



**VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA**

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**“Correlación entre la expresión
de microRNAs en la hipertensión ocular
versus glaucoma primario
de ángulo abierto.”**

JORGE RAGA CERVERA

Facultativo Especialista en Oftalmología

Directores: Prof. María Dolores Pinazo Durán
Prof. Vicente Zanón Moreno
Dra. María Jose Gamborino Jordá



María Dolores Pinazo Durán, Profesora Titular de Oftalmología, del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia.

Vicente Zanón Moreno, Profesor Asociado de Universidad del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Valencia.

María José Gamborino Jordá, Facultativo Especialista de área del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral con el título: “**Correlación entre la expresión de microRNA en hipertensión ocular versus Glaucoma primario de ángulo abierto**”, ha sido realizada por Jorge Raga Cervera, bajo nuestra dirección, y reúne los méritos suficientes para que su autor obtenga el título de Doctor por la *Universitat de València*.

Y para que así conste, firman el presente certificado en
Valencia, a 17 de Septiembre de 2018

María D. Pinazo Durán

Vicente Zanón Moreno

María José Gamborino Jordá

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la persona sin la cual nada de esto habría ocurrido, la que hizo este sueño posible. Gracias por todo **M^a Dolores Pinazo Durán**. Alma y motor de la unidad de investigación oftalmológica Santiago Grisolía. Gran profesional, excelente investigadora, compañera y amiga. Bien sabes que sin tu esfuerzo y entrega no estaría escribiendo estas líneas. Gracias por tu tiempo, tu dedicación. Gracias por tantos y tantos consejos.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación oftalmológica “Santiago Grisolía”, pilares sobre los que se apoya todo este proyecto y a raíz del cual se ha forjado una gran amistad: A **Vicente Zanón Moreno**, co-director de esta tesis y gran compañero. Gracias por tu paciencia y sabiduría. El destino nos juntó y espero que nuestros caminos permanezcan unidos mucho tiempo. A **Silvia Sanz González**, por tu incalculable ayuda. Eres una grandísima persona, altruista, entregada, profesional, y una fantástica *medical writer*. A **Oscar Álvarez Barrachina** el cual siempre consigue sacarme una sonrisa, o de algún apuro burocrático. Gracias por toda tu ayuda y entrega.

A todos mis compañeros residentes y adjuntos que siempre han estado a mi lado para apoyarme y ayudarme tanto en los buenos como en los malos momentos. En especial a **Victor Chiner Ridaura**, amigo y excelente profesional. A **Lydia Valero** y **Beatriz Valls Espinosa**, por aguantarme y apoyarme siempre. **M^a Jose**

Gamborino Jordá, Alicia Solves Alemany, Julián Zarco... Gracias a todos.

Especialmente quiero dar las gracias al Dr. **Vicente Vila Bou**, eterno oftalmólogo y profesor, adelantado a su tiempo. Gracias por haberte fijado en mí y haberme abierto las puertas a este mundo de la investigación que tanto me ha aportado.

Y como no, a las dos personas que más quiero en este mundo. Las que me aguantan, me ayudan, me complementan y me hacen día a día ser mejor persona.

A mi novia, **Patricia Gil Expósito**. Tantos años juntos y nunca has fallado. Siempre has estado ahí para lo que he necesitado.

A mi madre, **Marian Cervera Roig**. Luchadora como ninguna. Toda tu vida peleando para que yo pudiera llegar hasta aquí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	XV
ABSTRACT AND KEY WORD.....	XVII
RESUM I PARAULES CLAU	XIX
INTRODUCCIÓN.....	1
1- LA HIPERTENSIÓN OCULAR Y EL GLAUCOMA....	1
1.1 RECUERDO HISTÓRICO.....	3
1.2 RECUERDO ANATÓMICO.....	6
1.3 HOMEOSTASIS DEL HUMOR ACUOSO.....	9
1.4 HIPERTENSIÓN OCULAR VERSUS GLAUCOMA.....	15
1.5 MECANISMOS PATOGENICOS.....	18

1.6 CLASIFICACIÓN DE LOS GLAUCOMAS.....	23
1.7 EPIDEMIOLOGÍA Y ASPECTOS ECONÓMICOS.....	25
1.8 EL GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO (GPAA).....	29
1.8.1 FACTORES DE RIESGO PARA EL GPAA.....	30
1.8.2 TRATAMIENTO ACTUAL DEL GPAA.....	40
2- EL GENOMA HUMANO.....	44
2.1 GENERALIDADES SOBRE LA INFORMACIÓN GENÉTICA Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO.....	44
2.2 EL PROYECTO GENOMA HUMANO.....	46
2.3. ÚLTIMOS HALLAZGOS SOBRE EL GENOMA HUMANO.....	48
3- EL ÁCIDO RIBONUCLEICO	51
3.1 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DEL ARN.....	51
3.2 INTERFERENCIA POR RNA.....	51
3.3 LOS PEQUEÑOS RNAs INTERFERENTES.....	54
3.3.1 NUEVAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS CON miRNAs.....	58
3.3.2 CONSIDERACIONES SOBRE EL FUTURO DE LOS miRNAs y LAS ENFERMEDADES OCULARES.....	62
4. LAS LÁGRIMAS.....	63
4.1 COMPOSICIÓN Y FUNCIONES.....	64

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	67
OBJETIVOS.....	69
1. OBJETIVOS GENERALES.....	69
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	69
METODOLOGÍA.....	71
1. DISEÑO EPIDEMIOLÓGICO DEL ESTUDIO.....	71
1.1 SELECCIÓN DE PARTICIPANTES, TAMAÑO MUESTRAL Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	71
1.2 VARIABLES DEL ESTUDIO.....	73
2. PROCEDIMIENTO.....	74
2.1 EXAMEN OFTALMOLÓGICO.....	74
2.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE LÁGRIMA.....	75
2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL...	76
2.4 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS DE miRNAS.....	80
2.5 SECUENCIACIÓN DE miRNAS.....	89
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICO.....	90
RESULTADOS	93
1. DATOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES.....	93

2. DATOS CLÍNICOS. EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA.....	95
3. DATOS MOLECULARES. LOS miRNAs.....	103
DISCUSIÓN.....	109
CONSIDERACIONES FINALES.....	121
CONCLUSIONES.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	127
ANEXOS.....	149

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AUC:	Área bajo la curva.
CGRs:	Células ganglionares de la retina.
CV:	Campo visual
DMAE:	Degeneración macular asociada a la edad.
GL:	Glaucoma.
GPAA:	Glaucoma primario de ángulo abierto.
HA:	Humor acuoso.
HTO:	Hipertensión ocular.
mRNA:	RNA mensajero.
miRNA:	micro RNA.
ncRNA:	RNA pequeño no codificante.
OCT:	Tomografía óptica computarizada.
OCTp:	Tomografía óptica computarizada papilar.
PIO:	Presión intraocular.
piRNA:	RNA asociado a PIWI.
RISC:	RNA-Induced Silencing Complex.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Factores que influyen en la PIO	18
Tabla 2.	Genes asociados con riesgo de glaucoma	21
Tabla 3.	Resumen tipos de tratamiento médico antiglaucomatoso.	41
Tabla 4.	Criterios de inclusión y exclusión para la selección de los participantes	72
Tabla 5.	Características socio-demográficas de los participantes.	94
Tabla 6.	Parámetros oftalmológicos.	100
Tabla 7.	Resultados PIO.	101
Tabla 8.	Número de células ganglionares.	102
Tabla 9.	Número de miRNAs identificados que mostraron diferencias significativas.	105
Tabla 10.	Área bajo la curva de cada miRNA obtenida a partir de las curvas ROC	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Capas del globo ocular.	7
Fig. 2.	La vía óptica.	8
Fig. 3.	Fondo de ojo derecho e izquierdo compatibles con la normalidad, del autor de esta Tesis Doctoral.	9
Fig. 4.	Morfología del segmento anterior ocular.	10
Fig. 5.	Detalle de la homeostasis del humor acuoso entre las cámaras anterior y posterior del segmento anterior ocular.	12
Fig. 6.	Detalle del sistema de drenaje del acuoso a través de la malla trabecular.	13
Fig. 7.	Detalle de la vía de eliminación uveoescleral.	15
Fig. 8.	Clasificación de los glaucomas según la causa.	24
Fig. 9.	Nomograma del riesgo de progresión desde HTO a GL basado en el Ocular Hypertension Treatment Study.	37
Fig. 10.	La doble hélice del ADN.	45
Fig. 11.	Revistas Science y Nature.	48

Fig. 12.	Estructura de los ácidos nucleicos.	52
Fig. 13.	Biogénesis y función de los miRNAs.	54
Fig. 14.	Micro-ARN en acción con su ARN mensajero.	58
Fig. 15.	Productos de Sylentis basados en RNA de interferencia que están en fase de investigación.	60
Fig. 16.	Tubos usados para la recolección de las muestras de lágrima	75
Fig. 17.	Congeladores -80°C de la Unidad de Investigación Santiago Grisoliá	76
Fig. 18.	Foto del doctorando trabajando en el proceso de extracción de RNA total.	78
Fig. 19.	Descripción del protocolo realizado.(purificación RNA)	79
Fig. 20.	Bioanalyzer 2100 System.	80
Fig. 21.	Illumina® (Set 1 #E7300)	80
Fig. 22.	Flujo de trabajo para la preparación de librerías.	81
Fig. 23.	QIAquick® PCR Purification Kit (#28104, QIAGEN®, Hilden, Germany)	87
Fig. 24.	4200 TapeStation (Agilent® Technologies, Inc.)	87
Fig. 25.	Flujo de trabajo para el control de calidad de las	88

librerías.

Fig. 26.	Pippin Prep System (Sage Science, Inc., Beverly, MA, USA)	88
Fig. 27.	NextSeq 500 System y MID Output 150 ciclos	89
Fig. 28.	Fondo de ojo normal en paciente con HTO	95
Fig. 29.	OCT papilar y CV normal en paciente con HTO.	96
Fig. 30.	Fondo de ojo en GPAA.	97
Fig. 31.	A.: CV patológico en paciente con GPAA. B: Mapa de células ganglionares en paciente con GPAA.	97
Fig. 32.	OCT papilar en paciente con GPAA.	9
Fig. 33.	Gráficas del análisis de componentes principales tras la normalización.	103
Fig. 34.	Gráficos de clúster.	104
Fig. 35.	Procesos biológicos fundamentales en los que se ven implicados los miRNAs aislados	106
Fig. 36.	Gráficas del análisis de componentes principales de los 10 miRNAs con perfil de expresión significativa.	108

RESUMEN

El Glaucoma Primario de Ángulo Abierto (GPAA), la primera causa mundial de ceguera irreversible, aumenta su prevalencia en mayores de 40 años. El primer factor de riesgo es la hipertensión ocular (HTO). No existe un biomarcador que pueda identificar sujetos con mayor predisposición hacia el GPAA. Planteamos la búsqueda de biomarcadores moleculares que ayuden a predecir el riesgo de padecer la enfermedad o de progresión de la misma. Las pequeñas moléculas de ARN no codificante (21-30 nucleótidos) que regulan la expresión génica a nivel posttranscripcional, se denominan miRNAs y se han relacionado con diversas patologías oculares. Esta Tesis Doctoral propone relacionar el perfil diferencial de miRNAs en lágrimas de pacientes con GPAA (en estadio inicial) y sujetos con (HTO), para abordar el diagnóstico molecular del glaucoma. El estudio de casos y controles incluye 48 participantes divididos en dos grupos: 1) pacientes con GPAA (n=24), y 2) sujetos con HTO (n=24) emparejados por edad. Se realizó anamnesis, examen oftalmológico completo y extracción de lágrimas reflejas mediante capilaridad que se procesaron para extraer el ARN completo, generar las librerías y realizar la secuenciación de próxima generación, para obtener el perfil de expresión de miRNAs. Hemos identificado 120 microRNAs en las lágrimas de los participantes. De ellos, 10 microRNAs (8 regulados positivamente y 2 negativamente), mostraron diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$), La mayoría están implicados en procesos de glicosilación protéica (adición de un carbohidrato a

la proteína). Nuestros hallazgos sugieren que los miRNAs más significativos en el perfil diferencial entre los dos grupos de estudio podrían utilizarse como biomarcadores moleculares específico del riesgo de padecer GPAA en individuos con HTO.

Palabras clave: Glaucoma. Hipertensión ocular. Micro RNAs. Lágrimas

ABSTRACT

Primary Open Angle Glaucoma (POAG), the first cause of irreversible blindness worldwide, increases its prevalence in people older than 40 years. Ocular hypertension (OHT) is the main risk factor. There is a lack of effective biomarkers to identify people at risk of POAG. It is essential to search for molecular biomarkers that may help predicting the risk, as well as the progression rates of the disease. The so-called micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules (21-30 nucleotides) that regulate gene expression at the posttranscriptional level. This Doctoral Thesis aims to analyze the differential profile of miRNAs in tears of patients with POAG and individuals with OHT. We plan to correlate the findings with the POAG molecular diagnosis. To this end, a case-control study was conducted in 48 participants divided into: 1) patients with POAG (n=24), and 2) subjects with OHT (n=24) matched for age. Anamnesis, ophthalmological examination and reflex tears collection (by capillarity) were performed. Through total RNA extraction, generation of libraries and next generation sequencing of the tear samples of both groups, 120 miRNAs have been identified. Of these, 8 miRNAs showed significant differences between groups ($p < 0.05$), (6 positively regulated and 2 negatively). Most are involved in protein glycosylation (addition of a carbohydrate to the protein). Our findings suggest that the most significant miRNAs in the differential profile between groups could be used as a specific

molecular marker of the risk of developing POAG in HTO individuals.

Key words: Glaucoma. Ocular Hypertension. Micro RNAs. Tears

RESUM

El Glaucoma Primari d'Angle Obert (GPAA) és la major causa mundial de ceguesa irreversible en tot el món, augmenta la seua prevalença en majors de 40 anys, sent el primer factor de risc la hipertensió ocular (HTO). No hi ha un marcador que ajudi a identificar persones en risc de patir o progressar en el glaucoma. Les xicotetes molècules d'ARN no codificant (21-30 nucleòtids) que regulen l'expressió gènica a nivell posttranscripcional, s'anomenen micro RNAs (miRNAs). Aquesta tesi doctoral té com a propòsit relacionar el perfil diferencial de miRNAs en llàgrimes de pacients amb GPAA i pacients amb HTO, amb el diagnòstic molecular de glaucoma. Per això s'ha realitzat un estudi de casos i controls en 48 participants dividits en: 1) pacients amb GPAA (n=24), i 2) subjectes amb HTO (n = 24) aparellats per edat. Es va realitzar anamnesi, examen oftalmològic i obtenció de llàgrimes reflexes mitjançant capil·laritat. Amb la obtenció del RNA total, la generació de llibreries i la seqüenciació de pròxima generació en les mostres de llàgrimes de tots dos grups, s'han identificat 120 miRNAs. D'aquests, 8 miRNAs van mostrar diferències significatives entre grups ($p < 0,05$), (6 regulats positivament i 2 negativament). La majoria estan implicats en processos post-transcripcionals de glicosilació proteica (addició d'un carbohidrat a la proteïna). Els nostres dades suggereixen que els miRNAs més significatius que es trobin en el perfil diferencial entre grups podrien utilitzar-se com un marcador molecular específic del risc de patir GPAA en individus amb HTO.

Paraules Clau: Glaucoma. Hipertensió ocular. Micro RNas.
Llàgrimes.

INTRODUCCIÓN

1. LA HIPERTENSIÓN OCULAR Y EL GLAUCOMA

El condiciones normales el globo ocular posee una consistencia (o tono) constante, debido en parte a la presencia en su interior de diversas estructuras y fluidos, entre ellos, el humor acuoso (HA). Este líquido incoloro que se produce, circula y se elimina en el segmento anterior ocular, con una renovación completa y constante cada 90 minutos. La profundidad de la cámara anterior ocular es de entre 3 y 4,5 mm (con una media de 3,6 mm). La amplitud de la cámara anterior es de 12.5 mm. Además de contribuir a mantener el tono ocular también promueve la nutrición de los tejidos transparentes avasculares en esa ubicación, como la córnea y cristalino.

Si el HA no fluye con facilidad a través de los sistemas de drenaje (vía trabecular y vía uveoescleral), abandonando el globo ocular, o se produce en exceso en su lugar de síntesis (el cuerpo ciliar), el tono del ojo aumentará, debido a que la presión del interior del mismo (PIO) es más elevada, provocando la hipertensión ocular (HTO), proceso fundamental, como veremos, en el tema que nos ocupa.

Los glaucomas son un conjunto de entidades de etiología multifactorial cuyos mecanismos patogénicos son en gran parte desconocidos, que comparten, en general, un factor de riesgo común, la HTO. Según el tipo clínico, entre los que cabe incluir el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) el más frecuente, el glaucoma primario de ángulo cerrado, el glaucoma de tensión normal, el glaucoma congénito y otros, muestran manifestaciones de diversa índole e intensidad. En cualquier caso, de forma independiente al estado de la PIO, el glaucoma puede evolucionar a la lesión de las células ganglionares retinianas (CGRs) y fibras del nervio óptico (FNO), en un proceso neurodegenerativo que conducirá hacia la atrofia óptica y la ceguera, con la pérdida de la calidad de vida ligada a la función visual. Por eso, el GL es la segunda causa mundial de ceguera irreversible¹.

Teniendo en cuenta que el principal factor de riesgo para el glaucoma (de la forma clínica que sea) es la HTO, y que está ampliamente demostrado que el control de la misma no es suficiente para impedir la progresión de la neuropatía óptica degenerativa, y subsecuente pérdida de la función visual¹, la única actuación posible es detectar y tratar precozmente la HTO. Para ello existen las campañas de detección de la HTO, y el seguimiento oftalmológico de los individuos con HTO y de los pacientes afectados de glaucoma, mediante la realización de exámenes oculares morfológicos y funcionales e instauración lo más precoz posible del tratamiento más adecuado para cada caso. Aún con ello, el futuro del paciente glaucomatoso es incierto, puesto que la evolución del proceso neurodegenerativo y el pronóstico visual siguen estando

fuera de nuestro control, debido a la ausencia de cualquier tratamiento que no sea el hipotensor ocular, o de otra actuación terapéutica, bien sean los procedimientos láser o la cirugía antiglaucomatosa, que haya demostrado efecto neuroprotector. El problema proviene del gran desconocimiento de la neuropatía óptica glaucomatosa, que de forma similar a las demás enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson o la esclerosis múltiple, precisan investigaciones en profundidad para completar el conocimiento sobre los mecanismos patogénicos y de los factores de riesgo que permitan abordar otras estrategias diagnósticas y terapéuticas que eviten la progresión del paciente glaucomatoso hacia la ceguera irreversible.

1.1. RECUERDO HISTÓRICO

Aunque la primera constancia del GL aparece en los “Aforismos de Hipócrates”, en los que le denomina *γλαυκος* (del griego: *glaukos*, color verde mar)², no es hasta la Edad Moderna cuando encontramos las primeras definiciones de esta neuropatía. Ya en 1854 un oftalmólogo austríaco llamado Eduard Jaeger, describe las características oftalmoscópicas del nervio óptico. Observaciones que fueron confirmadas por Albrecht von Graefe, quien define el concepto de “amaurosis con excavación del nervio óptico”³.

Lo que describieron los oftalmólogos clásicos fue el hallazgo en el fondo de ojo de una papila óptica de aspecto particular. Este

tipo de neuropatía consiste en la pérdida progresiva de los elementos nerviosos y tejidos conectivos de la papila óptica, con un patrón de lesión estereotipado que induce un deterioro progresivo y característico de la papila apreciable en el examen del fondo de ojo, que se denomina excavación papilar, y cuyas manifestaciones funcionales se reflejan a su vez en el campo visual (CV).

Otro hallazgo fundamental en relación a la enfermedad glaucomatosa fue el dispositivo capaz de medir la PIO. Las primeras investigaciones sobre la PIO fueron llevadas a cabo por William Bowman en 1826 que realizaba palpación digital sobre el párpado superior, comparando la presión con los ojos normales. Posteriormente Von Graefe inventa en 1862 el tonómetro de indentación, instrumento que fue mejorado por Weber y sobre todo por Maklakov que en 1885 inventó su propio tonómetro. No obstante, el tonómetro más ampliamente utilizado hasta los años 70 del pasado siglo fue el tonómetro de indentación del oftalmólogo noruego Hjalma Agust Schiøtz (1850-1927). No obstante, el tonómetro más popular y el que ha llegado hasta nuestros días como el "*gold standard*" de los tonómetros es el introducido por Goldmann en 1954, que es un sistema de fuerza variable que consiste en un doble prisma con un diámetro de 3,06 mm que mide la fuerza aplicada por unidad de superficie de la córnea. Se basa en el principio de Imbert-Fick según el cual la presión (denominada P) en el interior de una esfera ideal, seca y de paredes finas es igual a la fuerza necesaria para aplanar su superficie (denominada F) dividida por el área de aplanación (denominado A), es decir: $P=F/A$.

Para explorar el ojo glaucomatoso, en paralelo se utilizan otros instrumentos que fueron inventados a principios del s. XX, como la lámpara de hendidura del oftalmólogo sueco Allvar Gullstrand (1911) que le valió el Premio Nobel de Medicina. Este sistema posee diversas estructuras de ampliación de imágenes, con un control central y un sistema de iluminación que permite la coloración directa o coaxial, y al que se puede acoplar no solo el tonómetro de aplanación de Goldmann sino que permite también visualizar el fondo ocular mediante la interposición de lentes y llevar a cabo la exploración de las estructuras de la cámara anterior ocular o gonioscopia. Esta última técnica la introdujo Trantas en 1907, pero no fué hasta la década de los 30 cuando Barkan, diferencie el glaucoma por cierre angular de los glaucomas de ángulo abierto, por gonioscopia. También debemos considerar aquí, las técnicas perimétricas para el estudio del campo visual, que no se introducirán y perfeccionarán hasta mediados de siglo XX.

No obstante, el final del siglo XX supone una revolución en la terapéutica médica del glaucoma, con el desarrollo de nuevos fármacos, como los basados en los betabloqueante adrenérgicos, o los basados en la acción de las prostaglandinas, siendo estos años testigos de una evolución multidisciplinar tanto en el diagnóstico morfológico, funcional, terapéutico médico y quirúrgico. No hay que olvidar el incipiente y vasto campo de estudio molecular y genético, que señala un nuevo horizonte de progreso en la comprensión y tratamiento de esta enfermedad⁴.

1.2. RECUERDO ANATÓMICO

El órgano de la visión está compuesto por el globo ocular, la vía óptica y los anejos. El ojo está constituido por 3 capas, tal como muestra la figura 1: 1) Capa Externa, compuesta por un tejido anterior, la córnea y otro posterior, la esclerótica. Función principal de esta capa es la de conferir tono y forma al globo ocular, transmitir el impulso visual y proteger a los elementos más internos, 2) Media, llamada úvea. Es la capa vascular y en ella podemos distinguir la zona anterior (iris y cuerpo ciliar) y la posterior (coroides), y 3) Interna, constituida por la retina. Contiene, entre otros elementos, las células fotorreceptoras (conos y bastones). En relación a estas células encontramos el punto de mayor agudeza visual por incluir la mayor concentración de conos, la mácula lútea (por su coloración). Por otra parte, la papila o disco óptico es una zona más pálida, no sensible a la luz (mancha ciega) por carecer de células fotorreceptoras y que es el punto de salida de las fibras del nervio óptico desde el globo ocular. Especialmente importantes por su relación etiopatogénica con los glaucomas son las células ganglionares de la retina (CGRs) y sus axones, las fibras del nervio óptico.

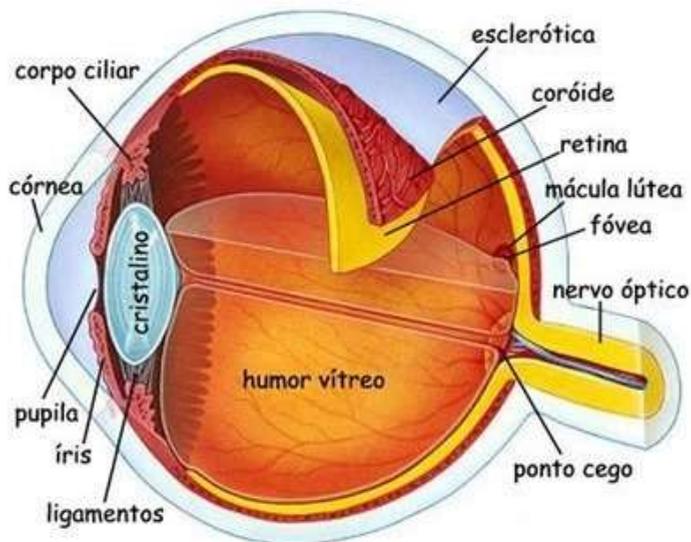


Fig. 1. Capas del globo ocular. Extraído de:
<https://www.pinterest.es/pin/752241943982712500/?lp=true>

En relación a las estructuras oculares que son fundamentales para el estudio y seguimiento del paciente glaucomatoso destaca la papila óptica, la parte del globo ocular más reconocible en el examen del fondo de ojo. Corresponde a la porción intraescleral del nervio óptico, por la que abandonan y penetran en el globo ocular tanto las FNO como el sistema vascular retiniano. Está constituida por la confluencia de todos los axones de las CGRs, a partir de los cuales se dirigen los impulsos nerviosos hacia el cerebro a través de toda la vía óptica (Fig. 2). La papila óptica presenta una depresión o excavación fisiológica, que en condiciones normales debe ser inferior al 40% de su tamaño. Variaciones en la observación de esta depresión o excavación

papilar se utiliza para el seguimiento del paciente glaucomatoso, ya que en el GL, la excavación papilar es muy característica y de tamaño superior al fisiológico, lo que puede valorarse de forma objetiva morfológica y morfométricamente en la exploración del fondo de ojo (Fig. 3).

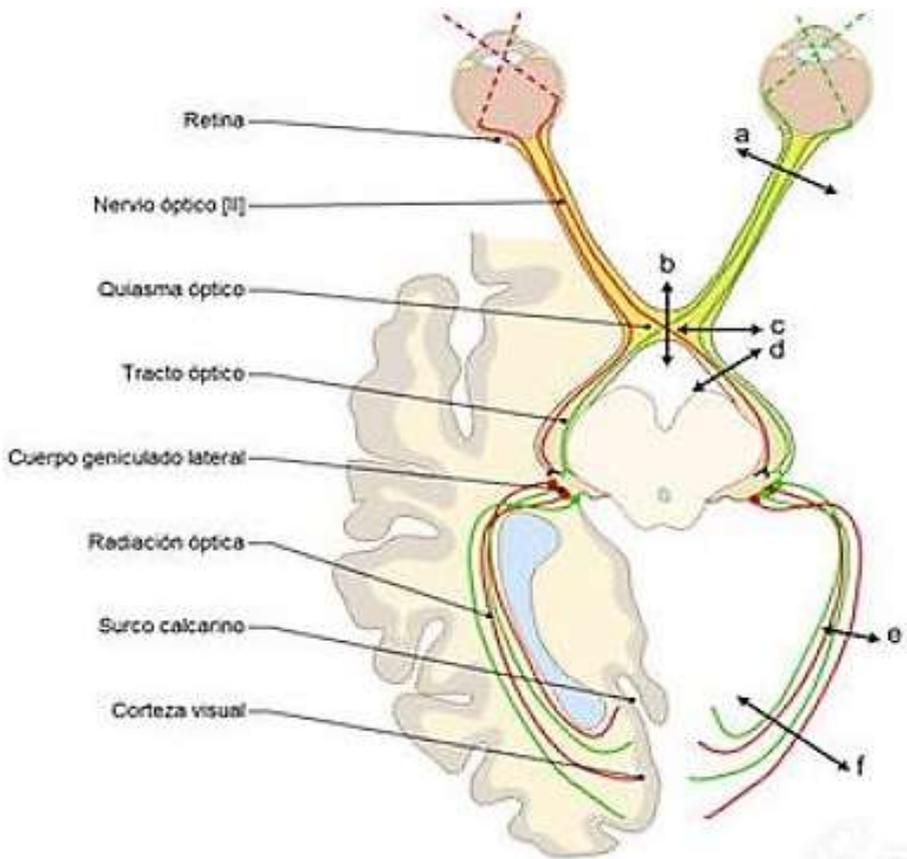


Fig. 2. La vía óptica..Extraído de:
<http://blogdeanatomiahumana.blogspot.com/2014/11/nervio-optico-y-via-optica.html>



Fig. 3. Fondo de ojo derecho e izquierdo compatibles con la normalidad, del autor de esta Tesis Doctoral.

1.3. HOMEOSTASIS DEL HUMOR ACUOSO

El HA es el sistema de circulación alternativo a través del cual se proporciona alimento y se eliminan los desechos del segmento anterior del ojo; pues el cristalino, la córnea y el trabeculum carecen de vasos sanguíneos para garantizar su transparencia absoluta. Se sintetiza en las células epiteliales del cuerpo ciliar, circula por la cámara posterior (entre cristalino y límites posteriores del iris), atraviesa la pupila en su camino hacia la cámara anterior, que rellena, y abandona el globo ocular a través del retículo trabecular o trabeculum, y de la vía uveoescleral (Fig. 4).

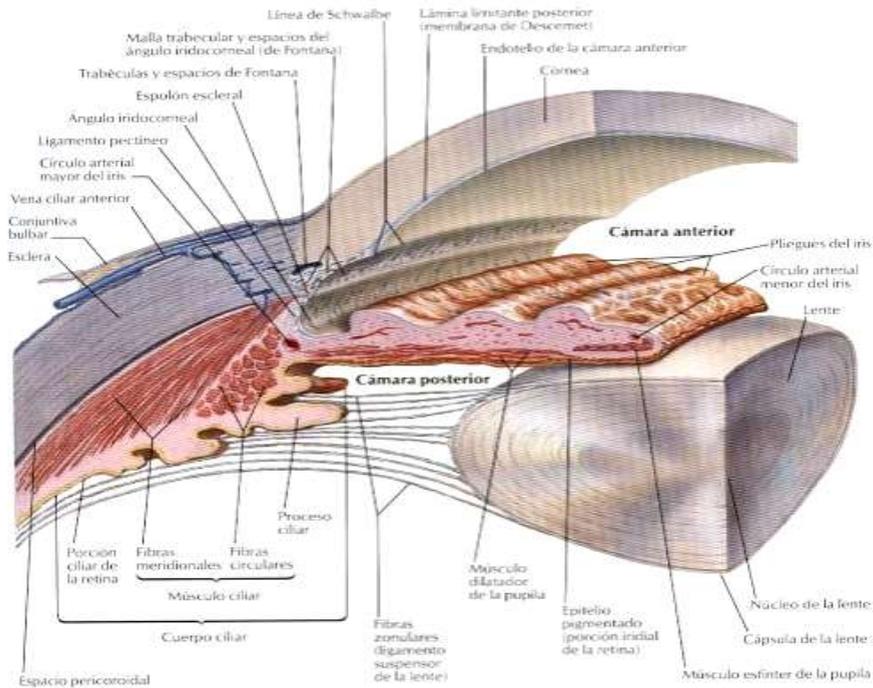


Fig. 4. El segmento anterior ocular. Extraído de: <http://www.medicinavademecum.info/atlas-anatomia-camara-anterior-y->

La secreción de HA es aproximadamente de unos 2 μ l/minuto. La osmolaridad media es de 305 mOsm/l. El HA está constituido por agua en un 99% del total, y su índice de refracción es de 1,336. El proceso activo de la secreción de HA está mediado por transporte selectivo de iones y moléculas a través de la membrana basal del epitelio no pigmentado contra un gradiente de concentración, en el que forman parte activa los enzimas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ y la anhidrasa carbónica.

Aunque procede del plasma, la composición del HA es distinta del mismo. Posee elevadas dosis de ácido ascórbico (entre 10-50 veces más que el plasma), de lactato, glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, ácido hialurónico, inmunoglobulinas, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, sodio, potasio, calcio, bicarbonato, cloro, etc. En general posee escasas proteínas (unos 0,05 g/dl). Es hipertónico y ligeramente más ácido que el plasma. Parte fundamental de su composición es el agua (99,6%). Cambios en su composición inducen cambios en la transparencia, objetivables en la exploración biomicroscópica del segmento anterior ocular.

Como se ha comentado con anterioridad, la PIO viene determinada por la proporción entre producción y eliminación del HA (Fig. 5). La HTO se debe pues a un desequilibrio en esta proporción, bien por excesiva producción de acuoso (poco común), o por un defecto en el drenaje del mismo⁵. Según aumenta la PIO el flujo sanguíneo se mantiene, gracias al mecanismo de autorregulación^{6,7}. Esto ocurre hasta que la presión llega a los 40 mmHg, punto en el que dicha autorregulación no es suficiente y el flujo empieza a bajar. Algunos pacientes no son capaces de autorregular, y ante una HTO el flujo disminuye directamente, siendo éstos los pacientes con una predisposición para desarrollar el GL^(8,9).



Fig. 5. Detalle de la homeostasis del humor acuoso entre las cámaras anterior y posterior del segmento anterior ocular

Extraído de: <http://panamericanodeojos.com/cirugia-de-glaucoma>

El sistema de drenaje del HA hacia el exterior del globo ocular está constituido por la malla trabecular y canales de drenaje (canal de Schlemm y venas episclerales) (Fig. 6).

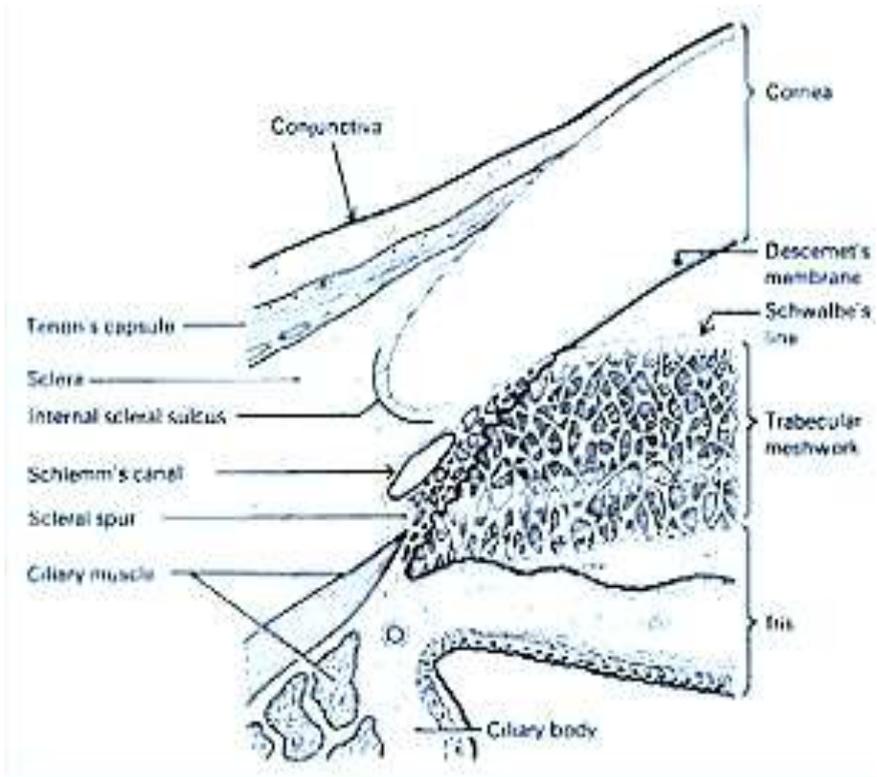


Fig. 6. Detalle del sistema de drenaje del humor acuoso a través de la malla trabecular. Extraído de: <http://iuofisiologia1.blogspot.com/2015/09/malla-trabecular-drenaje-humor-acuoso.html>.

El HA sale del globo ocular principalmente a través de la vía convencional, que constituye el lugar de evacuación del 80-90% del acuoso, y que se realiza a través de las distintas capas de **la red trabecular**: úveoescleral, corneoescleral y cribiforme, hasta que penetra en el canal de Schlemm y desde él entra en los canales colectores que desembocan en las venas intraesclerales y episclerales. El canal de Schlemm está situado en la porción más

externa del ángulo iridocorneal y lo recorre de manera circular. Su pared interna está cubierta por células endoteliales con forma de huso que contienen invaginaciones, y la pared externa por células aplanadas lisas que contiene las aberturas de los canales colectores. Es aquí donde llega el HA procedente de la red trabecular que se evacúa hacia los canales colectores y las venas episclerales¹⁰⁻¹².

El trabéculum yuxtacanalicular es la estructura que ofrece mayor resistencia a la salida del HA, y por ello su estado anatómico y funcional constituye uno de los principales factores reguladores de la PIO. Es pues uno de los mecanismos principales para el establecimiento del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA). También cambios estructurales inducidos por el envejecimiento como la pérdida de células de la malla trabecular, el engrosamiento de las membranas basales, la compactación y ensanchamiento de las láminas de la red uveal y corneoescleral, el cierre de espacios trabeculares por material de desecho o calcificaciones y los cambios de la matriz extracelular, se han erigido como causas de la disfunción en los mecanismos filtrantes del HA y su eliminación del globo ocular provocando la HTO.

Otra forma de drenaje del HA es **la vía uveoescleral** (Fig. 7) que facilita la salida de aproximadamente entre el 10 y 20 % del HA. El coeficiente normal de salida del HA es de 0,1 a 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$ y disminuye con la edad y en el GL. Estos valores pueden sufrir variación debido a cambios de temperatura, concentración de oxígeno en sangre y el uso de ciertos

medicamentos. Factores secundarios que pueden variar la dinámica del HA son los cambios posturales (la PIO de un paciente en decúbito o sentado es mayor que cuando está erguido, lo que es debido al aumento o disminución de la presión venosa episcleral)¹³.

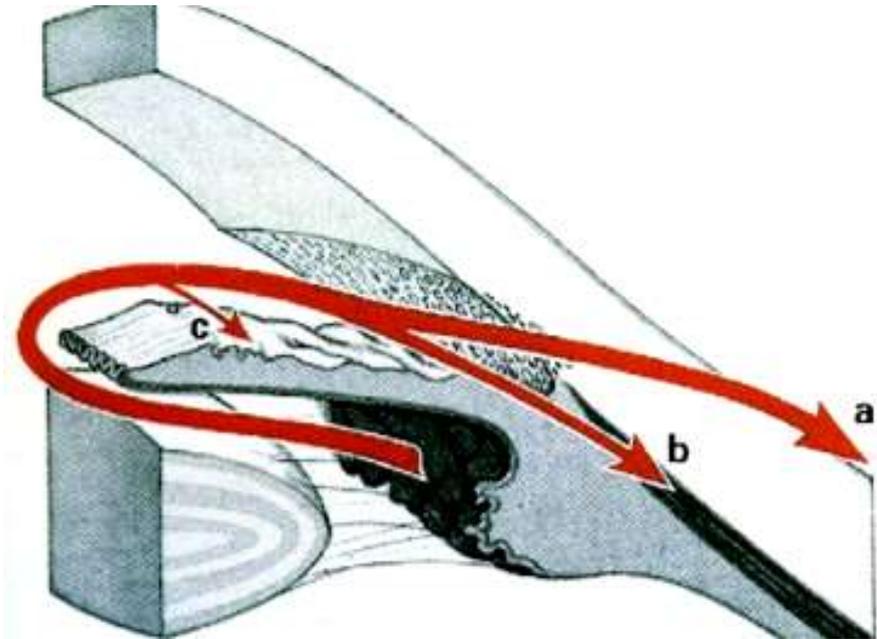


Fig. 7. Detalle de la vía de eliminación uveoescleral.
Extraído de: <http://www.acmcb.es/files/425-3425-DOCUMENT/Vila-35-22Maio12.pdf>

1.4. HIPERTENSIÓN OCULAR VERSUS GLAUCOMA

La HTO es el factor de riesgo conocido y universalmente aceptado como el más importante para producir daño glaucomatoso. Para ciertos autores, el riesgo de padecer glaucoma en pacientes con PIO superior a 26 mm Hg es 13 veces mayor que para aquellos con PIO menor. Sin embargo otros trabajos no consideran estos

aumentos de presión un factor fundamental, argumentando los escasos resultados de los fármacos hipotensores en el control de la enfermedad¹⁴

. La PIO media es de $15,5 \pm 2,6$ mmHg¹⁵. De este dato puramente numérico se derivó el concepto de “presión normal” como aquélla que no superara en más de dos desviaciones estándar la media poblacional. Este concepto de normalidad/anormalidad presenta, no obstante, serios problemas, ya que se basa para diferenciarlos en un valor numérico. Sabemos que la única PIO considerable como normal es aquella que en un ojo determinado no induce daño glaucomatoso¹⁶. La variabilidad interindividual y la vulnerabilidad del nervio óptico del paciente obligan pues a personalizar este valor. No obstante, a pesar de tener en cuenta estas situaciones especiales en cada individuo, la cifra de la PIO sigue teniendo una importancia primordial. Estudios poblacionales como el *Framingham Eye Study* indican que la PIO media es de 16 mmHg siguiendo una distribución no exactamente gaussiana, con una cierta desviación hacia presiones más altas, principalmente en individuos mayores de 40 años. En cambio, en edades comprendidas entre los 20 y 40 años sí podemos admitir una distribución gaussiana de la misma¹⁷.

Todos estos hechos son fundamentales para comprender la HTO, ya que la suposición de la existencia de una PIO límite entre normalidad/anormalidad a la hora de planificar programas de detección sistemática de la HTO basados únicamente en que la PIO

sea >21 mm Hg, desestiman hasta la mitad de los casos de GL con lesión de nervio óptico de la población estudiada.

Para identificar mejor los términos siguientes en todo el texto anotamos a continuación las características de cada uno de ellos¹⁸

-FACTORES DE RIESGO: Los factores de riesgo para el GPAA son aquéllos estadísticamente asociados con el desarrollo de GPAA o con la conversión de HTO a GL¹⁹

-FACTORES PRONÓSTICOS: Los factores pronósticos para el GPAA están estadísticamente asociados con la progresión de un GPAA establecido. Ni los factores de riesgo ni los factores pronósticos establecen causalidad. A menudo, los términos factor de riesgo y factor pronóstico son empleados indistintamente en la literatura.

-FACTORES PREDICTIVOS: El término factor predictivo debe ser reservado para aquellos factores que se asocian con un mayor riesgo de GL y que son parte de la definición de GPAA, tales como los parámetros del disco óptico y los índices del CV.

Una vez aclarados estos tres conceptos, los principales factores que influyen en la PIO y que pueden favorecer el desarrollo del GL se enumeran a continuación: la edad (infantil para el GL congénito, >40 años para el GPAA y >60 años para el GL de ángulo cerrado), raza (oriental para el GL de ángulo cerrado, hispanos y afroamericanos para el GPAA), historia familiar de GL (para cualquier

tipo de GL, aumentando el riesgo de parecerlo de forma exponencial), morfología del ángulo de la cámara anterior (disgenesias para el GL congénito, traumatismos para cualquier tipo de GL), defectos de refracción (miopía para el GPAA, hipermetropía y cámara anterior estrecha para el GL de ángulo cerrado), y otros que debe reflejar la anamnesis, tal como muestra la tabla 1.

Tabla 1 – Factores que influyen en la PIO (diseño propio)

Edad, raza, ocupación, historia social, estilo vida	Tabaco, alcohol, drogadicción
Historia familiar de glaucoma	Diabetes
Embarazo	Enfermedad pulmonar
Enfermedad, trauma o cirugía ocular previos	Cardiopatía
Uso de corticoides	Enfermedad cerebro-vascular
Medicación oftalmológica o sistémica	Hipertensión/Hipotensión
Alergias	Litiasis renal
Enfermedad de Raynaud	Migraña

1.5 MECANISMOS PATOGENICOS PARA EL GLAUCOMA

La lesión del nervio óptico en el curso del GL produce una pérdida de la función visual progresiva caracterizada por la reducción periférica y respeto de la visión central. Sobre la lesión de la papila óptica, visible en el examen de fondo de ojo de los

glaucomatosos existen dos teorías principales: la mecánica y la vascular²⁰⁻²².

- **Teoría MECÁNICA.**- Según esta teoría, es la afectación del flujo axoplásmico lo que conduce a la muerte axonal, producida por la compresión contra la lámina cribosa. En modelos experimentales de GL, a los que se induce HTO, se ha demostrado que la compresión y la fusión de las placas de la lámina cribosa comprimen los axones; y que la interrupción del flujo axoplasmático producida por esta compresión puede iniciar la apoptosis, conduciendo a la muerte celular²¹.

- **Teoría VASCULAR.**- Defiende la afectación del flujo sanguíneo de la papila óptica. La isquemia resultante a la falta de flujo puede dificultar la nutrición de los axones. En el nervio óptico normal, los vasos se autorregulan para acomodarse a las variaciones de presión de perfusión; una anomalía en esta autorregulación puede desempeñar un papel en la lesión glaucomatosa²².

Es un hecho, que las CGRs mueren por apoptosis en el curso del glaucoma²³⁻²⁵.

El motivo por el que una señal de HTO que se inicia en el segmento anterior ocular puede llegar a lesionar irreversiblemente las CGRs y las fibras del nervio óptico puede estar relacionado con ciertas vías de transmisión de señales y circuitos de comunicación intercelular, que hasta ahora se desconocen.

Desde el punto de vista de la biología molecular y genética, se han identificado varios genes en relación a esta enfermedad: entre ellos destacan los genes MYOC, WDR36, OPTN, OPA1, NTF4, CYP1B1, y LTBP2 (Tabla 2).

Como hemos explicado anteriormente, resulta primordial desarrollar herramientas de detección precoz y prevención, e identificar aquéllos pacientes con más probabilidad de evolucionar a formas graves de GL.

Para ello es necesario, pues, estudiar y encontrar los factores de riesgo involucrados en el inicio y desarrollo de la enfermedad.

Bien es cierto que si conocemos los factores de riesgos más importantes causantes de la predisposición al glaucoma, e incluso podemos individualizarlos y gradarlos, podremos intentar modificarlos o eliminarlos.

Tabla 2. Genes asociados con riesgo de glaucoma

Locus	Localización Cromosómica	Gen	Tipo de GL	Herencia
GLC1A	1q24.3-q25.2	MYOC	GPAAJ, GPAA	AD, Multifactorial
GLC1B	2cen-q13	NI	GPAA	AD
GLC1C	3q21-q24	NI	GPAA	AD
GLC1D	8q23	NI	GPAA	AD
GLC1E	10p15-p14	OPTN	GTN, GPAA	AD
GLC1G	7q35-36	NI	GPAA	AD
GLC1G	5q21.3-q22.1	WDR36	GPAA	AD, Multifactorial
GLC1H	2p15-p16	NI	GPAA	AD
GLC1I	15q11-q13	NI	GPAA	Multifactorial
GLC1J	9q22	NI	GPAAJ	AD
GLC1K	20p12	NI	GPAAJ	AD
GLC1L	3p21-p22	NI	GPAA	AD
GLC1M	5q22.1-q32	NI	GPAAJ	AD
GLC1N	15q22-q24	NI	GPAAJ	AD
GLC1O	19q13.33	NTF4	GTN, GPAA	Multifactorial
GLC3A	2p21-p22	CYP1B1	GPC, GPAA	AR

GL: glaucoma; MYOC: gen de miocilina; NI: gen no identificado; OPTN: gen de optineurina; WDR36: gen de WD con dominios de 36 repetido; NTF4: gen de neurotrofina 4; CYP1B1: gen del citocromo P450 familia 1 subfamilia B miembro 1; GPAAJ: glaucoma primario de ángulo abierto de inicio juvenil; GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto de inicio en la edad adulta; GTN: glaucoma de tensión normal; GPC: glaucoma primario congénito; AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva

Adaptado de: Gálvez-Rosas A. Aspectos genéticos del glaucoma primario de ángulo abierto en el adulto. Investigación en discapacidad 2014; 3: 69-76

En el GL la detección precoz es particularmente difícil ya que a menudo es realmente complicado diferenciar entre daño muy incipiente y normalidad. Por lo que la definición de GL incipiente dependerá de la sensibilidad de los métodos empleados para valorar la estructura íntima y la función del nervio óptico. Esto es así, debido a que como ya se ha comentado el GL es una neuropatía degenerativa y adquirida que se define por una pérdida progresiva de axones de las CGRs, dando lugar a un deterioro de la capa de fibras nerviosas y una atrofia progresiva del disco óptico, que provoca un determinado patrón de daño funcional involutivo con defectos típicos. Es por ello, que la capacidad de diagnosticar aquéllos casos fronterizos dependerá de la capacidad del instrumento diagnóstico y de la variabilidad interindividual.

Y teniendo en cuenta el patrón de enfermedad neurodegenerativa, es de particular interés destacarlo en relación al GL. En este contexto, se ha comparado al GPAA con otras enfermedades de amplio reconocimiento, principalmente la demencia de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson²⁶⁻²⁸.

A su vez, diversas líneas de investigación intentan determinar qué papel ejercen en la evolución de la enfermedad los denominados biomarcadores o marcadores moleculares²⁹⁻³³ relacionados con daño celular. Por otro lado el estudio genético del GL revela una nueva perspectiva de diagnóstico y futuro abordaje terapéutico que en los próximos años experimentará un desarrollo exponencial.

1.6. CLASIFICACIÓN DE LOS GLAUCOMAS.

Tener una PIO elevada no implica padecer GL³⁴. Como bien sabemos esta enfermedad es una neuropatía óptica progresiva de la cual su primer factor de riesgo es la PIO elevada. Pero para poder hablar de GL es necesaria la presencia de neuropatía. Por lo cual, si hay daño en el nervio óptico debido al aumento de la PIO hablaremos de GL. En cambio, si no hay daño, no podemos hablar del mismo sin ese daño, estando ante una HTO. Si esta división de la población, en función de tener lesionado o no el nervio óptico, la reorganizamos teniendo en cuenta la PIO, los grupos que obtenemos son:

- **Normal:** sin GL y PIO normal. Nervio óptico normal y PIO 12-21 mm Hg.
- **Hipertensión ocular:** sin GL pero con PIO elevada. Nervio óptico normal y PIO >21 mm Hg.
- **Glaucoma:** con GL e HTO. Lesión glaucomatosa del nervio óptico y PIO >21 mm Hg.
- **Glaucoma normotensivo:** con GL y sin HTO. Lesión glaucomatosa del nervio óptico y PIO entre 12-21 mm Hg.

Una vez esclarecida la presencia o no de GL, podemos realizar una clasificación de este en función de la existencia de obstrucción en el sistema de drenaje (GL de ángulo abierto y GL de ángulo cerrado) o en función de su etiología (GL primario y GL secundario)³⁵. Por último, según sus causas³⁶, el GL puede clasificarse en los siguientes, como muestra la figura 8:

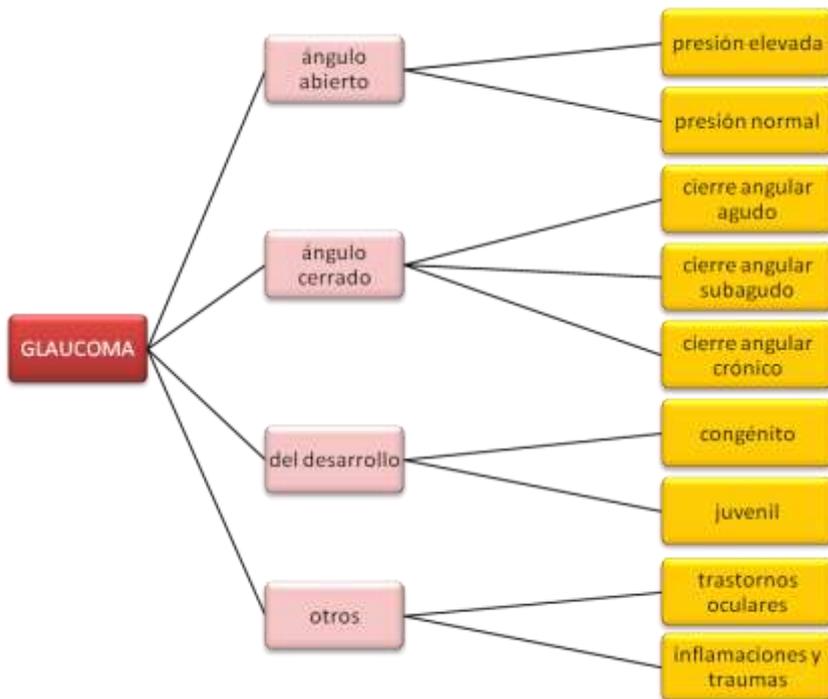


Fig. 8. Clasificación de los glaucomas según la causa. Elaboración propia.

De todos ellos, el GPAA es el más frecuente con diferencia, llegando al 60-70% de todos los casos³⁷⁻³⁸. Es un GL crónico, de progresión lenta y asintomática, por lo que el diagnóstico es tardío y se realiza cuando el paciente ya ha perdido el 40-50% de las fibras nerviosas del nervio óptico, cuando la pérdida de visión ya es importante³⁹⁻⁴⁰. La relación entre la PIO y las lesiones glaucomatosas del nervio óptico es indiscutible, pero la existencia de un tipo de glaucoma con PIO normal (glaucoma normotensivo) y de Hipertensos oculares (PIO alta sin neuropatía glaucomatosa) indica que otros factores deben desempeñar un papel importante

en la patogenia del glaucoma. Entre los mecanismos que pueden estar relacionados con la etiopatogenia del glaucoma y la homeostasis del HA, están entre otros la formación de radicales libres y el estado de las defensas antioxidantes, así como la expresión o no de una serie de proteínas o mRNAs que puedan regular cascadas metabólicas que influyan en la predisposición o no al daño glaucomatoso.

1.7. EPIDEMIOLOGÍA Y ASPECTOS ECONÓMICOS

El GL es la segunda causa de ceguera en los países occidentales, tras la catarata³⁶⁻⁴³, pero “ES” la primera causa de ceguera irreversible en el mundo desarrollado. Se estima un número de afectados en el mundo de 66,8 millones de personas, de los cuales 6,7 millones presentan ceguera bilateral. En EEUU, un 12% de las cegueras legales que se diagnostican anualmente lo son por glaucoma³⁷⁻³⁹ y, teniendo en cuenta el rápido envejecimiento de la población, se calcula que en ese país el número de pacientes con GPAA se incrementará un 50% hasta 3,36 millones en 2020⁴⁰. Estos datos, en su conjunto, pueden no ser más que pálidas estimaciones de la magnitud del problema, ya que para hablar de GL se requiere de una pérdida de CV y como bien sabemos existen personas con daño glaucomatoso sin constatar pérdida campimétrica.

A finales del siglo XX, una serie de estudios patrocinados por la Organización Mundial de la salud (OMS) obtuvieron los siguientes resultados: el número total de personas con PIO alta (>21mmHg)

sería de 104,5 millones, con una incidencia de nuevos casos identificados de GPAA estimada en 2,4 millones al año, cifrando la prevalencia de ceguera asociada a todos los tipos de glaucoma en 8 millones de personas, siendo la mitad de ellas causadas por GPAA; según la OMS, el glaucoma sería la tercera causa de ceguera, por detrás de cataratas y oncocercosis, caracterizándola como “ceguera evitable”, ya que dispone de un tratamiento específico.

Aunque la prevalencia estimada de GPAA varía ampliamente en las muestras poblacionales³⁶⁻⁴³ los estudios acerca de su prevalencia apuntan unos valores de 1% al 2% en la raza caucásica. El estudio de Rotterdam⁴¹ muestra valores de 0,8%. Entre los estudios españoles, destaca el llevado a cabo por Antón et al.,⁴² en una población de Segovia, reportando una prevalencia del 2,1%, magnitud que aumenta con la edad. El estudio llevado a cabo en las Islas Barbados⁴³ sitúa la prevalencia en el 7% en mayores de 40 años. Este aumento asociado al envejecimiento es de gran importancia, obteniéndose que a los 70 años es de 3 a 8 veces más frecuente que a los 40 años. En cuanto la frecuencia de presentación en función del grupo étnico, varía sensiblemente; la prevalencia en la población africana y afroamericana es 3-4 veces mayor que en la blanca, con un riesgo cuatro veces mayor de ceguera que otras razas, aumentando asimismo estos valores con la edad⁴⁴.

En estudios poblacionales, hay pocas estimaciones directas de la incidencia de GL; Voy a enumerar los estudios más relevantes. El Rotterdam Study⁴¹ concluyó con un valor de 1,8% de riesgo a los 5

años de GPAA confirmado y probable, aumentando la incidencia significativamente con la edad. Así mismo, el Estudio de las Islas Barbados⁴³ demostró, en una población afrocaribeña, una incidencia de 2,2% en mayores de 40 años; Y por su parte, el Baltimore Eye Study⁴⁴ también coincide con estos datos. El Latino Eye Study⁴⁵ realizado en Los Angeles en población latina reportó cifras de incidencia de HTO de 3,5% y de GPAA del 2,3%, siendo estos valores mayores que en blancos no hispanos, pero menores que en afrocaribeños. El Visual Impairment Project (Australia) reveló una incidencia 1,1% para GPAA confirmado y probable⁴⁶. El Blue Mountains Eye Study, también australiano, describió estas asociaciones⁴⁷.

El GL representa un porcentaje elevado de las consultas oftalmológicas y, en general, su tratamiento es costoso. A pesar de las evidencias de este hecho, el impacto del GL en términos económicos y de salud pública no ha sido adecuadamente estimado. Actualmente carecemos de la suficiente información acerca de la carga emocional que supone una enfermedad crónica con riesgo de ceguera, de los efectos debilitantes de los tratamientos y de la pérdida cualitativa y de calidad de vida asociada a los síntomas de la neuropatía glaucomatosa. Asimismo, no disponemos de la información necesaria que nos permita estimar en toda su magnitud los costes socioeconómicos asociados a la detección, tratamiento y rehabilitación de esta patología. En 2005, se llevó a cabo un estudio multicéntrico europeo el cual estima el coste de un paciente glaucomatoso en 16000 euros⁴⁸. Un estudio más reciente llevado a cabo en el Reino Unido también incide en la magnitud del problema y

su empeoramiento en las décadas 2020-2050⁴⁹. Otro estudio más amplio estima que se puede llegar a una población de glaucomatosos de unos 8 millones de personas, de los cuales el 4% correspondería a la edad entre los 70-80 años⁵⁰. Es un hecho confirmado la dificultad de este diagnóstico precoz en el glaucoma. Como bien sabemos el paciente glaucomatoso a menudo no es consciente del padecimiento que sufre incluso cuando puede presentar algún grado de deterioro en su función visual, ya que la AV puede, en no pocos casos, perdurar razonablemente hasta estadios avanzados de la enfermedad. El diagnóstico precoz del GL se presenta pues, como una necesidad médica y una exigencia social, del cual debería de implantarse un *screening*, más aún cuando sabemos a ciencia cierta que el daño producido por la neuropatía glaucomatosa es irreversible.

Según la OMS⁵¹, es fundamental definir el GL y establecer los criterios que deben justificar un programa de *screening*, y que son:

- Problema de salud relevante.
- Diagnosticable precozmente, previo a la aparición de síntomas.
- Metodología de *screening* fiable y segura.
- A un coste aceptable.

Aun así, actualmente no hay un consenso generalizado y universal para desarrollar un programa de *screening*, principalmente debido a una serie de cuestiones aún no resueltas a lo largo del mundo:

- : ¿Quién debe ser la población diana?
- ¿Cuáles son los criterios diagnósticos?,
- ¿Qué estrategias diagnósticas deben ser empleadas?
- ¿Quién debe realizar el/los tests?
- ¿Cuál es el coste del fracaso en la detección y la historia natural de la enfermedad?

Gracias al Estudio para el Tratamiento de la Hipertensión Ocular⁵²⁻⁵³, sabemos que una reducción de un 20% del nivel de PIO acorta la progresión a GL un 4,4% en los pacientes tratados, mientras que los no tratados progresan en un 9,5%. Todo ello nos llevaría a plantearnos si esta evidencia obligaría a tratar a todos los pacientes con HTO, y la respuesta probablemente sería negativa, ya que la relación coste-efectividad resultaría injustificable. El mismo estudio reportó otros factores de riesgo (PIO alta, edad avanzada, grosor paquimétrico bajo, aumento de excavación papilar) que deben tenerse en cuenta a la hora de planificar futuras estrategias terapéuticas⁵²⁻⁵³.

1.8 EL GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO (GPAA)

Es el tipo de GL más frecuente, y en términos de gravedad, salvando la emergencia médica que supone el glaucoma primario de ángulo cerrado, el GPAA, es el más peligroso ya que en los inicios carece de sintomatología. Se le denomina el “ladron silencioso de la

visión". El principal factor de riesgo para su desarrollo es la HTO, aunque existen otros factores que hay que tener en cuenta tanto en el inicio como en la progresión del daño glaucomatoso^{18,32,34,45,54}.

1.8.1. FACTORES DE RIESGO PARA EL GPAA

Enumero a continuación los más conocidos, validados por estudios poblacionales a lo largo de todo el mundo⁵⁵⁻⁶⁰.

Edad. Si bien la PIO sigue una distribución gaussiana entre los 20 y 40 años, por encima de esta edad existe una desviación hacia presiones más altas⁵⁵⁻⁵⁶. Entre los factores de riesgo demográfico independientes destaca de manera significativa la edad avanzada. La prevalencia de GPAA en personas mayores de 40 años es 2,1% (95% IC 1,7 a 2,5), y oscila desde 0,3% (95% IC 0,1 a 0,5) a los 40 años, hasta 3,3% (95% IC 2,5 a 4,0) a los 70 años. En el Baltimore Eye Study, la prevalencia de glaucoma entre la población caucásica fue 3,4 veces más alta en los individuos de 70-80 años que en la de los de 40-50 años. En lo que al sexo se refiere, no suele considerarse factor de riesgo en el GPAA debido a los resultados contradictorios entre diversos estudios poblacionales⁵⁷.

Raza. Desconocemos la causa, pero la población afroamericana y la hispana poseen PIOs más altas que la raza blanca⁴⁴⁻⁴⁵. En cuanto al riesgo de padecer GPAA, parece haber un riesgo fuertemente aumentado en pacientes afrocaribeños y afroamericanos frente a caucásicos⁴²⁻⁴⁵. El riesgo relativo de padecer GPAA en este grupo étnico comparado con pacientes blancos, es

3,80 (95% IC 2,56 a 5,64). En población latina la prevalencia e incidencia es asimismo mayor que en caucásicos, aunque menor que en afrocaribeños⁴⁴.

Herencia. Hay una influencia poligénica multifactorial sobre las cifras de PIO⁶⁰⁻⁶¹. Sabemos que los familiares de primer grado tienen PIOs más altas. Dos estudios sobre diferentes grupos étnicos encuentran que el riesgo de padecer GPAA fue 9,2 y 4 veces más alto respectivamente para individuos con familiares de primer grado confirmados para GPAA comparados con aquellos que no lo padecen⁶⁰⁻⁶¹. El antecedente familiar positivo para GPAA es pues, un fuerte factor de riesgo, siendo la mayor asociación para hermanos gemelos de pacientes afectos.

Variaciones circadianas. En individuos normales la PIO varía 2-6 mmHg durante 24 horas, fenómeno relacionado con cambios cíclicos en la producción y drenaje del HA. Se asocia una mayor fluctuación a presiones más elevadas, siendo una fluctuación diurna superior a 10 mmHg un dato que orienta hacia la posibilidad de glaucoma. Existe variabilidad horaria, pero en general, la mayor elevación se alcanza en horas matutinas. Aunque la fluctuación se ha considerado como factor predictivo independiente para la progresión de enfermedad glaucomatosa⁶², diversas publicaciones han cuestionado este hecho⁶³⁻⁶⁵. Medir PIO fuera del horario de consulta podría servir para determinar por qué hay daño del nervio óptico a pesar del aparente correcto control tensional. Diversos autores afirman que las fluctuaciones de la PIO son en sí mismas un factor de riesgo de lesión del nervio óptico⁶⁶. La PIO varía a lo largo del día

y numerosas condiciones pueden influir en su valor, incluyendo la frecuente ingesta concomitante de fármacos por los pacientes. Desconocemos hasta qué punto este pico máximo de presión representa un mayor riesgo frente a una elevación mantenida de la misma. Estudios en sujetos sanos demuestran que la PIO es máxima durante el sueño nocturno, pudiendo deberse al menos en parte, por cambios en la posición corporal, de hecho se ha sugerido que la toma de PIO en decúbito semejaría el pico de presión nocturno. Estos conceptos ligados al ritmo circadiano han tomado relevancia desde los trabajos de Hall, Rosbash y Young, de las universidades norteamericanas de Maine, Brandeis y Rockefeller, respectivamente, que fueron laureados con el Premio Nobel de Medicina 2017 por demostrar de qué manera los seres vivos han adaptado su ritmo biológico para sincronizarlo con las rotaciones de la Tierra. Y en este sentido ya han aparecido trabajos sobre ritmo circadiano y el GL⁶⁶⁻⁶⁸.

Cambios posturales. La PIO es más alta en decúbito que en ortostatismo, por aumento de la presión venosa episcleral. Esta tendencia podría ser importante en ciertas formas patogénicas de glaucoma⁶⁹⁻⁷⁰

Factores cardiovasculares. Ciertos estudios asocian presión arterial y PIO. Así, la hipotensión sistémica, sobre todo nocturna, podría reducir la presión de perfusión ocular e inducir en el nervio óptico daño glaucomatoso⁷¹⁻⁷². La hipótesis vascular en el GPAA sugiere que una anormal perfusión de la cabeza del nervio óptico causaría isquemia e hiponutrición en las CGRs^{22,73-74}. En numerosos estudios epidemiológicos longitudinales y transversales realizados en

distintas poblaciones, se ha demostrado que una presión de perfusión ocular baja es un consistente factor de riesgo tanto en la incidencia⁷⁴, prevalencia⁷⁵⁻⁷⁶ y progresión⁷⁷ del GL. Así mismo, se han desarrollado diversos métodos para medir el flujo sanguíneo ocular, si bien su valor en la práctica clínica está por determinar. No obstante, en la actualidad nuestras limitaciones para comprender esta variable compleja hacen que el rol exacto de la presión de perfusión ocular en el manejo del GL permanezca sin esclarecer⁷³⁻⁷⁷. En consecuencia, los factores de riesgo vasculares deben tenerse en cuenta en el manejo del GL, especialmente cuando la PIO es baja durante las 24 horas con espesor corneal central normal, y los CV muestran un daño severo y progresivo.

Sabemos que determinadas enfermedades cardiovasculares asociadas, concretamente la cardiopatía isquémica crónica estable, empeoran la evolución de pacientes con GPAA. Estudios como el Eigna Neumarkt Study⁷⁷ (estudios de impacto de factores de riesgo vascular) reportan información acerca de una fuerte asociación entre baja presión de perfusión diastólica e incremento progresivo de la frecuencia de glaucoma hipertensivo, estimándolo como un potencial nuevo factor de riesgo para la enfermedad.

Refracción. Diversos estudios relacionan^{78,79} miopía, PIO elevada y longitud axial. Varios estudios poblacionales identifican la miopía moderada (superior a 3 dioptrías) y alta como factores asociados con incremento de la prevalencia de GPAA⁸⁰⁻⁸¹. En California, la población latina presentó un riesgo de GPAA

incrementado en un 48% por cada incremento de longitud axial de 1 mm⁸².

Ejercicio. El ejercicio aeróbico prolongado reduce la PIO, posiblemente por el aumento de osmolaridad sérica y acidosis metabólica⁸³. Otras investigaciones⁸⁴ describen el enorme beneficio que pueden proporcionar la actividad y el ejercicio físico, tanto en personas sanas como en enfermedades crónicas (diabetes mellitus, hipertensión y dislipemias). Psicológicamente, la actividad física alivia la ansiedad y la depresión, ayuda a mejorar la propia imagen y la autoestima, y mejora la calidad del sueño y la calidad de vida relacionada con la salud⁸⁵. La actividad física comprende cualquier actividad muscular que incremente el gasto energético de forma sustancial⁸⁶. Esto incluye actividades habituales de la vida diaria que implican movimiento corporal, como caminar, ir en bicicleta, subir escaleras, hacer las tareas del hogar y comprar. Desde un punto de vista cuantitativo, la actividad física se ha definido como «al menos 150 min de actividad física moderada por semana»⁸⁷. El sedentarismo se ha definido como la realización de actividad física, tal como caminar a paso rápido, realizar tareas en el jardín o tareas domésticas pesadas, menos de tres veces a la semana⁸⁸. El sedentarismo ha sido incluido como diagnóstico de enfermería por NANDA – Internacional⁸⁹. Este diagnóstico se define como un hábito de vida que se caracteriza por una actividad física baja (menos de 90 min de actividad física moderada semanal) y que puede conllevar un riesgo para la salud⁹⁰. La prevalencia del sedentarismo es alta en la Unión Europea, y en España el hábito sedentario afecta a un 40,38% de la población española mayor de 16 años⁹¹. Estos patrones de

actividad física no se distribuyen de forma homogénea en la población sino que se asocian a la clase social, los estudios realizados o los ingresos económicos⁹² Los patrones de actividad se pueden estimar de forma directa (bioquímica) pero esta sería tremendamente costosa técnica y económicamente. Por ello para estimar la actividad física se recurre a cuestionarios cuyo resultado suele ser una clasificación global de los sujetos (activo-inactivo)⁹³. Otro tipo de cuestionarios son los que cuantifican la actividad física identificando la intensidad, la frecuencia, la duración y la cantidad total de actividad física desarrollada, y cuyo resultado suele ser un índice (unidades de ejercicio) o una variable continua en MET/min⁹⁴. Un MET (equivalente metabólico) se define como la “tasa de gasto energético necesaria para mantenerse sentado en reposo”. Los MET equivalen a 1kcal por kilo de peso corporal y hora, o a 3,5ml de oxígeno por kilo de peso corporal y minuto⁹⁴. Auspiciado por la Organización Mundial de la Salud y patrocinado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, se publicó en 2015 el mayor estudio paneuropeo medioambiental de estilo de vida y asociaciones genéticas de enfermedades crónicas en la edad adulta, el Estudio Europeo Prospectivo de Investigación acerca del Cáncer y Nutrición (EPIC). En él, se ha seguido durante un período medio de más de doce años a una población de más de cuatrocientos mil europeos de ambos sexos pertenecientes a diez países, estudiando entre otros datos el índice de masa corporal, circunferencia de la cintura y actividad física mediante el empleo de cuestionarios validados de autoinforme⁹⁵. El estudio es concluyente: la actividad física reduce todas las causas de mortalidad. Foster *et al.* concretamente han estudiado el glaucoma y las enfermedades

maculares de la cohorte EPIC de la población inglesa de Norfolk (más de diez mil individuos de ambos sexos durante cinco años), valorando detalles de calidad y estilo de vida (en esta cohorte el cuestionario de actividades físicas empleado fue el denominado EPAQ2), junto con medidas analíticas (hemoglobina glicosilada, ascorbato) y moleculares (ADN), con la expectativa de hallar evidencias que refuercen la importancia de la dieta, estilo de vida y exposición medioambiental en las enfermedades oculares⁹⁶⁻⁹⁷. De este trabajo, entre otros hallazgos, se demuestra la relación entre la realización de actividad física y presión de perfusión ocular⁹⁸, un consistente factor de riesgo para el GL. Se concluyó que bajos niveles de actividad física se asocian con bajos valores de presión de perfusión ocular, aconsejando la necesidad de futuras investigaciones para discernir el potencial beneficio de un incremento de la actividad física como método simple y seguro para modificar el riesgo de GL.

Drogas. Así mismo, el consumo de ciertas sustancias, tales como cocaína, metanfetamina, éxtasis u otras, son factores predictivos de glaucoma según ciertos autores⁹⁹. Por otra parte, el consumo de alcohol y cannabis reduce transitoriamente la PIO, no pareciendo haber efectos apreciables con la cafeína¹⁰⁰. En cuanto al tabaco, éste se relaciona con aumento del riesgo de padecer GL¹⁰¹.

Espesor Corneal Central. La disminución del espesor corneal es un factor de riesgo independiente para GPA¹⁰². La variación del grosor da lugar a una medida artefactual en la PIO. Los pacientes con córneas más finas tienen mayor riesgo de padecer GL

con independencia de la relación con la PIO. Aunque no se ha demostrado concluyentemente, se piensa que las córneas finas pueden ser un marcador biológico de vulnerabilidad biomecánica en la lámina cribosa y esclera peripapilar.

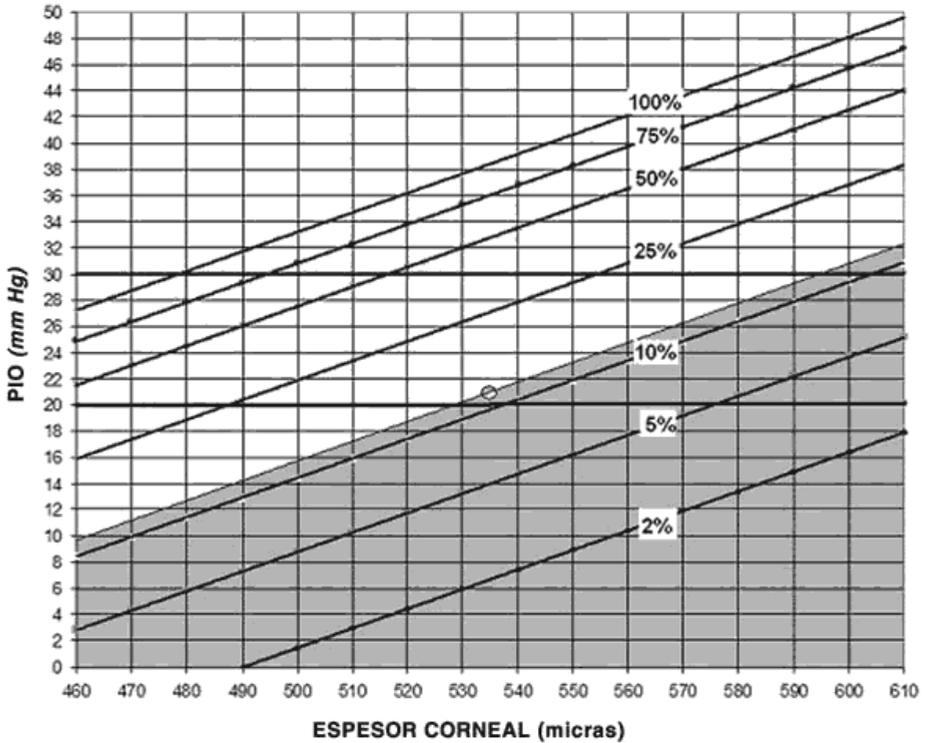


Fig. 9. Nomograma del riesgo de progresión desde HTO a GL (del Ocular Hypertension Treatment Study). Extraído: Diaz-Alemán et al., Arch Soc Esp Oftalmol 2005.

Y en cuanto a **otros factores de riesgo** relacionados con el GPAA, incluidos los emergentes, deben tenerse en cuenta los siguientes¹⁰³⁻¹¹⁰:

Se ha reportado que existe al menos dos veces más riesgo de GPAA en pacientes con **diabetes** comparados con aquéllos que no la tienen (riesgo relativo 1,93, CI 1,38 a 2,69). También, se ha probado la relación entre el **síndrome de apnea o hipopnea del sueño** con ciertas patologías oftalmológicas, tales como: el síndrome del párpado flácido, el GL, la neuropatía óptica isquémica no arterítica y el papiledema. En concreto, los pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) tienen una alta prevalencia de GPAA de presión normal, especialmente aquéllos en estadios moderados y severos de enfermedad; la severidad de la apnea parece ser inversamente proporcional al espesor de la capa de fibras nerviosas de la retina¹⁰³. Diversos autores afirman que **el uso de estatinas** se asocia con una significativa reducción en el riesgo de GPAA en personas con hiperlipidemia. Dicha afirmación es apoyada tanto en estudios clínicos observacionales como en investigación básica, aconsejando la implementación de estudios prospectivos para evaluar adecuadamente el rol de las estatinas en la prevención del GL de ángulo abierto precoz¹⁰⁴⁻¹⁰⁵. La asociación entre **migraña** y GPAA, concretamente el GL de tensión normal ha sido sugerida por varios estudios¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. Se propone el vasoespasma que ocurre en la migraña como fenómeno relacionado. El Blue Mountains Eye Study¹⁰⁷ sugirió la posibilidad de una asociación entre cefalea migrañosa típica y GL, que podría ser modificada por la edad. La **disfunción eréctil** es una condición frecuentemente hallada en ciertas dolencias sistémicas metabólicas y desórdenes cardiovasculares. Recientemente se ha publicado una nueva asociación entre la disfunción eréctil y el GPAA¹⁰⁸. La individual vulnerabilidad del nervio óptico de cada uno de los pacientes puede

estar influenciada por la **nutrición**, el ejercicio físico e incluso por los hábitos tóxicos. Estos factores pueden tener un papel relevante en la patogenia y fisiopatología del glaucoma y están insuficientemente documentados. Así, en estudios poblacionales como el Estudio de Fracturas osteoporóticas en mujeres mayores, se revelan datos acerca de que el alto consumo de ciertas frutas y vegetales pueden estar asociados con un descenso del riesgo de glaucoma¹⁰⁹. La **obesidad** ha sido relacionada con GL, catarata, degeneración macular asociada a la edad y retinopatía diabética. Se ha documentado la relación entre la reducción del espesor de la capa de fibras nerviosas en varones glaucomatosos con alto índice de masa corporal¹¹⁰. Existen pruebas en pacientes con **alteraciones del estado emocional** como ansiedad, depresión y estrés psicofísico de empeoramiento del glaucoma. De los estudios psiquiátricos y psicométricos en población enferma de GL en diversos estadios y pacientes oftalmológicos no glaucomatosos, los hallazgos fueron los siguientes¹¹¹⁻¹¹²: La comprobación, en la población afectada de glaucoma, de una emotividad difusa que disminuye la capacidad de decisión cuando se confrontan con situaciones difíciles o estresantes (la enfermedad y el tratamiento lo son). Esta dificultad de respuesta es más severa en los pacientes con GL avanzado. Los glaucomatosos presentan, fuera de la existencia o ausencia de conflictos psíquicos, un marcado repliegue afectivo, con dificultad para tomar conciencia y/o expresar verbalmente sus propias emociones. Este trazo de personalidad en los glaucomatosos se aproximaría al de las llamadas personalidades alexitímicas, observadas en ciertas afecciones psicosomáticas como el asma bronquial y la úlcera duodenal. El 55% de los glaucomatosos

presentan dificultades para modular sus pulsiones agresivas, frente al 24% en el grupo control. Por el contrario, las respuestas evasivas o ambiguas en relación con la obediencia terapéutica se encuentran en el 71% de los pacientes con GL avanzado, y sólo el 17% de pacientes con GL leve. En la evaluación psiquiátrica se comprobó además la existencia de trastornos adaptativos de la personalidad, que tienen como característica el desarrollo de síntomas emocionales o comportamentales en respuesta a un estresante identificable, que en este caso está representado por una enfermedad crónica, progresiva e incapacitante. Se demuestra asimismo que la prevalencia de trastornos de personalidad es más elevada en los pacientes con GL avanzado (42%), sin embargo ninguna patología de la personalidad aparece como específica o dominante en estos pacientes. Se ha demostrado que hay asociación entre labilidad emocional e incumplimiento terapéutico¹¹². Las implicaciones en la adherencia terapéutica y las dificultades en recordar información importante complican la capacidad de seguir las instrucciones del médico. Tales observaciones apuntan a la necesidad de tenerlas en cuenta en futuras investigaciones de cara a manejarlas como factores en la adherencia al tratamiento del GL.

Hay que considerar que la Sociedad Europea de Glaucoma¹⁸ considera que la información publicada acerca de los factores de riesgo emergentes es todavía inconsistente, por lo que hay que estimular la búsqueda de nuevos factores de riesgo para implementar el conocimiento del GL.

1.8.2. TRATAMIENTO ACTUAL DEL GPAA

El único tratamiento actual del GPAA está dirigido a disminuir la PIO, lo que puede llevarse a cabo mediante tratamiento médico hipotensor en colirios y también en comprimidos y perfusión intravenosa, así como el tratamiento láser y cirugía antiglaucomatosa^{14,17-18,20,40,52-53}. Es el especialista el que decide qué medicamentos son más adecuados para un paciente basado en el tipo de GL, historial médico y régimen de medicación actual. Mostramos a continuación un breve resumen de algunos los diferentes principios activos utilizados. (Tabla 3, de realización propia).

Tabla 3 – Tipos de tratamiento médico antiglaucomatoso.

Mecanismo de acción	Principio activo (producto comercializado)
Alfa agonistas adrenérgicos	- Apraclonidina (Iopimax ®) - Brimonidina (Alphagan ®)
Beta-bloqueadores	- Timolol (Timoftol® y Timoptic ®) - Levobunolol (Betagan ®)
Inhibidores de la anhidrasa carbónica	- Dorzolamida (Trusopt ®) - Brinzolamida (Azopt ®)
Análogos de prostaglandinas	- Latanoprost (Xalatan ®) - Bimatoprost (Lumigan ®) - Travoprost (Travatan ®)
Combinaciones	- Dorzolamida y Timolol (Cosopt ®) - Latanoprost y Timolol (Xalacom ®) - Brimonidina y Timolol (Combigan ™) - Latanoprost y Timolol (Taptiqom®)

* Alfa agonistas adrenérgicos reducen la producción HA y aumentan su salida. Las reacciones alérgicas se producen con frecuencia con esta clase de medicamentos. Los efectos secundarios pueden incluir aumento de la frecuencia cardíaca, presión arterial elevada, dolor de cabeza, visión borrosa, la fatiga, sequedad de boca y enrojecimiento dentro o alrededor del ojo. Medicamentos que se incluyen:

-Apraclonidina (Iopimax ®)
-Brimonidina (Alphagan ®)

* Beta-bloqueadores disminuyen la PIO por el aumento de la facilidad de salida a través de la malla trabecular. Los efectos secundarios pueden incluir un latido lento o irregular del corazón, la depresión, la impotencia, somnolencia, visión doble, y problemas respiratorios para los pacientes con asma o enfisema. Los medicamentos de este grupo son:

-Timolol (Timoftol® y Timoptic ®)
-Levobunolol (Betagan ®)
-Carteolol (Ocupress ®)
-Betaxolol (Betoptic ®)

* Inhibidores de la anhidrasa carbónica, bien en colirios o comprimidos para reducir la producción de HA. Los efectos secundarios pueden incluir erupción de la piel, ojos rojos o la irritación, dolor de cabeza, náuseas o malestar estomacal, la alteración del gusto (especialmente con bebidas gaseosas), pérdida

de peso, fatiga y disminución de la energía. Medicamentos que se incluyen:

- Dorzolamida (Trusopt ®)
- Brinzolamida (Azopt ®)
- Acetazolamida (Diamox ®) - medicación oral

* Análogos de prostaglandinas, que reducen la PIO al aumentar el flujo de HA por la vía uveoescleral. Los efectos secundarios pueden incluir enrojecimiento o irritación de los ojos, un cambio de color de ojos (principalmente aquellos de ojos de color avellano o verde), el aumento en el grosor y número de pestañas y dolores en las articulaciones o síntomas gripales. Medicamentos que se incluyen:

- Latanoprost (Xalatan ®)
- Bimatoprost (Lumigan ®)
- Travoprost (Travatan ®)

Las asociaciones de drogas hipotensoras también pueden ser usadas para obtener mejores resultados. Los efectos secundarios de estos medicamentos se mencionaron anteriormente. Medicamentos que se incluyen:

- Dorzolamida y Timolol (Cosopt ®)
- Latanoprost y Timolol (Xalacom ®)
- Brimonidina y Timolol (Combigan ™)
- Latanoprost y Timolol (Taptiqom®)

Actualmente se está investigando mucho en la generación de nuevos fármacos más selectivos y seguros, como el BAMOSIRÁN, basado en la tecnología de ARN de interferencia, cuya diana son los receptores adrenérgicos beta 2 (ADRB2) que participan en la regulación de la PIO. También existen numerosas investigaciones en lo que respecta a la neuroprotección, hasta el momento sin resultados satisfactorios.

2. EL PROYECTO GENOMA HUMANO Y DIVERSOS ASPECTOS DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA.

2.1 GENERALIDADES SOBRE LA INFORMACIÓN GENÉTICA Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO

La información genética está contenida en la secuencia de bases de los nucleótidos que integran el ADN.

Francis Harry
Compton Crick
Prize share: 1/3

James Dewey
Watson
Prize share: 1/3

Maurice Hugh
Frederick Wilkins
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 was awarded jointly to Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson and Maurice Hugh Frederick Wilkins "for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material."

Un gen se define como una secuencia de nucleótidos que contiene la información para sintetizar una proteína, o como una secuencia de nucleótidos específica para un tipo particular de ARN (de transferencia)¹¹³. En el ADN se encuentran cuatro tipos de bases: por consiguiente, el número de las distintas secuencias posibles en un gen con n nucleótidos es cuatro elevado a n . Si n es del orden de las centenas, como efectivamente sucede en los genes, cuatro elevado a n resulta ser un número extraordinariamente elevado de combinaciones posibles. Se sabe que cada proteína está constituida por una cadena de aminoácidos, por lo que la información genética de una proteína se descompondrá en secuencias de aminoácidos.



Fig. 10 La doble hélice del ADN. Extraído de:
<https://www.infobiologia.net/2012/11/informacion-genetica.html>

El genoma humano posee 24 cromosomas (22 autosomas+2 sexuales: X,Y) con un tamaño total de unos 3200 millones de pares de bases de ADN (Mpb) que contienen entre 30.000-35.000 genes. De estos millones de pares de bases unas 2950 corresponden a eucromatina y 250 a heterocromatina¹¹⁴.

2.2 EL PROYECTO GENOMA HUMANO

El Proyecto Genoma Humano, obtuvo por parte de sus dos equipos investigadores, el de Venter y cols¹¹⁵ y el consorcio internacional de Lander y cols.,¹¹⁶ una secuencia de referencia del genoma humano eucromático sin precedentes, que continúa utilizándose en biomedicina. No obstante, si recordamos el dogma de la información transmitida desde el ADN al ARN y la teoría “cada gen codifica para una proteína” es difícil comprender como pueden esos genes dar lugar a la enorme diversidad de proteínas de nuestro organismo, y con ello surge la duda de que el conocimiento aportado por el Proyecto Genoma Humano sea completo y definitivo.

El proyecto de secuenciación del genoma humano ha sido el mayor proyecto de investigación biomédica de la historia. Con un presupuesto inicial de 3 mil millones de dólares y la participación de un Consorcio Público Internacional, formado por EEUU, Reino Unido, Japón, Francia, Alemania, China y otros países, tenía como objetivo último la consecución de la secuencia completa del genoma humano, es decir, el texto lineal constituido por la secuencia de las cuatro bases químicas del ADN que contiene las

instrucciones para construir un ser humano. Iniciado en 1990, el proyecto se dio por concluido en el 2003, dos años antes de lo previsto. Otros objetivos del proyecto eran la secuenciación de genomas de otros organismos modelos de los que había un amplio conocimiento previo, como la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccaromyces cerevisiae*, el gusano *Caenorhabditis elegans*, o la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. También tuvo un papel destacado el estudio de las implicaciones éticas, legales y sociales que se derivarían de los resultados del proyecto. Ocho años después del inicio del proyecto público apareció en escena una empresa privada, Celera genomics, presidida por el brillante y revolucionario científico Craig J. Venter, que lanzó el reto de conseguir la secuencia humana en un tiempo récord, antes del previsto por el Consorcio Público. Proponía una estrategia de secuenciación alternativa a la secuenciación jerárquica que seguía el Consorcio, la secuenciación aleatoria (shotgun), con la que ya se había conseguido secuenciar el primer genoma celular en 1995, el de la bacteria *Haemophilus influenzae*. Empieza a partir de ese momento una carrera apasionante por la conquista del genoma humano, que acabaría finalmente en tablas. El 26 de Junio de 2000, en un acto auspiciado por el presidente Bill Clinton y que tuvo como escenario la Casa Blanca, se encontraron los dos máximos representantes de las partes en competición, Craig Venter por Celera, y el director del Consorcio Público, Francis Collins. Se anunció de forma conjunta la consecución de dos borradores de la secuencia completa del genoma humano. Las publicaciones correspondientes de ambas secuencias no aparecieron hasta Febrero de 2001 (Figura 11). Celera publicó sus resultados en

Science¹¹⁵. El Consorcio publicó su secuencia en la revista Nature¹¹⁶. Unos años después, en 2004, el Consorcio publica la versión final o completa del genoma humano. El proyecto genoma humano había concluido con un éxito rotundo y, en palabras de F. Collins, se iniciaba una nueva era en la investigación biomédica basada en la genómica que afectaría crucialmente a la biología, a la salud y a la sociedad¹¹⁷.



Fig. 11. Portadas de las Revista Nature y Science, donde aparecen publicados los resultados privados y públicos del proyecto genoma humano.

2.3 ULTIMOS HALLAZGOS SOBRE EL GENOMA HUMANO

La genómica ha cambiado la sociología de la investigación biológica. La complejidad de los proyectos genómicos requiere de la colaboración en redes científicas, utilizando equipos

multidisciplinarios e infraestructuras de última generación. Muchas de las publicaciones de genomas están firmadas por decenas, e incluso centenares, de científicos procedentes de diversos centros de investigación de países distintos, y esta tendencia no dejará de crecer. Los pequeños laboratorios continuarán existiendo, pero su peso relativo en la investigación disminuirá. La capacidad de colaboración e interacción con otros grupos de investigación, un modo de trabajar orientado hacia Internet y un dominio fluido del inglés forman parte de las competencias de un genético en la era genómica¹¹⁸.

El conocimiento del genoma humano ha influido profundamente en el modo de conceptualizar la biología molecular. Un nuevo paradigma ha aparecido en el panorama científico, que ve a la biología como una ciencia informacional. El análisis de los sistemas biológicos se hace en términos de almacenamiento, transmisión y transformación de la información biológica que parte del genoma. El genoma es en esencia información digital que codifica los fenotipos y la cuestión fundamental de la biología es como se descodifica esta información para producir la forma y función de los organismos individuales. Desde el nuevo paradigma, los sistemas biológicos son redes complejas de miles de rutas, muchas de ellas conectadas entre sí, rutas biosintéticas, rutas de transducción de señales, rutas de regulación de la expresión de los genes^x. La integración, representación y modelado de las redes de interconversión de la información biológica requieren de análisis globales, sistémicos. La biología de sistemas o integrativa es uno de los campos en boga de esta nueva visión¹¹⁸⁻¹²⁰. El enfoque

reduccionista que se ha aplicado a la biología durante todo el siglo XX es un ejemplo indiscutible de éxito científico, pues nos ha permitido descubrir los bloques de construcción de los organismos. Pero el siglo XXI es el de la reconstrucción de los organismos, el de un enfoque sintético, interdisciplinario, donde grandes grupos de investigación formados por genéticos, bioinformáticos, bioquímicos, físicos, matemáticos, médicos, informáticos,... trabajan conjuntamente para explicar las propiedades emergentes de los sistemas biológicos.

Las nuevas tecnologías han irrumpido en el campo de la ingeniería genética. Entre los últimos descubrimientos está la técnica conocida como CRISPR (clustered regularly interspaced alindromic repeat) -CAS 9 ¹²¹ que puede modificar, regular o marcar locus genómicos de una gran variedad de células y organismos.

El genoma humano ha cambiado el modo de conceptualizar los procesos biológicos. Éstos se ven en términos de redes de interconversión de la información biológica que parte del genoma. La biología de sistemas trata de la integración, representación y modelado de la información biológica y requiere análisis globales, sistémicos. Por ello muchos investigadores han vuelto la mirada al ARN, como el depositario de información importante para nuestra salud y las enfermedades que nos aquejan. En nuestro caso sería un resultado excelente poder relacionar la expresión o función de alguno de estos ARNs pequeños con la predisposición a padecer el glaucoma o la posibilidad de progresión de esta enfermedad hacia

la ceguera. La presunción de utilizarlo como biomarcador y el posible diseño de un fármaco que impidiese el desarrollo de la enfermedad es un reto para los investigadores.

3. EL ÁCIDO RIBONUCLEICO

3.1 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DEL ARN

El ácido ribonucleico (ARN) es fundamental para la transmisión de la información genética. Está formado por una cadena de ribonucleótidos, cada uno de ellos formado por ribosa, un fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y uracilo). El ARN celular es lineal y monocatenario (una sola cadena) y sus funciones incluyen la transferencia y control de la información del ADN para la síntesis de proteínas. Diversos tipos de ARN regulan la expresión génica y otros tienen actividad catalítica¹²².

3.2 INTERFERENCIA POR RNA.

Se conoce como ARN interferente (del inglés interfering RNA) a aquella molécula de ARN que regula la expresión de genes específicos mediante mecanismos conocidos como “ribointerferencia” o interferencia por ARN¹²⁵⁻¹²⁶. El mecanismo de interferencia por RNA es un proceso natural por el cual las células eucariotas silencian la expresión de genes, a través de la

generación de RNA pequeños de secuencia complementaria con el RNA mensajero (mRNA).

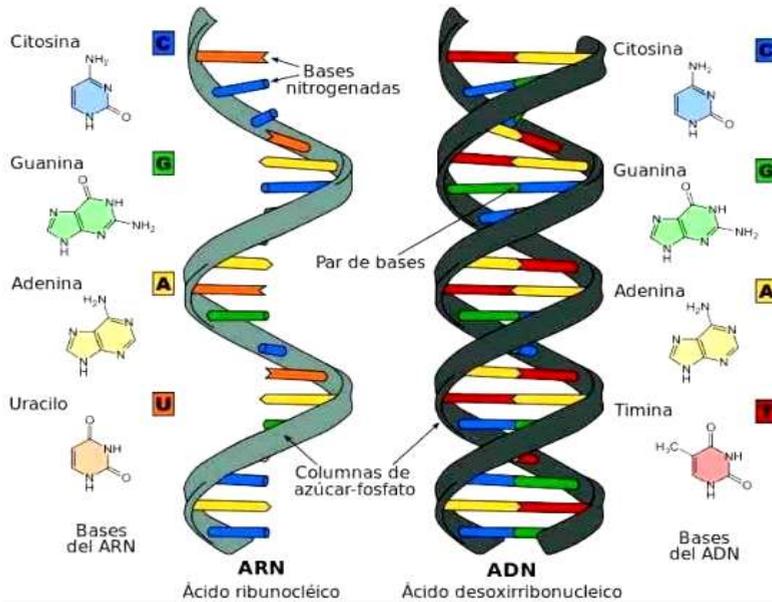


Fig. 12. Estructura de los ácidos nucleicos. Extraído de: <http://kayrjaramillo.blogspot.com/p/el-arn-el-acido-ribonucleico-arn-o-rna.html>.

En este sentido se le ha relacionado con una cifra del 20-30% de las variaciones genómicas. El RNA de interferencia es responsable de un proceso de silenciamiento génico mediado por moléculas denominadas ARN interferente. Los transcritos de RNA pequeños son procesados para generar las principales especies de RNA funcionales. Se trata de moléculas pequeñas (entre 20-25 nucleótidos) que se forman por fragmentación de precursores más largos y que se clasifican en 3 grandes grupos: los micro ARNs (del inglés *micro RNAs*: miRNAs), los pequeños ARNs interferentes (del

inglés *small interfering RNAs*: siRNAs) y los ARNs asociados a piwi (del inglés *Piwi-interacting RNAs*: piRNAs). Para facilitar la identificación en adelante utilizaremos la nomenclatura y abreviaturas inglesas. El descubrimiento del primer miRNA por Lee y cols., en 1993 ⁽¹²³⁾ y de los mecanismos que explican la interferencia con el RNA por Fire y Mello en 1998 ⁽¹²⁴⁾, facilitaron el conocimiento de gran número de ARNs pequeños no codificantes (ncRNAs) que regulan procesos fundamentales como la diferenciación celular, desarrollo, respuesta inmune e integridad del genoma. Debido a estos descubrimientos, nuestra forma de comprender los mecanismos reguladores de la expresión génica y sus implicaciones en diversas enfermedades ha cambiado sustancialmente en las últimas dos décadas.

Ambos, los miRNAs y siRNAs se forman a partir de un precursor de doble hebra o precursor “en horquilla”, y dichos precursores son procesados por enzimas ARNasas III. Aunque el mecanismo de acción de cada tipo difiere, en las vías reguladoras de ambos, los miRNAs y siRNAs, participan enzimas de la familia Argonauta ⁽¹²⁴⁾, que se asocian a ellos y forman complejos ARN-proteína llamados RISC (RNA-Induced Silencing Complexes).

Éstos RISC usan los miRNAs como guía para silenciar específicamente a ARN mensajeros (mRNAs) que contienen una secuencia complementaria al miRNA maduro, y así inducen la degradación de los mRNAs o bien reprimen su traducción, lo que se puede explicar de la siguiente forma: en dichos complejos RISC la proteína Argonauta proporciona la actividad bioquímica que corta el

mRNA diana e interacciona con otras proteínas, mientras que el miRNA confiere la especificidad de sustrato a través de la complementariedad de su secuencia.

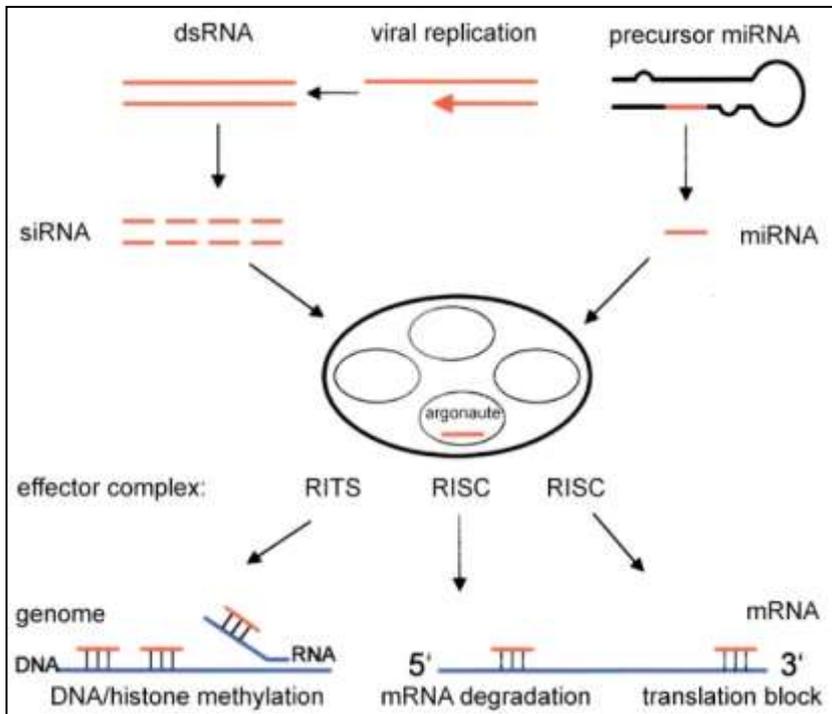


Fig. 13. Biogénesis y función de los miRNAs. Extraído de: https://es.wikipedia.org/wiki/ARN_interferente

3.3 LOS PEQUEÑOS RNAs INTERFERENTES

Se han descrito hasta el momento tres grupos principales de RNAs interferentes. Los siRNAs, los asociados a PIWI y los microRNAs. Se exponen a continuación.

LOS siRNAs.

Los siRNAs son moléculas de RNA de doble cadena constituidas por 21-25 nucleótidos, que forman a partir de secuencias endógenas denominadas transposones, o secuencias antisentido o secuencias repetidas, o bien esta vía puede verse activada por introducción de un ARN externo lo que conocemos como interferencia de ARN ⁽¹²⁵⁾. Su mecanismo de acción es comparable a los miRNAs, y se inicia al cargar los siRNAs en el complejo RISC con una proteína Argonauta específica, y se unen con homología completa a su diana e inducen la degradación endonucleolítica del mRNA, que tiene como consecuencia la inhibición de la expresión del gen en cuestión.

LOS RNAs ASOCIADOS A PIWI.

Los piRNAs constituyen la tercera clase de ncRNAs, cuya misión es impedir la proliferación de los elementos genéticos denominados transposones. Son los de mayor tamaño conteniendo entre 24-31 nucleótidos. Este grupo ha sido el último en identificarse y el menos conocido. Se asocian con la subfamilia Piwi de proteínas, esenciales para la autoregeneración de células madre germinales y el control de la movilidad de transposones ⁽¹²⁷⁾. Son muy abundantes en células germinales. Algunas de estas moléculas están implicadas en el silenciamiento transposónico a través de la formación de heterocromatina o la desestabilización del RNA. Las características de los transcritos primarios generados por

los piRNAs son desconocidas, pero se sabe que a lo largo de su procesamiento se van produciendo cortes similares a los que ocurren en la ruta del siRNA, que en este caso define los extremos 5' de los piRNAs maduros.

LOS MICRO RNAS (miRNAs)

Los miRNAs son moléculas pequeñas de ARN no codificantes, de doble cadena (22 nucleótidos de longitud) que actúan regulando post-transcripcionalmente la expresión génica mediante unión a los mRNAs ⁽¹²³⁻¹²⁷⁾. Se hallan muy conservados en todas las especies. Una vez que el miRNA maduro ha llegado al citoplasma es cargado en el complejo RISC que une el miRNA con su gen diana. Solo una de las dos hebras del miRNA maduro la llamada “hebra guía” participa en la unión con el gen diana, mientras que la otra denominada “hebra pasajera” es desestimada. Y ya reconocida su diana, se inicia el bloqueo de la traducción de proteínas mediante un sistema de apareamiento imperfecto. Debido a que solo una pequeña región del miRNA, denominada “germinal”, es la responsable del reconocimiento de la diana, un solo miRNA se puede unir al mismo tiempo a varios genes y regularlos (a todos ellos) a la vez. Por esa característica de regular simultáneamente muchas dianas e incluso vías metabólicas y cadenas de transmisión de señales en su totalidad, los miRNAs se erigen en grandes candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos en un tipo singular de terapia génica. Los miRNAs, están alterados en gran variedad de procesos patológicos. Se ha demostrado que al regular la expresión de un miRNA se puede modular una vía en su

totalidad, ya que los miRNAs actúan sobre muchas dianas a la vez, siendo está una de las principales posibilidades de encontrar nuevas terapias basadas en aumentar o inhibir su expresión.

La forma de inhibir la expresión de un miRNA es utilizar un anti-miRNA, que se une a su miRNA correspondiente e impide la unión del miRNA endógeno a su miRNA diana en el órgano o tejido pertinente.

Los anti-miRNA contienen nucleótidos modificados LANS (locked nucleic acids), que aumentan su afinidad, estabilidad y especificidad por la diana. También se pueden utilizar los miRNAs denominados “esponja” que actúan secuestrando miRNAs, porque presentan secuencias complementarias a las regiones base de miRNA¹²⁵⁻¹²⁶

En cuanto a los análogos de miRNA también llamados miRNA “miméticos” se han diseñado para utilizarlos en procesos en los que se conoce que la reducción de la expresión de un miRNA específico induce una respuesta anómala, o bien la inhibición de una vía que provoca una respuesta patológica. Sin embargo, el principal inconveniente de esta terapia génica deriva de los problemas para ajustar la dosis adecuada.

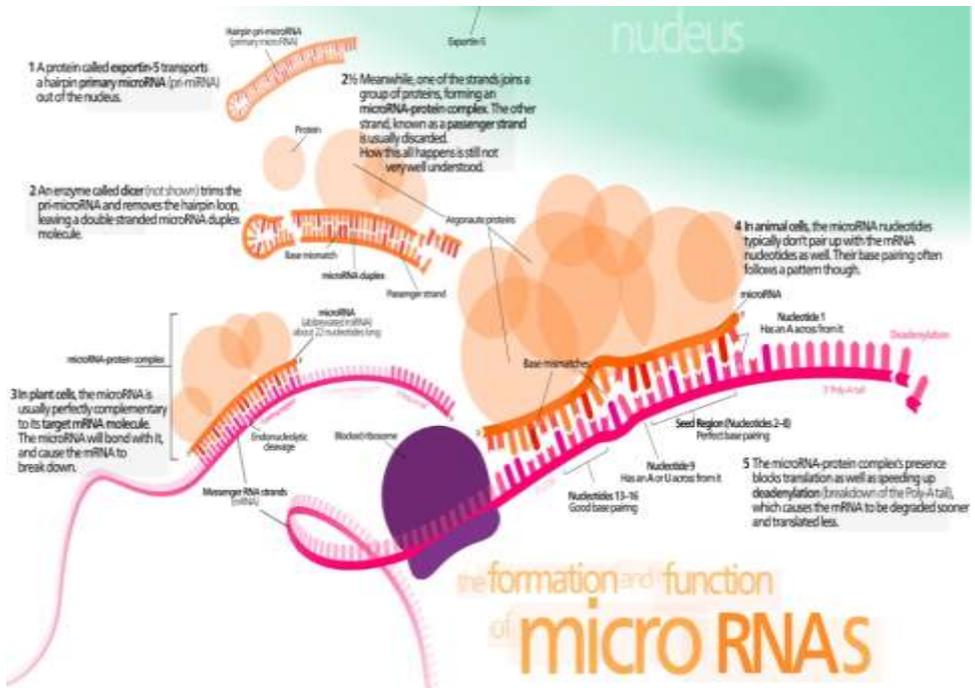


Fig. 14. Micro-ARN en acción con su ARN mensajero. Extraído de: Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? RNA 2005;11:1753-6

3.3.1. NUEVAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS Y TERAPEUTICAS CON miRNAs.

Todo lo expuesto es lo que ha generado una rápida investigación de estas moléculas (miRNAs, siRNAs y piRNAs) en relación a diversas enfermedades, utilizándolos como

biomarcadores específicos, y también para el desarrollo de nuevos fármacos. A nuestro grupo le interesa este tema de forma particular, ya que en relación a las enfermedades oculares, se han descrito características de la expresión de miRNAs en la retina, cristalino y córnea y se han establecido los miRNA-transcriptomas en estos tres tejidos. Una revisión de Zhang y cols¹²⁹, confirma que cientos de miRNA se expresan en los tejidos y fluidos oculares y sus funciones más importantes son precisamente regulando procesos fisiológicos entre los que destacan el desarrollo, la diferenciación, regeneración post-lesional y el control del ciclo circadiano en nuestros ojos.

También describen que los miRNAs desempeñan funciones esenciales regulatorias en la patogénesis de la neovascularización, uveítis autoinmune, glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o retinopatía diabética. Se ha descrito que la manipulación de los miRNAs-23 y -27 puede proporcionar una nueva estrategia terapéutica para la neovascularización coroidea. Además el miRNA-23 está implicado en la regulación del estrés oxidativo por lo que a través de esta vía puede involucrarse en el proceso etiopatogénico de la DMAE y en el glaucoma. De hecho, Wang et al.,¹³⁰, demostraron que el silenciamiento de miR-23 y miR-27 bloqueó la angiogenesis en el curso de la DMAE.

Por otra parte, Tanaka et al.,¹³¹ han publicado los resultados del análisis de microarrays en el humor acuoso de pacientes con glaucoma y cataratas (como grupo comparativo) para identificar los

perfiles de miRNAs extracelulares encontrando 11 miRNAs sobre-regulados y 18 infra-regulados en los glaucomatosos. Además, Paylakhi et al.,¹³², utilizando el mismo método identificaron en la malla trabecular a miR-204, junto a otros genes y factores de transcripción en relación al GPAA. Por otra parte, Luna et al.,¹³² demuestran que miR-200c regula la contracción de las células de la malla trabecular y la presión intraocular. Estudios preclínicos con Bamosiran (SYL040012) han demostrado la eficacia “in vivo” de los siRNAs administrados por vía tópica para el tratamiento de la hipertensión ocular asociada al glaucoma primario de ángulo abierto (Figura 15).

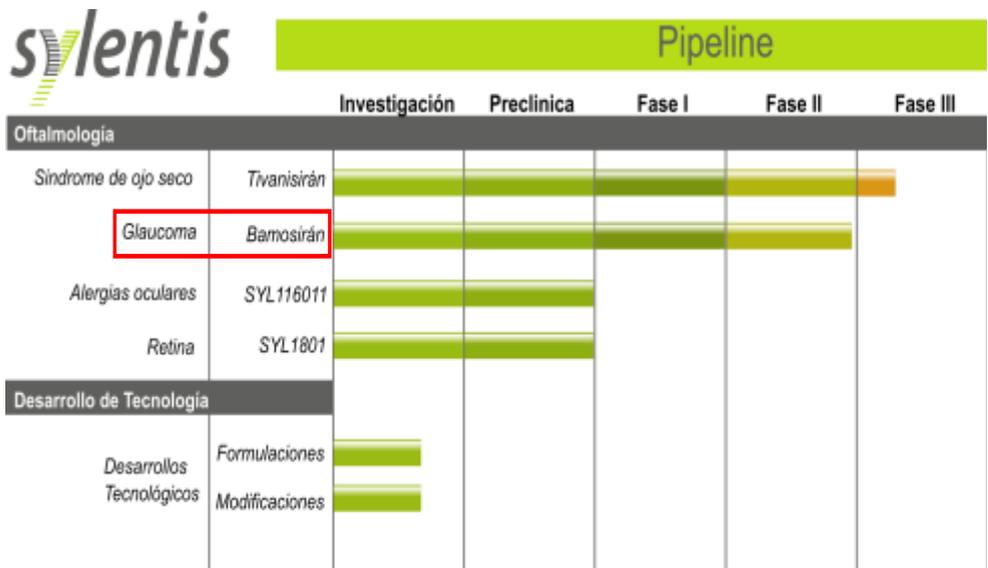


Fig. 15. Productos de Sylentis basados en RNA de interferencia que están en fase de investigación. Tomado de:

<https://www.sylentis.com/index.php/es/productos/pipeline>

Actualmente, Sylentis ha acabado el ensayo de fase II y se encuentra en los trámites para poder comenzar la fase III con Bamosiran, para tratar el glaucoma e hipertensión ocular. En nuestro caso, hemos trabajado en los últimos años desarrollando un método para extracción de las lágrimas y poder utilizarlas de la forma más sencilla en el protocolo para extracción de miRNAs, lo que nos ha permitido obtener resultados cuantificando la expresión de miRNAs en lágrimas de diabéticos con y sin retinopatía frente a controles sanos. Estos datos los hemos relacionado con factores de riesgo para la progresión de la enfermedad, obteniendo un perfil del paciente más susceptible a sufrir las complicaciones oculares, con la perspectiva de poder actuar sobre ello a través de la identificación de los miRNAs específicos de este proceso ^(133, 134). Con esto hemos puesto en marcha un protocolo de extracción de lágrimas reflejas y hemos optimizado la técnica (con nuestros estudios preliminares ¹³⁴⁻¹³⁵, lo que nos permite ampliar nuestra hipótesis de trabajo sobre las posibilidades diagnósticas y terapéuticas de los pequeños RNAs de interferencia a otras enfermedades oculares de gran prevalencia, como el glaucoma.

La neuropatía óptica degenerativa conocida como glaucoma es la segunda causa de ceguera a nivel mundial y en nuestro ámbito de estudio (Valencia) como en el resto de España, la prevalencia es del 2%, aunque se estima un incremento de más del 30% para el año 2020, lo que no es realmente sorprendente, ya que esta enfermedad se trata con colirios antihipertensivos pero no existe un tratamiento que detenga la neurodegeneración ¹³⁶ y el camino hacia la ceguera.

3.3.2. CONSIDERACIONES SOBRE EL FUTURO DE LOS miRNAs Y LAS ENFERMEDADES OCULARES.

El descubrimiento de la estructura tridimensional del ADN en 1955 por Watson y Crick¹¹³ cambió los conceptos de salud y enfermedad, abordando el conocimiento del material genético como objetivo prioritario en biomedicina. Ha transcurrido algo más de una década de la secuenciación del genoma humano¹¹⁵⁻¹¹⁷ y los científicos han descubierto muchos genes que cumplen funciones importantes en las enfermedades, progresando en el conocimiento de la biología molecular y genética. Los marcadores genéticos han contribuido al diagnóstico precoz y a la instauración de terapias más específicas para diversas enfermedades. Muy poco a poco aumenta el número de pacientes que puede alcanzar un tratamiento efectivo en la terapia génica¹³⁷⁻¹⁴¹. Aun así, grupos de investigación de todo el mundo siguen trabajando en la búsqueda de genes implicados tanto en las enfermedades de mayor prevalencia, como en enfermedades raras y en el envejecimiento. Y en oftalmología, las terapias con factores neuroprotectores¹³⁶, la terapia génica¹³⁷⁻¹³⁸ y la terapia regenerativa¹³⁹⁻¹⁴¹ junto al desarrollo de la bioingeniería para la visión artificial¹⁴², son el objetivo principal de los grupos de investigación más sobresalientes¹³⁷⁻¹⁴². En ciencias de la visión queda un largo camino por recorrer hasta alcanzar una información más completa de los diferentes genes que causan las enfermedades oculares y provocan la ceguera e identificar a los que contribuyen a la presentación en uno u otro sexo, a su severidad o que regulen la respuesta a la medicación instaurada. Nos encontramos en una época crucial en la

investigación oftalmológica basada en los fenómenos de interferencia por RNA.

El mayor conocimiento de los miRNAs, siRNAs y piRNAs, conducirá a un nuevo concepto del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades oculares basada en dispositivos autodiagnósticos y terapia génica mediante inyecciones intracamerulares o intravítreas, que en combinación con vectores virales o bien con nanopartículas permitirán ofrecer una alternativa terapéutica excepcional a los pacientes afectados. El tratamiento actual del glaucoma es insuficiente. Ante la imposibilidad de frenar la neurodegeneración glaucomatosa, proponemos un estudio para identificar miRNAs en lágrimas de pacientes con glaucoma para relacionarlos con factores de riesgo para el inicio y la progresión de la enfermedad, y obtener una nueva estrategia en el marco del diagnóstico molecular del glaucoma para la población Valenciana, y extrapolable al resto de la sociedad.

4. LAS LÁGRIMAS.

4.1 COMPOSICIÓN Y FUNCIONES

Nuestras lágrimas poseen una composición muy particular¹⁴³⁻¹⁴⁴, lo que ha deparado multitud de estudios, tendiendo en los últimos años hacia su utilización como muestra biológica, tanto por su accesibilidad y obtención rápida e incruenta, como la posibilidad de obtener información del estado del paciente en relación a enfermedades sistémicas, loco-regionales o situaciones especiales, entre ellas las infecciones, inflamaciones, alergias, enfermedades autoinmunes, el ojo seco, la exposición a radiaciones o a pantallas de ordenador, la respuesta inmune en queratoplastias, seguimiento del queratocono, o la instilación crónica de colirios. Algunos de los trabajos sobre estos temas han sido llevados a cabo por nuestro grupo investigador¹⁴⁵⁻¹⁵⁰.

Los humanos producimos diariamente 1,5 ml de lágrimas. El volumen total de las lágrimas varía entre los 5 μ l a los 10 μ l (media de 7 μ l). Atendiendo a su distribución, las lágrimas se localizan en la hendidura palpebral (1,1 μ l), en el menisco lagrimal (2,9 μ l) y en el fondo de saco conjuntival (4,4 μ l). La secreción de lágrimas es de unos 1,2 μ l/min, aunque varía mucho durante el día en relación al estado general, u otras situaciones de la vida diaria, incluyendo nutrición, fármacos, edad, etc. Nuestras lágrimas se evaporan aproximadamente entre 0,05 y 0,07 μ l/min/cm². Su temperatura es de unos 32-34°C. El pH de las lágrimas oscila entre 7,3-7,8. El valor más importante en patología de la película lagrimal superficial es la osmolaridad de la lágrima cuyo valor normal medio medido durante

el día es de unos 305 mOsm/l, que aumenta en diversas situaciones, principalmente en el síndrome del ojo seco (más de 330 mOsm/l). La tensión superficial de nuestras lágrimas es de unas 46,24 dinas/cm.

Sabemos que en el 98,2% de la composición de la lágrima es agua, y por ello el índice de refracción es 1,357.

Pretendemos utilizar lágrimas reflejas obtenidas del menisco lagrimal inferior mediante capilaridad para procesarlas mediante técnicas de biología molecular e identificar los miRNAs presentes en las mismas y el perfil diferencial de expresión entre los grupos de estudio.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El GPAA no tiene un tratamiento definitivo que impida la neurodegeneración. Se han propuesto marcadores clínicos¹⁵¹, moleculares¹⁵²⁻¹⁵³ y genéticos¹⁵⁴ que apoyen el diagnóstico precoz e identifiquen a los pacientes más susceptibles a la progresión de la enfermedad.

Buscando muestras biológicas humanas alternativas a las clásicas, sobre todo aquellas que se puedan obtener de forma relativamente sencilla e incruenta, nuestro grupo ha desarrollado diversas técnicas para obtenerlas para investigación, evitando maniobras invasivas. Hemos establecido una técnica fácil, rápida y útil para obtención de lágrimas reflejas en cantidad suficiente (20-30 μ L de cada ojo), que permiten el procesamiento para técnicas moleculares y genéticas¹⁴⁵⁻¹⁵⁰

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes que desempeñan funciones esenciales como reguladores de numerosas vías y procesos biológicos, modulando negativamente la expresión de genes diana. Se estima que cada uno puede regular unos 200 mensajeros (mRNA), controlando hasta el 60% de la expresión de genes

codificantes de proteínas. Cambios en la expresión de miRNAs se han relacionado con la incidencia, factores de riesgo, desarrollo/progresión de muchas enfermedades, entre ellas el GPAA¹⁵⁵, como el aumento de niveles circulantes de ciertos miRNAs asociados a inflamación, apoptosis y estrés oxidativo en glaucomatosos.

Nos planteamos un estudio para averiguar en primer lugar si la expresión de los miRNAs en lágrimas es diferente en pacientes con GPAA en estadio inicial y en sujetos con HTO, y en segundo lugar si hay algún o algunos miRNAs que puedan estar relacionados con los factores de riesgo o mecanismos patogénicos del GPAA y pudieran ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico precoz para identificar los pacientes con mayor riesgo de ceguera glaucomatosa.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el perfil diferencial de expresión de miRNAs en lágrimas de sujetos con hipertensión ocular y pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtener los datos sociodemográficos, características y estilo de vida de los participantes, así como los antecedentes familiares y personales de interés para el estudio.
2. Realizar una exploración oftalmológica sistematizada y específica para glaucoma en todos los participantes de nuestra muestra.
3. Extraer RNA a partir de muestras de lágrima de los participantes.
4. Identificar y cuantificar los miRNAs para la obtener el perfil de expresión en pacientes con GPAA y en individuos con HTO.
5. Analizar todos los datos sociodemográficos, clínicos y moleculares de cada grupo en particular para integrarlos y comparar ambos grupos de estudio.
6. Establecer los miRNAs que pueden potencialmente ser predictivos del riesgo de padecer glaucoma, con el fin de responder a la necesidad de avanzar en investigación del glaucoma y ofrecer una alternativa diagnóstica y terapéutica de forma personalizada.

METODOLOGÍA

1. DISEÑO EPIDEMIOLÓGICO

Desde el punto de vista epidemiológico se trata de un estudio multicéntrico, observacional analítico de tipo caso-control, cuyo objetivo es determinar el perfil diferencial de expresión de miRNAs en pacientes con HTO y pacientes con GPAA en muestras de lágrimas humanas, para establecer el riesgo de desarrollar el glaucoma, en una población valenciana.

1.1 SELECCIÓN DE PARTICIPANTES, TAMAÑO MUESTRAL Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para ello, y según los criterios de inclusión y exclusión establecidos (tabla 4), se seleccionaron 80 sujetos en las consultas del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, clasificándose en 2 grupos: 1) pacientes con GPAA (n=40), 2) pacientes con HTO (n=40).

**Tabla 4. Criterios de inclusión y exclusión
para la selección de los participantes**

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	
GPAA	HTO
GPAA	Sin daño neurosensorial, pero tensión ocular elevada
Rango de edad de 50-80 años	
Ambos sexos	
Capacidad de entender y participar en el estudio	
CRITERIOS DE EXCLUSION	
GPAA	HTO
Tener GL diferente del GPAA	Tener daño sensorial o tensión ocular normal
Edad <40 años ó >80 años	
Padecer cualquier otra enfermedad ocular, patología sistémica o trastorno mental	
Tratamiento crónico agresivo	
Cirugía ocular o láser el último año	
Llevar lentes de contacto	
Incapacidad de participar en el estudio	

GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto; HTO: hipertensión ocular; GL: glaucoma

El tamaño muestral ha sido calculado con el programa estadístico eNe 2.0 (GlaxoSmithKline S.A.) de manera que, aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan 40 casos y 40 controles para detectar una *odds ratio* mínima de 3. Se asume que la tasa de expuestos en

el grupo control será del 0.4. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%. Se ha utilizado la aproximación de POISSON.

Todas las pruebas y los procedimientos del estudio se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki para la experimentación humana (Helsinki 1964, versión actualizada 2004) y se ajustaron a la normativa vigente para este tipo de estudios en la Comunidad Europea. La documentación relativa al estudio se presentó al Comité Ético de Investigación en Medicamentos del Hospital Universitario Doctor Peset, el cual aprobó la realización del estudio. Así mismo, se informó a los sujetos sobre las particularidades del estudio y se les explicó los pormenores del mismo, entregándoles los detalles en un documento escrito. Una vez decidieron participar, se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de ellos.

1.2 VARIABLES DEL ESTUDIO

➤ **Variables de tipo caso-control**

Caso: sujeto diagnosticado de GPAA.

Control: sujeto diagnosticado de HTO, sin daño neurosensorial.

➤ **Variables sociodemográficas:** edad, sexo, domicilio, lugar de trabajo, características de la nutrición, hábitos tóxicos, realización de ejercicio Físico, otras patologías relacionadas (insuficiencia cardio-respiratoria, diabetes mellitus, disfunción tiroidea).

➤ **Variables clínicas:** agudeza visual con mejor corrección, biomicroscopía segmento anterior, gonioscopia, PIO, campimetría, OCT

- **Variables genéticas:** expresión de miRNAs

2. PROCEDIMIENTO

2.1 EXAMEN OFTALMOLÓGICO

Una vez reclutados a los participantes, se llevó a cabo una entrevista personal a los mismos para registrar datos demográficos, características personales y familiares, hábitos nutricionales y hábitos tóxicos. Detalles de la enfermedad (fecha al diagnóstico, duración, medicación actual, comentarios y sugerencias).

Posteriormente, se les realizó una evaluación oftalmológica para confirmar el diagnóstico de GPAA o el de HTO.

El diagnóstico de GPAA se realizó en base a la determinación de la presión intraocular y pruebas morfológicas y funcionales:

- PIO >21 mmHg con Tonómetro de Aplanación de Goldmann.
- Espesor Corneal Central < 500 micras
- Campo Visual Patológico (< 6 dB)
- Examen de Fondo de ojo (Excavación papilar superior a 4/10)

La HTO se diagnosticó en base a las pruebas anteriores, debiendo presentar PIO elevada y resultado normal para las demás.

La clasificación del estadio del glaucoma se ajusta a las descripciones de Mills y cols .

2.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Una vez clasificados los participantes y siguiendo la definición operativa expuesta anteriormente, se procedió a la obtención de las muestras de lágrima. Para ello, se usó un tubo capilar de vidrio de 70 μ L (figura 16), y se recogió una muestra de lágrima refleja de cada ojo mediante el método réfex y sin instilar anestésicos (como se describe en nuestros trabajos anteriores ⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁹⁾). De esta manera, se obtuvieron aproximadamente 20-25 μ L de lágrima por ojo, que se depositaron en un tubo microeppendorf y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.



Fig. 16. Tubos usados para la recolección de las muestras de lágrima. Imagen tomada de: <http://www.deltalab.es/>



Fig. 17. Congeladores -80°C de la Unidad de Investigación Oftalmológica Santiago Grisolía

2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Una vez reunidas todas las muestras, se precedió a la extracción de RNA total usando el *miCURY RNA Isolation Kit* (EXIQON Inc., Woburn, MA, USA), diseñado para la purificación de todos los ARN menores de 1000 nucleótidos, desde ARNm y ARNt hasta microARN y ARN interferente pequeño. La purificación se basa en la cromatografía en columna de centrifugación utilizando como matriz de separación una resina patentada. Los ARN pequeños se separan de otros componentes celulares, como las proteínas, sin el uso de fenol o cloroformo. El protocolo realizado fue el siguiente:

- Transferir cada muestra de lágrima a un tubo eppendorf
- Añadir agua libre de RNAsas hasta completar un volumen de $200\mu\text{L}$
- Añadir $60\mu\text{L}$ de solución de lisis BF

- Mezclar en vórtex 5 segundos e incubar 1 minuto a temperatura ambiente (TA).
- Centrifugar 3 minutos a 11000g
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 2mL (con tapón)
- Añadir 270µL de isopropanol
- Mezclar en vórtex 5 segundos
- Colocar las columnas con membrana de sílice (microRNA Mini Spin Column BF) en un tubo, rotular y cargar cada muestra en la columna correspondiente
- Incubar 2 minutos a TA
- Centrifugar 30 segundos a 11000g
- Descartar el filtrado y volver a colocar las columnas en el tubo correspondiente
- Añadir 100µL de Solución de lavado 1 BF a cada columna
- Centrifugar 30 segundos a 11000g
- Descartar el filtrado y volver a colocar las columnas en el tubo correspondiente
- Añadir 700µL de Solución de lavado 2 BF a cada columna
- Centrifugar 30 segundos a 11000g
- Descartar el filtrado y volver a colocar las columnas en el tubo correspondiente
- Añadir 250µL de Solución de lavado 2 BF a cada columna
- Centrifugar 2 minutos a 11000g para secar completamente las membranas
- Colocar cada columna en un tubo nuevo de 1.5mL (con tapón)
- Añadir 30µL de agua libre de RNasas directamente en las membranas

- Incubar 1 minuto a TA
- Cerrar el tapón y centrifugar 1 minuto a 11000g
- Almacenar el RNA purificado a -80°C hasta su procesamiento



Fig. 18. Foto del doctorando trabajando en el proceso de extracción de RNA total

La siguiente figura muestra esquemáticamente el protocolo seguido, cuya duración aproximada es de 40-70 minutos.

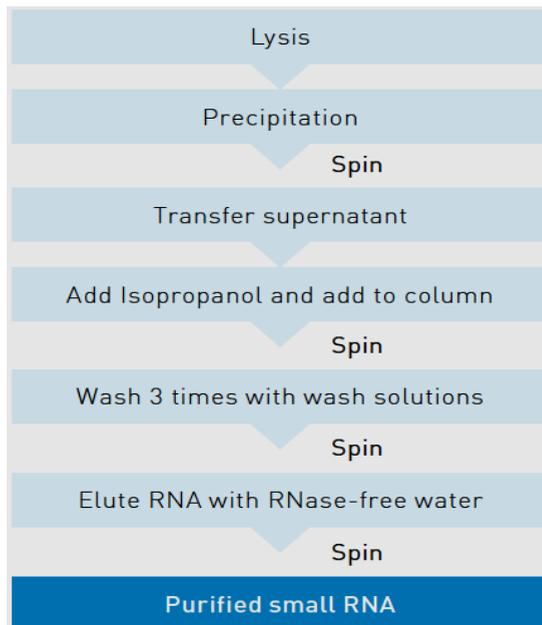


Fig. 19. Descripción del protocolo realizado. Tomado del manual del fabricante (EXIQON Inc., Woburn, MA, USA)

Una vez obtenido el RNA total de lágrimas, se cuantificó en un Bioanalyzer 2100 (Agilent® Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) (fig, 20), usando el RNA 6000 Nano Kit (Agilent® Technologies, Inc.). De esta manera se pudo conocer la concentración del material de partida.



Fig. 20. Bioanalyzer 2100 System. Tomado de: <https://www.biocompare.com>

2.4 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS DE miRNAs

Todas las librerías fueron preparadas usando el NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set 1 and 2 for Illumina® (Set 1 #E7300 y Set 2 #7580; New England BioLabs®, Inc., Ipswich, MA, USA).



Fig. 21. Illumina® (Set 1 #E7300)

Este kit contiene todos los reactivos necesarios para la conversión de los small RNAs en librerías indexadas para secuenciación masiva en la plataforma Illumina. El procedimiento se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante (ver figura 22).

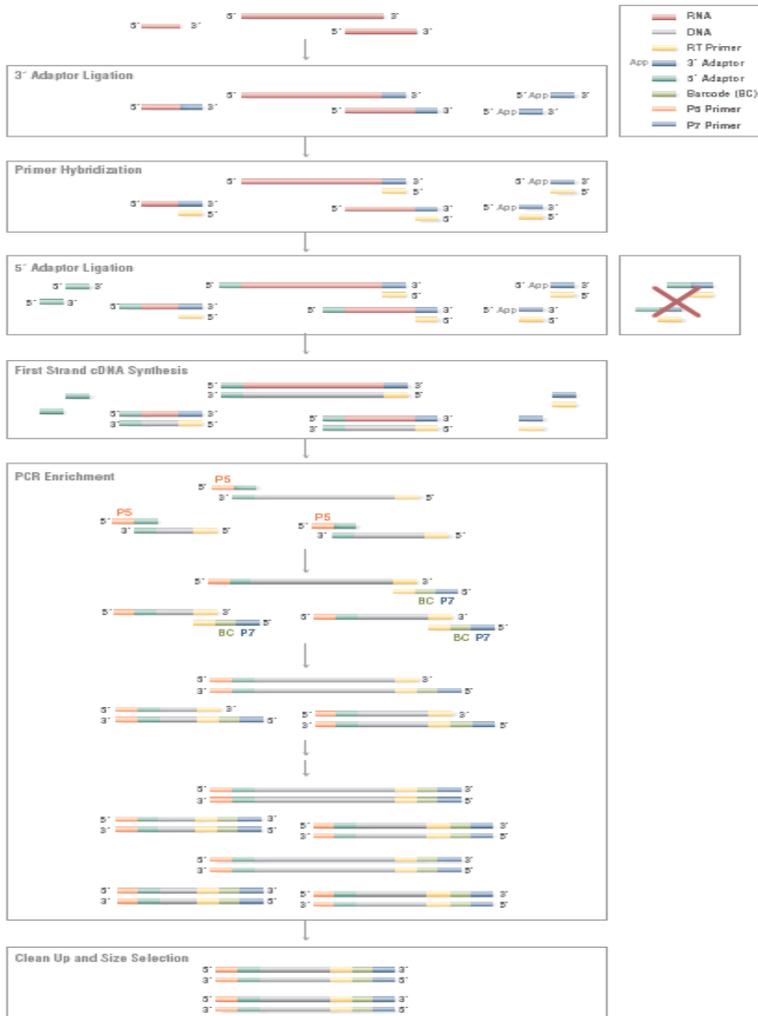


Fig. 22. Flujo de trabajo para la preparación de librerías. Tomado del manual del fabricante (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA)

El protocolo realizado, siguiendo las instrucciones del fabricante, fue:

- Ligación del adaptador 3' SR:

- Debido a la baja concentración de RNA de partida, el adaptador 3' SR fue añadido preparando previamente una dilución $\frac{1}{2}$.
- Mezclar los siguientes componentes en un tubo estéril de PCR libre de nucleasas:

RNA	1-6 μL
Adaptador 3' SR	1 μL
Agua libre de Nucleasas	Variable
<hr/>	
Volumen Total en el tubo	7 μL

- Incubar en termociclador durante 2 minutos a 70°C
- Colocar los tubos en hielo
- Añadir y mezclar los siguientes reactivos:

Tampón de Ligación 3' (2X)	10 μL
Mix de Enzima de Ligación 3'	3 μL
<hr/>	
Volumen Total en el tubo	20 μL

- Incubar 1 hora a 25°C en termociclador

- Hibridación del primer para la transcripción reversa:

- Este paso es importante para prevenir la formación de dímeros de adaptador, que interferirán en la secuenciación de las muestras.
- Debido a la baja concentración de RNA de partida, el primer SR se diluyó $\frac{1}{2}$.
- Añadir los siguientes reactivos y mezclar bien:

Primer SR de Transcripción Reversa	1 μ L
Agua libre de Nucleasas	4.5 μ L
<hr/>	
Volumen Total en el tubo	25.5 μ L

→ Poner las muestras en un termociclador con la cubierta precalentada (>85°C) y ejecutar el siguiente programa:

Tiempo	Temperatura
5 minutos	75°C
15 minutos	37°C
15 minutos	25°C
Hold	4°C

- Ligación del adaptador 5' SR:

→ Debido a la baja concentración de RNA de partida, se preparó una dilución $\frac{1}{2}$ del adaptador 5' SR.

→ Resuspender el adaptador 5' SR en 120 μ L de agua libre de nucleasas, 5 minutos antes de utilizarlo.

→ Alícuotar el adaptador 5' SR en un tubo de PCR libre de nucleasas de 200 μ L según el número de muestras a analizar en el experimento más un exceso del 10%.

→ Incubar el adaptador en termociclador durante 2 minutos a 70°C.

→ Colocar los tubos inmediatamente en hielo.

→ Mantener los tubos en hielo y usar el adaptador desnaturalizado dentro de los 30 minutos posteriores a la desnaturalización.

* Guardar el adaptador 5' SR resuspendido que no se haya usado a -80°C. Desnaturalizar alícuotas antes de su uso. Minimizar los ciclos de congelación/descongelación.

→ Añadir y mezclar los siguientes reactivos en los tubos del final del paso de la hibridación del primer:

Adaptador 5' SR (desnaturalizado)	1 μ L
Tampón de Ligación 5' (10X)	1 μ L
Mix de Enzima de Ligación 5'	2.5 μ L
<hr/>	
Volumen Total en el tubo	30 μ L

→ Incubar 1 hora a 25°C en termociclador.

- Transcripción reversa:

→ Mezclar los siguientes reactivos en un tubo de PCR estéril libre de nucleasas:

Adaptador de RNA ligado (del paso anterior)	30 μ L
Tampón de síntesis de primera hebra	8 μ L
Inhibidor de la RNasa murina	1 μ L
Transcriptasa Reversa ProtoScript II	1 μ L
<hr/>	
Volumen Total en el tubo	40 μ L

→ Incubar 1 hora a 50°C en termociclador.

→ Proceder inmediatamente con la amplificación.

* Si no se puede proceder inmediatamente con la amplificación, inactive la reacción de RT mediante incubación a 70°C durante 15 minutos. Después, las muestras se podrán almacenar de forma segura a una temperatura entre -15°C y -25°C.

- Amplificación:

→ Añadir y mezclar los siguientes reactivos en los tubos procedentes del paso anterior:

LongAmp Taq 2X Master Mix	50 µL
Primer SR	2.5 µL
Index (X) Primer*	2.5 µL
Agua libre de nucleasas	5 µL
<hr/>	
Volumen Total en el tubo	100 µL

* El NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set 1 de Illumina contiene 1-12 primers de PCR, cada uno con un índice diferente. Para cada reacción, sólo se usa uno de los 12 índices de primer de PCR durante la etapa de PCR.

→ Ejecutar la PCR con las siguientes condiciones:

PASO	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	30 segundos	1
Desnaturalización	94°C	15 segundos	15
Alineación	62°C	30 segundos	
Extensión	70°C	15 segundos	
Extensión final	70°C	5 minutos	1
Hold	4°C	∞	

→ Almacenar las librerías a -20°C

- PURIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS LIBRERÍAS

-

Las librerías indexadas fueron purificadas mediante el QIAquick® PCR Purification Kit (#28104 , QIAGEN®, Hilden, Germany) para la limpieza de primers, nucleótidos, enzimas y sales de las reacciones enzimáticas previas. El protocolo de purificación fue el siguiente:

- Añadir 5 volúmenes de tampón PB a 1 volumen del producto de PCR (librerías) y mezclar bien. Si el color de la mezcla es anaranjado o violeta, añadir 10µL de acetato de sodio 3M pH 5.0, y mezcle (la mezcla debería volverse amarilla).
- Colocar las columnas QIAquick en tubs de recolección de 2mL (vienen en el kit).
- Introducir la muestra en la columna y centrifugar a 13000rpm y TA durante 30-60 segundos. Descartar el filtrado y volver a poner la columna en el tubo de recolección.
- Lavar añadiendo 750µL de tampón PE en la columna y centrifugar a 13000rpm y TA durante 30-60 segundos. Descartar el filtrado y volver a poner la columna en el tubo de recolección.
- Volver a centrifugar a 13000rpm y TA durante 1 minuto para eliminar la cantidad de tampón que aún pudiera quedar en la columna.
- Colocar las columnas en tubos nuevos de 1.5mL.
- Añadir 50µL de tampón EB (10mM Tris·Cl, pH 8.5) o agua (pH 7.0-8.5) al centro de la membrana y centrifugue la columna a 13000rpm y TA durante 1 minuto. Para aumentar la concentración de ADN, agregue 30 µL de tampón de elución al centro de la membrana, deje

reposar la columna durante 1 minuto y luego centrifugue (13000rpm, TA, 30-60 segundos).

•



Fig 23. QIAquick® PCR Purification Kit (#28104, QIAGEN®, Hilden, Germany)

Posteriormente, se realizó un control de calidad de las librerías purificadas mediante el 4200 TapeStation (Agilent® Technologies, Inc.) con el High Sensitivity D1000 Kit (Agilent® Technologies, Inc.).



Fig. 24. 4200 TapeStation (Agilent® Technologies, Inc.)

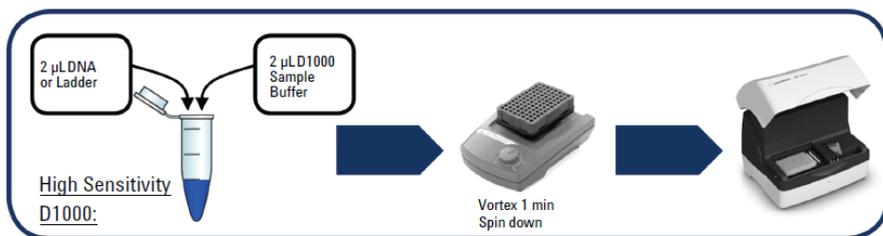


Fig. 25. Flujo de trabajo para el control de calidad de las librerías. Tomado del manual del fabricante (AGILENT. Waldbronn. Germany)

A continuación, se realizó la selección de tamaño para la obtención de la fracción de miRNAs en cada una de las librerías realizadas mediante uso del equipo Pippin Prep System (Sage Science, Inc., Beverly, MA, USA) (Fig. 26) utilizando el kit 3% Agarose, dye free gel with internal standards (Marker P) (Sage Science # CDP3010). Este equipo presenta la capacidad de seleccionar amplios rangos de fragmentos. El rango de tamaño seleccionado fue de 120-200 pb para obtener los miRNAs.



Fig.26. Pippin Prep System (Sage Science, Inc., Beverly, MA, USA)

Finalmente, los miRNAs fueron cuantificados mediante el 4200 TapeStation (Agilent® Technologies, Inc.) con el High Sensitivity D1000 Kit (Agilent® Technologies, Inc.) para conocer la molaridad de cada una de las muestras y se procedió a su normalización (1nM) para la preparación del pool y posterior secuenciación.

2.5 SECUENCIACIÓN DE miRNAs

La secuenciación de próxima generación se llevó a cabo en la plataforma NextSeq 500 System (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) con MID Output 150 ciclos de Illumina (Fig. 27), obteniendo una media de 3,5 millones de lecturas de los miRNAs.



Fig. 27. NextSeq 500 System (derecha) y MID Output 150 ciclos (izquierda)

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Brevemente:

- Descongelar y preparar un nuevo cartucho de reactivos
- Preparar una nueva celda de flujo (llevar a temperatura ambiente)
- Desnaturalizar y diluir las librerías

- Cargar la librería en el pocillo del cartucho de reactivos
- Seleccionar “*SEQUENCE*” en la interfaz del software para configurar los pasos para la ejecución
- Cargar la celda de flujo
- Vaciar y volver a cargar el contenedor de reactivos usados
- Cargar el cartucho de tampón y el cartucho de reactivo
- Revisar los parámetros de ejecución y los resultados de la verificación automática
- Seleccionar “*START*”
- Monitorizar la ejecución

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICO

Se tomaron en un primer momento cada uno de los archivos FASTQ con el fin de determinar la calidad de la secuenciación mediante el uso de FASTQC. Tanto los adaptadores como las lecturas que presentaron una baja calidad fueron eliminadas y se procedió a su alineamiento contra los precursores de RNAs no codificantes depositados en la base de datos ENSEMBL, tomando aquellas lecturas que alinearon de manera específica con los precursores de miRNAs, caracterizando la naturaleza del miRNA maduro en base a su posición de alineamiento (5p y 3p).

Posteriormente, se obtuvo la matriz de conteos para cada miRNA, cuyo tratamiento estadístico (normalización, expresión diferencial y significancia) se realizó con los correspondientes

paquetes estadísticos (Limma y edgeR) depositados en Bioconductor (www.bioconductor.org).

Los genes diana asociados a cada uno de los miRNAs que presentaron variaciones significativas en su nivel de expresión, fueron usados para realizar un análisis funcional (GSEA) basado en los valores de control establecidos sobre cada gen y detectando categorías funcionales y rutas metabólicas significativas que pudiesen ser de interés al estar relacionadas con el fenotipo/clínica de los pacientes estudiados.

Posteriormente se realizó un análisis predictivo basado en curva de la característica operativa del receptor (ROC), para determinar si los miRNAs cuyos niveles de expresión variaban de forma significativa pudiesen ser usados como biomarcadores. Se utilizó el software SPSS para construir la ROC para cada miRNA con expresión diferente entre los 2 grupos de estudio. El área bajo la curva (AUC) obtenida en este análisis nos indicará si el miRNA puede considerarse como predictor del GPAA. Para ello, clasificamos el AUC de la siguiente manera:

- 0.50-0.60: mal predictor
- 0.60-0.70: predictor aceptable
- 0.70-0.80: predictor bueno
- 0.80-0.90: predictor muy bueno
- 0.90-1.0: predictor excelente

En cuanto al análisis de datos sociodemográficos y clínicos, la comparación de 2 variables categóricas se realizó mediante el test Chi cuadrado de Pearson. Se comprobó la normalidad de los datos de variables cuantitativas mediante el test de Kolmogorov Smirnov. Las variables cuantitativas normales se analizaron mediante el test t de Student para muestras independientes (comparación de 2 medias) o el análisis de la varianza (ANOVA, comparación de más de dos medias). Las variables cuantitativas no normales se analizaron mediante el test U de Mann Whitney (comparación de 2 medias) o el test de Kruskal Wallis (comparación de más de 2 medias).

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS v.22 (IBM Corporation 2017, Armonk, NY, USA).

RESULTADOS

1. DATOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES

Para la realización del estudio se han procesado un total de 42 muestras de lágrimas de los participantes, por una parte las correspondientes a pacientes diagnosticados de GPAA en estadio inicial [leve-moderado (n=20)], y por otra parte de sujetos diagnosticados de HTO (n= 22), que presentan una PIO elevada, pero sin presencia de daño en el nervio óptico.

La edad media de los participantes fue: 64.5 ± 1.4 y 61.1 ± 2.4 para GPAA y HTO respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos ($p=0.218$).

La distribución por género demostró que 47.61% fueron hombres y 52.38% mujeres en el grupo GPAA, mientras que en el grupo HTO el 33.33% fueron hombres y el 66.66% mujeres. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.366$).

La duración media del proceso fue de 11.7 ± 2.2 años en el caso de GPAA y 7.4 ± 2.0 años en el caso de HTO.

Respecto a la presencia o no de antecedentes familiares de glaucoma, en el grupo de glaucomatosos obtuvimos un 42.85 % de pacientes con antecedentes familiares y un 45% en el caso de los individuos con HTO.

En cuanto a las características de los participantes y estilo de vida, que son a su vez factores de riesgo para el GL, tal como se muestra en la Tabla 5, no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Tabla 5. Características socio-demográficas de los participantes.

PARÁMETRO		GPAA	HTO	p
Talla (cm)		165.2 ± 2.2	164.0 ± 2.2	0.694
Peso (kg)		76.7 ± 3.7	70.6 ± 3.2	0.217
IMC (kg/m²)		28.1 ± 1.2	26.2 ± 0.9	0.238
Tabaco (%)		28.6	22.2	0.651
Alcohol (%)		9.5	16.7	0.506
Ejercicio Físico (%)	Leve	42.9	61.1	0.225
	Moderado	57.1	33.3	
	Alto	0.0	5.6	

GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto; HTO: hipertensión ocular; IMC: índice de masa corporal

El hábito tabáquico, el consumo de alcohol y el ejercicio físico representan el porcentaje de los que sí lo realizan.

Todos los participantes del estudio realizan ejercicio físico de manera leve o moderada: En este sentido un total de 12 participantes

con GPAA realizaban ejercicio físico moderado y 9 de forma leve. En el grupo con HTO, 6 sujetos realizaban ejercicio físico moderado, 1 ejercicio fuerte y 11 lo realizaban de forma leve.

Respecto al hábito tabáquico y alcohólico, de forma global, no existían dependencias fuertes. Respecto al fumar: en el GPAA: 6 fumaban y 15 no lo hacían. En los HTO 4 sí fumaban y 14 no. Y en el caso del alcohol, en el GPAA 2 sí beben vs 19 que no beben, mientras que en los HTO, 3 sí beben vs 15 que no lo hacían.

2. DATOS CLÍNICOS. EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA

Revisamos ahora nuestros resultados clínicos. La exploración oftalmológica de los pacientes HTO reveló en general datos normales o en relación a la normalidad tanto en la OCT, como en CV y en las exploraciones del fondo que mostraron papilas dentro de los parámetros considerados fisiológicos (para completar la información véanse las figuras 28, 29A,B, 30 y 31, representativas de los participantes en estudio).

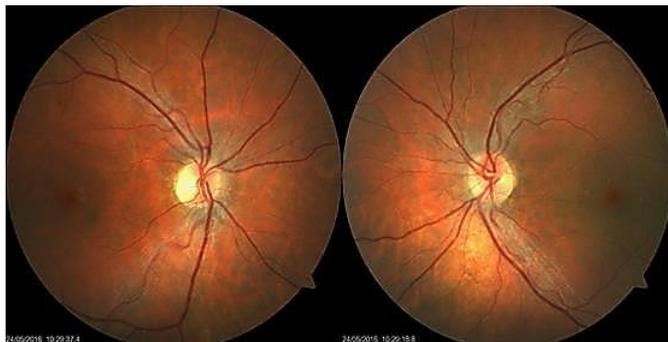


Fig. 28 Fondo de ojo normal en paciente con HTO

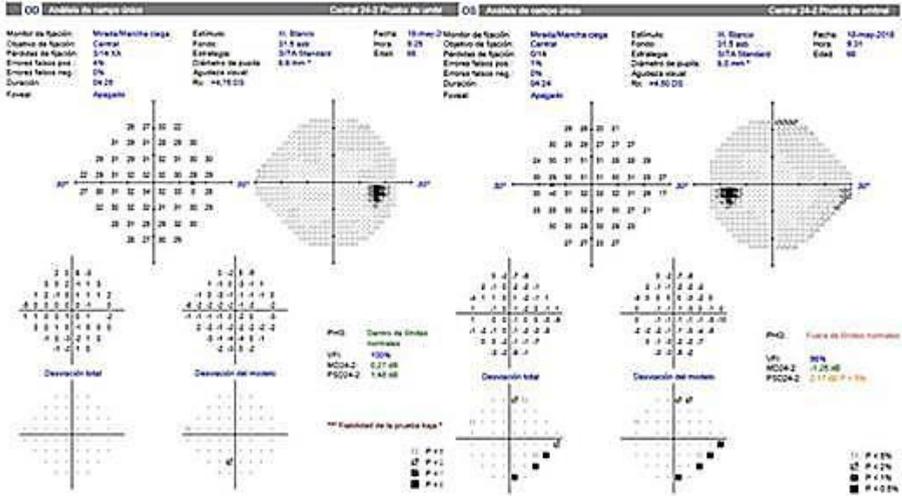


Fig. 29.A CV normal en paciente con HTO.

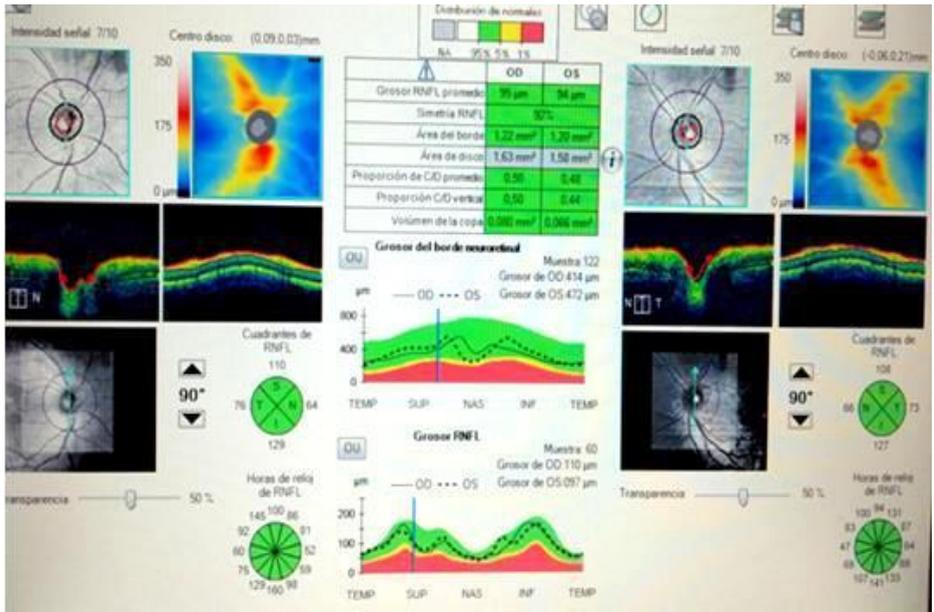


Fig. 29B. OCT papilar normal en paciente con HTO.

En los datos oftalmológicos del GPPA, se objetivaron en las pruebas un aumento de la excavación papilar en la funduscopia, daño en CV y en las fibras nerviosas en el examen OCT.

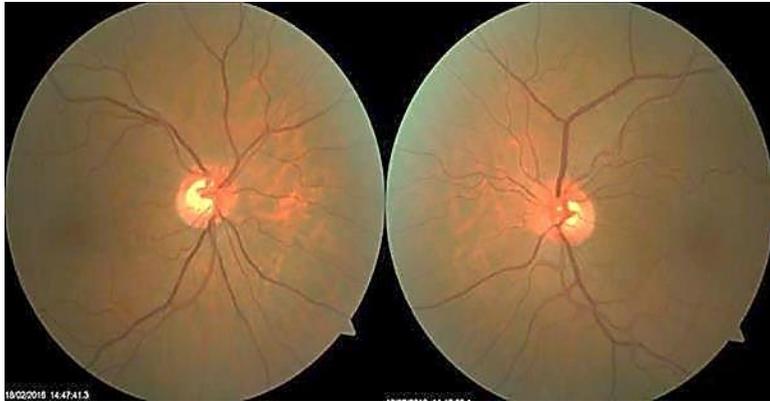


Fig. 30. Fondo de ojo en GPPA. Apréciase el aumento de excavación papilar, más claro en la imagen del ojo derecho (a la izquierda), donde llega a ocupar 5/10 de la papila.

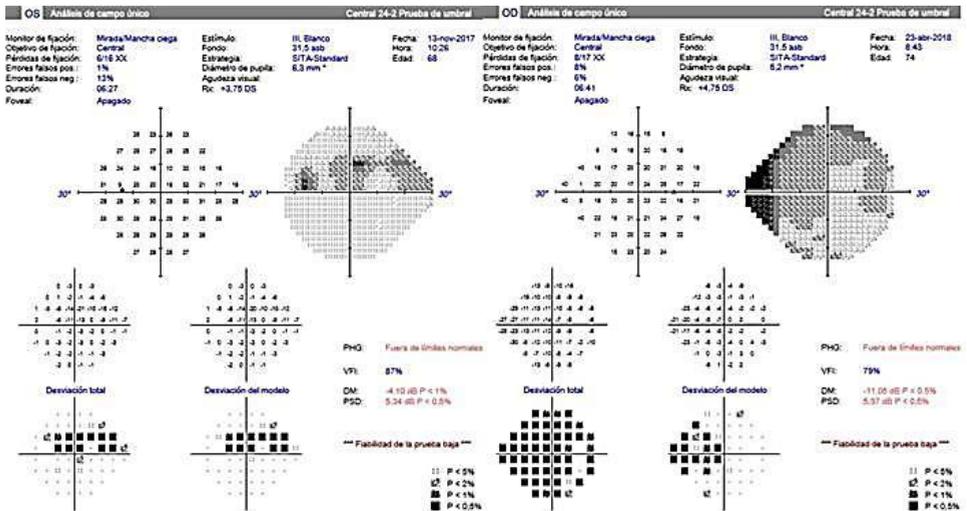


Fig. 31A. CV patológico en paciente con GPPA.

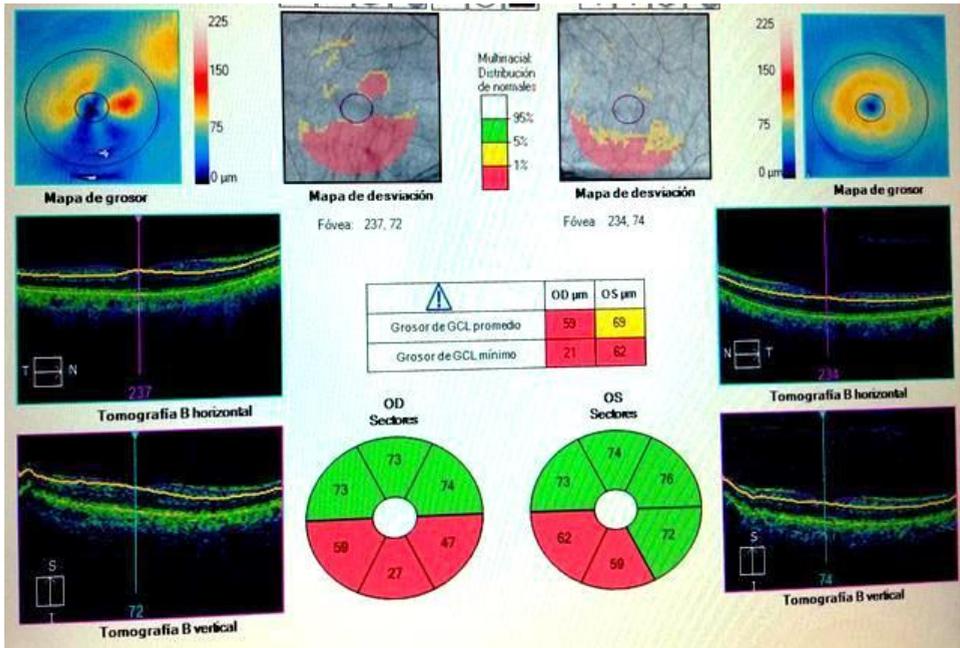


Fig. 31B. Mapa de células ganglionares patológica en paciente con GPAA.

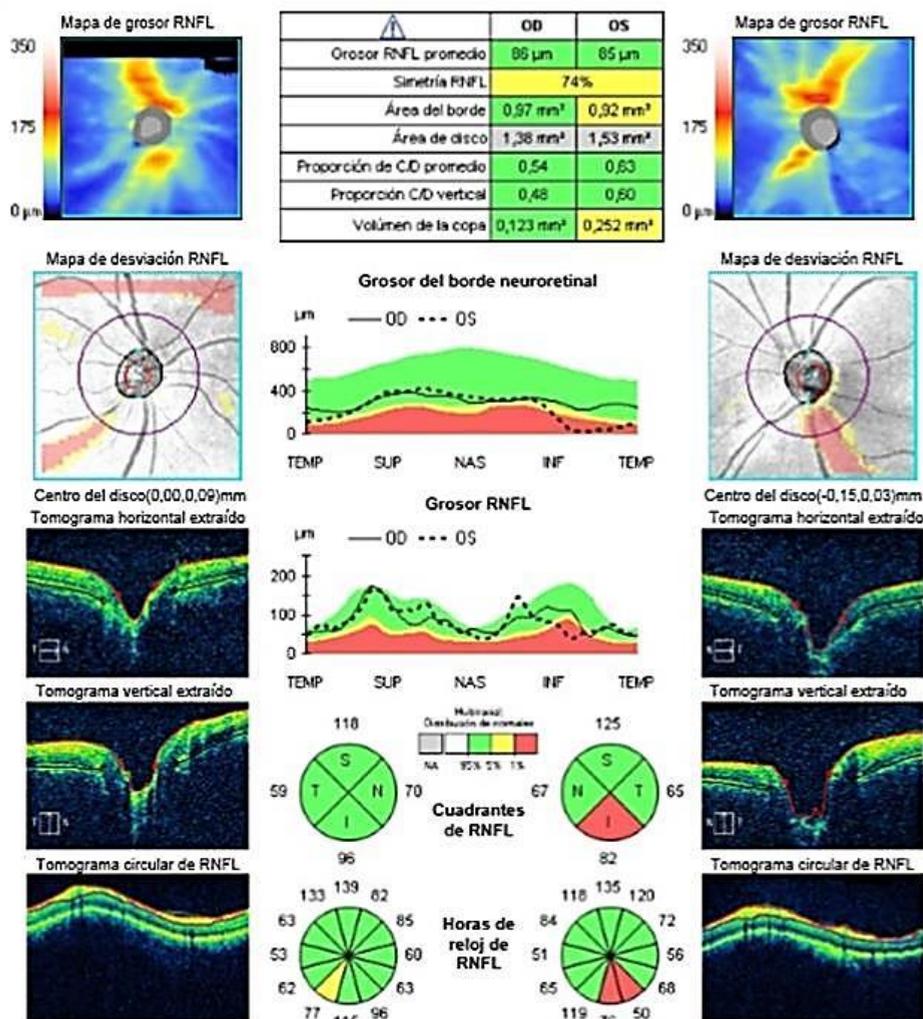


Fig. 32. OCT papilar en paciente con GPA.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros oftalmológicos de ambos grupos de estudio.

Tabla 6. Parámetros oftalmológicos

		GPAA	HTO	p
AV (decimal)	OD	0.86 ± 0.04	0.91 ± 0.03	0.340
	OI	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.04	0.696
PIO	OD	15.81 ± 0.57	18.22 ± 0.86	0.022*
	OI	16.19 ± 0.63	18.11 ± 0.81	0.067
E/P	OD	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.885
	OI	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.779
PAQUIMETRÍA	OD	537.24 ± 6.09	550.44 ± 8.37	0.202
	OI	536.48 ± 7.43	544.39 ± 8.09	0.111
CV PSD	OD	1.88 ± 0.14	1.30 ± 0.16	0.010*
	OI	2.66 ± 0.55	1.36 ± 0.15	0.039*
CV VFI	OD	91.60 ± 2.45	92.56 ± 1.23	0.741
	OI	89.55 ± 2.47	91.89 ± 1.51	0.444
CV DM	OD	-0.84 ± 0.85	1.21 ± 0.43	0.048*
	OI	-0.25 ± 1.18	0.74 ± 0.45	0.451
OCT excavación papilar	OD	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.920
	OI	0.66 ± 0.06	0.58 ± 0.04	0.290
OCT grosor fibrilar	OD	84.27 ± 4.69	88.89 ± 2.68	0.418
	OI	85.14 ± 3.02	88.33 ± 2.38	0.423
OCT área del borde	OD	1.31 ± 0.07	1.12 ± 0.06	0.033*
	OI	7.86 ± 4.57	1.10 ± 0.05	0.180
Nº células ganglionares	OD	68.20 ± 2.58	77.06 ± 2.50	0.021*
	OI	69.70 ± 3.14	78.72 ± 2.08	0.028*

GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto; HTO: hipertensión ocular; AV: agudeza visual, PIO: presión intraocular; E/P: excavación papilar; CV PSD: desviación estándar del patrón en el campo visual; CV VFI: índice del campo visual; CV DM: desviación media en el campo visual; OCT: tomografía de coherencia óptica; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo.

Los datos representan la media ± error estándar. * Diferencias estadísticamente significativas, (p<0.05)

En cuanto a los parámetros oftalmológicos, y a pesar de no existir diferencias significativas entre los grupos, la media de la agudeza visual, es ligeramente inferior en el caso de los GPAA, en ambos ojos (tabla 6). Cuando analizamos la PIO, encontramos que los HTO presentan mayores valores, siendo la diferencia estadísticamente significativa en los valores del ojo derecho, quizá esto pueda deberse al número distinto de principios activos con los que están tratados los pacientes de ambos grupos, ya que presentan menos número de principios activos los HTO al no buscar PIOs tan bajas en su tratamiento. Los GPAA mayoritariamente están tratados con un mayor número de principios en los colirios (2.0 ± 0.2) que los HTO (0.94 ± 0.19) siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p). Y en el contexto de la excavación papilar, no existen diferencias significativas entre los grupos. Lo mismo ocurre con la paquimetría. (Ver tabla 6)

Tabla 7. Resultados PIO

		GPAA	HTO	p
PIO	OD	15.81 ± 0.57	18.22 ± 0.86	0.022*
	OI	16.19 ± 0.63	18.11 ± 0.81	0.067

GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto; HTO: hipertensión ocular; PIO: presión intraocular; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo

* Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Sin embargo, encontramos diferencias significativas en la exploración del campo visual PSD. Los HTO presentan valores significativamente inferiores, en ambos ojos, al compararlos con los GPAA: OD: 1.30 ± 0.16 vs 1.88 ± 0.14 y OI: 1.36 ± 0.15 vs 2.66 ± 0.55 respectivamente (HTO vs GPAA).

Los parámetros obtenidos de la OCT, excavación, grosor fibrilar y área del borde, no muestran diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos ojos comparando GPAA vs HTO, exceptuando el área del borde del ojo derecho, tanto comparando todos los individuos como únicamente las mujeres. Finalmente, si existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células ganglionares en ambos ojos, al comparar GPAA con HTO (tabla 8).

Tabla 8. Número de células ganglionares

		GPAA	HTO	p
Nº Células ganglionares	OD	68.20 ± 2.58	77.06 ± 2.50	0.021*
	OI	69.70 ± 3.14	78.72 ± 2.08	0.028*

GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto; HTO: hipertensión ocular; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

3. DATOS MOLECULARES. LOS miRNAs

En lo que al análisis de los datos moleculares, obtenidos del procesamiento de las muestras de lágrimas de los participantes en el estudio, se han identificado 120 microRNAs en el procesamiento del total de muestras. En primer lugar procedimos a clasificar los dos grupos de estudio (GPAA y HTO) según los miRNAs identificados.

Como puede observarse en las figuras 33 y 34, se aprecia la diferencia tras la normalización de los datos.

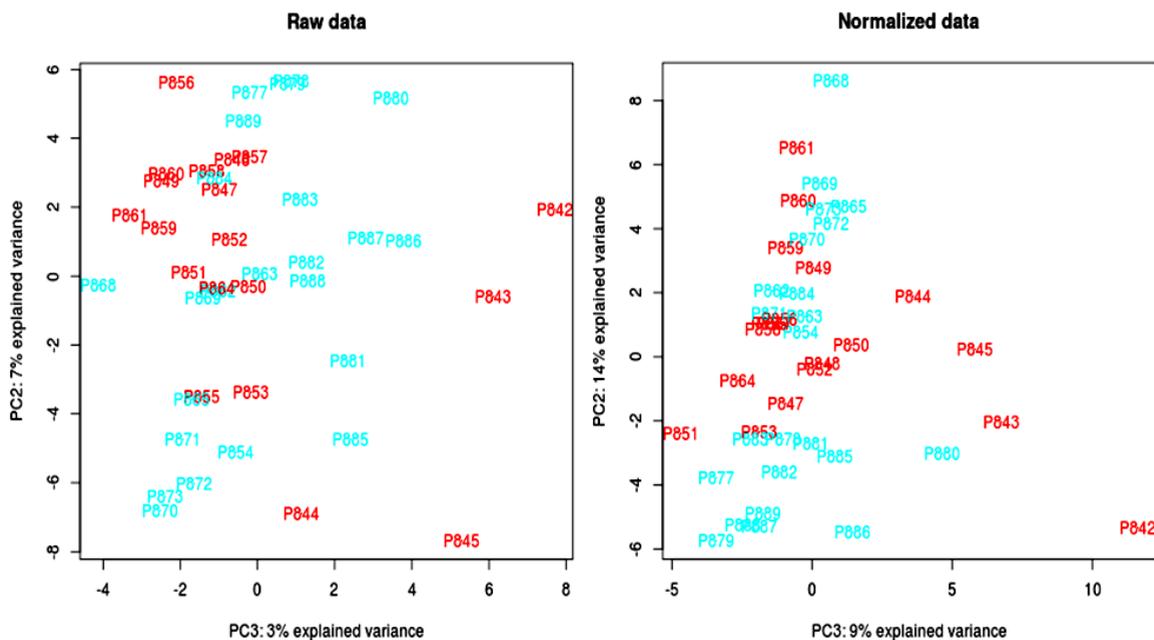
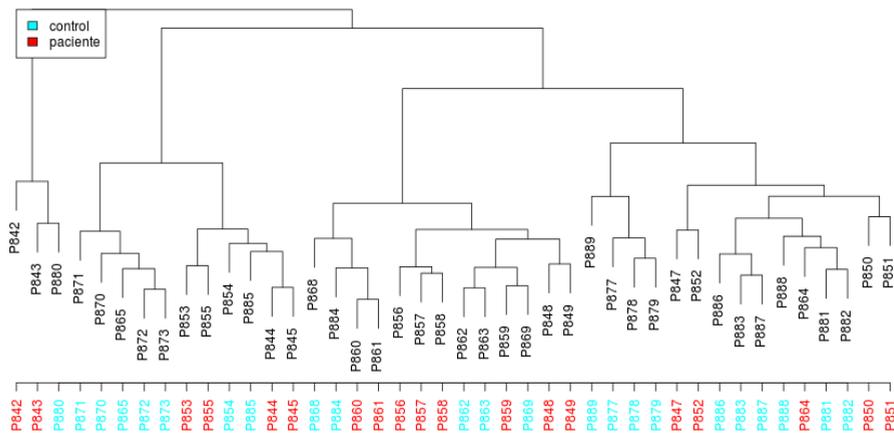


Fig. 33. Gráficas del análisis de componentes principales tras la normalización. Las muestras en rojo corresponden a pacientes con GPAA. Las muestras en azul corresponden a pacientes con HTO.

Correlation distance (Normalized data)



Euclidean distance (Normalized data)

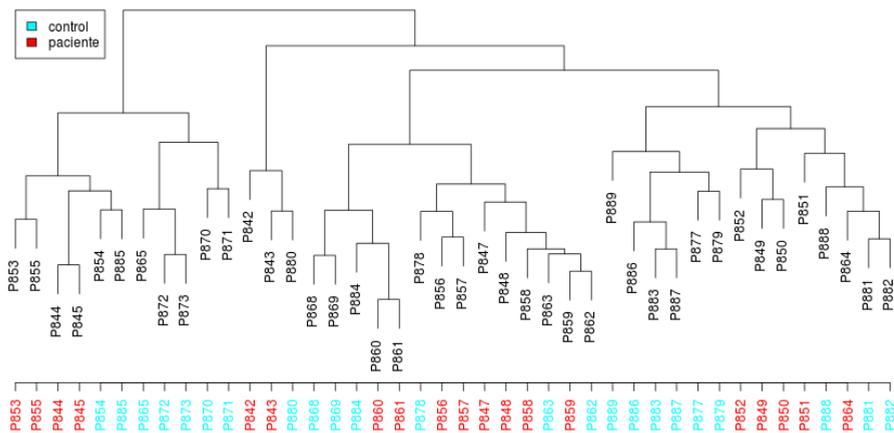


Fig. 34. Gráficos de clúster. El superior realizado mediante la distancia de correlación. El inferior mediante la distancia euclídea. Las muestras de GPAA se representan en rojo, las de HTO en azul.

Posteriormente realizamos el análisis de la expresión diferencial de los miRNAs entre grupos. De los miRNAs identificados, 8 mostraron diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$), 6 regulados positivamente y 2 negativamente (ver tabla 9). La mayoría están implicados en procesos posttranscripcionales de glicosilación protéica (adición de un carbohidrato a la proteína).

Tabla 9. Número de miRNAs identificados

	down-regulados (n)	Sin diferencias (n)	up-regulados (n)
GPAA vs HTO	2	87	6

GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto; HTO: hipertensión ocular

Estos 8 miRNAs que muestran diferencias significativas están implicados en numerosos procesos biológicos, afectando numerosas cascadas metabólicas y procesos tanto fisiológicos como patológicos. Como hemos destacado anteriormente, la mayoría de ellos están implicados en procesos de glicosilación protéica, pero también en otros procesos biológicos, lo que fue comprobado tras análisis de ontología génica de procesos biológicos. A continuación se expone una gráfica de algunos de los procesos biológicos en los que se ven implicados de manera significativa estos 8 miRNAs aislados. (Figura 35).

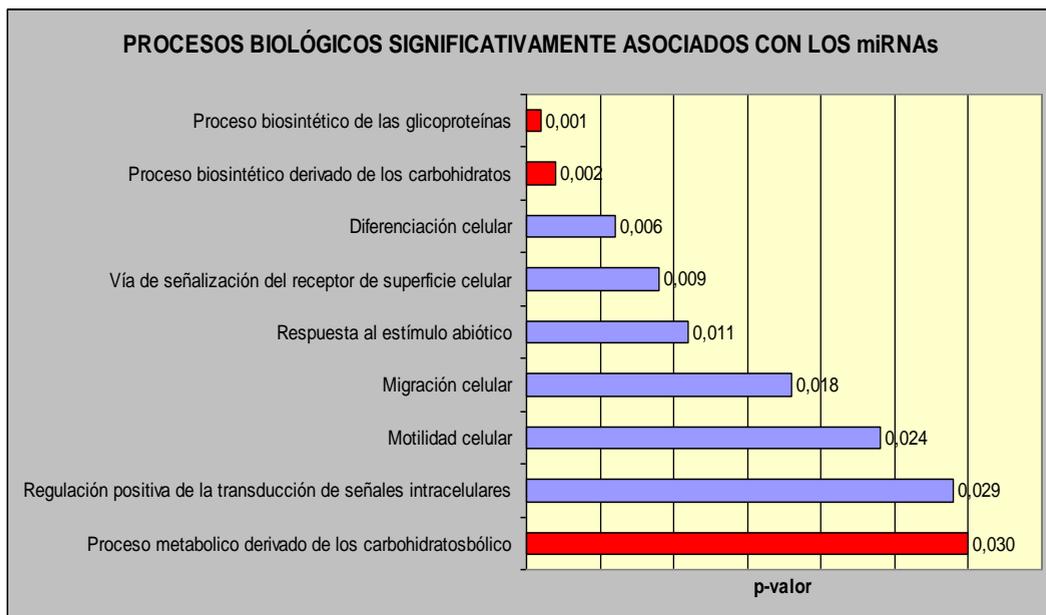


Figura 35. Procesos biológicos fundamentales en los que se ven implicados los miRNAs aislados

El siguiente paso fue realizar las curvas ROC con estos 8 miRNAs, con el objetivo de comprobar si alguno de ellos podría ser usado como predictor del GPAA. En este sentido, un AUC de 0.60-0.70 corresponde a predictores aceptables, un AUC de 0.70-0.80 corresponde a predictores buenos, y un AUC superior a 0.80 corresponde a predictores muy buenos. Como puede verse en la tabla 10, 3 de los 8 miRNAs identificados pueden ser considerados como predictores aceptables del GPAA, 4 predictores buenos, y 1 predictor muy bueno.

Tabla 10. Área bajo la curva de cada miRNA obtenida a partir de las curvas ROC

ID	AUC
hsa-mir-27a-3p	0.681922196796339
hsa-mir-152-3p	0.757437070938215
hsa-mir-26b-5p	0.816933638443936
hsa-mir-125b-2-5p	0.672768878718536
hsa-mir-224-5p	0.720823798627002
hsa-mir-30e-5p	0.762013729977117
hsa-mir-151a-3p	0.759725400457666
hsa-mir-1307-3p	0.695652173913043

ID: identificador del miRNA; AUC: área bajo la curva, obtenida de las curva ROC correspondiente

Por último, volvimos a realizar un análisis de componentes principales (principal component analysis: PCA) para clasificar los 2 grupos de estudio según únicamente los 8 miRNA que presentaron un perfil de expresión significativamente diferente.

Como se observa en la figura 36, esta vez conseguimos una mejor separación de ambos grupos, lo que nos hace pensar que estos miRNAs podrían desempeñar alguna función que determinase el paso de tensión ocular elevada a la neuropatía óptica glaucomatosa y, por tanto, sugerimos que podrían utilizarse como predictores de GPAA, en sujetos con HTO.

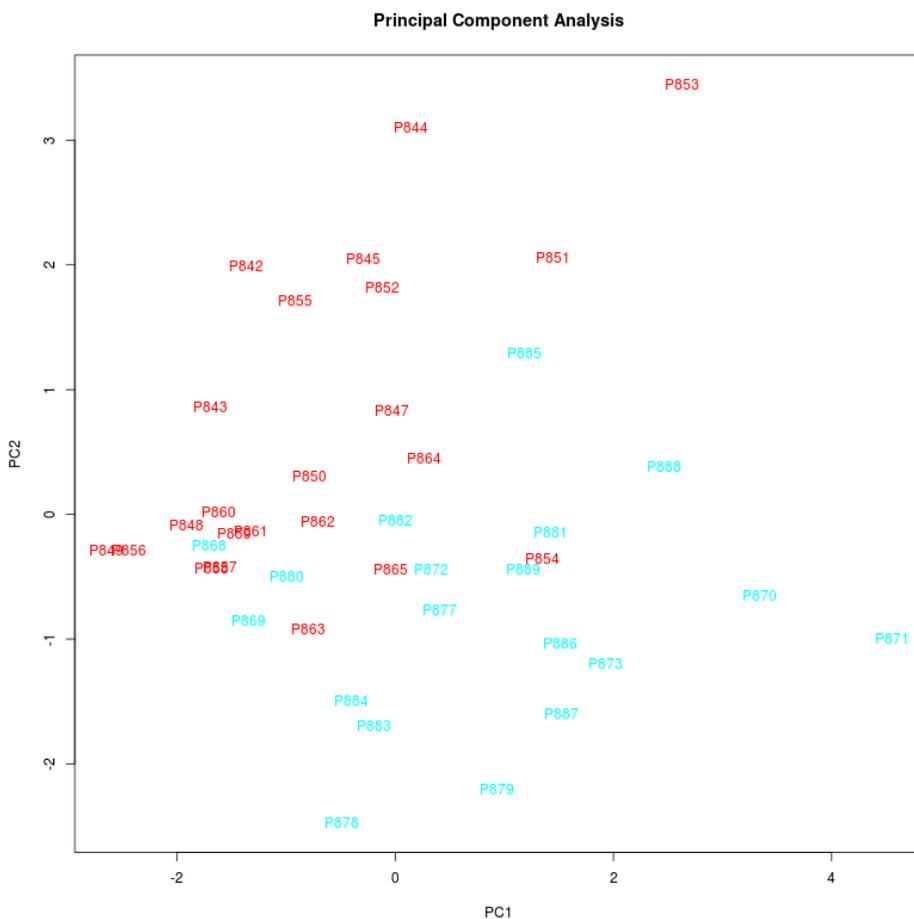


Fig. 36. Gráficas del análisis de componentes principales de los 8 miRNAs con perfil de expresión significativa. Las muestras en rojo corresponden a pacientes con GPA. Las muestras en azul corresponden a pacientes con HTO.

DISCUSIÓN

En la última década, los miRNAs han despertado un interés especial en biología molecular, y de forma muy particular en biomedicina.

La transmisión del código genético es un proceso estrictamente regulado¹¹³⁻¹¹⁴. Las biomoléculas presentes en la célula, principalmente proteínas y ácidos ribonucleicos, se encargan de ejecutar dicha regulación, que variará en función del momento fisiológico del individuo, las características medioambientales, el tejido al cual pertenezca la célula en cuestión, o si existe una patología, como en el caso del GL,

Existen distintos tipos de moléculas de RNA. El RNA mensajero (mRNA) es aquel que se genera como copia de la información contenida en los genes (DNA) gracias al proceso de transcripción. Tras unas modificaciones dará lugar a un mRNA maduro, que contiene las instrucciones para la síntesis de una proteína merced a la traducción realizada por los ribosomas. En dicho proceso intervienen también otros dos tipos de RNA: el RNA ribosómico (rRNA), que colabora en la estructura y funcionalidad de los ribosomas, y el RNA de transferencia (tRNA), que se encarga de añadir las unidades estructurales de la proteína “leyendo”, según

el código genético, la secuencia indicada en el propio mRNA.^{113-114,118}

Los miRNAs constituyen una clase de pequeños RNAs no codificantes que tienen funciones importantes en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, por unión de bases con su RNA mensajero diana^{123-125,128}.

En la última fase del siglo XX se caracterizaron las primeras moléculas de miRNA, aunque fue durante la primera década del milenio cuando se comenzó a identificar su función. Los miRNAs maduros se producen a partir de un precursor de mayor tamaño (pri y pre-miRNA) que se encuentra codificado en el genoma y regulan determinados genes diana mediante la unión a regiones complementarias de mRNA. Este acoplamiento suele tener como resultado un aumento de la tasa de degradación del mRNA o una inhibición de la traducción. El resultado, en ambos casos, es una disminución de la expresión del gen codificado en el mRNA diana.

Por su función de reguladores de la expresión génica, cada vez deparan mayor interés, para la caracterización de ciertas patologías originadas por alteraciones genéticas, como en las enfermedades oculares, y su posible aplicación como marcadores moleculares de pronóstico y monitorización de la respuesta a tratamientos.

Ha sido en estos últimos años, cuando han surgido muchos investigadores que han analizado tanto la biogénesis de los

miRNAs^{123-125,128}, como los mecanismos y procesos que los implican en la expresión génica^(122,127) y su relación con diversas enfermedades, entre ellas el GL¹²⁹⁻¹³³.

Los datos sociodemográficos obtenidos, las características de los participantes y sus hábitos de vida son similares a otros estudios en la misma línea de interés^{19-20,34-36,43} y a los estudios ya publicados de nuestro grupo investigador^{29-31,100-101,111,134,135,147-150}.

La edad de los participantes fue bastante similar entre grupos (64.5 ± 1.4 en el grupo GPPA y 61.1 ± 2.4 en el grupo HTO). No encontramos diferencias en razón de género (GPAA: 47'61% hombres y 52'38% mujeres; HTO: 33'33% hombres y 66.66% mujeres).

No hay autores que relacionen la edad en estos dos procesos con la expresión diferencial de miRNAs. Por eso, nos planteamos si el perfil de expresión de los miRNAs en las lágrimas de los pacientes con HTO y con GL puede relacionarse con los datos sociodemográficos obtenidos de los participantes en el estudio, interesándonos especialmente los antecedentes familiares de la enfermedad, ciertas características de los pacientes y la duración del proceso. Para ello, los datos que procesamos fueron la talla y el peso corporal para hallar el IMC (Índice de masa corporal), el hábito tabáquico y sus características así como el hábito alcohólico. Finalmente también registramos si el paciente realizaba ejercicio físico reglado y las características del mismo. No hemos apreciado diferencias significativas entre ambos grupos de estudio

en ninguna de estos parámetros. Sin embargo, otros autores han demostrado diferencias de expresión de miRNAs en relación a algunos de los parámetros citados en nuestro estudio, tales como los hábitos tabáquico y alcohólico, el IMC, el ejercicio físico, la duración y tipo de glaucoma.¹⁵⁵⁻¹⁵⁹

Otro punto importante dentro de la definición operativa de nuestro estudio fue analizar si los hallazgos del examen oftalmológico eran diferentes entre grupos y si se relacionaban con la expresión de los miRNAs en muestras de lágrimas. En este sentido, Liu et al.,¹⁶⁰ han descrito la expresión de miRNAs en humor acuoso de pacientes con varios grados de evolución del glaucoma mediante el examen del CV. Compararon los resultados de la NGS de 19 humores acuosos de GPAA y 17 de pacientes operados de cataratas, y los datos demostraron la expresión diferencial de los miRNAs, que se relacionó como predictor de la alteración post transcripcional del metabolismo regulador de la tiamina, y de la purina.

Nuestros pacientes con GPAA mostraron cambios en todas las pruebas, como era de esperar, cuando se compararon con los datos de las mismas exploraciones llevadas a cabo en sujetos con HTO. En este sentido, el aumento de la excavación papilar en la funduscopia, la reducción del espesor de la capa de FNO, en la OCT y/o afectación del CV fue el hallazgo habitual en el grupo GPAA.

Las cifras de PIO fueron distintas en ambos grupos, mostrando valores superiores en el grupo con HTO que en los

pacientes con GPAA. Hemos reflexionado sobre este hecho, y pensamos que las cifras de PIO más bajas en los glaucomatosos son el resultado del tratamiento médico prescrito, ya que éstos pacientes precisan alcanzar una PIO diana más baja y mantenerla en el tiempo, por el riesgo de progresión de la neuropatía óptica, como indican los estudios poblacionales^{18,52,56-57,71,75}. Generalmente, los sujetos con HTO no llevaban tratamiento, y si lo tenían, éstos contabilizaban menor número de principios activos en los colirios hipotensores (0.94 ± 0.19) que los pacientes con GPAA (2.0 ± 0.2).

Por otra parte, ni los datos del espesor corneal central ni la E/P presentaron diferencias significativas entre grupos, al contrario de lo que cabría esperar. Sin embargo, encontramos diferencias significativas en la exploración del campo visual PSD, ya que en los sujetos con HTO existían valores significativamente inferiores, en ambos ojos, al compararlos con los pacientes del grupo GPAA: OD: 1.30 ± 0.16 vs 1.88 ± 0.14 y OI: 1.36 ± 0.15 vs 2.66 ± 0.55 respectivamente (HTO vs GPAA)

No obtuvimos tampoco diferencias significativas entre los parámetros obtenidos del examen OCT (excavación papilar, grosor fibrilar y área del borde papilar) para ningún ojo, comparando los pacientes con GPAA vs sujetos con HTO.

El único parámetro que demostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos fue la densidad de CGR en ambos ojos (68.20 ± 2.58 en GPAA vs 77.06 ± 2.50 en HTO; $p=0.02$)

1*), siendo menor en el grupo de glaucomatosos, lo que es el exponente de la pérdida de CGR por apoptosis en el curso del GPAA, principal mecanismo patogénico, ampliamente reportado en la literatura científica^{20,23-24}.

Respecto a la duración del proceso, los datos mostraron que fue de 11.7 ± 2.2 años en los pacientes del GPAA, en comparación con los 7.4 ± 2.0 años de los sujetos con HTO. La duración del GL es uno de los factores más importantes a considerar en el proceso de progresión, y aunque en nuestros participantes la media de duración de cualquiera de los procesos era distinta, es obvio que los sujetos con HTO no presentaban daño perimétrico ni disminución de la densidad de CGR, por lo que no se han podido comparar estos datos entre los dos grupos de estudio¹⁶¹⁻¹⁶².

Como hemos comentado anteriormente, la reducción en la PIO tiene un efecto positivo sobre el retraso en la instauración de la progresión glaucomatosa^{18,52,56-57,71,75}. En este contexto, es interesante el estudio de McMonnies¹⁶³ en el que 183 pacientes australianos con diagnóstico de sospecha de GL fueron examinados para evaluar su PIO, mostrando una amplia gama de fluctuaciones, con picos de elevación sorprendentes en intensidad y duración, concluyendo que estos individuos tienen mayor riesgo de progresar a GL, que los que presentan menor variación en la PIO.

El principal objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido estudiar el perfil diferencial de expresión de miRNAs en lágrimas de sujetos con HTO y pacientes con GPAA en estadio inicial.

En este sentido hemos de recordar que los miRNAs se posicionan como nuevos biomarcadores de gran interés en biomedicina, ya que se ha demostrado que son resistentes a la actividad ARNasa en sangre periférica, lo que les confiere una elevada estabilidad tanto en suero como en plasma¹⁶⁴. Nuestros resultados previos^{4,134-135,145-150} y los de este trabajo demuestran que también lo son en las lágrimas, lo que es un dato a tener en cuenta. Por otro lado, los miRNAs son reproducibles y tienen una elevada especificidad tisular inter-individual¹⁶⁵, lo que refuerza los resultados obtenidos por nosotros en el presente estudio.

El procesamiento de las muestras de lágrimas de ambos grupos de participantes ha sido satisfactorio, confirmando la utilidad de las mismas como muestras biológicas para estudios moleculares y genéticos en oftalmología, y nos ha aportado datos fundamentales para el estudio. Hemos identificado un total de 120 miRNAs en las lágrimas de todos nuestros participantes, independientemente del grupo al que pertenecieran.

De ellos, 8 miRNAs mostraban una expresión diferencial en las lágrimas de pacientes con HTO y de pacientes con GL, mediante secuenciación de próxima generación. Junto a otros autores¹³⁰⁻¹³², pensamos que esas diferencias en la expresión de miRNAs pueden definir a nivel molecular la interfase entre la HTO y la instauración del daño glaucomatoso. De hecho, Molasi et al.,¹⁴⁸, describen que la neuropatía óptica glaucomatosa asociada con cambios en el perfil de los miRNAs sugiere que éstos deben desempeñar una función principal en la neurodegeneración bien inhibiendo o favoreciendo vías moleculares aún desconocidas, implicadas en la lesión y muerte neuronal. En el caso de aportar conocimientos en este contexto, se pueden abrir nuevas perspectivas al diagnóstico preclínico del glaucoma.

Los datos del presente estudio, mediante análisis bioinformático exhaustivo de la expresión de los miRNAs entre los dos grupos de estudio, demostraron la presencia de 8 miRNAs con diferencias significativas ($p < 0,05$). De ellos, 6 estaban regulados positivamente y 2 negativamente (para completar esta información se puede consultar la tabla 9 de la sección de resultados). A partir de estos datos, el análisis pormenorizado demostró que la mayoría de estos miRNAs están implicados en procesos post-transcripcionales de glicosilación protéica (adición de un carbohidrato a la proteína) aunque otros estaban implicados en la regulación del crecimiento, envejecimiento celular, y diferentes vías de señalización.

Como hemos explicado, entre las características funcionales de los miRNAs que presentaban mayor poder significativo en la comparación de los grupos, la glicosilación de proteínas ha sido una de las más frecuentes. Hace más de un siglo que se describieron las características de la conjugación de carbohidratos a proteínas¹⁶⁶, y desde entonces múltiples descripciones sugieren que las glicoproteínas no están restringidas al suero, a la matriz extracelular, a la superficie celular o al sistema endomembrana¹⁶⁷. Los estudios demostraron que esta modificación proteica se encontraba en miles de proteínas que regulan los procesos celulares como agregación de proteínas, localización posttraslacional de las modificaciones, actividad e interacciones de las mismas. Es muy interesante el proceso de glicosilación proteica y su aplicación a nivel celular¹⁶⁷. El proceso que define la biogénesis de la glicosilación es claramente la formación de la unión de los azúcares a las proteínas, lo que en muchas circunstancias determina la naturaleza y funciones de las proteínas resultantes. Abundando en este tema, se ha descrito recientemente que los azúcares de las glicoproteínas, glicolípidos y glicosaminoglicanos constituyen “el glicoma” y los genes implicados en su biosíntesis, degradación, transporte y reconocimientos son denominados “los glicogenes”. La extrema complejidad del glicoma dificulta el conocimiento de muchas de las funciones que realiza y por lo tanto es un campo abierto a la investigación, ya que la glicosilación aberrante está relacionada con el cáncer, entre otras enfermedades¹⁶⁸.

Posiblemente aquí esté la que estábamos buscando, para poder aplicar los miRNAs al diagnóstico diferencial del proceso de HTO, de la neuropatía óptica glaucomatosa.

Apoyando nuestros resultados, varios autores han descrito miRNAs implicados en diferentes procesos en relación al GPAA¹⁷⁰⁻¹⁷⁵, sobresaliendo aquellos implicados en estrés oxidativo, disfunción de la malla trabecular, fallo de la cirugía filtrante, efectividad del tratamiento hipotensor, etc. Sin embargo, no se han efectuado estudios para obtener el perfil diferencial entre pacientes con GPAA y sujetos con HTO. En nuestro estudio hemos podido identificar 8 miRNAs que se expresaron de forma distinta en los pacientes con GPAA y sujetos con HTO. Pero aunque pensamos que estos 8 miRNAs son los que podrían estar implicados en el riesgo de progresar a GPAA desde la HTO, no hemos podido establecer una relación directa entre ambos procesos.

Por otra parte, Además, se sabe que los niveles de expresión de varios miRNAs varían con el envejecimiento., lo que aún los relaciona más con las enfermedades oculares ligadas a la edad, como en el GPAA¹⁷⁶. También se ha publicado que un miRNA específico puede tener un efecto positivo y negativo en una misma célula y que ello depende de su estado de diferenciación¹⁷⁶.

. Además, la cuantificación de los miRNAs ya es un hecho, y por ello algunos de ellos se están empleando como biomarcadores en el diagnóstico y progresión de diversas enfermedades, incluidas

las oculares, entre las que se encuentran el GL y la retinopatía diabética¹⁷⁷⁻¹⁷⁸.

Entre las limitaciones del estudio debemos incluir en primer lugar el tamaño muestral. Pese a haber realizado un estudio para optimizar el número de participantes necesario para alcanzar potencia estadística suficiente con nuestros resultados, es cierto que la muestra es pequeña. En parte, hay que considerar el coste de las pruebas realizadas en este trabajo, lo que en sí es ya un factor limitante de las muestras. No obstante, en futuros estudios se aumentará el número de participantes, para mejorar la viabilidad de los resultados, siempre que las condiciones de financiación así lo permitan. Por otra parte, la presencia de los miRNAs en las lágrimas que mostraron mayor significación estadística entre los sujetos con HTO y los pacientes con GPAA se debería validar aprovechando los estudios con mayor tamaño muestral y la reproducibilidad de los mismos por otros investigadores. Y finalmente, la utilización de lágrimas de pacientes con GPAA que se instilan diariamente los tratamientos hipotensores, que a pesar de conocer el/los principios activos y excipientes, y la proporción de los mismos en la presentación –monoterapia/asociaciones- (como queda reflejado en esta misma sección), también precisa estudios estadísticos adicionales, para valorar la posible influencia de estos tratamientos, tanto del principio activo, como de los excipientes, en la composición de las lágrimas y por tanto en los resultados finales.

En resumen, hemos identificado 8 miRNAs que se expresan diferencialmente y de forma estadísticamente significativa en las

muestras de lágrimas de los sujetos con HTO y de los pacientes con GPAA en estadio inicial. No obstante, y pese a los resultados obtenidos que potencialmente pueden ser muy valorables, se necesitan más estudios, en muestras mayores, para poder avanzar en este interesante punto del diagnóstico molecular que favorecería la identificación precoz de los individuos más susceptibles a progresar hacia la neuropatía óptica glaucomatosa en la interfase entre HTO y GPAA, incidiendo en la necesidad de validar los resultados obtenidos en el transcurso del presente estudio.

CONSIDERACIONES FINALES

En la práctica clínica, nos encontramos en más de una ocasión, casos que nos plantean dudas diagnósticas, y a falta de una batería de pruebas que nos permitan clasificar con toda seguridad al paciente como “glaucomatoso” o “no glaucomatoso”, nos vemos en la necesidad de revisar a esos pacientes de forma continuada. Esto lo hacemos para poder detectar cualquier daño en el nervio óptico y así comenzar el tratamiento, para evitar la progresión y la pérdida de la visión. Sin embargo, esto repercute en las continuas visitas médicas y las prescripciones de colirios hipotensores, que incrementan las listas de espera y sobrecargan el gasto sanitario.

Como hemos comentado, otra alternativa ante esta situación de HTO, es seguir el criterio propio, y para evitar dejar el caso al azar, iniciar tratamiento antiglaucomatoso en aquellos pacientes con PIOs elevadas y dudosas pruebas, que no pueden confirmar de forma fidedigna que no se está desarrollando una neuropatía óptica glaucomatosa. En estas situaciones, nos basamos en las cifras de la paquimetría corneal, iniciando tratamiento si esta se encuentra en niveles bajos y optando por revisiones estrechas sin tratamiento cuando tenemos paquimetrías elevadas.

Es precisamente en este tipo de casos, donde las moléculas que hemos estudiado, los miRNAs, podrían usarse como

coadyuvantes del diagnóstico, ayudándonos a elegir una opción u otra: iniciar el tratamiento médico o la actitud expectante, dependiendo de la expresión de miRNAs específicos en unos u otros individuos.

Como hemos comentado anteriormente, los miRNAs podrían ser útiles a la hora del diagnóstico, y también ayudar a establecer un pronóstico individual de la evolución del GL. Es sabido que ciertos tipos de GL, como los pigmentarios o los pseudoexfoliativos tienen peor pronóstico que los GPAA, precisando de colirios hipotensores con asociación de principios activos frente a las monoterapias, y con una tendencia a mal control, precisando de cirugía antiglaucomatosa más frecuentemente que en los otros tipos.

El GL es una patología que causa temor a los pacientes, cuando se les diagnostica en la consulta, y el mayor es la posible pérdida visual o la necesidad de cirugía. Surge la ansiedad y la necesidad de saber si su patología va a evolucionar bien o no, si va a precisar de muchos fármacos, si va a perder o no visión, y la necesidad o no futura de cirugía, entre otros

Cualquier avance en el conocimiento del GL que suponga aportar una nueva estrategia para los pacientes tendrá un fuerte impacto en la sociedad. Quizá con los miRNAs pudiéramos informar satisfactoriamente al paciente y de forma más precisa de su pronóstico. No olvidemos que nuestra labor no solo debe de limitarse a diagnosticar y tratar enfermedades. Somos médicos y

ante una enfermedad debemos de usar todas las armas que tenemos a nuestro alcance para informar bien al paciente y poder darle la información más completa de la que podamos disponer.

Hay que continuar investigando, ya que los miRNAs ofrecen una alternativa al diagnóstico clínico, dotándolo de un refuerzo molecular, por el que no sólo se optimizaría el diagnóstico y el pronóstico sino también podría ser la base de nuevas bioterapias para el GL.

Desde nuestro punto de vista, esta posibilidad es un hecho apasionante. El tratamiento del GL siempre ha ido enfocado a disminuir el único factor conocido modificable, la PIO. Se han ensayado y siguen investigándose tratamientos neuroprotectores y neuro-regeneradores, hasta ahora sin resultados. Sin embargo, con esta vía molecular de los RNA interferentes, se abre la posibilidad de encontrar nuevas formas de tratamiento para los pacientes glaucomatosos.

Por nuestra parte, continuaremos trabajando en esta línea de investigación con la esperanza de mejorar el conocimiento de los mecanismos patogénicos del GL y aplicar nuestros resultados a la práctica oftalmológica diaria, para beneficio de nuestros pacientes.

CONCLUSIONES

1) Las lágrimas han resultado ser una muestra biológica útil para extraer el RNA de interferencia y, a partir de él, los miRNAs, obteniendo un perfil diferencial de expresión de éstos últimos entre los hipertensos oculares y los pacientes con glaucoma

2) Los miRNAs han demostrado una elevada estabilidad en las lágrimas, y muestran una fuerte especificidad inter-individual, lo que refuerza su validez para los objetivos del presente estudio: utilizarlos para el diagnóstico molecular de la hipertension ocular y del glaucoma..

3) Entre los miRNAs identificados en las lágrimas de los participantes, los de mayor significación estadística diferencial son los siguientes:

- hsa-mir-27a-3p
- hsa-mir-152-3p
- hsa-mir-26b-5p
- hsa-mir-125b-2-5p
- hsa-mir-224-5p
- hsa-mir-30e-5p
- hsa-mir-151a-3p
- hsa-mir-1307-3p

4) Entre los miRNAs implicados con mayor potencia estadística en el perfil diferencial entre hipertensos oculares y glaucomatosos son más numerosos aquellos relacionados con procesos de glicosilación, por lo que sugerimos que la determinación analítica del parámetro glicosilación proteica sería un interesante y nuevo marcador para identificar los pacientes hipertensos en riesgo de desarrollar glaucoma.

5) Los miRNAs 27a-3p, 152-3p, 26b-5p, 125b-2-5p, 224-5p, 30e-5p, 151a-3p y 1307-3p, que se expresan en la interfase HTO/Glaucoma son potenciales efectores de nuevas terapias, como el silenciamiento génico, aplicables a los pacientes con HTO, para impedir que progresen hacia la instauración de la neuropatía óptica glaucomatosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prum BE, Rosenberg LF, Gedde SJ, Mansberger SL, Stein JD, Moroi SE, Herndon LW, Lim MC, Williams RD, by the American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Pattern Glaucoma Panel. Primary Open-Angle Glaucoma PPP. AAO. 2015. <https://www.aaopt.org/preferred-practice-pattern/primary-open-angle-glaucoma-ppp-2015>
2. Diccionario de la Lengua Española. 21 ed. española RAE. 2001.
3. Vorläufige Nothüber des wesen des glaucoms. Archives Ophthalmology. 1854;1:371:1.
4. Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, Vinuesa Silva I, García-Medina JJ, Benítez del Castillo J Presente y futuro de la interferencia por RNA. Arch Soc Esp Oftalmol 2014. Editorial.
5. Yu XB, et al. Increased levels of transforming growth factor-beta1 and -beta2 in the aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. Ophthalmic Surg Lasers Imaging 2007; 38: 6-14
6. Ozcan AA, Ozdemir N, Canataroglu A. The aqueous levels of TGF-beta2 in patients with glaucoma. Int Ophthalmol 2004; 25: 19-22
7. Chen KH, Wu CC, Roy S, Lee SM, Liu JH. Increased interleukin-6 in aqueous humor of neovascular glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 2627-2632.

8. Melo P, Rodrigues LG, Pinazo-Duran MD, Tavares MA. Methamphetamine and lipid peroxidation in the rat retina. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 455-460.
9. Strömland K, Pinazo-Durán MD. Optic nerve hypoplasia: comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy. *Teratology*. 1994 Aug;50(2):100-11.
10. Hartog F, Meyer D. The anatomy pathophysiology of the anterior chamber and its angle. En: Garg A, Melamed S, Jean Bovet J, Pajic B, Carassa R, Dada T. *Mastering the techniques of glaucoma diagnosis and management*. New Delhi: Jaypee Brothers Eds.; 2006. pp. 3-11.
11. Vaughan DG, Asbury T. *Vaughan & Asbury's General Ophthalmology*. 17th. Ed. USA: McGraw-Hill; 2008.
12. Sit AJ. Continuous monitoring of intraocular pressure: rationale and progress toward a clinical device. *J Glaucoma*. 2009;18(4):272-9.
13. Soto D, Comes N, Ferrer E, Morales M, Escalada A, Pales J, et al. Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(9):3650-61.
14. Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1989;107:186-8.
15. *Ophthalmology AAO*, editor. *Glaucoma*. 2008-2009 ed2008-2009.
16. MB S. *Glaucoma*. Editorial Médica Panamericana. 1987.
17. Leidhecker W AK, Neumann HG. Der intraoculare Druck gesunder menschlicher Augen. *Kin Monatsbl Augenheilkd*. 1958;133:662.

18. European Glaucoma Society (EGS). Terminology and Guidelines for Glaucoma. 4 ed: European Glaucoma Society; 2014.
19. Coleman AI MS. Risk factors for glaucoma onset and progression. *Surv Ophthalmol*. 2008;53:Suppl1:S3-10.
20. Halpern DL, Grosskreutz CL. Glaucomatous optic neuropathy: mechanisms of disease. *Ophthalmol Clin North Am* 2002; 15: 61-68. Review.
21. Fortune B, Reynaud J, Hardin C, Wang L, Sigal IA, Burgoyne CF. Experimental Glaucoma Causes Optic Nerve Head Neural Rim Tissue Compression: A Potentially Important Mechanism of Axon Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(10):4403-11.
22. Ahmad SS. Controversies in the vascular theory of glaucomatous optic nerve degeneration. *Taiwan J Ophthalmol*. 2016;6(4):182-186.
23. Osborne NN Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Prog Brain Res*. 2008;173:339-52
24. Yap TE, Donna P, Almonte MT, Cordeiro MF. Real-Time Imaging of Retinal Ganglion Cell Apoptosis. *Cells*. 2018;7(6). Pii E60.
25. Gálvez-Rosas A. Aspectos genéticos del glaucoma primario de ángulo abierto en el adulto. *Investigación en discapacidad*. Vol 3 Núm 2. Abril-Junio 2014, pp 69-76.
26. Stern Y. Comparison of cognitive changes in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Archives of Neurology*. 1993;50:1040-5.

27. Plan estratégico nacional para el tratamiento integral de las enfermedades Neurológicas II. 2017. Documento electrónico accesible en: <http://www.sen.es/noticias/130-noticias-socios/2105-plan-estrategico-nacional-para-el-tratamiento-integral-de-las-enfermedades-neurologicas-ii-pentien-ii>
28. Mancino R, Martucci A, Cesareo M, Giannini C, Corasaniti MT, Bagetta G, Nucci C. Glaucoma and Alzheimer Disease: One Age-Related Neurodegenerative Disease of the Brain. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(7):971-977.
29. Zanón-Moreno V, Lleó-Pérez A, Pons-Vazques S, García-Medina JJ, Vinuesa-Silva I, Moreno-Nadal MA, Pinazo-Durán MD. . Oxidative stress in POAG. *Journal of Glaucoma*. 2008;17:263-8.
30. Zanón-Moreno V, Mendes-Pinto MM, Alves CJ, García-Medina JJ, Vinuesa-Silva I, Moreno-Nadal MA, Pinazo-Durán MD. Serotonin leves in aqueous humor of patients with POAG. *Molecular Vision*. 2008;14:2143-17.
31. Zanón-Moreno V, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, Vinuesa I, Vila-Bou V, Pinazo-Durán MD. Implicaciones del óxido nítrico y otras moléculas redox en GPAA. *Archivos Sociedad Española de Oftalmología*. 2008;83:365-72.
32. Shields MB. Glaucoma. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana; 1987; 147-148
33. DISCAPNET. Portal de la discapacidad. Fundación ONCE. Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Documento electrónico disponible en el link: <http://salud.discapnet.es/Castellano/Salud/Enfermedades/EnfermedadesDiscapacitantes/G/Glaucoma/Paginas/cover%20glaucoma.aspx>

34. Kosoko-Lasaki O, Gong G, Haynatzki G, Wilson MR. Race, ethnicity and prevalence of primary open-angle glaucoma. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 1626-16219.
35. Izzotti A, Di Marco B, De Flora S, Sacca S. Open angle glaucoma: epidemiology, pathogenesis and prevention. *Recenti Prog Med* 2006; 97: 37-45. Review.
36. Flammer J. *Glaucoma*. Barcelona; MRA Ediciones; 2004; 45-48
37. HA Q. Number of People with Glaucoma Worldwide. *British Journal of Ophtalmology*. 1996;80(5):389-93.
38. Leibowitz HM, Maunder LR. **The Framingham Eye Study** Monograph. *Survey Ophtalmology*. 1980;24(suppl):335-610.
39. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(3):262-7.
40. Klein BE, Sponsel WE, Franke T. Prevalence of Glaucoma: **The Beaver Dam Eye Study**. *Ophtalmology*. 1992;Oct:99(10):1499-504.
41. The prevalence of Primary Open Angle Glaucoma in a Population-based study in The Netherlands. **The Rotterdam Study**. *Ophtalmology*. 1994;101(1).
42. Leske MC CA, Schachat AP, Hyman L. **The Barbados Eye Study**. Prevalence of open angle glaucoma. *Arch Ophtalmol*. 1994;112(6):821-9.
43. Antón A, Mújica V. Prevalence of Primary Open Angle Glaucoma in a Spanish population: **The Segovia Study**. *Journal of Glaucoma*. 2004;13:371-6.
44. Tielsh JM, Katz J. Racial variation in the prevalence of Primary Open Angle Glaucoma: **The Baltimore Eye Survey**. *JAMA*. 1991:266-369.

45. Varma R, Wu C. Four-Year Incidence of Open-Angle Glaucoma and Ocular Hipertension: **The Los Angeles Latino Eye Study**. *Am J Ophtalmol*. 2012;154:315-25.
46. VanNewkirk MR, Weih L, McCarty CA, Taylor HR. Cause-specific prevalence of bilateral visual impairment in Victoria, Australia: the Visual Impairment Project. *Ophthalmology*. 2001;108(5):960-7
47. Ong LS, Mitchell P, Healey PR, Cumming RG. Asymmetry in optic disc parameters: **The Blue Mountains Eye Study**. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(5):849-57.
48. Traverso C, Walt JG, Kelly SP, Hommer AH, Bron AM, Denis P, Nordmann JP, Renard JP, Bayer A, Grehn F, Pfeiffer N, Cedrone C, Gandolfi S, Orzalesi N, Nucci C, Rossetti L, Azuara-Blanco A, Bagnis A, Hitchings R, Salmon JF, Bricola G, Buchholz PM, Kotak SV, Katz LM, Siegartel LR, Doyle JJ. Direct costs of glaucoma and severity of the disease: a multinational long term study of resource utilisation in Europe. *Br J Ophthalmol*. 2005 Oct;89(10):1245-9.
49. Pezzullo L, Streatfeild J, Simkiss P, Shickle D. The economic impact of sight loss and blindness in the UK adult population. *BMC Health Serv Res*. 2018;18(1):63
50. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, Keeffe J, Kempen JH, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017 Dec; 5(12):e1221-e1234.
51. Mokhles P, Schouten J, Beckers H, Webers C. Does the World Health Organization criterion adequately define glaucoma blindness? *Clin Ophthalmol*. 2017;11:473-480.

52. Gordon MO, Brandt JD. **The Ocular Hipertension Treatment Study**: baseline factors that predict the onset of Primary Open Angle Glaucoma. *Archives of Ophtalmology*. 2002;120:714-20.
53. Stewart WC, Nassar QJ. Cost-effectiveness of treating Ocular Hipertension. *Ophthalmology*. 2008;115:94-8.
54. Mittal S. Classification of glaucomas. En: Garg A, Melamed S, Jean Bovet J, Pajic B, Carassa R, Dada T. *Mastering the techniques of glaucoma diagnosis and management*. New Delhi: Jaypee Brothres; 2006. p. 12-5
55. Gaasterland D, Kupfer C, Milton R, Ross K, McCain L, MacLellan H. Studies of aqueous humour dynamics in man. VI. Effect of age upon parameters of intraocular pressure in normal human eyes. *Exp Eye Res*. 1978 Jun;26(6):651-6.
56. Group CN-TGS. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with Normal-tension Glaucoma and patients with therapeutically reduced-IOP. *American Journal of Ophtalmology*. 1998;126:487-97.
57. Sommer A, Katz J, Quigley HA. Relationship between intraocular pressure and Primary Open Angle Glaucoma among white and black Americans: **The Baltimore Eye Survey**. *Archives of Ophtalmology*. 1991;109:1090.
58. Tielsh JM, Singh K. A population-based evaluation of glaucoma screening: **The Baltimore Eye Survey**. *American Journal of Epidemiology*. 1991;134:1102-10.
59. Quigley HA, Rodriguez J. The prevalence of glaucoma in a population-based study of Hispanic subjets: **proyecto VER**. *Arch Ophtalmol*. 2001;119(12):1819-26.

60. Armaly MF. On the distribution of applanation pressure statistical features and the effects of age, sex and family history of Glaucoma. *Archives of Ophthalmology*. 1965;73:11.
61. Wolfs RC, Ramratan SS. Genetic risk of Primary Open Angle Glaucoma: population based familial aggregation Study. *Archives of Ophthalmology*. 1998;116:1640-5.
62. Asrani S, Wilensky J. Large diurnal fluctuation in intraocular pressure are an independent risk factor in patients with Glaucoma. *Journal of Glaucoma*. 2000;9:134-42.
63. González I, Pueyo M. Assessment of diurnal tension curve in early glaucoma damage. *Int Ophthalmology*. 1996-1997;20:997-1004.
64. Medeiros FA, Zangwill LM. Long-term IOP fluctuations and risk of conversion from Ocular Hypertension to Glaucoma. *Ophthalmology*. 2008;115:934-40.
65. Bengtsson B, Hyman L. EMGT group: Fluctuation of intraocular pressure and Glaucoma progression in **the Early Manifest Glaucoma Study**. *Ophthalmology*. 2007;115:934-40.
66. Wang H, Zhang Y, Ding J, Wang N. Changes in the circadian rhythm in patients with primary glaucoma. *PLoS One*. 2013;8(4):e62841.
67. Leidl MC, Choi CJ, Syed ZA, Melki SA. Intraocular pressure fluctuation and glaucoma progression: what do we know? *Br J Ophthalmol*. 2014;98:1315-9.
68. Sit AJ. Intraocular pressure variations: causes and clinical significance. *Can J Ophthalmol*. 2014;49:484-8. Review.

69. Weber AK. Pressure differential of Intraocular Pressure measured between supine and sitting position. *Ann als of Ophtalmology*. 1981;13:323.
70. Tsukchara S. Postural changes of IOP in normal persons and in patients with Primary Open Angle Glaucoma and Low-tension Glaucoma. *British Journal of Ophtalmology*. 1984;68:389.
71. Leske MC, Hyman L. Predictors of long term progression in the **Early Manifest Glaucoma Trial**. *Ophthalmology*. 2007;114:1965-72.
72. Flammer J, Costa VP, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 2002;21:359-93.
73. Bonomi L, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A. . . Vascular risk factors for primary open angle glaucoma: **the Egna-Neumarkt Study**. *Ophthalmology*. 2000;107:1287-93.
74. Zheng Y, Mitchell P, Friedman DS, He M, Aung T. . Distribution of ocular perfusion pressure and its relationship with open-angle glaucoma: **The Singapore Malay Eye Study**. . *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;51:3399-404.
75. Leske MC, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E. . Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: **The Early Manifest Glaucoma Trial**. *Arch Ophtalmol*. 2003;121:48-56.
76. Khawaja AP, Jansonius NM. The role of ocular perfusion pressure in glaucoma cannot be studied with multivariable regression analysis applied to surrogates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(7):4619-20.
77. Bonomi L, Marraffa M. Vascular risk factors for primary open angle glaucoma: **The Egna-Neumarkt Study**. *Ophtalmology*. 2000;107(7):1287-93.

78. Tomlinson A. Applanation tension and axial length of the eyeball. *British Journal of Ophthalmology*. 1970;54:548.
79. Daubs JC. Effects of refractive error on the Risk of Ocular Hypertension and Open Angle Glaucoma. *Trans Ophthalmological Society UK*. 1981;101:121.
80. Topouzis F, Harris A. Risk factors for primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliative glaucoma in the **Thessaloniki eye Study**. *Am J Ophthalmol*. 2011;152(2):219-28.
81. Mitchell P, Sandbach J, Wang JJ, . The relationship between glaucoma and myopia: **the Blue Mountains Eye Study**. *Ophthalmology*. 1999;106(10):2010-5.
82. Burdon KP, Mitchell P, Lee A, Healey PR, White AJ, Rochtchina E, Thomas PB, Wang JJ, Craig JE, .Mitchell P, Sandbach J, Wang JJ, . Association of open-angle glaucoma loci with incident glaucoma in **the Blue Mountains Eye Study**. *Am J Ophthalmol*. 2015
83. Passo MS, Elliot DL. Exercise conditioning and Intraocular Pressure. *American Journal of Ophthalmology*. 1967;103:754.
84. Markus DF, Podos SM. The effects of exercise on Intraocular Pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1970;9:749.
85. Kesaniemi Y.K, Jensen M.D., et al. . Dose-response issues concerning physical activity and health: an evidence-based symposium. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(6 Suppl):341-8.
86. Centers for Disease Control and Prevention NCfCDPaHP. Physical activity and health: a report of the surgeon general. Atlanta. In: Services UDoHaH, editor. 1996
87. Burton L.C., German P.S., et al. The effect among older persons of a general preventive visit on three health behaviors: smoking,

- excessive alcohol drinking, and sedentary lifestyle. *Prev Med.* 1995;24:492-7.
88. Guirao-Goris J. The expert nurse profile and diagnostic content validity of Sedentary Lifestyle: the Spanish validation. *Int J Nurs Terminol Classif.* 2007;18:84-92.
89. Guirao-Goris J.A. MPP, Martínez-Del Campo P. Validación de Contenido Diagnóstico de la Etiqueta Diagnóstica Enfermera Sedentarismo. *Enferm Clín.* 2001;11:135-40.
90. INE. Encuesta Nacional de Salud. Personas de 16 y más años por sexo, edad y tipo de actividad física. Madrid.. 2006.
91. Pascual C, Gutiérrez-Fisac J.L., et al. . Bienestar material de la provincia de residencia e inactividad física. *Gac Sanit.* 2005;19:424-32.
92. Ainsworth BE, Leon A.S. . Validity and reliability of self-reported physical activity status: the Lipid Research Clinics questionnaire. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25:92-8.
93. Ainsworth BE, Leon A.S., et al. Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. . *Med Sci Sports Exerc* 1993;25:71-8.
94. Institute NC. Physical Activity Questionnaire 2002. Available from: <http://www.srl.cam.ac.uk/epic/questionnaires/epaq2/epaq2.pdf>.
95. Institute NC. Epic-Norfolk Physical Activity Questionnaire 2002. from: <http://www.srl.cam.ac.uk/epic/questionnaires/epaq2/epaq2.pdf>.
- 96 . Jennifer LY, Yip, David C. Broadway, Robert Luben, David F. Garway-Heath, Shabina Hayat, Nichola Dalzell, Pak Sang Lee, Amit Bhaniani, Nicholas J. Wareham, Kay-Tee Khaw and Paul J. Foster.

- Physical Activity and Ocular Perfusion Pressure: **The EPIC-Norfolk Eye Study** .Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;vol. 52 (11):8186-92.
97. Hayat SA, Keevil VL, Moore S, Dalzell N, Bhaniani A, I Foster P, Brayne C, Wareham NJ, Khaw KT. Cohort Profile: A prospective cohort study of objective physical and cognitive capability and visual health in an ageing population of men and women **in Norfolk (EPIC-Norfolk 3)**. Int J Epidemiol August 2014;43:1063-72.
98. Yip J, Luben R, Garway-Health D et al. Physical activity and ocular Perfusion Pressure: **The EPIC-Norfolk Study**. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(11):8186-92.
99. French DD, Harman LE. Substance use Disorder and th risk of Open-angle Glaucoma. Journal of Glaucoma. 2011;20(7):452-7.
100. García-Medina JJ, Vinuesa-Silva I, Zanón-Moreno V, Santos-Bueso E, Pinazo-Durán MD. What to eat and drink in glaucoma? Evidence from human studies. Arch Soc Esp Oftalmol. 2014 Mar;89(3):89-91.
101. Zanon-Moreno V, Garcia-Medina JJ, Zanon-Viguer V, Moreno-Nadal MA, Pinazo-Duran MD. Smoking, an additional risk factor in elder women with primary open-angle glaucoma. Mol Vis. 2009 Dec 31;15:2953-2959.
102. Congdon NG, Broman AT, Bandeen-Roche K, Grover D, Quigley HA. Central corneal thickness and corneal hysteresis associated with glaucoma damage. Am J Ophthalmol 2006; 141: 868-875
103. Lin P, Friedman M, . Normal Tension Glaucoma in Patients With Obstructive Sleepe Apnes/Hypopnea Syndrome. Journal of Glaucoma. 2011;20(9):553-8.

104. Stein J, Newman-Casey PA, Nidhi-Talwar MA. The Reelationship between Statin Use and Open-Angle Glaucoma. *Ophthalmology*. 2012;119:2074-81.
105. De castro DK. Effect of statin drugs and aspirin on progression in OAG suspects using confocal scanning laser ophtalmoscopy. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2007;35(6):506-13.
106. Phelps OD. Migraine an low tension glaucoma: a case control study. *INVEST OPHT VIS SCI*. 1985;26:1105-8.
107. Wang JJ; Mitchell P SW. Is there an association between migraine headache and open-angle glaucoma. Findings from the Blue Mount1714-9ains Study. *Ophthalmology*. 1997.
108. Shiu-Dong C. Open-Angle Glaucoma and the Risk of Erectile Dysfunction. *Ophthalmology*. 2012;119:289-93.
109. Coleman AL. Glaucoma risk and the Consumption of fruits and vegetables Amons Older Women in the Study of Osteoporotic fractures. *American Journal of Ophthalmology*. 2008;145:1081-9.
110. Anthony P. Khawaja¹ MPYC, David F. Garway-Heath³, David C. Broadway⁴, Robert Luben¹, Justin C. Sherwin¹, Shabina Hayat¹, Kay-Tee Khaw¹ and Paul J. Foster²,. Associations With Retinal Nerve Fiber Layer Measures in the EPIC-Norfolk Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(7):5028-34.
111. Zanón-Moreno V, Vinuesa-Silva I, Lleó-Pérez AV, García-Medina JJ, Hernández-Martínez FJ, Bendala-Tufanisco E, Raga-Cervera J, Pinazo-Durán MD. Marcadores clínicos y moleculares de los trastornos psicológicos en el glaucoma primario de ángulo abierto. *Revista Española de Glaucoma e Hipertensión Ocular* 2017, 7(1): 11-20.

112. Yochim BP MA, Kane K. Prevalence of Cognitive Impairment, Depression, and Anxiety Symptoms Among Older Adults With Glaucoma. *Journal of Glaucoma*. 2012;21(4):250-4.
113. Watson J D, Baker TA, Bell, S P, Gann A, Levine M, Losick R Las estructuras del DNA y el RNA. En: *Biología Molecular del Gen* (5ª Ed.) (Madrid: Médica Panamericana).2006.
114. Mount DM *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2 edición). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004.
115. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al., The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291 (5507): 1304-1351
- 116 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC., et al. International Genome Project Consortium. *Nature* 2001;409:860–921
117. **The ENCODE Project Consortium**. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007; 447 (7146): 799-816.
118. Chen L, Aziz MM, Mohammed N, Jiang X. Secure large-scale genome data storage and query.*Comput Methods Programs Biomed*. 2018;165:129-137.
119. Anderson PSL. Making a point: shared mechanics underlying the diversity of biological puncture.*J Exp Biol*. 2018;221(Pt 22).
120. Hernández-Lemus E, Li W, Meyer P. Advances in systems biology--New trends and perspectives. *Comput Biol Chem*. 2015;59 Pt B:1-2.

121. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28;346(6213):1258096.
122. Watkins AM, Geniesse C, Kladwang W, Zakrevsky P, Jaeger L, Das R. Blind prediction of noncanonical RNA structure at atomic accuracy. *Sci Adv*. 2018;4(5):eaar5316
123. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.
124. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-11.
125. Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 2006; 127:747-574.
126. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of miRNAs in vivo with antagomirs. *Nature* 2005; 438:685-689.
127. Hartig JV, Tomari Y, Förstemann K. piRNAs--the ancient hunters of genome invaders. *Genes Dev*. 2007; 21:1707-13.
128. Dogini DB, Pascoal VD, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC, Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genet Mol Biol*. 2014; 37:285-93.
129. Zhang LJ, Zhang Y, Dong LJ, Li XR Expression and function of microRNA in the eye. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2012; 48:1136-40.

130. Wang S, Koster KM, He Y, Zhou Q. MiRNAs as potential therapeutic targets in age related macular degeneration. *Future Med Chem.* 2012; 4:277-287.
131. Tanaka Y, Tsuda S, Kunikata H, Sato J, Kokubun T, Yasuda M, Nishiguchi KM, Inada T, Nakazawa T. Profiles of extracellular miRNAs in the aqueous humor of glaucoma patients assessed with a microarray system. *Sci Rep.* 2014; 4:5089-94
132. Paylakhi SH, Moazzeni H, Yazdani S, Rassouli P, Arefian E, Jaber E, Arash EH, Gilani AS, Fan JB, April C, Amin S, Suri F, Elahi E. FOXC1 in human trabecular meshwork cells is involved in regulatory pathway that includes miR-204, MEIS2, and ITG β 1. *Exp Eye Res.* 2013; 111:112-21.
133. Luna C, Li G, Huang J, Qiu J, Wu J, Yuan F, Epstein DL, Gonzalez P. Regulation of trabecular meshwork cell contraction and intraocular pressure by miR-200c. *PLoS One.* 2012; 7:e51688.
134. Pinazo-Durán MD, García-Medina JJ, Galarreta D, Marco-Ramirez C, Galbis-Estrada C, Gallego-Pinazo R, López-Galvez MI. Micro RNAs in Tears Correlates with Pivotal Risk Factors for Diabetic Retinopathy. *Ophthalmic Res* 2014; 52:184.
- 135 Pinazo-Duran MD. Genética y algo más. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2012; 87:35–37 Editorial.
136. Kauper K, McGovern C, Sherman S. Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:7484-7491 .
137. Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-

related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006; 17:167-176.

138. Safety and Tolerability Study of AAV2-sFLT01 in Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration (AMD)—Full Text View—ClinicalTrials.gov. clinical trials.gov. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01024998>.

139. Singh MS, Charbel Issa P, Butler R. Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:1101-1106.

140. Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E517-25.

141. Yamamoto S, Sugawara T, Murakami A, Nakazawa M, Nao-I N, Machida S, Wada Y, Mashima Y, Myake Y. Topical Isopropyl Unoprostone for Retinitis Pigmentosa: Microperimetric Results of the Phase 2 Clinical Study. *Ophthalmology and Therapy* 2012; 1:5.

142. Ahuja AK, Behrend MR. The ARGUS II epiretinal prosthesis. Factors affecting patient's selection for Retinitis Pigmentosa: Microperimetric Results of the Phase 2 Clinical Study. *Ophthalmology and Therapy* 2012; 1:5.

143. Van Haeringen NJ. Clinical biochemistry of tears. *Surv Ophthalmol.* 1981;26(2):84-96. Review.

144. Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Acta.* 2006;369(1):17-28.

- 145 Muñoz-Hernández AM, Galbis-Estrada C, Santos-Bueso E, Cuiña-Sardiña R, Díaz-Valle D, Gegúndez-Fernández JA, x. Pinazo-Durán MD, Benítez-del-Castillo JM. Human tear metabolome. Arch Soc Esp Oftalmol. 2016;91(4):157-9.
146. Galbis-Estrada C, Martinez-Castillo S, Morales JM, Vivar-Llopis B, Monleón D, Díaz-Llopis M, Pinazo-Durán MD. Differential effects of dry eye disorders on metabolomic profile by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biomed Res Int. 2014;2014:542549.
- 147.- Pinazo-Durán MD, Galbis-Estrada C, Zanón-Moreno V, García-Medina JJ, Bendala-Tufanisco E, Vinuesa-Silva I, Benítez del Castillo FJ. MicroRNAs as potential biomarkers of eye diseases. Arch Soc Esp Oftalmol. 2015 Dec;90(12):604-51
- 148.- Pinazo-Durán MD, García-Medina JJ, Galarreta D, Marco-Ramírez C, Galbis-Estrada C, Gallego-Pinazo R, López-Galvez MI. Micro RNAs in Tears Correlates with Pivotal Risk Factors for Diabetic Retinopathy. Ophthalmic Res 2014; 52:184.
- 149.- Pinazo-Durán MD, Galbis-Estrada C, Pons-Vázquez S, Cantú-Dibildox J, Marco-Ramírez C, Benítezdel-Castillo J. Effects of a nutraceutical formulation based on the combination of antioxidants and ω -3 essential fatty acids in the expression of inflammation and immune response mediators in tears from patients with dry eye disorders. Clin Interv Aging. 2013; 8:139-48.
- 150.- Galbis-Estrada C, Pinazo-Durán MD, Cantú-Dibildox J, Marco-Ramírez C, Díaz-Llopis M, Benítezdel-Castillo J. Patients undergoing long-term treatment with antihypertensive eye drops responded positively with respect to their ocular surface disorder to

oral supplementation with antioxidants and essential fatty acids. *Clin Interv Aging*. 2013; 8:711-9.

151. Kasahara N. Biomarkers and surrogate endpoints in the glaucomatous optic neuropathy: new developments and a review *Rev Bras.Oftalmol*. 2015; 74 (4):

152. Colligris B, Crooke A, Gasull X, Escribano J, Herrero-Vanrell R, Benítez-del-Castillo JM, García Feijoo J. Recent Patents on Recent Patents and Developments in Glaucoma Biomarkers *Endocrine, Metab Imm Drug Discovery* 2012

153.- Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, García-Medina JJ, Gallego-Pinazo R. Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13:98-107.

154. Aroca-Aguilar JD, Martínez-Redondo F, Sánchez-Sánchez F, Coca-Prados M, Escribano J. Functional role of proteolytic processing of recombinant myocilin in self-aggregation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(1):72-8.

155. Molasy M, Walczak A, Szaflik J, Szaflik JP, Majsterek I. MicroRNAs in glaucoma and neurodegenerative diseases. *J Hum Genet*. 2017;62(1):105-112.

156. Guo L, Yang S, Zhao Y, Zhang H, Wu Q, Chen F. Global analysis of miRNA gene clusters and gene families reveals dynamic and coordinated expression. *Biomed Res Int*. 2014;2014:782490. doi: 10.1155/2014/782490. Epub 2014 Mar 25

157. Fang X, Li X, Yin Z, Xia L, Quan X, Zhao Y, Zhou B. Genetic variation at the microRNA binding site of CAV1 gene is associated

with lung cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017;8(54):92943-92954.

158. Barragán R, Coltell O, Asensio EM, Francés F, Sorlí JV, Estruch R, Salas-Huetos A, Ordovas JM, Corella D. MicroRNAs and Drinking: Association between the Pre-miR-27a rs895819 Polymorphism and Alcohol Consumption in a Mediterranean Population. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8)

159. Nielsen S, Åkerström T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen BK, Laye MJ. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One*. 2014;9(2):e87308.

160. Liu Y, Chen Y, Wang Y, Zhang X, Gao K, Chen S, Zhang X. microRNA Profiling in Glaucoma Eyes With Varying Degrees of Optic Neuropathy by Using Next-Generation Sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(7):2955-2966.

161. Aptel F, Aryal-Charles N, Giraud JM, El Chehab H, Delbarre M, Chiquet C, Romanet JP, Renard JP. Progression of visual field in patients with primary open-angle glaucoma - ProgF study 1. *Acta Ophthalmol*. 2015;93(8):e615-20.

162. Gupta V, Devi K S, Kumar S, Pandey RM, Sihota R, Sharma A, Gupta S. Risk of perimetric blindness among juvenile glaucoma patients. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2015;35(2):206-11

163. McMonnies C. An examination of the hypothesis that intraocular pressure elevation episodes can have prognostic significance in glaucoma suspects. *J Optom*. 2015;8(4):223-31

164. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3:e3148
165. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10513-8.
- 166 Spiro RG. Glycoproteins. *Adv. Protein Chem.* 1973, 27:349-467.
- 167 Zachara NE. Critical observations that shaped our understanding of the function(s) of Intracellular Glycosylation (O-GlcNAc). *FEBS Lett.* 2018
168. Dall'Olio F, Trinchera M. Epigenetic Bases of Aberrant Glycosylation in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5). pii: E998.
170. Chatzikiyriakidou A, Founti P, Melidou A, Minti F, Bouras E, Anastasopoulos E, Pappas T, Haidich AB, Lambropoulos A, Topouzis F. MicroRNA-related polymorphisms in pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliative glaucoma, and primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Genet.* 2018:1-7.
171. Ruibin W, Zheng X, Chen J, Zhang X, Yang X, Lin Y. Micro RNA-1298 opposes the effects of chronic oxidative stress on human trabecular meshwork cells via targeting on EIF4E3. *Biomed Pharmacother.* 2018 ;100:349-357.
- 172, Wang WH, Deng AJ, He SG. A key role of microRNA-26a in the scar formation after glaucoma filtration surgery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(4):831-837.

173. Paylakhi SH, Moazzeni H, Yazdani S, Rassouli P, Arefian E, Jaber E, Arash EH, Gilani AS, Fan JB, April C, Amin S, Suri F, Elahi E. FOXC1 in human trabecular meshwork cells is involved in regulatory pathway that includes miR-204, MEIS2, and ITGβ1. *Exp Eye Res.* 2013;111:112-21.
175. Anthony TL, Lindsey JD, Weinreb RN. Latanoprost's effects on TIMP-1 and TIMP-2 expression in human ciliary muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(12):3705-11.
175. Wistow G, Bernstein SL, Ray S, Wyatt MK, Behal A, Touchman JW, Bouffard G, Smith D, Peterson K. Expressed sequence tag analysis of adult human iris for the NEIBank Project: steroid-response factors and similarities with retinal pigment epithelium. *Mol Vis.* 2002;8:185-95.
176. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010;101:2087-92.
177. Peng H, Sun YB, Hao JL, Lu CW, Bi MC, Song E. Neuroprotective effects of overexpressed microRNA-200a on activation of glaucoma-related retinal glial cells and apoptosis of ganglion cells via downregulating FGF7-mediated MAPK signaling pathway. *Cell Signal.* 2018 Nov 12.
178. Liu HN, Cao NJ, Li X, Qian W, Chen XL. Serum microRNA-211 as a biomarker for diabetic retinopathy via modulating Sirtuin 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;505(4):1236-1243.

ANEXO

En esta sección incluimos los documentos del CEIC, el formato de consentimiento informado para los participantes en el estudio y el formato de la base de datos utilizada para registrar los datos obtenidos en el estudio.

DOCUMENTO CEIC ACEPTACION ESTUDIO



A/A.: Dr. Jorge Raga Cervera
Servicio de Oftalmología

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 25 de Mayo de 2016 ha evaluado y ha aprobado el estudio titulado: Correlación entre la expresión de microRNAs en la hipertensión ocular versus glaucoma primario de ángulo abierto.

Proyecto de investigación. Tesis doctoral
Código Ceic: 47/16

Falta indicar en el Consentimiento informado que se le entregará una copia al paciente.

Valencia 3 de Junio de 2016

Fdo.: Pilar Codoñer Franch



CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Investigador Principal: JORGE RAGA CERVERA

SERVICIO DE OFTALMOLOGIA

Unidad Investigación Oftalmológica SANTIAGO GRISOLÍA

Sótano Edificio Consultas Externas. Laboratorios de la Unidad.

CENTRO: HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCTOR PESET

Título del proyecto de investigación:

Correlación entre la expresión de microRNAs en la hipertensión ocular versus glaucoma primario de ángulo abierto.

1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia). Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y lo suficientemente clara para que pueda evaluar y juzgar si desea 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. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas antes de darnos a conocer su decisión de participar o no en este estudio.

Se basa en la realización de un estudio genético en una muestra de sus lágrimas. Intentamos determinar si existe una información en el código genético que pueda informarnos de forma precoz del riesgo de padecer Glaucoma y perder visión.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

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

Explicación para usted:

Le citaremos para realizarle una entrevista en la cual obtendremos información de sus características personales y familiares, estilo de vida, hábitos alimenticios, tratamientos y datos de su enfermedad. Le realizaremos un examen oftalmológico incluyendo la superficie ocular, la presión intraocular, estudiaremos la forma y el color del nervio óptico, el campo visual así como el espesor de la córnea. Como técnica especial, analizaremos sus lágrimas para determinar si la información genética posee unas características especiales tanto en su contenido como en su transmisión que pudiera relacionarse con el desarrollo de Glaucoma y la disminución de la visión.

Por lo tanto el esquema de trabajo será el siguiente:

- 1) Citación en el Servicio de Oftalmología. Visita con el mismo especialista durante todo el estudio
- 2) Entrevista personal para determinar la posibilidad de participar en el estudio.
- 3) Explicación del mismo y entrega de la documentación
- 4) Firma del Consentimiento para la participación

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

El Glaucoma es la segunda causa de ceguera mundial. El glaucoma primario de ángulo abierto corresponde al 90% de todos los glaucomas, y comienza de forma silenciosa, provocando el daño al nervio óptico que solo se manifiesta cuando ya hay pérdida de visión irrecuperable. El primer factor de riesgo es la hipertensión ocular, pero su mantenimiento provoca la lesión del nervio óptico y la pérdida de visión.

Esta enfermedad no posee un tratamiento efectivo, conduce a la pérdida de visión de una u otra forma y por ello repercuten negativamente en la calidad de vida de los enfermos. Pretendemos conocer más datos de la enfermedad por medio de estos estudios.

Si acepta participar, le citaremos en el Servicio de Oftalmología, le visitará siempre el mismo especialista y le realizaremos las siguientes pruebas:

En cuanto a las pruebas oftalmológicas:

- Agudeza Visual con la mejor corrección óptica
- Examen de las estructuras anteriores del ojo (párpados, córnea, cristalino)
- Toma de la Tensión Ocular
- Examen de las estructuras internas de la parte posterior del ojo (vítreo, retina, nervio óptico)
- Perimetría, que nos permite ver la totalidad del campo visual
- Gonioscopia, que nos permite estudiar el ángulo del ojo donde el iris se encuentra con la córnea
- Paquimetría, que nos permite estudiar el espesor de la córnea
- Pruebas complementarias: Tomografía de Coherencia Óptica (nos permite obtener un análisis segmentado de la retina, como en un TAC).
- Extracción de lágrimas: Colocando un tubito que las recoge, y las congelaremos hasta que realicemos las determinaciones moleculares y genéticas para determinar la presencia de los ácidos ribonucleicos (ARN) de pequeño tamaño. Estos llevan la información del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la transmiten para sintetizar proteínas y que las células realicen sus funciones. Si se alteran, las células pueden enfermar e incluso morir. Esta información puede estar relacionada con el riesgo de padecer alguna de estas enfermedades. Por lo tanto esperamos encontrar un factor pronóstico para ayudarle a modificar en lo posible este hecho.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO
Hospital Universitario Doctor Peset
Avenida/ Gaspar Aguilar 90
46017 Valencia; Tel: 961622500

Yo , Don/Dña

(nombre y apellidos) como (marcar la casilla correspondiente)
paciente /padre o
madre del paciente /custodio legal del paciente , declaro que he sido
informado por
el
Dr/Dra _____

de que (nombre y apellidos de la persona a la que se le hace la
extracción de lágrima)

_____ puede estar afecto o ser portador/a de información genética y que las
determinaciones están encaminadas a encontrar características
moleculares y genéticas personales en las muestras de lágrimas con
fines oftalmológicos.

Por tanto, he sido informado/a de que el objetivo de este análisis, es
determinar la presencia de ácidos nucleicos de pequeño tamaño
(micro RNAs) cuya presencia y cantidad pudiera estar relacionada
con las complicaciones oculares de la enfermedad glaucomatosa.
**Aunque no padezca enfermedad alguna, esta información me
puede resultar beneficiosa.** De esta manera, el resultado del
estudio puede llevar a conocer las características genéticas de los
pacientes y ayudar a realizar un diagnóstico precoz de la posibilidad
de desarrollar glaucoma o de empeorar en dicha enfermedad.

He sido informado/a de que la extracción de lágrimas no es dolorosa
y no me provoca molestias ni efectos secundarios y que cabe la
posibilidad de que dicho estudio no sea concluyente, e incluso que
pueda ser necesario una nueva muestra para confirmar los
resultados. **Aun estando sano, estas técnicas no me van a
provocar ningún efecto adverso.**

La muestra biológica (lágrimas) necesaria para llevar a cabo el análisis, es muy pequeña y se obtiene mediante extracción directa de la superficie ocular, de forma indolora.

En todo momento se mantendrá la confidencialidad de los datos en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal.

Por lo tanto, doy mi consentimiento para el uso de estas muestras biológicas (mis lágrimas) en el laboratorio designado para ayudar en el proceso diagnóstico y otros estudios científicos dirigidos a la mejor comprensión de las enfermedades oculares, siempre de acuerdo con las regulaciones y normas éticas vigentes (marcar la casilla correspondiente).

SI

NO

Nota: El paciente (y/o los representantes legales) tienen total accesibilidad a los resultados del estudio genético realizado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO

En el caso de identificarse la mutación o alteración cromosómica responsable de la patología/enfermedad a estudio, deseo ser informado/a

(marcar la casilla correspondiente):

SI

NO

Tengo derecho a revocar este consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación.

DECLARO:

- * Que he leído la hoja de información que se me ha entregado
- * He sido informado por el médico arriba indicado y he comprendido las explicaciones que me ha facilitado
- * He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado
- * He comprendido que este estudio es voluntario y que puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento

EN CONSECUENCIA, DOY MI CONSENTIMIENTO PARA EL ESTUDIO GENÉTICO QUE SE ME HA PRESENTADO

Firma del paciente/padre o madre
Firma del Médico
O responsable legal del paciente

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con fecha _____ revoco el consentimiento prestado para el estudio genético.

Firma del paciente/padre o madre del Firma del Médico Responsable
paciente /custodio legal del paciente del paciente:

Fecha: _____
Fecha:

BASE DE DATOS DEL ESTUDIO

DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Apellidos, Nombre	Edad	Sexo (1 v; 2m)	Duración (años)	Ant. Fam. Glaucoma (si 1, no 2)	principios activos del/los colirio/s	talla (cm sin decimales)	peso (Kg)	IMC	trabajo, ocio, ejercicio físico	tabaco (si 1, no 2)	alcohol (si 1, no 2)	otras enfermedades	tratamientos

DATOS CLÍNICOS

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
TIPO (Glaucoma 1, HTO 2)	CODE	Apellidos, Nombre	AVODg (decimal)	AVOIg (demical)	PIO OD	BASAL OD	PIO OI	BASAL OI	BMC OD Detalles	BMC OI Detalles	E/P OD	E/P OI	PAQUIM OD	PAQUIM OI	CV OD PSD	CV OI PSD	CV OD VFI	CV OI VFI	CV OD

S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE
CV OI VFI	CV OD DM	CV OI DM	Estadio OD (1 leve, 2 moder)	Estadio OI (1 leve, 2 moder)	OCT OD1 exc	OCT OD2 grosor fib	OCT OD3 area del borde	OCT OI1 exc	OCT OI2 grosor fib	OCT OI3 area del borde	nº cells ganglion OD	nº cells ganglion OI

MOLECULARES

A	B	C	D	E
Apellidos, Nombre	Día obtención	Volumen muestra	RNA total	miRNA