061170 and <i>FZD4</i> rs10898563	Not studied
Nischler et al. (2011)	Prospective study/ 197	Austria	1	- Significant worse outcome for distance and reading visual acuity in the <i>CFH</i> 402HH genotype group - Less patients who lost 3 or more lines in <i>CFH</i> 402YY group	Not studied
Teper et al. (2010)	Prospective/90	Poland	2	Correlation between the <i>ARMS2</i> genotype and ranibizumab efficacy: poor response in the homozygous for the 69S variant	None
Brantley et al. (2007)	Retrospective/86	USA	2	Patients with the <i>CFH</i> (Y402H) CC genotype fared significantly worse than did those with the <i>CFH</i> TC and TT genotypes,	Not studied

after the loading phase) may be less effective. In the case of rs1061170 (*CFH*), the effect could be the opposite.

Another important anti-VEGF-related gene is *VEGFR1*. This gene encodes for a tyrosine kinase receptor (TKR) and transmits signalling from several members of the VEGF family.

The VEGFR1 signalling route plays an important role in angiogenesis as well, particularly in pathological conditions such as AMD (Huang et al. 2011). We found that *VEGFR1-E28* rs7993418 was associated with a good anatomical result after the loading phase and after 12 months of treatment. The association between this gene and anti-VEGF

treatment response was previously studied by Hermann et al. (2014) without finding any relation.

In addition to certain genetic associations, environmental factors such as hypertension, age, gender and smoking habit have also been associated with ranibizumab response (Chakravarthy et al. 2010). According to our results,

not only hypertension is the environmental factor most strongly associated with AMD development but also it is associated with a poor ranibizumab response, a finding that has not been previously described. All these environmental factors could explain pharmacogenetic discrepancies between cohorts of patients from different countries.

Among the most important pharmacogenetics studies of AMD (Table 6), only the investigation conducted by Park et al. (2014b), Kitchens et al. (2013), Matsumiya et al. (2014) and Lotery et al. (2013) found statistically significant results in terms of anatomical response to anti-VEGF therapy. Park and colleagues reported that *ARMS2* (rs10490924) and *HTRA1* (rs11200638) were associated with a greater reduction in CFT. Kitchens et al. found that *LOC387715* (rs10490924) was associated with a poor anatomical result. Matsumiya et al. observed poor resolution of the intraretinal fluid in patients with the combination of the variants *CFH* I62V + *CFH* Y402H. In the IVAN study, Lotery et al. found no statistically significant association between the nearly 500 SNPs assessed and the anatomical response, although the one with the strongest result was rs9679290 in *EPAS*. Our findings show that other genetic variants: *SERPINF1* (rs1136287), *VEGFR1* (rs7993418) and *CFH* (rs800292), are associated with good anatomical results.

The primary genes associated with VA outcomes are *VEGFA* and *CFH*, as shown in Table 5 (Imai et al. 2010; Kloeckener-Gruissem et al. 2011; Smailhodzic et al. 2012; Abedi et al. 2013a; Hagstrom et al. 2013; Kitchens et al. 2013; Park et al. 2014a,b). In our study, the strongest associations in functional response were observed with *SERPINF1*, *CFB*, *CFH* and *VEGFR1*.

Study strengths and limitations

The sample size (404 eyes) of our study is among the largest of all pharmacogenetic studies of AMD conducted to date. However, this sample was still insufficient to achieve strong statistical results on some outcome measures. A second limitation is that we evaluated only five SNPs (*VEGFA*, *VEGFA-P*, *VEGFR* and two SNPs of *SERPINF1*) related to ranibizumab response, yet

our results suggest that these genes play an important role in differences in treatment response, and thus, it would have been helpful to study more SNPs related to these genes. Nevertheless, our study is a real-life study, and response to ranibizumab was evaluated not only measuring VA, but also with objective measures as CFT and presence of fluid in OCT.

Conclusions

In conclusion, this study investigated the pharmacogenetic association between nine AMD-relevant SNPs and anatomical and functional response to ranibizumab in a real-life cohort of Spanish patients. The most important novel finding of this study is that *SERPINF1* is associated with poor VA outcomes and a reduction of CFT after treatment. This is the first time that *SERPINF1* has been implicated in ranibizumab response in AMD patients. We also found that *VEGFR1* is associated with treatment response, which is a novel finding too. Our *VEGFA* confirm previous studies' results. *CFH* protective genotype is associated with a poor ranibizumab response. The present study also confirms the importance of environmental factors, particularly hypertension, in treatment outcomes. Based on our results, *SERPINF1* and hypertension may both be good candidates for use as biomarkers of treatment response in AMD patients. As our results demonstrate, genetic variation clearly plays an important role in response to ranibizumab in AMD patients, although more real-life pharmacogenetics studies in other cohorts of patients are needed to confirm these findings.

References

Abedi F, Wickremasinghe S, Richardson AJ, Islam AFM, Guymer RH & Baird PN (2013a): Genetic influences on the outcome of anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **120**: 1641–1648.
 Abedi F, Wickremasinghe S, Richardson AJ, Makalic E, Schmidt DF, Sandhu SS, Baird PN & Guymer RH (2013b): Variants in the *VEGFA* gene and treatment outcome after anti-VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **120**: 115–121.

Almeida LN, Melillo-Carolino R, Veloso CE et al. (2013): Association analysis of *CFH* and *ARMS2* gene polymorphisms in a Brazilian cohort with age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* **50**: 117–122.
 American Academy of Ophthalmology (2000): Photodynamic therapy with verteporfin for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **107**: 2314–2317.
 Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K et al. (2011): Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Nat Genet* **43**: 1001–1005.
 Black JRM & Clark SJ (2016): Age-related macular degeneration: genome-wide association studies to translation. *Genet Med* **18**: 238–239.
 Boltz A, Ruff M, Jonas JB et al. (2012): Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in the treatment success in patients with wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **119**: 1615–1620.
 Brantley MA, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM & Shiels A (2007): Association of complement factor H and *LOC387715* genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology* **114**: 2168–2173.
 Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A et al. (2010): Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* **10**: 31.
 Chen W, Stambolian D, Edwards AO et al. (2010): Genetic variants near *TIMP3* and high-density lipoprotein – associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *PNAS* **107**: 7401–7406.
 Chen H, Yu KD & Xu GZ (2012): Association between variant Y402H in age-related macular degeneration (AMD) susceptibility gene *CFH* and treatment response of AMD: A meta-analysis. *PLoS ONE* **7**: e42464.
 Cruz-Gonzalez F, Cabrillo-Esteviz L, Rivero-Gutierrez V, Sanchez-Jara A, Juan-Morcos LD & Gonzalez-Sarmiento R (2016): Influence of *CFH*, *HTRA1* and *ARMS2* polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet age-related macular degeneration in a Spanish population. *Int J Ophthalmol* **9**: 1304–1309.
 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W & Bouck NP (1999): Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**: 245–248.
 Dietzel M, Pauleikhoff D, Arning A, Heimes B, Lommatzsch A, Stoll M & Hense HW (2014): The contribution of genetic factors to phenotype and progression of drusen in early age-related macular degeneration. *Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol* **52**: 1273–1281.
 Dikmetas O, Kadayifcilar S & Eldem B (2013): The effect of *CFH* polymorphisms on the response to the treatment of age-related macular degeneration (AMD) with intravitreal ranibizumab. *Mol Vis* **19**: 2571–2578.

- Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C & Farrer LA (2005): Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* **308**: 421–424.
- Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR & Initiative B (2013): Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **120**: 844–851.
- Francis PJ (2011): The influence of genetics on response to treatment with ranibizumab (Lucentis) for age-related macular degeneration: the Lucentis Genotype Study (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* **109**: 115–156.
- Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG & Klein ML (2009): Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *J Med Genet* **46**: 300–307.
- Fritsche LG, Fariñas RN, Stambolian D, Abeccasis R, Curcio CA & Swaroop A (2014): Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **15**: 151–171.
- Fritsche LG, Igl W, Bailey JN et al. (2016): A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet* **48**: 134–143.
- Gorin MB (2012): Molecular aspects of medicine genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med* **33**: 467–486.
- Grassmann F, Fleckenstein M, Chew EY et al. (2015): Clinical and genetic factors associated with progression of geographic atrophy lesions in age-related macular degeneration. *PLoS ONE* **10**: 1–9.
- Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJT et al. (2013): Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the comparison of AMD treatments trials (CATT). *Ophthalmology* **120**: 593–599.
- Haines J, Hauser M, Schmidt S et al. (2005): Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* **308**: 419–421.
- Hall JB, Cooke Bailey JN, Hoffman JD et al. (2015): Estimating cumulative pathway effects on risk for age-related macular degeneration using mixed linear models. *BMC Bioinformatics* **16**: 329.
- Hermann MM, Van Asten F, Muether PS et al. (2014): Polymorphisms in vascular endothelial growth factor receptor 2 are associated with better response rates to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **121**: 905–910.
- Hernandez-pastor LJ, Ortega A, Garcia-layana A & Giraldez J (2008): Cost-effectiveness of ranibizumab compared with photodynamic treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Clin Ther* **30**: 2436–2451.
- Holliday EG, Smith AV, Cornes BK et al. (2013): Insights into the genetic architecture of early stage age-related macular degeneration: a genome-wide association study meta-analysis. *PLoS ONE* **8**: 1–12.
- Huang H, Shen J & Viores SA (2011): Blockade of VEGFR1 and 2 suppresses pathological angiogenesis and vascular leakage in the eye. *PLoS ONE* **6**: e21411.
- Imai D, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Awata T, Inoue S & Yoneya S (2010): CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration. *J Ocul Biol Dis Infor* **3**: 53–59.
- Kanoff J & Miller J (2013): Pharmacogenetics of the treatment response of age-related macular degeneration with ranibizumab and bevacizumab. *Semin Ophthalmol* **28**: 355–360.
- Kitchens JW, Kassem N, Wood W et al. (2013): A pharmacogenetics study to predict outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* **7**: 1987–1993.
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY et al. (2005): Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* **308**: 385–389.
- Kloekener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S et al. (2011): Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 4694–4702.
- Kume A, Ohshiro T, Sakurada Y & Kikushima W (2016): Treatment patterns and health care costs for age-related macular degeneration in Japan: an analysis of national insurance claims data. *Ophthalmology* **123**: 1–6.
- Kvavilni L & Krohn J (2017): Switching from pro re nata to treat-and-extend regimen improves visual acuity in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* [Epub ahead of Print].
- Lechanteur YTE, van de Camp PL, Smailhodzic D et al. (2015): Association of smoking and CFH and ARMS2 risk variants with younger age at onset of neovascular age-related macular degeneration. *JAMA Ophthalmol* **133**: 533–541.
- Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shields A & Brantley MA (2009): Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br J Ophthalmol* **93**: 610–613.
- Levezuel N, Tilleul J, Puche N, Zerbib J, Laloum F, Querques G & Souied EH (2011): Genetic factors associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* **226**: 87–102.
- Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG & Wong TY (2012): Series ophthalmology 1 Age-related macular degeneration. *Lancet* **379**: 1728–1738.
- Lotery AJ, Gibson J, Cree AJ et al. (2013): Pharmacogenetic associations with vascular endothelial growth factor inhibition in participants with neovascular age-related macular degeneration in the ivan study. *Ophthalmology* **120**: 2637–2643.
- Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ & Seddon JM (2006): Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* **38**: 1055–1059.
- Martínez-Barricarte R, Recalde S, Fernández-Robredo P et al. (2012): Relevance of complement factor H-related 1 (CFHR1) genotypes in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 1087–1094.
- Matsumiya W, Honda S, Yanagisawa S, Miki A, Nagai T & Tsukahara Y (2014): Evaluation of clinical and genetic indicators for the early response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* **15**: 833–843.
- McKibbin M, Ali M, Bansal S, Baxter PD, West K, Williams G, Cassidy F & Inglehearn CF (2012): CFH, VEGF and HTRA1 polymorphisms may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* **96**: 208–212.
- Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, Sobrin L & Parker M (2010): Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *PNAS* **107**: 7395–7400.
- Nischler C, Oberkofler H, Ortner C, Paikl D, Riha W, Lang N, Patsch W & Egger SF (2011): Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* **89**: 344–349.
- Park UC, Shin JY, Kim SJ et al. (2014a): Genetic factors associated with response to intravitreal ranibizumab in Korean patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina* **34**: 288–297.
- Park UC, Shin JY, McCarthy LC, Kim SJ, Park JH & Chung H (2014b): Pharmacogenetic associations with long-term response to anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular AMD patients. *Mol Vis* **20**: 1680–1694.
- Patel N, Adewoyin T & Chong NV (2008): Age-related macular degeneration: a perspective on genetic studies. *Eye (Lond)* **22**: 768–776.
- Rasmussen A, Sander B, Larsen M, Brandt S, Fuchs J, Hansen LH & Lund-Andersen H (2017): Neovascular age-related macular degeneration treated with ranibizumab or aflibercept in the same large clinical setting: Visual outcome and number of injections. *Acta Ophthalmol* **95**: 128–132.
- Real JP & Luna JD (2016): Visual outcomes in relation to time to treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* **94**: e803.
- Recalde S, Fernández-Robredo P, Altarriba M & Saiinas-Alaman AG-LA (2008): Age-related

- macular degeneration genetics. *Ophthalmology* **115**: 916–916.e1.
- Rein DB, Zhang P, Wirth KE et al. (2006): The economic burden of major adult visual disorders in the United States. *Arch Ophthalmol* **124**: 1754–1760.
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY & Kim RY (2006): Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **355**: 1419–1431.
- Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH & Neale MC (2005): The US twin study of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* **123**: 321–327.
- Shah AR, Williams S, Bauman CR, Rosner B, Duker JS & Seddon JM (2016): Predictors of response to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor treatment of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* **163**: 154–166.
- Smaihodziec D, Muether PS, Chen J et al. (2012): Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **119**: 2304–2311.
- Sobrin L & Seddon JM (2014): Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **40**: 1–15.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R & Moreno V (2006): SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**: 1928–1929.
- Thakkinstian A, Han P, McEvoy M, Smith W, Hoh J, Magnusson K, Zhang K & Attia J (2006): Systematic review and meta-analysis of the association between complementary factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* **15**: 2784–2790.
- Teper SJ, Nowinska A, Pilat J, Palucha A & Wylegala E (2010): Involvement of genetic factors in the response to a variable-dosing ranibizumab treatment regimen for age-related macular degeneration. *Mol Vis* **16**: 2598–2604.
- The AMD Gene Consortium (2013): Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* **45**: 433–439.
- The Eyeteach Study Group (2003): Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* **110**: 979–986.
- Wu B, Li J, Lin H & Wu H (2016): Different strategies for the treatment of age-related macular degeneration in China: an economic evaluation. *J Ophthalmol* **2016**: 1–12.

Correspondence:

Estefania Cobos, MD
 Department of Ophthalmology
 Bellvitge University Hospital
 Feixa Llarga Street
 Hospitalet de Llobregat
 08907 Barcelona
 Spain
 Tel: +34 932607705
 Fax: 932607533
 Email: ecobosmartin@gmail.com

We thank the patients and their relatives for their participation in this study and the technicians from Secugen SL DNA sequencing and Diagnostics laboratories for their invaluable technical assistance with the sequencing and genotyping. We also thank Bradley Londres for editing the text.

This work has been developed by members of the Spanish Vitreoretinal society (SERV), the RETICS: RD07-0062: "Age-Related Ocular Diseases, Quality of Life and Vision," and RETICS OFTARED (RD12/0034) "Prevention, Early Detection and Treatment of the Prevalent Degenerative and Chronic Ocular Pathology" from the Instituto de Salud Carlos III from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain. This work has been partly funded by the FIS project PI15/01374, integrated in the National Plan of I+D+I 2013-2016; the ISCIII-Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa; and the European Program FEDER, and the grant PI15/01374.

Received on February 9th, 2017.
 Accepted on June 1st, 2017.

Sobre la autora

ESTEFANÍA COBOS MARTÍN, natural de Ibiza, es licenciada en Medicina por la Universidad de Barcelona. Se formó como oftalmóloga en el Hospital Universitario de Bellvitge.

Actualmente es especialista en retina médica y quirúrgica en el Hospital Universitario de Bellvitge.

