

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPS) DE LOS GENES DE METALOPROTEINASAS Y DEL RECEPTOR DE PROSTAGLANDINA F2ALFA CON LA RESPUESTA CLÍNICA AL LATANOPROST EN PACIENTES GLAUCOMATOSOS

TRABAJO DE INVESTIGACION PRESENTADO POR

D. FERNANDO USSA HERRERA

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR
LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

DIRECTOR: PROFESOR D. JOSÉ CARLOS PASTOR JIMENO.
VALLADOLID, MARZO 2013

FINANCIACIÓN Y DIVULGACIÓN

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado en su totalidad por los laboratorios Pfizer, con un proyecto de investigación otorgado en septiembre de 2010.

DIVULGACIÓN

El presente trabajo ha sido presentado de forma parcial como comunicación oral en los siguientes congresos

- XXIII curso bianual de glaucoma, Bogotá DC. 23 de Septiembre de 2011.
- XXXI Curso de glaucoma – Universidad de Valladolid. Noviembre de 2011

Enviado para su presentación a la Academia Americana de Oftalmología (AAO), New Orleans 2013



*“Never forget the old saying that a strong wind may destroy the sturdy tree
but the willow bows, and the wind passes through”*

Gichin Fukahoshi

Tokio, September 1956

“No hay medicina que cure lo que no cura la felicidad”

Gabriel García Márquez: Del amor y otros demonios.
Cartagena de Indias, 1994



A mis padres, por enseñarme a perseverar y hacer que hoy sea quien soy



AGRADECIMIENTOS

Después de tanto tiempo, ilusiones y trabajos pasados me gustaría dedicar algunas palabras de gratitud a quienes de una u otra manera han estado presentes y me han ayudado a obtener el resultado final de esta tesis.

En primer lugar deseo agradecer a mi director de tesis, el Profesor D. José Carlos Pastor Jimeno por haber confiado en mí, por su guía constante, su ejemplo de pasión por el trabajo, por el hecho de estar siempre presente en los momentos que necesité de su invaluable ayuda y por motivarme a terminar este trabajo... al igual que en aquella mañana de otoño del año 2003 cuando corrimos juntos y terminamos una media maratón. Siempre habrá un lugar especial para usted en mis afectos.

A los laboratorios Pfizer y especialmente a la Dra. Isabel Fernández Arias por confiar en nuestro Instituto en los peores momentos de una crisis económica mundial y apoyarnos con la beca de investigación que ha permitido llevar a cabo este trabajo, sin su generosa ayuda económica hubiera sido imposible realizar esta labor.

Debo además agradecer de forma muy especial a dos personas del IOBA que han sido una parte fundamental en el desarrollo de este trabajo y me han acompañado en los buenos y malos momentos: a la Dra. Itziar Fernández, porque sin su apoyo estadístico especializado este trabajo no es viable, por estar siempre dispuesta a apoyarme de forma inmediata y por su confianza en este nuestro trabajo. A Maite García por su labor metódica e impecable con el procesamiento de las muestras que han permitido llegar a unos buenos resultados y por revelarme la magia de la extracción del DNA y hacer tangible lo intangible.

Al Profesor Angel Carracedo y a las Dras. María Brion y María Torres y el equipo del Ce-Gen de Santiago de Compostela por su valiosa ayuda en todo el proceso de genotipado.

A mi querido amigo, el Dr. Francisco Blázquez, por toda su ayuda desde el inicio hasta el final de este trabajo, pero principalmente por ser como es, por brindarme su amistad y acogerme como uno más de su familia desde mi llegada a España.

A todos los médicos IPs colaboradores: Dr. Ramón Juberías, Dra. Lourdes Juan, Dra. Ana Sánchez, Dra. Soledad Jiménez, Dr. José María Martínez de la Casa. A la Dra. Jimena Rojas por sus recomendaciones en el diseño del estudio.

Quiero agradecer especialmente al Dr. José Andrés Maquet por su apoyo incondicional en este trabajo, su amistad y por todo lo que he podido aprender de él a lo largo de los años.

A los fellows que han colaborado en este trabajo y con quienes he tenido el honor de guiar y aprender: Dr. Jose David Paulo, Dr. Marco Bogado, Dr. Kelvin Lio y Dr. Federico Pacheco.

A las secretarias del IOBA que han cargado con una buena parte de éste trabajo: Mari-Paz, Ana, Judit, Lourdes y Pilar.

A las enfermeras del IOBA por la recolección cuidadosa de las muestras pero sobre todo por el cariño y cuidados que tienen hacia nuestros pacientes en el día a día. A la Dra. Yolanda Diebold por recibirme en el programa de doctorado y por sus consejos. A la Dra. Rosa Coco y al Dr. Miguel Maldonado por animarme en los momentos más difíciles.

A la Dra. Begoña Coco y a D. Rubén Cuadrado por su apoyo incondicional, al igual que a todos mis colegas y compañeros del Instituto ya que de una u otra forma el trabajo de uno

de nosotros forma parte del trabajo de todos.

A mis hermanos, a Jairo Alejandro por que sin su ayuda no hubiese llegado a donde estoy, por apoyarme en los momentos más duros. A Alberto por sus palabras discretas de ánimo.

A todos mis maestros, especialmente al Profesor Mario Arenas Pérez por haberme dado la oportunidad de demostrar que era capaz y a todos aquellos que han sentado las bases de mi profesión.

A mis amigos de aquí y de allí: Charly, Eleonora, Álvaro, Javier Chaves, Jorge Forero, Kike Daza. A los amigos que son ya parte de mi familia: Hans Soeldner y Yuri Kushko, de todos ellos siempre he recibido una palabra de cariño y aliento en el momento más oportuno.

A Rosa mi compañera en el camino de la vida por hacerme ver la vida de otra manera, por su amor y ayuda constantes que llenan mis días con la esperanza de otro día más junto a ella.



TABLA DE CONTENIDOS

JUSTIFICACIÓN 1

HIPÓTESIS DE TRABAJO 3

OBJETIVOS 5

4.1 Aspectos farmacogenéticos: 7

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA 7

4.2 Farmacogenética en glaucoma: 8

4.2.1 Betabloqueantes: 9

4.2.2 Análogos de prostaglandinas: 10

4.3 Estudio de genes candidatos en glaucoma: 12

4.4 Aspectos epidemiológicos: 13

4.5 farmacoeconomía y glaucoma: 13

4.6 Terapia farmacológica en glaucoma: 14

4.7 Mecanismo de acción del Latanoprost 16

4.7.1 Receptores prostanoides y receptor FP (PTGFR): 17

4.7.2 Receptor FP (PTGFR): 17

4.7.3 Mapping. 17

4.7.4 Características del receptor PTGFR:	17
4.8 Lugares de acción del Latanoprost:	18
4.8.1 Matriz extracelular (ECM):	18
4.8.2 Metaloproteinasas –MMPs:	19
4.8.3 Regulación de la actividad de MMPs (TIMPS (Tissue Inhibitors of metalloproteinases))	20
4.8.4 Acción del Latanoprost en la expresión del mRNA de MMPs y TIMPS en la malla trabecular (TM)	20
4.8.4.1 Acción de las MMPs en la malla trabecular:	21
4.8.4.2 Cambios moleculares en la malla trabecular en el glaucoma: TIMPs	22
4.8.5 Efecto del Latanoprost en la expresión de MMPs y TIMPs en el cuerpo ciliar	23
4.8.5.1 Substratos de las MMPs:	24
4.8.5.2 Regulación de la producción de MMPs:	25
4.8.6 Efecto del Latanoprost en la Protein-Kinasa-C (PKC):	25
4.8.7 Efectos en el recambio de la matriz extracelular:	26

4.8.8 Efectos en la expresión de TIMP-1 y -2 en el músculo ciliar:	27
4.8.9 Efectos en la expresión de TIMP-3:	28
4.8.10 Efectos del Latanoprost en la expresión de genes de metaloproteinasas en la esclera humana:	29
4.9 “ Mapping” de las MMPs involucradas en la degradación controlada de la ECM secundario a la activación de receptores FP por el Latanoprost:	30
4.9.1 MMP-1.	30
4.9.2 MMP-2	30
4.9.3 MMP-3 (stromelisina I)	31
4.9.4 MMP-9: (Colagenasa tipo IV-B)	31
4.9.5 MMP-17:	31
PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODO	33
5.1 Definición de respuesta positiva ó negativa al latanoprost:	33
5.2 Criterios de Inclusión para el grupo no respondedores (casos)	34
5.3 Criterios de inclusión para el grupo de respondedores positivos (controles):	35
5.4 Criterios de exclusión (para ambos grupos casos y controles):	35

TABLA DE CONTENIDOS

5.5 Recolección de muestras:	35
5.6 Procesamiento de las muestras	
Extracción del ADN:	36
5.7 Selección de genes candidatos:	38
5.8 Selección de SNPs	39
5.9 Genotipado de muestras:	40
5.10 Análisis estadístico:	42
5.10.1 Análisis preliminar:	42
5.10.1.1 Frecuencias genotípicas y alélicas:	42
5.10.1.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg:	42
5.10.1.3 Estructura de genotipos fallidos (“missing”)	44
5.10.1.4 Desequilibrio de ligamiento:	44
5.10.2 Asociación genotípica	45
5.10.2.1 Modelos de herencia	45
5.10.2.2 Selección del mejor modelo	47
5.10.3 Asociación alélica	48

5.10.4	Análisis de SNPs múltiples	49
5.10.4.1	Análisis de haplotipos	50
5.10.4.1.1	Estimación de las frecuencias haplotípicas	51
5.10.4.1.2	Asociación del haplotipo con la enfermedad. “Estadístico score”	51
5.10.4.1.3	Test “score” en sub-haplotipos	51
5.10.5	Comparaciones múltiples	51
5.10.5.1	Estrategia de comparaciones múltiples en un gen candidato	53
5.10.5.2	Estrategia de comparaciones múltiples en un conjunto de genes candidatos:	55
	RESULTADOS	57
6.1	Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas	58
	DISCUSIÓN	93
7.1	Limitaciones del presente estudio	93
7.1.1	Concepto de no respondedor	93
7.1.2	Número de sujetos enrolados en el estudio	99
7.1.3	Medición de la PIO	100
7.1.4	Otras causas de posibles falsas asociaciones: fenotipado y cumplimiento de la terapia	

TABLA DE CONTENIDOS

farmacológica	101
7.2 Alternativas al estudio genético realizado – GWAS	103
7.3 Tecnología de genotipado	104
7.4 Interpretación y discusión de los resultados	104
7.4.1 Variables	105
7.4.2 Modelos de herencia en asociación genotípica	105
7.4.3 Asociación alélica	107
7.4.4 Análisis de sub-haplotipos	108
7.4.4.1 Gen PTGFR	108
7.4.4.2 Gen de MMP-1	109
7.4.4.3: Genes MMP-2,-3,-9 y -17	109
7.4.5 Comparaciones múltiples	110
7.5 Comparación con otros estudios	110
7.6 Implicaciones clínicas y futuro de la línea de investigación	112
7.7 Conclusiones	114
BIBLIOGRAFÍA	116
ANEXO 1: Formulario para respondedor negativo	

Formulario de recolección de datos Proyecto Glaucoma 1	
Respondedor NEGATIVO a Latanoprost	129
ANEXOS	129
ANEXO 2 Formulario para respondedor positivo	131
ANEXO 3 : SNPs seleccionados para estudio	133
ANEXO 4: Modelo de consentimiento informado	134
ANEXO 5: Estimación de frecuencias alélicas y genotípicas, expresadas en porcentaje de cada SNP evaluado	140
ANEXO 6: Asociación genotípica para cada SNP evaluado	147
ANEXO 7: Modelos de herencia significativos	153
ANEXO 8: Asociación alélica	155
ANEXO 9: Gen PTGFR frecuencias y subhaplotipos	159
ANEXO 10 Gen MMP-1 frecuencias y estadístico score / subhaplotipos	165
ANEXO 11: MMP-2 frecuencias, estadístico score y subhaplotipos	168
ANEXO 12: Gen MMP-3, frecuencias estadístico score y subhaplotipos	169
ANEXO 13: Gen MMP-9 frecuencias, estadístico score y subhaplotipos	169
ANEXO 14: Gen MMP-17 frecuencias, estadístico score y subhaplotipos	170



La neuropatía óptica glaucomatosa es la segunda causa de ceguera a nivel mundial y se estima que para el año 2020 más de 80 millones de personas estarán afectadas por algún tipo de glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) ó cerrado (GAC) (Quigley 2006). En Europa, la incidencia del glaucoma en los mayores de 80 años es del 5% y se calcula que en países como Francia cerca de 500.000 personas padecen esta enfermedad existiendo además un número similar de casos sin diagnosticar dadas las características de esta patología de no presentar una sintomatología o ser difícilmente detectable por parte del paciente hasta estadios avanzados (Gray 2000, Traverso 2005).

En la actualidad, el único tratamiento eficaz para el GPAA es la reducción de la presión intraocular (PIO) mediante una terapia farmacológica o a través de procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, existen factores genéticos en cada individuo que influyen en la respuesta a un fármaco determinando incluso la falta de respuesta, en lo que se denomina resistencia. El estudio de esta asociación es la finalidad de la farmacogenética, disciplina relativamente reciente, con menos de 30 años de evolución (Zhou 2008). En el campo del glaucoma, los estudios de este tipo se han realizado únicamente con dos grupos farmacológicos: los beta-bloqueantes y los análogos de prostaglandinas ya que son los fármacos que abarcan un mayor porcentaje del mercado y se han constituido actualmente como los pilares iniciales del tratamiento farmacológico del glaucoma (Mossböck 2012).

Sakurai y colaboradores describieron en el año 2007 que la presencia de dos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) rs3753380 y rs3766355 en el gen del receptor para prostaglandina F2a (receptor FP), causaban una respuesta disminuida al Latanoprost en sujetos

japoneses sanos, pero de momento no existen resultados de este tipo en poblaciones caucásicas sanas o afectadas por glaucoma.

El presente trabajo trata sobre los aspectos farmacogenéticos que influyen en la respuesta hipotensora positiva al Latanoprost en una población de pacientes caucásicos afectados por el GPAA y además ofrece la posibilidad de validar los resultados obtenidos por el grupo de Sakurai y colaboradores, esta vez en una población caucásica lo cual proporcionaría mayor amplitud a sus hallazgos.

De otra parte, puede abrir las puertas al desarrollo, en un futuro cercano, de un kit de diagnóstico basado en el análisis genético de los polimorfismos involucrados en la falta de respuesta hipotensora al Latanoprost y así poder predecir de forma más ajustada la respuesta de un paciente ante este fármaco evitando que se inicie el tratamiento. De esa manera, el tener la posibilidad de determinar por adelantado la respuesta a uno de los medicamentos antiglaucomatosos más utilizados, supone un ahorro significativo a cualquier sistema sanitario, al evitar tratamientos ineficaces y de otra parte permitiría un mejor cuidado de los enfermos de glaucoma al disminuir la posibilidad de progresión de la enfermedad por un inadecuado control de su PIO.

Este enfoque terapéutico representaría un avance significativo en la forma de tratar a los pacientes, al generar una alternativa a que la terapia farmacológica para el glaucoma se base en la simple “prueba y error” de evaluación de la respuesta hipotensora a un determinado compuesto y se pueda predecir el fármaco que mejor se ajuste a cada caso.

2

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existe una evidencia científica, suficientemente contrastada de que las metaloproteinasas -1, -2, -3, -9 y -17 son las moléculas mediadoras en la respuesta hipotensora al Latanoprost (Xalatan® 0,005% - Pfizer), y que estas enzimas aumentan la permeabilidad a la salida del humor acuoso al actuar sobre la matriz extracelular del cuerpo ciliar y de la malla trabecular.

Con el planteamiento anterior, es posible que los polimorfismos genéticos de los genes que codifican éstas moléculas afecten la respuesta al Latanoprost de pacientes glaucomatosos e hipertensos oculares y que con su identificación se pueda predecir qué pacientes van a ser no respondedores a éstos fármacos.

3

OBJETIVOS

- 1** Determinar mediante una búsqueda bibliográfica los genes candidatos involucrados en el mecanismo de acción del Latanoprost y que puedan influir en la respuesta ante el tratamiento farmacológico.
- 2** Seleccionar entre los polimorfismos de los genes estudiados, los que representen mejor a cada gen de las MMPs y el receptor FP y que posiblemente están involucrados en la respuesta al Latanoprost.
- 3** Recolectar una muestra de pacientes con GPAA que incluya dos subgrupos, uno con una respuesta positiva y otro con una respuesta negativa al tratamiento con Latanoprost – según los criterios del *Latanoprost Study Group*.
- 4** Determinar si los polimorfismos genéticos de los genes que codifican las metaloproteinasas (MMPs) -1,-2,-3,-9 y -17 (que son las moléculas involucradas en la respuesta hipotensora del Latanoprost) están en relación con la respuesta positiva ó negativa al tratamiento con Latanoprost.

4.1 ASPECTOS FARMACOGENÉTICOS:

La respuesta a un fármaco está determinada por factores extrínsecos como la dieta, el consumo de alcohol ó nicotina y factores geográficos y además por factores intrínsecos como la edad, sexo, grupo étnico, estado de la enfermedad y el color del iris. Aunque también existen algunos factores modificables como el índice de masa corporal o la coexistencia de enfermedades sistémicas y oftalmológicas (*Liebler 2005*).

La primera publicación sobre la variabilidad en la respuesta a un fármaco de uso oftálmico se hizo en 1929 y fue relativo al efecto midriático de la cocaína, efedrina y agentes antimuscarínicos en ojos con iris poco pigmentados, comparados con iris altamente pigmentados.

La variabilidad en la respuesta al midriático fue atribuida inicialmente a diferencias étnicas ó a un receptor muscarínico “atípico” presente en los iris más pigmentados (*Chen 1929*).

Posteriormente se determinó que existe una fijación inespecífica del agente midriático a la melanina y por lo tanto a mayor contenido de melanina en los ojos existe una disminución de la biodisponibilidad de estos fármacos (*Salazar 1976*).

De otra parte, existen factores como la constitución genética de cada individuo, que influyen en la farmacocinética y farmacodinámica de una droga. La presencia de polimorfismos en los receptores de un fármaco y en las moléculas involucradas en su cascada metabólica, podrían incrementar ó atenuar los efectos de una droga, mientras que variantes en el metabolismo ó activación de determinadas enzimas pueden llevar a niveles aumentados ó disminuidos de un medicamento. Determinados alelos pueden variar entre diferentes poblaciones derivadas de un ancestro común y podían ser importantes para tratar a cada individuo.

Existen, por ejemplo, estudios que describen una menor eficacia del timolol en poblaciones

de origen africano (*Higgingbotham 2002, Netland 2001*)

El fin de la farmacogenética es el describir estos polimorfismos y su impacto en la reacción de cada individuo a una determinada droga. El estudio de la farmacogenética se inició hace 30 años y la *Food and Drug Administration* (FDA) tiene un listado de biomarcadores farmacogenéticos para más de 100 drogas, principalmente en medicamentos de uso en psiquiatría y oncología (*Mossbock 2012*).

La existencia de alelos activos o inactivos o alelos con actividad disminuida, pueden conducir a un metabolismo lento ó rápido de un fármaco (*Zhou 2008*). Estudios recientes han aportado evidencia de que el genotipo CFHY402H tiene un impacto significativo en la respuesta a la terapia anti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) y que los pacientes con el genotipo T/T o T/C presentan una mejoría de su agudeza visual (AV) en un 53% de los casos, comparados con una mejoría de la AV en un 10% de los pacientes con el genotipo C/C (*Lee 2009*).

4.2 FARMACOGENÉTICA EN GLAUCOMA:

La reducción de la presión intraocular (PIO) y la toxicidad de los fármacos antiglaucomatosos varía entre pacientes habiéndose reconocido sujetos respondedores y no respondedores. El término no respondedor no tiene una definición universal y por eso sus porcentajes entre la población de glaucomatosos son muy variables. La no respuesta al Latanoprost y al timolol se considera como una reducción de la PIO inferior al 20% de la PIO de base (*Camras 2003*). Algunos autores consideran que tras un periodo de tres meses de tratamiento, el porcentaje de no respondedores al Latanoprost es de un 18% y del 26% para el timolol, mientras que existen cifras de no respondedores tras un mes de tratamiento de

4.1% para población italiana (*Rosetti 2006*) y de un 13.5% para poblaciones de los Estados Unidos (*Netland 2001*). Con respecto a los demás fármacos hipotensores oculares (inhibidores de anhidrasa carbónica, alfa agonistas, parasimpático miméticos) los porcentajes de no respondedores son aún menos conocidos.

Los genes diana para estudios farmacogenéticos en el glaucoma, incluyen los receptores y las enzimas que se aceptan son activadas con los tratamientos. Hasta la fecha, solo se han realizado estudios en dos grupos farmacológicos: los betabloqueantes y los análogos de las prostaglandinas.

4.2.1 Betabloqueantes:

El efecto hipotensor de un betabloqueante está causado por la disminución de la producción del humor acuoso en el cuerpo ciliar, efecto mediado por receptores adrenérgicos β_1 y β_2 (*Wax 1987*).

El metabolismo del betabloqueante se lleva a cabo por oxidación de fase 1 por el citocromo P450 (CYP2D6) (*Volotinen 2007*). Los genes para estos dos receptores son el ADRB1 (receptor β_1) y el ADRB2 (receptor β_2).

El gen ADRB1 es un gen de exón único localizado en el cromosoma 10q25.3 que codifica una proteína de 477 aminoácidos. Se han descrito dos polimorfismos de nucleótido único (SNP) con consecuencias funcionales: rs1801253 y rs1801252. El SNP rs1801253 se ha descrito en el nucleótido 1165 resultando en una sustitución G-C y consecuentemente en una sustitución de la Argininina por Glicina en el codón 389 (G389R) (*Mason 1999*).

El polimorfismo rs1801252 ocurre en el nucleótido 145, resultando en una sustitución A-C

y lleva a una sustitución de la Serina por Glicina en el codón 49. Este SNP ha sido asociado a una disminución de la expresión del receptor, promovida por el agonista (*Levin 2002*).

Al igual que el gen del receptor $\alpha 1$, el ADRB2 es un gen de exón único localizado en el cromosoma 8p12 y codifica una proteína de 413 aminoácidos. Tiene dos SNPs funcionales: rs1042713, que es una sustitución de G por A en el nucleótido 46, lo que resulta en una sustitución de Arginina por Glicina en el codón 16 (G16R) y se relaciona con una hiporegulación del receptor (*Mc Carthy 2008*). El segundo SNP, rs1042714 es una sustitución de G por C en la posición 179 que lleva a sustitución de un ácido Glutámico por Glutamina (E27Q) y genera una alteración de la función del receptor (*Nieminen 2005*).

La enzima CYP2D6 es una de las principales del hígado humano, su gen está localizado en el cromosoma 22q13.2 y contiene nueve exones que codifican una proteína de 469 aminoácidos, habiéndose descrito más de 100 isoformas de esta enzima. Se han estudiado dos SNPs: rs16947 y rs1135840 sin encontrarse asociación entre estos SNPs y la respuesta hipotensora en 123 pacientes con GPAA, pero el genotipo CC del rs16947 disminuye el riesgo de bradicardia inducida por el timolol (*Yuan 2010*).

4.2.2 Análogos de prostaglandinas:

Los análogos de prostaglandinas ejercen su efecto hipotensor vía el receptor F2a (Receptor FP). Por lo tanto, variantes genéticas de su respectivo gen (PTGFR) explicarían la variabilidad de la respuesta de la PIO a estos fármacos. Sakurai et al. han evaluado 10 SNPs del PTGFR tras determinar la respuesta a un tratamiento de siete días con Latanoprost en 100 voluntarios sanos. Se obtuvo una disminución promedio de la PIO del 18.1% , con un 19% de no respondedores, definidos como una disminución de la PIO menor del 10%

de la PIO base. Dos SNPs estaban correlacionados de forma significativa con la reducción de la PIO: el rs3753380 localizado en la región promotora y el rs3766355. Un análisis de promotor, reveló una actividad transcripcional reducida para el alelo C del SNP rs3766355 y el alelo T del rs3753380. Los autores investigaron el impacto de estos polimorfismos en las proteínas involucradas en la cascada metabólica de las prostaglandinas (transportador de prostaglandinas, proteína regulatoria del receptor FP y metaloproteinasas de matriz) sin encontrar una correlación significativa.

Como resumen, se puede decir que aunque la farmacogenética tiene el potencial de guiar al clínico hacia una medicina más personalizada, hasta la fecha y a pesar de diversos estudios con resultados positivos, solo unos pocos tests farmacogenéticos han sido incluidos en la práctica clínica, principalmente por razones económicas. Los resultados de estudios farmacogenéticos de la terapia antiglaucomatosa han aportado evidencia de la implicación de diferentes SNPs en la respuesta de la PIO y los efectos adversos producidos por el tratamiento, pero existen limitaciones como los tamaños muestrales pequeños, diseños retrospectivos y ausencia de estudios de validación que son el principal problema antes de poner en marcha el uso de este tipo de tests en la práctica clínica. Además, los tests farmacogenéticos deben probar su utilidad con respecto a su repercusión socioeconómica (*Chalkidou 2011*).

Existen varias compañías que realizan tests genómicos personalizados como son: *23andme*, *deCODEme*, *Navigenics*, *Knome* que están ampliando de forma constante su rango de SNPs y han incluido genes candidatos como el *ADRB1*. No obstante, la interpretación de estos resultados aún continúa siendo incierta. Para lograr resultados robustos con interpretaciones correctas, sería necesario realizar estudios prospectivos a gran escala que incluyeran un número suficiente de participantes y realizar un fenotipado adecuado respecto a la respuesta

de la PIO ante la terapia antiglaucomatosa.

4.3 ESTUDIO DE GENES CANDIDATOS EN GLAUCOMA:

Los genes candidatos relevantes a la terapia antiglaucomatosa incluyen cuatro grupos (McLaren 2003):

Dianas de tratamiento antiglaucomatoso:

Receptores adrenérgicos: $\beta_1, \beta_2, \alpha_2A, \alpha_2B, \alpha_2C$; receptor de prostaglandina F, transportador de prostaglandina, anhidrasa cardónica tipos I-IV y receptores muscarínicos.

Vías de la cascada metabólica:

Proteína G (subunidades α, β, γ), adenilato ciclasas, guanilato ciclasa, fosfolipasa C, protein quinasa, óxido nítrico sintetasa tipos 1 y 3) y canales iónicos.

Enzimas metabolizadoras de drogas:

Citocromo P450 tipo 2D6 y esterases del epitelio de la córnea

Genes relacionados con el glaucoma:

TIGR (*trabecular meshwork-induced glucocorticoid response protein*), optineurina, citocromo P450 1B1, PAX62 (*paired box gene 6*), FOXC1 (*Fork head box C1*), PITX2 (*paired-like homeo domain transcription factor 2*), LOXL1 (*Lysyl Oxidase like 1*).

La caracterización de la expresión de estos genes dentro de los tejidos oculares es un paso fundamental antes de seguir con la identificación de los SNPs de los mismos.

4.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS:

En España, la prevalencia global del GPAA es del 2.1% de la población siendo más frecuente en hombres (2.4%) que en mujeres (1.7%). Esta prevalencia se incrementa con la edad y pasa de 0.01% en la quinta década de la vida a 3.7% en los mayores de 70 años de edad. Por último, el riesgo de desarrollar glaucoma es 2.3 veces mayor para los individuos mayores de 60 años (*Antón 2004*). En el año 2000, un estudio realizado en el Reino Unido, reveló que la prevalencia del GPAA era del 5% en los mayores de 80 años (*Gray 2000*); en Alemania se considera al glaucoma como la tercera causa de ceguera bilateral e irreversible y en Francia cerca de 500.000 pacientes se encuentran en tratamiento por esta patología y se estima que un número similar de casos se encuentran sin diagnosticar (*Traverso 2005*).

Algunos estudios retrospectivos realizados sobre poblaciones blancas de Finlandia y los Estados Unidos, indican que el riesgo de desarrollar ceguera por GPAA es considerable; se estima que tras 20 años de seguimiento desde el momento del diagnóstico existe un 26-27% de posibilidad de desarrollar ceguera unilateral y entre un 6 a un 9% de ceguera bilateral, aún con tratamiento farmacológico o quirúrgico (*Hattenbauer 1998, Forsman 2007*).

4.5 FARMACOECONOMÍA Y GLAUCOMA:

En los Estados Unidos, se ha estimado que el coste sanitario relacionado con el glaucoma es de \$2.5 billones de dólares en gastos directos y de \$0.6 billones en gastos indirectos (*Glick 1994*) y existen datos que indican que los costes directos de la enfermedad aumentan con la gravedad de la misma (*Iskedijian JOG 2003*).

En Europa, un estudio realizado en Austria, Francia, Alemania, Italia y el Reino Unido comprueba esta presunción; encontrando que según avanza el estadio de la enfermedad, la

utilización de recursos y los gastos médicos directos se incrementan de forma lineal (utilizando la clasificación de cinco estadios de severidad del glaucoma de Hodapp-Parrish-Anderson / Bascom Palmer Glaucoma Staging System - *Hodapp 1993*). Este estudio incluye los gastos en los que se incurren por visitas al oftalmólogo, pruebas estructurales y funcionales, cirugía y tratamiento farmacológico. Los resultados muestran que los costes directos de tratamiento por persona /año en Europa son de 455 € para el estadio más bajo y de 969 € para el estadio más avanzado. Se considera que el tratamiento farmacológico representa como mínimo el 42% de los costes directos en cualquier estadio de la enfermedad (*Traverso 2005*).

De otra parte, existen estudios de costes indirectos de tipo no médico derivados de la discapacidad visual generada por el glaucoma y la degeneración macular relacionada con la edad y en Europa. Estos gastos anuales fluctúan entre 10.750 millones de €/año en Francia hasta 15.180 millones de €/año en el Reino Unido. En estos gastos no médicos se incluyen el cuidado institucional, las obras de adaptación en los edificios públicos y residencias privadas, las subvenciones y la pérdida de productividad en la carrera profesional de cada individuo afectado por estas patologías (*Lafuma 2006*). Aunque estos gastos pudieran parecer desorbitados, resultan congruentes si se consideran otras patologías crónicas como la diabetes mellitus donde se estima que en los Estados Unidos \$1 de cada \$5 dólares del presupuesto sanitario se gasta en cuidar a alguien con diabetes mellitus y el coste total de esta patología en el año 2007 fue de \$174.000 millones de dólares, de los cuales \$58.000 millones corresponden a disminución de la productividad profesional (*American Diabetes Association 2008*).

4.6 TERAPIA FARMACOLÓGICA EN GLAUCOMA:

Hasta el momento el único tratamiento eficaz en el GPAA es la reducción de la presión intra-ocular (PIO), ya sea con terapia farmacológica o por procedimientos quirúrgicos. En las últimas dos décadas se han comercializado nuevos fármacos para el tratamiento del glaucoma, tales como: agonistas α_2 (Brimonidina), inhibidores tópicos de la anhidrasa carbónica (Dorzolamida y Brinzolamida), análogos de prostaglandinas (Latanoprost y Travoprost) y prostanoides (Bimatoprost). El Latanoprost (Xalatan® 0,005% - Pfizer Laboratories), es un análogo de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, ampliamente utilizado en el tratamiento del glaucoma y la hipertensión ocular y ha sido aceptado como primera línea de tratamiento farmacológico por la Sociedad Europea de Glaucoma (*European Glaucoma Society Guidelines 2003*).

Sin embargo, se sabe que hay un grupo de pacientes que no responden a la terapia con este fármaco. Este grupo puede ser de entre un 5.4% - si no hay una reducción de la PIO basal mayor del 15%- (*Aung 2001*) a un 25% - si se considera una reducción de la PIO < 20% de la PIO basal- de los glaucomatosos sometidos a tratamiento (*Scherer 2002*).

El Latanoprost es un agonista altamente selectivo de los receptores para la prostaglandina $F_{2\alpha}$ (receptores FP). Este receptor se expresa en el epitelio corneal, el epitelio ciliar, la porción circular del músculo ciliar, el estroma y las células musculares lisas del iris (*Schlötzer IOVS 2002*).

Recientemente, Sakurai et al, han determinado que la respuesta de reducción de la PIO en voluntarios sanos, ante el tratamiento con Latanoprost está influenciada por la presencia de determinados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) en las regiones promotoras y en el intron 1 del gen del receptor FP, SNPs: rs3753380 y rs3766355 (*Sakurai 2007*), donde la

presencia del alelo C de rs-3766355 y el alelo T de rs3753380 pueden causar una respuesta disminuida al Latanoprost por una hiporegulación de la expresión del gen del receptor FP.

Otro estudio en una población malaya con GPAA ha identificado un nuevo SNP en el gen del receptor FP. Este SNP: IVS2-97A>T, es más frecuente en los pacientes con GPAA de Malasia. Igualmente, éste SNP podría también influir en la respuesta al Latanoprost y está siendo objeto de estudio (*Peng 2007*).

4.7 MECANISMO DE ACCIÓN DEL LATANOPROST

La molécula de Latanoprost (Xalatan® 0,005%) es un análogo sintético fenil-substituido de la prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ -isopropilester que ha demostrado ser eficaz en la reducción de la PIO en ojos de sujetos normales, hipertensos oculares y glaucomatosos (*Nagasubramanian 1993, Alm 1993*)

La acción hipotensora del Latanoprost y la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) se atribuye a un incremento en la salida de humor acuoso por la vía uveo-escleral mediado por receptores para la prostaglandina F (receptores FP).

El Latanoprost incrementa la salida del humor acuoso por la vía uveo-escleral hasta en un 60%. Puede también tener un efecto en la vía trabecular y se acepta que los análogos de $PGF_{2\alpha}$ causan una disminución de la matriz extracelular (ECM) alrededor de las células del músculo liso ciliar después de 4 a 8 días de tratamiento, mecanismo por el cual ejercen su efecto (*Richter 2003*).

El aumento de la permeabilidad de la vía uveo-escleral se ha asociado con diversos cambios en el músculo ciliar, incluyendo la expansión de los espacios extracelulares, la reducción del colágeno (*Sagara 1999*) y el aumento de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (*Oc-*

klind 1998, Weinreb 2002).

Las MMPs son proteínas de tipo enzima que degradan de forma específica las moléculas de la matriz extracelular (ECM). Pueden iniciar la degradación de colágeno y otras moléculas dentro de la ECM del músculo ciliar. Después del clivaje, los fragmentos de colágeno que resultan del proceso se desdoblán a la temperatura corporal y son degradados por las MMPs y por proteasas extracelulares no específicas ó por enzimas lisosomales después de la fagocitosis de los fragmentos (*Lindsey 1997*).

4.7.1 Receptores prostanoides y receptor FP (PTGFR):

Existen varios receptores prostanoides, en el humano, que se han caracterizado molecularmente: el receptor de tromboxano (TP), el receptor de prostaglandina F (FP) y cuatro clases de receptores para prostaglandina E (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄)

4.7.2 Receptor FP (PTGFR):

La prostaglandina F_{2α} está involucrada en diferentes procesos fisiológicos. Es un agente luteolítico potente en varias especies. Además se encuentra implicada en la regulación de la PIO y es importante para la contracción del músculo liso del útero y otros órganos.

4.7.3 Mapping.

El gen PTGFR se encuentra en la posición **1p31.1** y consiste en tres exones que abarcan 10Kb del DNA genómico, siendo el primer exon no codificador (*Duncan 1995*).

4.7.4 Características del receptor PTGFR:

El receptor humano FP es una proteína formada por 359 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 40.600 y posee siete dominios putativos transmembrana, característicos

de los receptores acoplados a la proteína-G (*Abramovitz 1994*).

El receptor FP fue clonado , en oocitos de *Xenopus laevis* y sus secuencias de aminoácidos y características de ligandos han sido descritas por Abramovitz (*Abramovitz 1994*).

El receptor FP comparte un 39% de identidad con los receptores TP y EP₁ humanos y en el ratón, con un 35 y 26% con receptores EP₂ y EP₃ respectivamente. La identidad de aminoácidos está restringida principalmente a los dominios trans-membrana (TMDs), especialmente el VII –que es el más conservado- con el dominio V que es el menos conservado.

El receptor FP comparte un número de características generales comunes a todos los sistemas de receptores acoplados a proteína-G, los cuales se piensan son importantes para definir la topografía y la función de esta superfamilia. Hay 15 aminoácidos altamente conservados en estos receptores ligados a proteínas-G dentro de los TMDs y 10 de ellos están conservados en el receptor FP. Estos incluyen 3 de los 4 residuos de prolina (Pro-170, Pro-264 y Pro-301) en los TMDs IV, VI y VII, los cuales pueden estar involucrados en la formación del espacio para el ligando (*Probst 1992*).

4.8 LUGARES DE ACCIÓN DEL LATANOPROST:

4.8.1 Matriz extracelular (ECM):

El músculo ciliar se compone de haces de fibras musculares lisas embebidas en tejido conectivo. La expresión de este tejido conectivo es escasa en la parte longitudinal del músculo ciliar y más abundante en las zonas radiales y circulares del mismo (*Ishikawa 1962*).

Los principales componentes de la ECM del músculo ciliar son los colágenos tipo I, III, IV y VI, la laminina, la fibronectina y la elastina (*Oklind 1998*).

Los colágenos I y II son proteínas fibrilares que sirven como andamiaje a la estructura móvil. El colágeno IV y la glicoproteína laminina tienen papeles estructurales y funcionales en la lámina basal del músculo ciliar. El colágeno VI es parte de los filamentos globulares del estroma del tejido conectivo y puede actuar como proteína de unión entre los diferentes elementos de la ECM. La fibronectina es una glicoproteína multifuncional en el estroma del tejido conectivo y la lámina externa que envuelve los haces musculares lisos.

4.8.2 Metaloproteinasas –MMPs:

La ECM es un sistema con una biosíntesis y degradación lenta y continua de todos sus componentes. Este proceso de degradación es mediado por las metaloproteinasas (MMPs) secretadas en la matriz extracelular y en menor grado por serina-proteinasas (*Lindsey 1997*).

Las MMPs son una familia de enzimas del tipo endopeptidasas, zinc-dependientes que colectivamente son capaces de degradar todos los componentes de la ECM (*Oh 2006*).

Clases de MMPs:

Existen 21 MMPs humanas que se clasifican en cinco subfamilias dependiendo de su estructura primaria, especificidad de sustrato y localización celular:

- Colagenasas: MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18
- Gelatinasas: MMP-2 y MMP-9
- Estromelisininas: MMP-3, MMP-10 y MMP-11
- MMPs del tipo de membrana (MT)-MMPs: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24

- Misceláneas: MMP-7, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23 y los Inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs)

La actividad proteolítica de las MMPs es controlada perfectamente por tres vías: durante la activación de sus precursores e inhibidores endógenos, α -Macroglobulinas y TIMPS.

4.8.3 Regulación de la actividad de MMPs (TIMPS (Tissue Inhibitors of metalloproteinases))

Los TIMPs son inhibidores de tisulares de la actividad enzimática de las MMPs y en algunos casos se encargan de la activación de las MMPs desde su forma de zimógeno inactivo a la forma activa. Además, los TIMPs son proteínas multifuncionales con modulación de la angiogénesis, invasión celular, génesis tumoral y la producción de metástasis (*Butler 1997, 1998*).

Se han identificado cuatro TIMPs en los mamíferos. Poseen un peso molecular de 21-30 Kda. Todos los TIMPs pueden inhibir todas las MMPs conocidas, aunque el TIMP-1 tiene una acción escasa sobre las MMP-14, -15, -16, -19 y -24 (*Baker 2002*).

Las MMPs pueden ser reguladas durante la transcripción, translación, activación y por inhibición en su lugar de acción, por las TIMPs. Para la mayoría de las MMPs – excepto la MMP-2 – los mecanismos predominantes son: regulación transcripcional e inhibición cinética por TIMPs (*Nagase 1999*).

4.8.4 Acción del Latanoprost en la expresión del mRNA de MMPs y TIMPS en la malla trabecular (TM)

En la TM se han detectado la presencia de mRNA y proteína de MMP-1, -2, -3, -9 y -14; al igual que TIMPs-1 y -2. Igualmente se ha encontrado la proteína, pero no el mRNA de

TIMP-3 y -4 (*Alexander 1991*).

A nivel de mRNA, las células trabeculares expresan las mismas 11 MMPs y los 4 TIMPs de las células musculares lisas del cuerpo ciliar (CBSM). Se han encontrado niveles relativos más bajos de mRNA para MMP-1, -11 y -24 en el trabéculo que en células CBSM. Sin embargo, la expresión de TIMP-3 fue mayor en el trabéculo. En general, las células trabeculares expresan menos MMPs y más TIMPs que las células CBSM (*Oh 2006*).

Hasta hace poco se pensaba que el efecto del Latanoprost se basaba exclusivamente en un incremento de la vía uveo-escleral de salida del humor acuoso, pero las células trabeculares producen PGE₂ y PGF_{2α} que también pueden influir en la regulación de la dinámica del humor acuoso. Así pues, la activación de los receptores FP puede jugar un papel importante en la regulación de la PIO, promoviendo también la vía de eflujo convencional del humor acuoso (*Sharif 2003*).

En cultivos de células trabeculares se ha comprobado que la adición de dosis farmacológicas de Latanoprost (0,3-30 µg/ml) incrementan la expresión de MMP-1, -3, -17 y -24, y la disminución de MMP-11 y -15 (*Oh 2006*).

4.8.4.1 Acción de las MMPs en la malla trabecular:

La MMP-1 es un potente modulador de la degradación de la ECM con una amplia especificidad de sustratos (*Nagase 1999*). La MMP-3 disminuye la resistencia al flujo del humor acuoso ante el estímulo de la trabeculoplastia con láser de Argon (*Pang 2003*). La MMP-17 activa la Agrecanasa-1 que a su vez degrada glicosaminoglicanos aumentando por tanto, la degradación de la ECM, además la MMP-17 activa la molécula pro-MMP-2 aumentando la degradación de la ECM (*Oh 2006*).

4.8.4.2 Cambios moleculares en la malla trabecular en el glaucoma: TIMPs

La actividad degradatoria de la ECM, estimulada por el Latanoprost no se acompaña de un cambio ultraestructural intenso, posiblemente por la elevación simultánea de TIMPs. La TIMP-3 es la única de las 4 TIMPs que es secuestrada en la ECM por proteoglicanos que contienen heparan-sulfato y posiblemente condroitín sulfato. En el glaucoma hay una desviación en las cadenas laterales de los proteoglicanos hacia condroitín sulfato.

Con el proceso de envejecimiento, las células trabeculares y la lámina cribosa del ojo humano sufren una disminución de la concentración del ácido hialurónico en la ECM y existen teorías que afirman que el glaucoma primario de ángulo abierto podría manifestarse cuando se alcanza un nivel crítico de disminución de esa concentración de ácido hialurónico en la malla trabecular (TM) y la lámina cribosa, mientras que la hipertensión ocular podría ocurrir al disminuir el ácido hialurónico en la malla trabecular únicamente y el glaucoma de baja tensión podría asociarse con una disminución del ácido hialurónico que afecte solo a la lámina cribosa (*Knepper 1996*).

De otra parte, ante el tratamiento farmacológico con Latanoprost, se produce un aumento en el mRNA de TIMPs-2,-3,-4 que sería el responsable del equilibrio del incremento de las MMPs inducido por el Latanoprost. A diferencia de las células de CBSM donde la relación de MMPs respecto a los TIMPs es mayor, con predominio de la acción de las MMPs, en la TM es posible que este equilibrio esté a favor de las TIMPs con menor cambio ultraestructural, pero con un posible aumento de la facilidad de salida del humor acuoso, aunque se requieren más estudios para determinar la relación precisa MMPs- TIMPs (*Oh 2006*)

4.8.5 Efecto del Latanoprost en la expresión de MMPs y TIMPs en el cuerpo ciliar

En el cuerpo ciliar se han descrito cinco MMPs (MMP-1, -2, -3, -9 y -14) y tres TIMPs (TIMP-1, -2, -3), pero en solo cuatro de las MMPs (MMPs-1, -2, -3, -9) y dos TIMPs (TIMP-1 y -2) se ha estudiado y comprobado su acción con respecto al Latanoprost (*Weinreb 1997, Ocklind 1998*)

El papel de los TIMPs en la respuesta de las células CBSM frente al Latanoprost es aún en gran parte desconocido. El examen de las regiones promotoras de los genes de MMPs y TIMPs ha identificado la activación de los dominios de proteína (AP)-1 en ambos promotores sugiriendo que puedan estar regulados por mecanismos similares (*Anthony 2002*). La molécula de $\text{PGF}_{2\alpha}$ induce activadores de la AP-1 como el C-Fos y C-Jun en cultivos de células humanas de músculo ciliar (*Lindsey 1994*)

La exposición de las células del músculo ciliar al Latanoprost aumenta la transcripción de mRNA de MMP-1, -3 y -9; observándose una variación en la intensidad de la respuesta entre las diferentes líneas celulares de músculo ciliar derivadas de distintos globos oculares donantes (*Weinreb 2002*).

Recientemente, Oh y cols, encontraron que las principales MMPs involucradas en la regulación de la ECM como respuesta al Latanoprost son las MMP-3, -9 y -17 (*Oh 2006*). Igualmente han descrito variaciones en la respuesta al Latanoprost en los diferentes cultivos celulares y que pueden corresponder con aquellos pacientes no respondedores al tratamiento con Latanoprost (hasta un 20%) y que podría estar en un nivel diferente al transcripcional en el cuerpo ciliar (*Camras 2003*).

4.8.5.1 Substratos de las MMPs:

Las MMPs son secretadas como pro-enzimas inactivas y convertidas a enzimas activas extracelularmente. En cultivos de células CBSM tratadas con prostaglandinas se encuentra un aumento en la concentración de pro-MMP-1 y pro-MMP-3 (*Lindsey 1997*).

La MMP-1 degrada colágenos fibrilares como el colágeno tipo I y III. La MMP-3 degrada colágenos tipo III y IV. El colágeno de tipo I y de tipo III se encuentra en la matriz estromal, entre los haces musculares, mientras que el colágeno tipo IV se encuentra en la membrana basal de forma adyacente a las fibras del músculo ciliar (*Lindsey 1997*).

Cada una de las MMPs realiza un clivaje de forma específica para cierto tipos de secuencias peptídicas en determinadas macromoléculas de la ECM.

MMP-1 cliva un lugar único en las cadenas de colágeno tipo I α 1 y I α 2, al igual que las cadenas homotípicas de colágeno tipo III. MMP-3 cliva lugares en los colágenos tipo III, IV, V y IX al igual que en la fibronectina y la laminina. MMP-9 cliva lugares en colágeno tipo IV y V. MMP-2 cliva lugares en los colágenos IV, V, VII y X (*Weinreb 1997*).

Tras la administración de Latanoprost a células CBSM se observa un cambio en la organización estructural de los colágenos tipo I, III y IV, que ha sido determinado mediante estudios inmuno-citoquímicos que muestran una reducción de la matriz estromal del músculo ciliar y por lo tanto se reduciría la resistencia al flujo del humor acuoso por esta vía (*Lindsey 1997*). Existen varios reguladores de esta activación de los pro-MMPs como son: activadores del plasminógeno de tipo tisular y tipo urokinasa, inhibidor de la α 1-Proteasa, α 2 macroglobulina, y TIMPS (*Lindsey 1997*).

4.8.5.2 Regulación de la producción de MMPs:

La producción coordinada de MMP-1,-2,-3 y -9 no se produce al azar ya que cada una tiene un elemento regulador AP-1 en sus promotores. Este elemento regulador promueve la transcripción cuando se liga a un complejo heterodimérico regulador que contiene proteínas de la familia c-Fos y c-Jun. Se ha demostrado que la exposición al Latanoprost induce una expresión del c-Fos. (*Lindsey 1994*). Estos resultados reafirman la hipótesis que la inducción de MMPs por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ está mediada por una activación del AP-1 (*Weinreb 1997*).

Varios factores pueden contribuir a la modulación *in vivo* de la activación de factores pro-MMP: en el humor acuoso se ha detectado el factor activador de la urokinasa del plasminógeno que puede a su vez activar factores pro-MMPs y la actividad de las MMPs puede ser bloqueada por su unión permanente con TIMPs (*Bernatchez 1992, Weinreb 1997*).

4.8.6 Efecto del Latanoprost en la Protein-Kinasa-C (PKC):

El Latanoprost es un potente activador del receptor FP. La activación de este receptor estimula varias vías de señales intra-celulares incluyendo la formación de inositol-fosfato, la liberación de calcio intracelular y la activación de PKC. (*Abramovitz 1994*). Ya se ha demostrado la implicación de la PKC en la regulación transcripcional de MMPs y TIMPs en varios tejidos (*Díaz-Meco 1991*)

También se ha demostrado que la estimulación de células del cuerpo lúteo bovino con $\text{PGF}_{2\alpha}$ induce la expresión de c-Fos por medio de una vía dependiente de la protein kinasa-C (*Chen 2001*)

La transcripción de mRNA de TIMP-1 se incrementa en un 37% después de la administra-

ción de Latanoprost en células CBSM al parecer vía activación de la PKC (*Anthony 2002*)

4.8.7 Efectos en el recambio de la matriz extracelular:

En los tejidos, el recambio de la ECM que ocurre durante el desarrollo, morfogénesis y cicatrización del tejido conectivo, se produce por la liberación de MMPs que se acompaña de una liberación de TIMPs. En otros procesos como el cáncer y la artritis, la liberación de MMPs ocurre sin una contra-regulación de TIMPs conlleva a una degradación excesiva y desordenada de la ECM (*Nagase 1999*).

En experimentos 'in vivo' realizados con monos *Cynomolgus* adultos se observó que la exposición al Latanoprost a dosis terapéuticas aumenta la concentración de MMP-1,-2 y -3 en los tejidos involucrados en la vía de salida uveo-escleral del humor acuoso (*Gaton 2001*).

El análisis histológico de CBSM del mono tras la exposición a dosis terapéuticas de Latanoprost mostró que la organización estructural permanece intacta después de diez días de tratamiento (*Ocklind 1998*), aunque existan reducciones en las concentraciones de colágeno tipo I, III y IV; fibronectina y laminina. La inducción de TIMP-1 que es un potente inhibidor de MMP-2, sugiere que los cambios en la ECM tras el tratamiento con Latanoprost son más del tipo de remodelación ordenada producida durante el desarrollo, morfogénesis y cicatrización.

Recientemente, se ha demostrado (en cultivos de células CBSM humanas) un incremento selectivo en el mRNA de MMP-3 y MMP-17 tras la exposición al Latanoprost, por lo que se piensa que estas dos enzimas están involucradas en el aumento de la degradación de la ECM inducida por el Latanoprost. La MMP-3 de la malla trabecular, está involucrada en la disminución de la resistencia al flujo del humor acuoso cuando se realizan tratamientos

focales con láser Argon y tert-butilhidroquinona (*Ob 2006*).

Poco se conoce de la acción de la MMP-17. Mediante su asociación con una de las formas del heparan sulfato de la superficie celular, el sindecan-1, activa la agrecanasa-1 (molécula también conocida como ADAMTS-4: *A dissintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) la cual es una enzima capaz de degradar los glicosamino-glicanos y su regulación se asocia con un aumento en la degradación de la ECM y es posible que por este mecanismo se aumente el recambio de la ECM asociado al Latanoprost. Además, la MMP-17 puede activar el TNF- α (*Flannery 2002*)

4.8.8 Efectos en la expresión de TIMP-1 y -2 en el músculo ciliar:

La exposición al Latanoprost induce en las células CBSM un incremento en el mRNA y proteína de TIMP-1 que es dosis y tiempo-dependiente. En contraste, el incremento en mRNA y proteína de TIMP-2 es insignificante. Además, el tiempo de inducción de TIMP-1 es similar al tiempo de la inducción de MMP-1 y -2, lo que sugiere que el Latanoprost induce TIMP-1, MMP-1 y -2 de una forma coordinada. Existen evidencias indirectas que sugieren ciertas similitudes entre las regiones promotoras de los genes de MMP-1, MMP-2 y TIMP-1 que puedan ser la base de una inducción coordinada de estas proteínas en las células tratadas con Latanoprost (*Anthony 2002*).

Primero, las secuencias promotoras de los genes de MMP y TIMP contienen varios elementos comunes esenciales para la activación transcripcional basal e inducida, incluyendo numerosos lugares AP-1 (que se ligan a c-Fos y c-Jun) y lugares PEA-3 (que se ligan a factores de transcripción Ets) (*Anthony 2002*).

Segundo, el tratamiento de las células CBSM con $\text{PGF}_{2\alpha}$ induce una expresión transitoria de la proteína nuclear reguladora c-Fos. La inducción de c-Fos ha sido relacionada con la inducción de MMPs y TIMP-1 en otros sistemas celulares. (*Anthony 2002*).

Tercero, varios estudios in-vitro demuestran que la transcripción de los genes MMPs y TIMPs se inducen de forma similar por señales extracelulares como: factores de crecimiento, citokinas inflamatorias y *phorbol esters* (que son compuestos promotores tumorales y activadores de los linfocitos T derivados del aceite del piñón de Indias – *Croton tiglium*) (*Clark 1997*).

4.8.9 Efectos en la expresión de TIMP-3:

Ante la exposición al Latanoprost se incrementa de forma consistente la expresión del mRNA de TIMP-3, cuyas funciones son en principio inhibitorias lo cual puede ser parte de una reacción regulatoria para equilibrar el incremento de las MMPs causado por el Latanoprost. Sin embargo, este aumento puede a la vez facilitar la activación de zimógenos ya que TIMP-3 puede ligarse a pro-MMP-9 (*Baker 2002*)

Los efectos principales del TIMP-3 son:

- Es un potente inhibidor de la enzima convertidora de $\text{TNF-}\alpha$ (TACE) y de MMPs, ADAMS y ADAMTS.
- Puede estar involucrado en la repuesta aguda de la remodelación tisular y regular la remodelación de la ECM durante la pérdida de epitelios.

4.8.10 Efectos del Latanoprost en la expresión de

genes de metaloproteinasas en la esclera humana:

Los efectos ya descritos del Latanoprost en el cuerpo ciliar que conducen a un aumento de la salida del humor acuoso por la vía uveo-escleral, incluyen una disminución del colágeno fibrilar (*Sagara 1999*) y un aumento de las MMPs -1,-2 y -3 en el cuerpo ciliar y la esclera (*Gaton 2001*). Es posible que la reducción de colágeno en la esclera, mediada por las MMPs, aumente la permeabilidad transescleral a grandes moléculas y facilite así su salida (*Lindsey 1997*). Estos cambios pueden reflejar respuestas directas de la esclera a las prostaglandinas ya que se han detectado receptores FP , EP(1) y EP(2) en la esclera humana (*Anthony 2001*). Adicionalmente, la incubación de fragmentos de esclera humana con Latanoprost incrementó la concentración de MMPs -1,-2 y -3, favoreciendo al mismo tiempo la permeabilidad a través de estos fragmentos esclerales (*Kim 2001*). Sin embargo, el aumento en la liberación de MMPs no siempre se asocia con una mayor transcripción del gen (*Nagase 1999*). Por ejemplo, el tratamiento con prostaglandinas a células CBSM aumentó la liberación de MMP-1, -2 y -3 y del mRNA de MMP-1 y MMP-3, sin cambiar el m-RNA de MMP-2.

La exposición de fragmentos de esclera a concentraciones de 100 nM de Latanoprost, se tradujo en un incremento del mRNA de las MMP-1,-3,-8,-10 y 12, mientras que el m-RNA de MMP-2 se mantuvo estable, al igual que lo observado en las células de músculo ciliar. Además se observó una inducción de TIMP-1,-2 y -3 que sugiere la importancia de estas moléculas en la contra-regulación de la actividad de MMPs en la esclera humana (*Weinreb 2004*). En este estudio se observó una gran variabilidad en la respuesta de todos los tipos de mRNA de MMPs examinados y que puede representar una variabilidad genética, que estaría soportada por el hecho de que en pacientes tratados con Latanoprost durante

seis meses, la probabilidad de lograr una reducción de la PIO de un 10%, 20% o >30%, fue del 89%, 73% y 35% respectivamente (*Camras 2003*). Es posible que la variación en la inducción de la transcripción del gene de MMP sea importante para la respuesta sobre la PIO (*Weinreb 2004*).

4.9 “ MAPPING” DE LAS MMPS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN CONTROLADA DE LA ECM SECUNDARIO A LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES FP POR EL LATANOPROST:

4.9.1 MMP-1.

El gen que codifica para la MMP-1 (colagenasa) se encuentra en el cromosoma 11: posición: 11q22-q23 (*Gerhard 1987*). La colagenasa es la única enzima capaz de degradar colágenos intersticiales tipo I, II y III. El hecho que estos colágenos sean las proteínas más abundantes en el cuerpo humano significa que la colagenasa juega un papel clave en la remodelación tisular constante tanto de los tejidos normales como enfermos.

4.9.2 MMP-2

El gen que codifica esta proteína MMP-2 (gelatinasa ó colagenasa tipo IV-A) de 72-kD, se ha localizado en el cromosoma 16, en la posición: 16q13.

Este gen tiene una longitud de 17kb con 13 exones que varían en tamaño de 110 a 901 bp y 12 intrones de 175 a 4350 bp. El alineamiento de los intrones, determina que los intrones 1 a 4 y 8 a 12 del gen de la MMP-2 coincidan con las localizaciones de intrones de los genes de la colagenasa intersticial y la stromelisin, indicando una relación estructural cercana de estos genes (*Huhtala 1990*).

4.9.3 MMP-3 (stromelisina I)

Es una proteoglicanasa relacionada con la colagenasa (MMP-1) con un amplio rango de especificidades de sustratos. Es una metaloproteasa producida primariamente por células del tejido conectivo.

Puede degradar proteoglicanos, fibronectina, laminina y colágeno tipo IV, pero no el colágeno intersticial tipo I. Es sintetizada como una pre-pro enzima con un tamaño de 53977Da, con 477 residuos de aminoácidos y una señal peptídica de 17 aminoácidos.

Spurr realizó el mapeo del locus de MMP-3 en 1988 determinándolo en la región 11q22-q23 (*Spurr 1988*). Formstone determinó en 1993 que existe un cluster de genes de MMPs (MMP-1, MMP-3 y stromelisina II) localizados en una región de 135 kb del cromosoma 11 (*Formstone, 1993*).

4.9.4 MMP-9: (Colagenasa tipo IV-B)

Está producida por los macrófagos y granulocitos. Se ha determinado en 1995 que el gen de la MMP-9 se encuentra en el cromosoma 20: locus. 20q11.2-q13.1 (*St. Jean 1995*).

4.9.5 MMP-17:

Es una proteína de 518 residuos aminoácidos, con una organización característica de la familia de las MMPs incluyendo un pro-dominio con un lugar de activación, un ligando para zinc y un dominio hemopexinico. La MMP-17 tiene una extensión C-terminal que contiene un dominio transmembrana, indicando que es un miembro de la subclase de MMPs del tipo de membrana.

En 1998 se realizó el mapeo del gene de MMP-17 determinándolo en el cromosoma 12, locus: 12q24.3 (*Puente 1998*).

5

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODO

En todo momento se respetaron las normas de la declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos, e igualmente se cumplieron los enunciados de la Ley 14/2007 (3 de julio – Boletín Oficial del Estado número 159: 4 de Julio de 2007. Páginas 28826-28848)

Antes de participar en el estudio, todos los pacientes firmaron un consentimiento informado específicamente diseñado para este estudio aceptando participar en el mismo (**Anexo 9.4**). El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación clínica de la Universidad de Valladolid y de todos los centros que participaron en el estudio: Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Hospital Puerta del Mar de Cádiz, Hospital Clínico Universitario de Valladolid y Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

5.1 DEFINICIÓN DE RESPUESTA POSITIVA Ó NEGATIVA AL LATANOPROST:

El *Latanoprost Study Group* (LSG) define arbitrariamente a un no respondedor como un sujeto que no experimenta una reducción de la PIO de un 15% respecto a la PIO base (*Camras 2003*).

El LSG determinó una proporción de no respondedores (LNR) del 20% a la segunda semana de tratamiento y del 18% a los tres meses. Sin embargo, la proporción de LNRs desciende con el tiempo y un 26% de aquellos que inicialmente no presentaban respuesta a la terapia, pueden presentar una respuesta positiva en visitas posteriores (*Camras 2003*).

En el presente estudio, tras una terapia continuada con Latanoprost (Xalatan® 0,005% -Pfizer), durante un periodo mínimo de cuatro semanas, se consideraron los pacientes como:

1. **No respondedores al tratamiento con Latanoprost** : son aquellos sujetos en los que la reducción de la PIO fue menor a un 15% de la PIO basal.
2. **Respondedor positivo al tratamiento con Latanoprost**: si la reducción de la PIO fue mayor del 15% de la PIO basal. También se incluyeron en este grupo a los sujetos hiper-respondedores, en quienes la reducción de la PIO basal fue superior al 30%.

5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA EL GRUPO NO RESPONDEDORES (CASOS)

- Pacientes de origen caucásico español.
- Pacientes con diagnóstico de GPAA (según perimetría estándar automatizada, características del nervio óptico y de la capa de fibras nerviosas en quienes la respuesta al tratamiento con Latanoprost (Xalatan® 0,005% - Pfizer) fuese negativa, considerada esta respuesta negativa como una reducción de la PIO menor al 15% de la PIO basal.
- Solo se incluyeron pacientes tratados con Latanoprost de la marca Xalatan® 0,005% - Laboratorios Pfizer, con el propósito de tener una homogeneidad total de la muestra y evitar el incluir sujetos donde la falta de respuesta pudiera ser debida a un principio activo con una concentración diferente o a modificaciones de los excipientes o conservantes que pudieran influir sobre la penetración transcorneal del fármaco y su siguiente concentración intraocular.
- Pacientes en tratamiento con Latanoprost (Xalatan® 0,005% - Laboratorios Pfizer) como monoterapia inicial o tras haber sido sometidos a un periodo de lavado correspondiente a cada grupo farmacológico en caso de tener tratamiento previo. Se pu-

dieron incluir pacientes en quienes se tuvo la certeza de la respuesta al Latanoprost y que dada la evolución de la enfermedad se hubiera adicionado otro fármaco en su tratamiento.

- Reducción de la PIO menor del 15% de la PIO basal (No respondedor al tratamiento con Latanoprost - Xalatan® 0,005%- Laboratorios Pfizer).

5.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA EL GRUPO DE RESPONDEDORES POSITIVOS (CONTROLES):

- Se siguieron los mismos criterios de inclusión del grupo de no respondedores, salvo el último punto (reducción de la PIO <15% de la PIO basal)
- Se consideró como respuesta positiva al Latanoprost, una reducción de la PIO entre un 15-30% de la PIO basal y si fue mayor de 30% como un hiper-respondedor.

5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN (PARA AMBOS GRUPOS CASOS Y CONTROLES):

- Menores de 18 años de edad.
- Otros glaucomas que cursan con ángulo abierto, glaucomas por cierre angular, todos los glaucomas secundarios y el glaucoma congénito.

5.5 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:

Tras la realización de un consentimiento informado diseñado para este estudio y la obtención de la autorización del paciente, cada centro participante extrajo 6.0 ml de sangre periférica de cada paciente que fue incluido en el estudio, conservándose en tubos de plástico con EDTA a una temperatura de 4°C hasta ser enviados al laboratorio de biología molecular del IOBA.

Los datos de las muestras se especificaron en el formulario diseñado para tal fin (anexo 9.1, 9.2). Se identificaron los tubos y los formularios con un código de barras para garantizar la confidencialidad en el tratamiento del material de estudio. Para tal fin se suministraron adhesivos ('pegatinas') con el código de barras impreso (realizados con el programa Zebra®) y con éste se identificó la hoja de la muestra y una copia de ella (en otro color) que permaneció en la historia clínica del paciente. Con esta medida se logró una codificación adecuada de la muestra y que únicamente los responsables del estudio en cada centro tuvieran acceso al nombre del paciente, en caso de tener dudas ó incongruencias en su análisis al momento del procesamiento y genotipado.

De acuerdo con la legislación vigente las muestras serán destruidas al término del presente estudio (*Real Decreto 1716/2011 de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación médica y el tratamiento de las muestras de origen humano y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica. Boletín Oficial del Estado, Viernes 2 de Diciembre de 2011*).

5.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

EXTRACCIÓN DEL ADN:

Se realizaron envíos de muestras desde los centros participantes, al laboratorio de Biología Molecular del IOBA a temperatura ambiente, con una frecuencia semanal. Al recibir las muestras se realizó la extracción del DNA según el siguiente protocolo.

Las muestras de DNA se almacenaron en tubos Eppendorf a -20°C, identificados con un código de barras. La cuantificación del DNA se realizó por espectrofotometría. Para tal

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA

Se utilizaron 300 µl de sangre de cada paciente, procediendo según las indicaciones del kit (REAL kit para extracción de DNA SSS ref.: RBME02) con los pasos siguientes:

1. Se añadieron 900 µl de solución de lisis de eritrocitos RBC ref.: E20 a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Se agitó suavemente el tubo de sangre hasta obtener una mezcla homogénea y agregar 300 µl de la misma la tubo Eppendorf que contenía la solución de lisis RBC ref.: E20. Se invirtió 5-6 veces para mezclar.
3. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos. Se invirtió el tubo varias veces durante la incubación. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 segundos a TA.
4. Se retiró y descartó el sobrenadante lo máximo posible sin tocar el precipitado.
5. Se agitó con vortex vigorosamente hasta conseguir que los leucocitos se resuspendieran.
6. Se agregaron 300 µl de solución de lisis de leucocitos E21 y se resuspendieron mediante pipeta para lisar las células. Se incubaron a 37°C hasta que la solución quedó homogénea, sin grupos celulares.
7. Se dejó atemperar la muestra a TA.
8. Se añadieron 180 µl de solución de precipitación de proteínas E23 al lisado nuclear y se agitó con vortex vigorosamente durante 30 segundos.
9. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 3'. Después de éste procedimiento se debe observar un precipitado de proteínas color marrón. En caso de no ser así, se volvió a centrifugar luego de incubar en hielo durante 5'.
10. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de Eppendorf que contiene 300 µl de isopropanol a TA y se mezcló suavemente por inversión unas 50 veces. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos a TA. El DNA se hizo visible en forma de un pequeño precipitado blanco.
11. Se descartó el sobrenadante y se secó el tubo de forma breve en papel absorbente. Se agregaron 300 µl de etanol al 70%. Se invirtió el tubo 5-6 veces y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto.
12. Se aspiró cuidadosamente el etanol, evitando entrar en contacto con el precipitado. Se centrifugó brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual, posteriormente, se invirtió el tubo en el papel absorbente limpio y se dejó secar el precipitado durante 15 minutos.
13. Se añadieron 25 µl de agua destilada y se resuspendieron con pipeta.

fin, se utilizó el espectrofotómetro BioPhotometer, de la casa Eppendorf y se estableció en 1,6 (cociente de absorbancia 260nm/280 nm) el punto de corte de índice de pureza de la muestra, según las recomendaciones de los expertos del Centro Nacional de Genotipado (CeGen) de Santiago de Compostela.

Una vez extraído el ADN de todas las muestras, éstas se enviaron al CeGen en placas de 96 pocillos de la casa Applied Biosystems, referencia PN4306737, debidamente numeradas y selladas, en concentraciones mayores de 75 ng/ml (las muestras procesadas estaban en el rango de 75.4 - 422 ng/ μ l) y con un volumen mayor de 25 μ l en cada uno. En el CeGen se realizó el genotipado mediante la técnica de iPlex- Mass Array (Increased plexing efficiency and flexibility for Mass Array).

5.7 SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS:

Para la selección de los genes candidatos se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) teniendo en cuenta el mecanismo de acción del Latanoprost sobre la ECM a nivel de las vías de salida del humor acuoso (uveo-escleral y trabecular). Se eligieron los genes del receptor FP y los de las MMPs involucradas en el aumento de la salida del humor acuoso.

El Latanoprost es un agonista altamente selectivo del receptor de prostaglandina F_{2a} (receptor FP), aunque se considera que su acción es mediada principalmente por el receptor FP, la activación del receptor FP lleva a un incremento del calcio intracelular mediado por un sistema de proteínas G, lo cual lleva a un aumento de las MMPs -1,-2,-3,-9 y -17, que degradan de forma controlada la ECM del músculo ciliar y consecuentemente aumenta la

salida del humor acuoso por la vía uveoescleral con una reducción de la PIO (*Abramovitz 1994, Lindsey 1997, Oh 2006, Ocklind 1998, Weinreb 1997-2002-2004*).

Según el receptor y las MMPs implicadas en el mecanismo de acción del Latanoprost se estudiaron los siguientes genes:

GEN	CROMOSOMA	POSICIÓN	
MMP-1	11	11q22-q23	<i>Gerhard 1987</i>
MMP-2	16	16q13	<i>Huhtala 1990</i>
MMP-3	11	11q22-23	<i>Spurr 1988</i>
MMP-9	20	20q11.2-q13.1	<i>St. Jean 1995</i>
MMP-17	12	12q24.3	<i>Puente 1998</i>
PTGFR	1	1p31.1	<i>Duncan 1995</i>

5.8 SELECCIÓN DE SNPS

La búsqueda se realizó en las bases de datos públicas como HapMap (<http://www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) y dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/SNP/>). Se tuvieron en cuenta los criterios de:

- **Localización dentro del gen:** priorizando los SNPs en regiones promotoras y exónicas.
- **Los SNPs relacionados con la respuesta al Latanoprost:** en este caso, para el gen del receptor FP de prostaglandina F2a: SNPs: rs3753380 y rs3766355 (*Sakurai 2007*)
- **Bloques de desequilibrio de ligamiento:** obtenido de HapMap, priorizando los TagSNPs.
- **La frecuencia alélica.**

Según los criterios anteriores, fueron seleccionados 71 nsSNPs, presentes en los cromosomas que codifican el receptor PTGFR y las MMPs de los genes a estudio: 1(PTGFR), 11 (MMP-3), 12 (MMP-17), 16 (MMP-2) y 20(MMP-9). (Anexo 9.3)

Los SNPs seleccionados fueron sometidos a un filtro del 5% de la frecuencia, para cada uno de ellos y en el caso del gen PTGFR se tomaron también SNPs localizados a más/menos 10Kb en cada extremo del gen.

Se utilizó una estrategia directa para la selección de los SNPs en los genes a estudio, mediante una búsqueda en la base de datos dbSNP, eligiendo solo los SNPs que hubieran sido validados para cada gen. Además se comprobó utilizando una estrategia automatizada mediante la base de datos de sysSNPs.org, en la que se realiza el método de “*tagger*” y se seleccionan frecuencias alélicas de mínimo 0.05 y un porcentaje de genotipo mínimo del 75% y con un umbral r^2 de 0.8, para evaluar el desequilibrio de ligamiento (LD), con lo cual se han obtenido los 71 SNPs que se han estudiado en la muestra del presente estudio.

5.9 GENOTIPADO DE MUESTRAS:

El genotipado de muestras se llevó a cabo de forma enmascarada y tanto los casos como los controles se analizaron simultáneamente y bajo las mismas condiciones. La interpretación del genotipado se llevó a cabo en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) de Santiago de Compostela. Se utilizó una plataforma de alto rendimiento denominada iPlex- MassArray, de la casa Sequenom (San Diego CA. USA).

La tecnología de genotipado de iPlex-gold se basa en una reacción de discriminación alélica de extensión de una base única (*SBE-single base extension*), donde el “*primer*” hibrida próximo al sitio polimórfico y extiende una base en función del polimorfismo. El resultado

final es un espectro de masas de los múltiples productos obtenidos empleando “*primers*” de extensión de diferentes longitudes en una única reacción, lo que genera grupos de picos suficientemente espaciados. El software de diseño de ensayos genera “*primers*” de PCR (*polymerase chain reaction*) y extensión para cada SNP y asigna automáticamente masas. El máximo número posible de SNPs por ensayo es de 36, pero el nivel medio por ensayo depende del número total de loci y de las características de la secuencia que flanquea el SNP.

Cada diseño señala los potenciales problemas de interacciones entre “*primers*”, motivos de las secuencias y complementariedad. Para el diseño de los “*primers*” se pueden indicar las regiones que contienen otros SNPs o las secuencias donde no se desea que sea diseñados, excluyéndolas del mismo. El ensayo se puntea directamente desde una placa de 384 pocillos en un chip creando 384 puntos para la detección. El equipo tiene la capacidad de leer hasta 10 chips secuencialmente de forma automática.

El software de análisis asigna genotipos a los SNPs en cada ensayo en función de las masas obtenidas. Como control para determinar la eficacia de cada reacción de extensión, se emplea el pico correspondiente a los primers que no han extendido. El cálculo de los ratios de los picos de cada alelo permite generar un informe con el análisis de cluster y posteriormente se desglosan las frecuencias genotípicas para contrastar el equilibrio Hardy-Weinberg. Con esta tecnología, la tasa de éxito para SNPs incorporados en ensayos (número de loci correctamente genotipados) es del 95-98% y la concordancia del genotipado es del 99,8-99,9%.

5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se planteó un diseño de casos y controles. Se tuvo en cuenta el porcentaje descrito de posibles no respondedores y se asumieron las siguientes tres condiciones: que los loci candidatos no están ligados, que existe un equilibrio de Hardy-Weinberg y que hay una distribución independientemente en la población.

Todo el análisis estadístico se ha realizado utilizando el software R (*R core team 2012*)

5.10.1 Análisis preliminar:

5.10.1.1 Frecuencias genotípicas y alélicas:

La descripción estadística de cada SNP consiste en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y genotipo posible, es decir las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente. Las frecuencias genotípicas se estiman por la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma y se calcula la proporción de cada alelo.

Se calculan intervalos de confianza para las frecuencias genotípicas y se presentan las frecuencias genotípicas obtenidas en HapMap en población europea, salvo para rs3766355 con frecuencias obtenidas de la población AFD_EUR_PANEL (48 muestras). Estos datos se han obtenido utilizando el *package snpMatrix* (*Clayton 2011*).

5.10.1.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg:

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina que frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo, en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos es independiente y no ocurren fenómenos distorsionantes, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la

probabilidad de observar un genotipo concreto depende del producto de las probabilidades de cada alelo.

El concepto de equilibrio en el modelo de Hardy-Weinberg se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmíctica, es decir que todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar. En el apareamiento no al azar, los individuos tienden a escoger compañeros parecidos a ellos mismos y aunque esto no altera las frecuencias alélicas, da como resultado menos individuos heterocigotos.
2. La población es suficientemente grande. En una población pequeña, pueden existir pocos alelos. Si por alguna razón los individuos con esos alelos no se reproducen exitosamente, la frecuencia alélica cambiará.
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección, es decir no hay pérdida ni ganancia de alelos.
4. Las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Bajo estas circunstancias las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio, lo que implica que,

- Al cabo de una generación de panmixia las frecuencias alélicas y genotípicas del locus no varían, es decir, la población está en equilibrio.
- Las frecuencias genotípicas se pueden expresar en función de las frecuencias alélicas.

En los estudios de casos y controles, los genotipos control, como representantes de la población general, deberían estar en equilibrio Hardy-Weinberg. Para comprobarlo, se comparan

las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas bajo condiciones de equilibrio utilizando un estadístico chi-cuadrado.

Estos resultados se han obtenido utilizando el *package genetics* (Warnes, 2012).

5.10.1.3 Estructura de genotipos fallidos (“missing”)

Para el análisis de SNP simples, la falta del genotipo en unos pocos pacientes no es muy importante, sin embargo si puede ser un problema cuando se hace el análisis con múltiples SNPs, ya que sólo se pueden utilizar aquellos pacientes completos. Este problema se soluciona con la imputación de datos: se reemplazan los valores “missing” con valores predichos a partir de los valores observados. Esta imputación de datos es necesaria en la construcción de haplotipos y, típicamente, es necesario suponer que la estructura de los valores missing no tiene relación con el fenotipo.

Se comprueba esta hipótesis mediante la asociación entre el estado caso / control y una variable codificada como 1 si el valor del genotipo es “missing” y 0 en el caso contrario.

5.10.1.4 Desequilibrio de ligamiento:

El desequilibrio de ligamiento (LD) describe la situación en la que algunas combinaciones de alelos o marcadores genéticos se heredan juntas. Con el objetivo de interpretar resultados se analiza el LD entre los SNPs que resulten significativos en cuanto a su asociación con la respuesta al tratamiento, y otros SNPs localizados a una distancia de $\pm 1\text{Mb}$ (millón de pares de bases). Para evaluar el LD se utilizan medidas como el r^2 , que es un coeficiente de correlación o D' , ambos entre 0 y 1, siendo mayores cuanto mayor sea el grado de LD. Otra medida frecuente es el LOD score, valores superiores a 3 se consideran indicador de desequilibrio de ligamiento.

Se utiliza el *package* NCBI2R (*Melville 2012*) para extraer la información de HapMap sobre el LD en una región y la información sobre los marcadores con un $r^2 > 0.5$.

5.10.2 Asociación genotípica

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo es una variable categórica con varios genotipos posibles. Para un SNP simple con alelos A y B en un estudio de casos y controles, los datos consisten en contar el número de pacientes de cada uno de los 3 genotipos (AA, AB y BB) en los casos y en los controles, es decir en una tabla de contingencia 2x3 del tipo,

	AA	AB	BB	
Casos	a	b	c	ncasos
Controles	d	e	f	ncontroles
	nAA	nAB	nBB	n

Estas tablas de contingencia se pueden analizar directamente usando un contraste del tipo χ^2 , en el que se comparan los valores observados con los valores esperados y que, asintóticamente, se distribuye según una chi-cuadrado con 2 grados de libertad.

Puesto que la distribución es asintótica, los valores observados que resultan pequeños en las celdas y/o los valores esperados inferiores a 5 en al menos el 80% de las celdas puede hacer que se violen las hipótesis necesarias para que la convergencia asintótica sea cierta. En estos casos se utiliza el estadístico exacto de Fisher.

5.10.2.1 Modelos de herencia

Una alternativa para evaluar la asociación entre cada SNP y el estado caso/control es la utilización de modelos de regresión logística. Esta aproximación permite establecer cinco

modelos de herencia que dependerán del número de copias del alelo que modifica el riesgo de responder o no al tratamiento. Concretamente, sea p la probabilidad de no responder al tratamiento, se puede suponer que el polimorfismo que se está analizando es un SNP en el que el alelo B modifica el riesgo de responder o no al tratamiento.

Ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo dependerá del número de copias de B, lo que permite definir cinco modelos de herencia posibles, siendo p la probabilidad de ser negativo al tratamiento.

Co-dominante. Es el modelo más general y permite que cada genotipo tenga un riesgo diferente y no aditivo (esto significa que si por ejemplo portar B aumenta el riesgo, portar BB no tiene porque suponer el doble del riesgo). Este modelo compara homocigotos para el alelo más frecuente con heterocigotos (He) y homocigotos para el otro alelo (Va, homocigoto variante):

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta_1 He + \beta_2 Va$$

Se estiman dos odds ratio, una para He y otra para Va.

Dominante. Una copia del alelo B es suficiente para modificar el riesgo, por tanto ser homocigoto BB o heterocigoto tiene el mismo riesgo. Este modelo compara la combinación de esos dos posibles genotipos (Do) con el otro homocigoto.

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Do$$

Recesivo. Se necesitan dos copias del alelo B para modificar el riesgo de ser respondedor, es decir que ser heterocigoto u homocigoto en el otro alelo, tiene el mismo efecto. Este modelo compara la combinación de esos dos posibles genotipos (Re) con el homocigoto variante.

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Re$$

Sobre-dominante. Se compara la combinación de homocigotos respecto a los heterocigotos (He).

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta He$$

Aditivo. Cada copia de B modifica el riesgo de ser respondedor de forma aditiva, es decir que los homocigotos BB tienen doble riesgo que los heterocigotos. Este modelo compara una combinación de 2 genotipos con pesos 2 y 1 respectivamente (Ad, 2B/B+T/B), respecto a homocigoto en el otro alelo.

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Ad$$

En la siguiente tabla se presenta un resumen de la codificación de las variables a utilizar en los diferentes modelos de herencia. Se utilizan los genotipos posibles para un polimorfismo en un locus bialélico A>B.

Genotipo	Codominante		Dominante	Recesivo	Sobre-dominante	Aditivo
	He	Va	Do	Re	He	Ad
AA	0	0	0	0	0	0
AB	1	0	1	0	1	1
BB	0	1	1	1	0	2

Los modelos de herencia se ajustan utilizando el *package* *SNPassoc* (Gonzalez et al, 2012).

5.10.2.2 Selección del mejor modelo

Para seleccionar el modelo que mejor se ajusta a los datos se utiliza el test de razón de verosi-

militudes (TRV). Este test compara la bondad del ajuste de dos modelos, uno relativamente más complejo respecto a uno más sencillo, para determinar cual se ajusta mejor a los datos.

El TRV se basa en un estadístico que compara la verosimilitud de los dos modelos, $LR=2(\ln L1 - \ln L2)$. Este estadístico se distribuye según una chi-cuadrado con tantos grados de libertad como el número de parámetros de más que hay en el modelo más complejo. En este caso el modelo co-dominante tiene 2 parámetros y el resto 1.

Este test no suele ser suficiente porque no tiene en cuenta la complejidad del modelo (número de parámetros). Por este motivo se utilizó el Criterio de Información de Akaike (AIC), que penaliza el criterio de verosimilitud utilizando el número de parámetros del mismo, $AIC = -2\text{Log}L + 2 \cdot \#\{\text{parámetros}\}$. Se prefiere el modelo con menor AIC.

5.10.3 Asociación alélica

Una alternativa para medir la asociación entre el fenotipo y cada SNP es el análisis por alelos. Consiste en duplicar la muestra y considerar una observación por cada alelo, es decir se considera a cada paciente 2 veces. Se analiza la asociación mostrada en la siguiente la tabla

	A	B	
Casos	2a+b	b+2c	$2n_{\text{casos}}$
Controles	2d+e	e+2f	$2n_{\text{controles}}$
	$2n_{AA}+n_{AB}$	$2n_{BB}+n_{AB}$	2n

Este análisis se corresponde con un modelo multiplicativo, en el que el riesgo de “ser negativo” aumentará en un factor r por cada alelo B que se porte, así el genotipo AB tendrá un riesgo r y BB un riesgo r^2 .

La desventaja de este modelo es que considera que cada alelo actúa de manera independiente. Además es necesario que tanto la muestra de controles, como la de casos, estén en

equilibrio Hardy-Weinberg.

Tradicionalmente, el análisis de la asociación en estas tablas se realiza comparando las frecuencias alélicas utilizando el estadístico chi-cuadrado de Pearson. Además de los inconvenientes de este test, relacionados con su distribución asintótica, se asume la independencia de los alelos bajo la hipótesis de no asociación, lo cual no siempre es cierto y en consecuencia, se introduce un sesgo en la tasa de error tipo I esperada. Por este motivo, se calcula el contraste exacto e insesgado propuesto por Guedj et al. Este test se calcula utilizando el package allelic (*Forner 2006 - Guegj 2006*).

5.10.4 Análisis de SNPs múltiples

Los métodos de análisis con cada SNP de forma independiente tienen una potencia limitada para detectar un efecto genético. Se puede intentar decidir si un determinado gen está o no asociado con la enfermedad, o si se conoce que dicha asociación existe, encontrar qué SNPs están más cerca de ser los polimorfismos “causales”.

Utilizando cada SNP de forma individual no se tiene en cuenta su distribución conjunta. Esto tiene pocas consecuencias en los dos casos extremos: cuando los SNPs están muy espaciados y en consecuencia existe poco o nada de desequilibrio de ligamiento entre ellos, o cuando la mayor parte de los SNPs están genotipados, de forma que cualquier variante causal es probable que haya sido tomada en cuenta en el estudio. En la práctica el diseño de los estudios se mueve entre estos dos extremos, lo que hace que el análisis simultáneo de múltiples SNPs sea muy importante.

En este trabajo, para abordar este problema se ha utilizado el análisis de haplotipos en los que intervienen todos los marcadores de un mismo gen.

5.10.4.1 Análisis de haplotipos

Un haplotipo es el conjunto de alelos de múltiples SNPs que son heredados de uno de los padres juntos en el mismo cromosoma. Puesto que los SNPs pueden estar cerca unos de otros en el mismo cromosoma, sus alelos no son necesariamente independientes. La fase haplotípica es la combinación de dos haplotipos que hereda un individuo. Esta fase no es siempre conocida ya que típicamente los genotipos se miden para cada SNP de forma independiente. Para un sujeto que como máximo es heterocigoto en uno de los marcadores, la fase haplotípica puede inferirse de los genotipos de los SNPs individuales. Sin embargo, para un sujeto heterocigoto en 2 o más marcadores, esta fase no puede ser determinada con certeza.

Para entenderlo mejor, un ejemplo: Se tiene un conjunto de SNPs cuyos alelos sólo pueden tomar 2 valores, A y B. Por cada SNP, un individuo hereda un alelo de su madre y otro de su padre. Se consideran 2 SNPs, SNP1 y SNP2, si un individuo hereda de su madre un alelo A en SNP1 y un alelo A en SNP2, el haplotipo que hereda de su madre es AA. Si el mismo individuo hereda de su padre el haplotipo BB, la fase haplotípica será AA/BB y los genotipos observados serán, en el SNP1 A/B y en el SNP2 A/B. En la práctica se hace al revés, se observa el genotipo y, teniendo en cuenta que en el genotipo no se conoce que alelo viene de que progenitor, este mismo genotipo puede dar lugar, a la fase haplotípica AB/BA.

En consecuencia, lo primero que se debe hacer es identificar los posibles haplotipos consistentes con los datos genotípicos observados. Además de la incertidumbre de la fase haplotípica, una determinada muestra puede tener alguno de sus genotipos missing, lo que aumentará los posibles haplotipos en esa muestra.

5.10.4.1.1 Estimación de las frecuencias haplotípicas

Se utiliza el algoritmo EM (*Expectation-Maximization*) para calcular las estimaciones máximo verosímiles de las frecuencias haplotípicas. Se estiman estas frecuencias en la muestra total y en cada grupo por separado.

Además de las frecuencias estimadas, se presenta el contraste de razón de verosimilitudes para la hipótesis nula “no hay desequilibrio de ligamiento entre los loci que intervienen”. Esto supondría que las frecuencias haplotípicas son producto de las frecuencias alélicas.

5.10.4.1.2 Asociación del haplotipo con la enfermedad. “Estadístico score”

Se utiliza un “*estadístico score*” para contrastar la asociación entre los haplotipos y el estado caso/control de la muestra. En primer lugar se realiza un test de asociación global y posteriormente se contrasta en cada haplotipo por separado, ambos basados en estadístico tipo chi-cuadrado. Cada estadístico score puede interpretarse como una medida del efecto del haplotipo y además del p-valor asintótico, se calcula un p-valor simulado a partir de permutaciones fundamental cuando se tienen datos dispersos (*Schaid 2002*) (*Besag 1991*).

5.10.4.1.3 Test “score” en sub-haplotipos

Se consideran los posibles sub-haplotipos, es decir los subconjuntos de alelos consecutivos, de tamaño 2 hasta el número de marcadores -1 , dentro de cada gen y se evalúa su asociación con el estado caso/control a través del estadístico “*score*”.

5.10.5 Comparaciones múltiples

Un problema en los estudios de asociación genética en los que se pretende evaluar un gran número de marcadores, es el gran número de contrastes –uno por SNP- que se realizan

simultáneamente. Esto va a provocar la aparición de asociaciones espurias simplemente por azar, lo que se conoce como el problema de las comparaciones múltiples.

Para corregir el efecto global de las comparaciones múltiples en el estudio de asociación completo, se ha utilizado el método propuesto por Rosenberg et al. Este método se propone específicamente para estudios de asociación en los que intervienen varios SNP en varios genes candidatos (*Rosenberg 2006*).

Es un método en dos etapas, en la primera se consideran contrastes de SNPs y haplotipos dentro de cada gen y se construye un test que combina ambos análisis. En la segunda etapa se ajustan los p-valores por gen obtenidos en la primera, utilizando el método de la *False Discovery Rate* (FDR) (*Benjamini - Hochberg, 1995*).

El problema de las comparaciones múltiples se presenta siempre que se quiera contrastar múltiples hipótesis simultáneamente. Si no se corrigen los contrastes individuales teniendo en cuenta el número de comparaciones, cuantas más hipótesis se contrasten, más probabilidad existirá de obtener falsos positivos.

Para resolver este problema, se utilizó el método en dos pasos propuesto por Rosenberg et al. (*Rosenberg, 2006*). En la primera etapa, cada asociación de un gen con la enfermedad se resume utilizando un único p-valor que combina los análisis de SNPs simples y de bloques haplotípicos. En esta fase se utilizaron las variaciones propuestas por Chen et al (*Chen, 2006*), basadas en técnicas de remuestreo, que tienen en cuenta la correlación entre los estadísticos de contraste, permitiendo tener pruebas más potentes. En la segunda etapa, estos p-valores por gen, se ajustaron utilizando un procedimiento *false discovery rate* (FDR).

5.10.5.1 Estrategia de comparaciones múltiples en un gen candidato

Los pasos de este análisis son:

1. Contrastar la asociación de cada SNP con el estado caso/control marginalmente, utilizando como método de corrección para comparaciones múltiples el contraste minP (*Westfall -Young, 1993*) (*Westfall, 2002*). Este contraste está basado en la estimación, a través de permutaciones, de la distribución del mínimo p-valor obtenido. Suponiendo que se tiene M SNPs en un gen candidato, y en el contraste marginal para el j-ésimo SNP se obtiene un p-valor p_j . El estadístico test minP se define como:

$$WYZ = \min_{1 \leq j \leq M} \{p_j\}$$

Bajo la hipótesis nula de que no existe asociación, el indicador caso/control puede permutarse B veces para generar un conjunto de muestras. Sea p_{jb}^* el p-valor para el j-ésimo SNP en la b-ésima muestra, el estadístico minP permutado vendrá dado por:

$$WYZ_b^* = \min_{1 \leq j \leq M} \{p_{jb}^*\}$$

y el p-valor basado en las permutaciones será la proporción de $\{WYZ_b^*\}_{b=1}^B$ que son menores o iguales que el estadístico WYZ observado originariamente. Se denota por p^{WYZ}

Al menos son necesarias 1000 permutaciones para obtener un estimador con una precisión razonable.

2. Realizar el análisis haplotípico para determinar si la distribución de frecuencias haplotípicas es diferente en los casos que en los controles. Como método de corrección para comparaciones múltiples y puesto que tenemos varias combinaciones de SNPs, se uti-

liza de nuevo el contraste minP: se estima la distribución del mínimo p-valor obtenido a través de permutaciones. Suponiendo que se tiene K conjuntos de SNPs en un gen candidato, y en el h-ésimo contraste se obtiene un p-valor p_h . El estadístico test minP se define como:

$$HFT = \min_{1 \leq h \leq M} \{p_h\}$$

Sea p_{hb}^* el p-valor para el h-ésimo contraste en la b-ésima muestra, el estadístico minP permutado vendrá dado por:

$$HFT_b^* = \min_{1 \leq h \leq M} \{p_{hb}^*\}$$

y el p-valor basado en las permutaciones será la proporción de $\{HFT_b^*\}_{b=1}^B$ que son menores o iguales que el estadístico HFT observado originariamente. Se denota por p^{HFT}

Se utiliza $B = 1000$ permutaciones.

3. Combinar la información de los dos análisis, SNP y haplotipos. Se construye el estadístico del contraste como:

$$OMNI = \min \{p^{WZY}, p^{HFT}\}$$

La distribución de este estadístico se estima utilizando permutaciones. Para la b-ésima muestra de permutaciones, se realiza el contraste basado en los SNPs sencillos, cal-

culando p-valor $p_b^{WZY^*}$ como la proporción de $\{WYZ_{b'}^*\}_{b'=1}^B$ menores o iguales que

WYZ_b^* , y el contraste basado en los haplotipos, $p_b^{HFT^*}$ como la proporción de

$\{\text{OMNI}_b^*\}_{b=1}^B$ menores o iguales que HFT_b^* . El valor en la b-ésima muestra del test será:

$$\text{OMNI}_b^* = \min\{p_b^{WZY^*}, p_b^{HFT^*}\}$$

El p-valor de este estadístico se estima como la proporción de $\{\text{OMNI}_b^*\}_{b=1}^B$ menores o iguales que el estadístico OMNI.

5.10.5.2 Estrategia de comparaciones múltiples en un conjunto de genes candidatos:

Para contrastar el conjunto de los 6 genes candidatos evaluados en nuestro estudio, se utilizan los p-valores resumen obtenidos en la etapa anterior y se controla la *False Discovery Rate* (FDR) (*Benjamini-Hochberg, 1995*). Para ello se introduce el concepto de q-valor (*Storey, 2003*). Antes de entrar en detalle acerca de lo que es un q-valor se define:

La **tasa de falsos positivos** (FPR, *false positive rate*) como la proporción de hipótesis nulas verdaderas que fueron incorrectamente rechazadas,

$$FPR \approx \frac{\#falsos_positivos}{\#H_0_verdaderas}$$

La tasa de falsos descubrimientos (FDR, *false discovery rate*) como la proporción esperada de falsos positivos entre los contrastes que resultaron significativos,

$$FDR \approx \frac{\#falsos_positivos}{\#test_significativos}$$

Para un contraste sencillo, la FPR puede ser útil para medir como es de verosímil lo observado cuando la hipótesis es verdadera. Sin embargo, cuando se hacen muchos contrastes

simultáneamente, es más útil la FDR. Por ejemplo, suponiendo que se fija una FPR del 5%, es decir que el 5% de las veces diremos que rechazamos la hipótesis cuando es cierta. Si se hacen 1000 contrastes con una FPR del 5% se puede esperar alrededor de 50 falsos positivos.

Tener una FDR del 5% significa que entre todos los contrastes que han resultado significativos, alrededor del 5% serán falsos positivos. Así, si 100 de los 1000 contrastes son significativos, 5 podrán ser falsos positivos.

Al igual que un p-valor, un q-valor va a proporcionar, para cada contraste de hipótesis, una medida de la significación estadística en términos de una cierta tasa de error. Concretamente, mide la mínima FDR (*false discovery rate*) que se puede tener cuando se dice que el contraste es significativo. Esta tasa de error se define como la proporción esperada de falsos positivos que resultaron significativos, es decir que tener una FDR del 5% significa que entre todos los contrastes que han resultado significativos, alrededor del 5% serán falsos positivos.

Para estimar con precisión la FDR se necesita saber que contrastes son de verdad significativos. Como esta información es difícil de conseguir, se utilizan los q-valores, que permiten estimar la FDR en términos de los p-valores (*Storey, 2002*) (*Storey, 2004*).

6

RESULTADOS

Durante un periodo de 13 meses, comprendido entre el 7 de febrero de 2011 y el 25 de marzo de 2012, se recogieron un total de 124 muestras eliminándose posteriormente 7 de ellas: en cinco en las cuales el genotipado no fue fiable ya que las muestras presentaron problemas de procesamiento y dos procedentes de pacientes que presentaban parentesco de primer grado, quedando finalmente 117 muestras válidas: 98 correspondientes a pacientes respondedores positivos al Latanoprost (83.8%) y 19 de pacientes no respondedores (16.2%).

El porcentaje de sujetos no respondedores fue de 16.1% (n=20). Entre los respondedores hubo un 7.7% (n=8) de hiperrespondores, es decir pacientes que presentaron una reducción de la PIO mayor del 30% con respecto al valor de la PIO basal.

CENTRO	RESPONDEDORES	NO RESPONDEDORES	TOTAL
IOBA - Valladolid	32	7	39
HCU - Salamanca	30	5	35
Cádiz	17	2	19
HCU - Valladolid	10	4	14
HCS - Madrid	9	1	10
Total	98	19	117

Tabla 1: Distribución de las muestras según centro de procedencia

La PIO promedio previa al tratamiento fue de 25.57 mmHg (rango: 22-42 mmHg, SD= 4.15) y la PIO post-tratamiento fue en promedio de 18.0 mmHg (rango:11-25 mmHg, SD= 3.38).

En el grupo de no respondedores al Latanoprost, la PIO promedio pre-tratamiento fue de 22.37 mmHg (rango: 15 - 27 mmHg, SD= 3.14) y post-tratamiento de 22.50 mmHg (ran-

go:16-27 mmHg, SD= 2.58).

Edad

El promedio de edad en la muestra evaluada fue de 66.3 años (rango: 19 - 91 años, SD: 12.3 años), el 54.04% fueron mujeres (n= 67) y el 45.96% (n= 57) varones.

La edad promedio según los grupos estudiados fue de 66.7 años en el grupo de repondedores al Latanoprost (rango: 19-91, SD: 12.9 años) y de 65.0 años en los no respondedores (rango: 39-80, SD: 12.6 años).

Tiempo de tratamiento

El tiempo de tratamiento fue mayor de 4 semanas en todos los casos y el promedio de tiempo de tratamiento de toda la muestra fue de 17.9 meses (rango:1-115 meses, SD= 24.55). En los no respondedores al Latanoprost el tiempo promedio de tratamiento fue de 6.11 meses (rango:1-36 meses, SD= 7.82).

6.1 Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas

En la **Tabla 2**, se muestra la estimación de frecuencias genotípicas y alélicas, expresadas en porcentaje, de cada SNP evaluado. Además, para cada genotipo se calcula un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Este intervalo sirve para determinar si existen diferencias significativas respecto de las frecuencias de la población caucásica europea (CEU). Se somborean en verde las frecuencias genotípicas significativamente menores que las frecuencias poblacionales y en rojo aquellas significativamente mayores. La tabla completa se presenta en el **Anexo 9.5**.

Gen	SNP	Genotipo	Población CEU	n	%	IC 95% para el %		Frecuencias alélicas			
						Inf.	Sup.	A	C	G	T
PTGFR	rs1328449	CC	1.27	0	0.00	0.00	0.00	.	7.69	.	92.31
		CT	12.66	18	15.38	8.85	21.92				
		TT	86.08	99	84.62	78.08	91.15				
PTGFR	rs1581920	CC	61.11	78	67.24	58.70	75.78	.	81.47	.	18.53
		CT	36.67	33	28.45	20.24	36.66				
		TT	2.22	5	4.31	0.61	8.01				
PTGFR	rs2352039	GG	74.39	77	65.81	57.22	74.41	.	.	82.48	17.52
		GT	24.39	39	33.33	24.79	41.88				
		TT	1.22	1	0.85	0.00	2.52				
PTGFR	rs10489950	CC	86.67	111	94.87	90.87	98.87	.	97.44	.	2.56
		CT	13.33	6	5.13	1.13	9.13				
		TT	0.00	0	0.00	0.00	0.00				
PTGFR	rs1999012	CC	73.03	74	63.79	55.05	72.54	.	79.31	20.69	.
		CG	26.97	36	31.03	22.62	39.45				
		GG	0.00	6	5.17	1.14	9.20				
PTGFR	rs11162488	AA	48.89	68	58.12	49.18	67.06	75.64	.	24.36	.
		AC	40.00	41	35.04	26.40	43.69				
		CC	11.11	8	6.84	2.26	11.41				
PTGFR	rs518341	CC	1.11	0	0.00	0.00	0.00	.	6.47	.	93.53
		CT	20.00	15	12.93	6.82	19.04				
		TT	78.89	101	87.07	80.96	93.18				
PTGFR	rs3766355	GG	79.17	83	70.94	62.71	79.17	.	.	84.19	15.81
		GT	20.83	31	26.50	18.50	34.49				
		TT	0.00	3	2.56	0.00	5.43				
PTGFR	rs3766354	CC	80.61	91	78.45	70.97	85.93	.	89.22	.	10.78
		CT	18.18	25	21.55	14.07	29.03				
		TT	1.21	0	0.00	0.00	0.00				
PTGFR	rs12748050	CC	66.67	85	72.65	64.57	80.73	.	85.04	.	14.96
		CT	27.27	29	24.79	16.96	32.61				
		TT	6.06	3	2.56	0.00	5.43				

Tabla 2: Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de cada SNP evaluado en la muestra total

Gen	SNP	Genotipo	Población CEU	n	%	IC 95% para el %		Frecuencias alélicas			
						Inf.	Sup.	A	C	G	T
PTGFR	rs4650581	AA	8.99	5	4.50	0.65	8.36	17.12	.	.	82.88
		AT	40.45	28	25.23	17.15	33.30				
		TT	50.56	78	70.27	61.77	78.77				
PTGFR	rs3766332	AA	0.61	0	0.00	0.00	0.00	6.47	.	.	93.53
		AT	11.59	15	12.93	6.82	19.04				
		TT	87.80	101	87.07	80.96	93.18				
MMP1	rs11225426	CC	86.67	90	77.59	70.00	85.18	.	87.93	.	12.07
		CT	12.12	24	20.69	13.32	28.06				
		TT	1.21	2	1.72	0.00	4.09				
MMP1	rs2071232	CC	2.42	4	3.45	0.13	6.77	.	15.52	.	84.48
		CT	38.18	28	24.14	16.35	31.93				
		TT	59.39	84	72.41	64.28	80.55				
MMP1	rs5031036	AA	83.33	107	91.45	86.39	96.52	95.73	.	4.27	.
		AG	16.67	10	8.55	3.48	13.61				
		GG	0.00	0	0.00	0.00	0.00				
MMP3	rs569444	AA	1.11	0	0.00	0.00	0.00	13.68	.	86.32	.
		AG	16.67	32	27.35	19.27	35.43				
		GG	82.22	85	72.65	64.57	80.73				
MMP3	rs650108	AA	4.44	7	5.98	1.69	10.28	30.34	.	69.66	.
		AG	38.89	57	48.72	39.66	57.78				
		GG	56.67	53	45.30	36.28	54.32				
MMP3	rs520540	AA	27.78	23	19.83	12.57	27.08	45.69	.	54.31	.
		AG	60.00	60	51.72	42.63	60.82				
		GG	12.22	33	28.45	20.24	36.66				
MMP17	rs4964926	CC	78.16	88	75.86	68.07	83.65	.	86.21	13.79	.
		CG	21.84	24	20.69	13.32	28.06				
		GG	0.00	4	3.45	0.13	6.77				
MMP17	rs7484577	CC	44.24	62	53.91	44.80	63.02	.	70.43	.	29.57
		CT	41.82	38	33.04	24.45	41.64				
		TT	13.94	15	13.04	6.89	19.20				

Tabla 2: Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de cada SNP evaluado en la muestra total (cont).

Gen	SNP	Genotipo	Población CEU	n	%	IC 95% para el %		Frecuencias alélicas			
						Inf.	Sup.	A	C	G	T
MMP17	rs10902456	GG	44.51	66	56.41	47.42	65.40	.	.	73.5	26.5
		GT	44.51	40	34.19	25.59	42.78				
		TT	10.98	11	9.40	4.11	14.69				
MMP17	rs12099648	AA	3.14	6	5.56	1.24	9.88	22.22	.	77.78	.
		AG	21.38	36	33.33	24.44	42.22				
		GG	75.47	66	61.11	51.92	70.31				
MMP17	rs10751701	CC	0.00	0	0.00	0.00	0.00	.	10.26	89.74	.
		CG	8.99	24	20.51	13.20	27.83				
		GG	91.01	93	79.49	72.17	86.80				
MMP17	rs3087864	AA	62.42	53	45.69	36.62	54.75	68.53	.	31.47	.
		AG	28.48	53	45.69	36.62	54.75				
		GG	9.09	10	8.62	3.51	13.73				
MMP17	rs11246851	AA	21.33	36	31.30	22.83	39.78	54.78	.	.	45.22
		AT	61.33	54	46.96	37.83	56.08				
		TT	17.33	25	21.74	14.20	29.28				
MMP17	rs11613757	CC	90.00	90	77.59	70.00	85.18	.	87.93	.	12.07
		CT	10.00	24	20.69	13.32	28.06				
		TT	0.00	2	1.72	0.00	4.09				
MMP2	rs1053605	CC	83.64	108	93.10	88.49	97.71	.	96.12	.	3.88
		CT	15.15	7	6.03	1.70	10.37				
		TT	1.21	1	0.86	0.00	2.54				
MMP2	rs866770	AA	76.14	68	58.62	49.66	67.58	76.29	.	23.71	.
		AG	23.86	41	35.34	26.65	44.04				
		GG	0.00	7	6.03	1.70	10.37				
MMP2	rs2241145	CC	21.11	16	13.79	7.52	20.07	.	34.05	65.95	.
		CG	52.22	47	40.52	31.58	49.45				
		GG	26.67	53	45.69	36.62	54.75				
MMP2	rs12923011	CC	35.56	67	57.26	48.30	66.23	.	73.5	.	26.5
		CT	48.89	38	32.48	23.99	40.96				
		TT	15.56	12	10.26	4.76	15.75				

Tabla 2: Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de cada SNP evaluado en la muestra total (cont).

MMP2	rs11541998	CC	80.61	92	79.31	71.94	86.68	.	89.66	10.34	.
		CG	18.18	24	20.69	13.32	28.06				
		GG	1.21	0	0.00	0.00	0.00				
MMP2	rs1861320	GG	30.49	49	41.88	32.94	50.82	.	.	61.97	38.03
		GT	54.27	47	40.17	31.29	49.05				
		TT	15.24	21	17.95	10.99	24.90				
MMP9	rs3787268	AA	2.22	7	5.98	1.69	10.28	26.07	.	73.93	.
		AG	28.89	47	40.17	31.29	49.05				
		GG	68.89	63	53.85	44.81	62.88				

Tabla 2: Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de cada SNP evaluado en la muestra total (cont).

6.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La **Tabla 3** muestra los contrastes acerca del equilibrio de Hardy-Weinberg en cada SNP evaluado, tanto en la muestra global como en la muestra de controles.

Se marcan en negrita los p-valores que resultan significativos a un nivel 0.05 de manera individual. Sin embargo, para seleccionar un conjunto de SNPs cuyos genotipos no verifiquen el equilibrio, en lugar de seleccionar un nivel de significación arbitrario y con el fin de solucionar el problema de las comparaciones múltiples, se ha utilizado el nivel de significación basado en el método false-discovery rate (*Benjamini, 1995*).

Todos los SNPs estudiados verifican la hipótesis de equilibrio.

gen	SNP	Muestra global			Controles		
		Estadístico HW	p-valor	p-valor exacto	Estadístico HW	p-valor	p-valor exacto
PTGFR	rs6686438	0.014	1	1	0.033	1	1
	rs7545762	0.74	0.4341	0.4355	0	1	1
	rs1328449	0.812	0.6146	1	0.884	0.5953	1
	rs12568630	0.554	0.6563	1	0.287	1	1
	rs1581920	0.39	0.5643	0.5386	0.296	0.7573	0.5429
	rs1581918	0.131	0.784	0.7823	0.326	0.7612	0.5394
	rs6672484	1.156	0.3797	0.2761	2.46	0.1308	0.1226
	rs1328441	0.85	0.3455	0.357	0.456	0.54	0.5416
	rs1417103	0.912	0.3603	0.3383	0.58	1	0.3929
	rs724159	0.061	0.8346	1	0.011	1	1
	rs2352039	2.749	0.1184	0.1926	1.885	0.2914	0.2901
	rs10873978	0.216	0.6922	0.6968	0.81	0.4019	0.5243
PTGFR	rs1034186	0.409	1	1	0.422	1	1
	rs10489950	0.081	1	1	0.024	1	1
	rs1999012	0.343	0.5748	0.5718	0.041	1	1
	rs11162488	0.282	0.6294	0.6165	0.326	0.6095	0.6046
	rs674345	0.672	0.4367	0.4281	0.364	0.6544	0.5172
	rs518341	0.554	0.6493	1	0.587	0.6625	1
	rs10782665	0.44	0.5483	0.543	0.013	1	1
	rs11578155	0.003	1	1	0.563	1	0.3963
	rs6692239	0.62	0.4427	0.5629	0.143	0.8409	0.832
	rs11162494	1.318	0.2578	0.2458	0.95	0.2887	0.4169
PTGFR	rs3753380	2.76	0.0731	0.118	0.955	0.3542	0.3517
	rs3766355	0.003	1	1	0.082	1	0.7151
	rs3766354	1.692	0.3634	0.3569	1.429	0.3581	0.5947
	rs1555541	0.83	0.4373	0.4293	1.318	0.2871	0.2773
	rs12748050	0.077	0.7372	0.7189	0.469	0.4533	0.4324
	rs520171	1.357	0.195	0.3097	2.57	0.075	0.1385
	rs473027	0.207	0.6616	0.6637	0.314	0.6257	0.6178
	rs4650581	1.367	0.3136	0.3073	3.16	0.0636	0.1234
	rs3766332	0.554	0.6484	1	0.587	0.6674	1
rs12731181	1.693	0.308	0.1812	4.44	0.0465	0.0445	

Tabla 3: Equilibrio de Hardy Weinberg en cada SNP evaluado

gen	SNP	Muestra global			Controles		
		Estadístico HW	p-valor	p-valor exacto	Estadístico HW	p-valor	p-valor exacto
MMP1	rs17293823	0.002	1	1	0.383	0.3558	0.6158
	rs7945189	1.049	0.2158	0.3793	1.628	0.2096	0.1812
	rs470215	0	1	1	0.048	1	1
	rs7125062	0.435	0.6135	0.4579	0.041	0.7888	0.7861
	rs7125320	0.026	1	0.5915	0.006	1	1
	rs11225426	0.074	1	0.6674	0.124	0.6819	0.6521
	rs2071232	0.731	0.481	0.4715	0	1	1
	rs5031036	0.233	1	1	0.227	1	1
	rs470358	1.32	0.3278	0.246	1.713	0.1973	0.202
	rs514921	0.022	1	0.8128	0.217	0.7986	0.7974
	rs475007	0.029	1	0.8515	0.182	0.685	0.6842
MMP3	rs569444	2.936	0.1212	0.124	2.095	0.2084	0.3541
	rs650108	2.721	0.1247	0.1278	3.161	0.1026	0.1031
	rs520540	0.207	0.708	0.7111	0	1	1
	rs3025066	0.08	1	0.5482	0.112	1	0.5317
MMP17	rs4964926	1.96	0.231	0.2261	1.254	0.3739	0.3651
	rs4964927	0.011	1	1	0.01	1	1
	rs10751699	1.17	0.3456	0.268	1.531	0.3063	0.2198
	rs7484577	4.909	0.0445	0.0416	3.586	0.0833	0.0807
	rs10902456	1.749	0.2368	0.2324	0.744	0.4329	0.4247
	rs12099648	0.138	0.7794	0.7799	0.137	0.7603	0.7593
	rs10751701	1.528	0.3635	0.6054	1.265	0.3852	0.5911
	rs3087864	0.409	0.5273	0.6671	0	1	1
	rs11246851	0.313	0.7115	0.5757	0.323	0.5429	0.5436
rs11613757	0.074	1	0.6674	0.062	1	1	
MMP2	rs1053605	4.224	0.0135	0.1488	6.506	0.0081	0.106
	rs866770	0.061	0.8091	0.7988	0.087	0.8015	0.7914
	rs2241145	1.111	0.3039	0.3035	2.01	0.18	0.1721
	rs12923011	3.231	0.0894	0.0937	2.584	0.1198	0.1198
	rs243845	0.127	0.7093	0.85	0.019	1	1
	rs11541998	1.544	0.3639	0.6062	1.587	0.3445	0.6031
	rs1861320	2.555	0.1197	0.1176	1.285	0.2938	0.2855
MMP9	rs3918249	1.953	0.1724	0.236	1.354	0.2925	0.2929
	rs2274755	0.364	0.697	1	0.206	1	1
	rs3918256	3.183	0.095	0.0936	2.504	0.1499	0.1537
	rs3787268	0.208	0.6395	0.8113	0.356	0.6148	0.7973

Tabla 3: Equilibrio de Hardy Weinberg en cada SNP evaluado

6.3 Estructura de los genotipos fallidos (valores missing)

Mencionados en el apartado 5.10.1.3 se comprueba la hipótesis de que los valores missing no están relacionados con el estado caso/control. En la tabla 4, se muestran el número de missing en aquellos SNPs que presentan algún valor faltante, bien en la muestra de casos (no respondedores) o en la de controles (respondedores). Además se contrasta la hipótesis de independencia entre valor missing y el estado caso/control. En general, la muestra es de buena calidad y es robusta para el análisis al tener pocos valores missing.

gen	SNP	N positivo	N negativo	Estadístico Chi-cuadrado	p-valor
PTGFR	rs6686438	1	0	0.0000	1.0000
	rs7545762	0	0	.	.
	rs1328449	0	0	.	.
	rs12568630	1	0	0.0000	1.0000
	rs1581920	1	0	0.0000	1.0000
	rs1581918	0	0	.	.
	rs6672484	1	0	0.0000	1.0000
	rs1328441	1	0	0.0000	1.0000
	rs1417103	0	0	.	.
	rs724159	1	0	0.0000	1.0000
	rs2352039	0	0	.	.
	rs10873978	0	0	.	.
PTGFR	rs1034186	1	0	0.0000	1.0000
	rs10489950	0	0	.	.
	rs1999012	1	0	0.0000	1.0000
	rs11162488	0	0	.	.
	rs674345	1	0	0.0000	1.0000
	rs518341	1	0	0.0000	1.0000
	rs10782665	0	0	.	.
	rs11578155	1	0	0.0000	1.0000
	rs6692239	1	0	0.0000	1.0000
	rs11162494	1	0	0.0000	1.0000

Tabla 4: Valores Missing

gen	SNP	N positivo	N negativo	Estadístico Chi-cua- drado	p-valor
PTGFR	rs3753380	1	0	0.0000	1.0000
	rs3766355	0	0	.	.
	rs3766354	1	0	0.0000	1.0000
	rs1555541	1	0	0.0000	1.0000
	rs12748050	0	0	.	.
	rs520171	0	0	.	.
	rs473027	2	0	0.0000	1.0000
	rs4650581	6	0	0.2906	0.5874
	rs3766332	1	0	0.0000	1.0000
	rs12731181	0	0	.	.
MMP1	rs17293823	1	0	0.0000	1.0000
	rs7945189	0	0	.	.
	rs470215	0	0	.	.
	rs7125062	0	0	.	.
	rs7125320	1	0	0.0000	1.0000
	rs11225426	1	0	0.0000	1.0000
	rs2071232	1	0	0.0000	1.0000
	rs5031036	0	0	.	.
	rs470358	5	1	0.0000	1.0000
	rs514921	0	0	.	.
rs475007	1	0	0.0000	1.0000	
MMP3	rs569444	0	0	.	.
	rs650108	0	0	.	.
	rs520540	1	0	0.0000	1.0000
	rs3025066	0	0	.	.
MMP17	rs4964926	0	1	0.8452	0.1624
	rs4964927	1	0	0.0000	1.0000
	rs10751699	0	0	.	.
	rs7484577	2	0	0.0000	1.0000
	rs10902456	0	0	.	.
	rs12099648	7	2	0.0013	0.6380
	rs10751701	0	0	.	.
	rs3087864	1	0	0.0000	1.0000
	rs11246851	1	1	0.1148	0.2996
rs11613757	1	0	0.0000	1.0000	

Tabla 4: Valores Missing

gen	SNP	N positivo	N negativo	Estadístico Chi-cuadrado	p-valor
MMP2	rs1053605	1	0	0.0000	1.0000
	rs866770	1	0	0.0000	1.0000
	rs2241145	1	0	0.0000	1.0000
	rs12923011	0	0	.	.
	rs243845	0	0	.	.
	rs11541998	1	0	0.0000	1.0000
	rs1861320	0	0	.	.
MMP9	rs3918249	0	0	.	.
	rs2274755	1	0	0.0000	1.0000
	rs3918256	1	0	0.0000	1.0000
	rs3787268	0	0	.	.

Tabla 4: Valores Missing

6.4 Asociación genotípica

Para cada SNP se muestra la tabla de contingencia, con el porcentaje de casos y controles en cada genotipo observado y un IC del 95% para el mismo. También se muestra el porcentaje de cada genotipo en la población CEU y se marcan en rojo aquellos genotipos que se observan significativamente mayores en la muestra recogida y en verde los significativamente menores. El p-valor se corresponde al estadístico chi-cuadrado o al exacto de Fisher cuando aparece marcado con (*). Se presentan únicamente los valores significativos, que en este caso corresponden solo al gen PTGFR. La tabla completa se muestra en el **anexo 9.6**.

Gen	SNP	Genot.	CEU	Grupo: Positivo				Grupo: Negativo				p-valor
				n	%	IC 95% para el %		n	%	IC 95% para el %		
						Inf.	Sup.			Inf.	Sup.	
PTGFR	rs6686438	GG	54.44	48	49.48	39.53	59.43	16	84.21	67.81	100.00	0.0195 (*)
		GT	36.67	41	42.27	32.44	52.10	3	15.79	0.00	32.19	
		TT	8.89	8	8.25	2.77	13.72	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs6672484	CC	54.44	55	56.70	46.84	66.56	4	21.05	2.72	39.38	0.0104 (*)
		CT	34.44	32	32.99	23.63	42.35	12	63.16	41.47	84.85	
		TT	11.11	10	10.31	4.26	16.36	3	15.79	0.00	32.19	

Tabla 5: Asociación genotípica para cada SNP significativo

Gen	SNP	Genot.	CEU	Grupo: Positivo				Grupo: Negativo				p-valor
				n	%	IC 95% para el %		n	%	IC 95% para el %		
						Inf.	Sup.			Inf.	Sup.	
PTGFR	rs1328441	AA	32.95	23	23.71	15.25	32.18	10	52.63	30.18	75.08	0.0154 (*)
		AG	45.45	45	46.39	36.47	56.32	8	42.11	19.90	64.31	
		GG	21.59	29	29.90	20.79	39.01	1	5.26	0.00	15.30	
PTGFR	rs10782665	GG	37.20	37	37.76	28.16	47.35	14	73.68	53.88	93.48	0.019 (*)
		GT	46.34	46	46.94	37.06	56.82	4	21.05	2.72	39.38	
		TT	16.46	15	15.31	8.18	22.43	1	5.26	0.00	15.30	
PTGFR	rs11578155	AA	86.67	84	86.60	79.82	93.38	12	63.16	41.47	84.85	0.026 (*)
		AG	13.33	12	12.37	5.82	18.92	7	36.84	15.15	58.53	
		GG	0.00	1	1.03	0.00	3.04	0	0.00	.	.	

Tabla 5: Asociación genotípica para cada SNP significativo

6.5 Modelos de herencia

En la **tabla 6**, se muestran los p-valores significativos (test de razón de verosimilitudes -TRV) para cada uno de los modelos en cada polimorfismo. Todos los valores significativos se encuentran asociados al gen del receptor PTGFR, sin encontrar relaciones con los genes de MMP-2,-3,-9 y 17. Se presentan 7 SNPs con modelos significativos, la tabla completa con todos los polimorfismos se presenta en el **anexo 9.7**.

gen	SNP	Co-dominante	Dominante	Recesivo	Over-Dominante	Aditivo
PTGFR	rs6686438	0.0195	0.0035	0.3498	0.0217	0.0195
	rs6672484	0.0136	0.0036	0.5063	0.0146	0.0191
	rs1328441	0.0100	0.0144	0.0112	0.7311	0.0029
	rs10489950	0.0474
	rs10782665	0.0142	0.0037	0.1987	0.0307	0.0049
	rs11578155	0.0260	0.0224	1.0000	0.0157	0.0260
PTGFR	rs3753380	0.0915	0.0399	0.8187	0.0396	0.1045

Tabla 6: Modelos de herencia

Para cada uno de los SNPs con algún modelo significativo se muestran los resultados del ajuste de todos los modelos:

SNP rs6686438 (PTGFR)

Modelo	Genot.	Grupo Positivo		Grupo Negativo		OR	IC 05% para OR		p-valor	AIC
		n	%	n	%		Inf.	Sup.		
Co-dominante	G/G	48	49.5	16	84.2	1	•	•	0.0195	99.9
	G/T	41	42.3	3	15.8	0.22	0.06	0.81		
	T/T	8	8.2	0	0	0	0			
Dominante	G/G	48	49.5	16	84.2	1	•	•	0.0035	98.9
	G/T-T/T	49	50.5	3	15.8	0.18	0.05	0.67		
Recesivo	G/G-G/T	89	91.8	19	100.0	1	•	•	0.3498	104.5
	T/T	8	8.2	0	0	0	•	•		
Sobre-dominante	G/G-T/T	56	57.7	16	84.2	1	•	•	0.0217	102.2
	G/T	41	42.3	3	15.8	0.26	0.07	0.94		
Aditivo	0,1,2	97	83.6	19	16.4	0.2	0.06	0.7	0.0195	98.1

Según el valor del AIC (*Akaike Information Criterion*) se elegiría el modelo aditivo, según el cual cada copia de T en este SNP modifica el riesgo de “ser no respondedor” de forma aditiva. Cada copia de T es un factor de protección, disminuyendo la posibilidad de ser no respondedor.

SNP rs6672484 (PTGFR)

Modelo	Genot.	Grupo: Positivo		Grupo: Negativo		OR	IC 05% para OR		p-valor	AIC
		n	%	n	%		Inf.	Sup.		
Co-dominante	C/C	55	56.7	4	21.1	1	.	.	0.0136	100.9
	C/T	32	33	12	63.2	5.16	1.53	17.34		
	T/T	10	10.3	3	15.8	4.12	0.8	21.3		
Dominante	C/C	55	56.7	4	21.1	1	.	.	0.0036	99
	C/T-T/T	42	43.3	15	78.9	4.91	1.52	15.88		
Recesivo	C/C-C/T	87	89.7	16	84.2	1	.	.	0.5063	107
	T/T	10	10.3	3	15.8	1.63	0.4	6.59		
Sobre-dominante	C/C-T/T	65	67	7	36.8	1	.	.	0.0146	101.5
	C/T	32	33	12	63.2	3.48	1.25	9.69		
Aditivo	0,1,2	97	83.6	19	16.4	2.3	1.14	4.63	0.0191	102

Según el valor del AIC se elegiría el modelo dominante, según el cual el alelo T en este SNP es suficiente para modificar el riesgo de “ser no respondedor”. Ser portador del alelo T aumenta la posibilidad de ser no respondedor.

SNP rs1328441 (PTGFR)

Modelo	Genot.	Grupo: Positivo		Grupo: Negativo		OR	IC 05% para OR		p-valor	AIC
		n	%	n	%		Inf.	Sup.		
Co-dominante	A/A	23	23.7	10	52.6	1	.	.	0.0100	100.2
	A/G	45	46.4	8	42.1	0.41	0.14	1.18		
	G/G	29	29.9	1	5.3	0.08	0.01	0.67		
Dominante	A/A	23	23.7	10	52.6	1	.	.	0.0144	101.5
	A/G-G/G	74	76.3	9	47.4	0.28	0.1	0.77		
Recesivo	A/A-A/G	68	70.1	18	94.7	1	.	.	0.0112	101
	G/G	29	29.9	1	5.3	0.13	0.02	1.02		
Sobre-dominante	A/A-G/G	52	53.6	11	57.9	1	.	.	0.7311	107.3
	A/G	45	46.4	8	42.1	0.84	0.31	2.27		
Aditivo	0,1,2	97	83.6	19	16.4	0.33	0.15	0.73	0.0029	98.6

Según el valor del AIC se elegiría el modelo aditivo, según el cual cada copia de G en este SNP modifica el riesgo de “ser no respondedor” de forma aditiva. Cada copia de G es un factor de protección, aumentando la posibilidad de presentar una respuesta positiva al Latanoprost.

Ser C/T en este polimorfismo es un factor de riesgo de “ser negativo”.

SNP rs10489950 (PTGFR)

Modelo	Genot.	Grupo: Positivo		Grupo: Negativo		OR	IC 05% para OR		p-valor	AIC
		n	%	n	%		Inf.	Sup.		
Co-dominante	C/C	95	96.9	16	84.2	1	.	.	0.0474	103.9
	C/T	3	3.1	3	15.8	5.94	1.1	32.04		

Según el valor del AIC se elegiría el modelo dominante, según el cual el alelo T en este SNP es suficiente para modificar el riesgo de “ser no respondedor”. Ser portador del alelo T es un factor de protección.

SNP rs10782665 (PTGFR)

Modelo	Genot.	Grupo: Positivo		Grupo: Negativo		OR	IC 05% para OR		p-valor	AIC
		n	%	n	%		Inf.	Sup.		
Co-dominante	G/G	37	37.8	14	73.7	1	NA	NA	0.0142	101.3
	G/T	46	46.9	4	21.1	0.23	0.07	0.76		
	T/T	15	15.3	1	5.3	0.18	0.02	1.46		
Dominante	G/G	37	37.8	14	73.7	1	NA	NA	0.0037	99.4
	G/T-T/T	61	62.2	5	26.3	0.22	0.07	0.65		
Recesivo	G/G-G/T	83	84.7	18	94.7	1	NA	NA	0.1987	106.2
	T/T	15	15.3	1	5.3	0.31	0.04	2.48		
Sobredominante	G/G-T/T	52	53.1	15	78.9	1	NA	NA	0.0307	103.1
	G/T	46	46.9	4	21.1	0.3	0.09	0.97		
Aditivo	0,1,2	98	83.8	19	16.2	0.31	0.12	0.77	0.0049	99.9

Según el valor del AIC se elegiría el modelo sobre-dominante, según el cual ser heterocigoto en este SNP modifica el riesgo de “ser no respondedor”. Ser portador del genotipo A/G es un factor de riesgo.

SNP rs11578155 (PTGFR)

Modelo	Genot.	Grupo: Positivo		Grupo: Negativo		OR	IC 05% para OR		p-valor	AIC
		n	%	n	%		Inf.	Sup.		
Co-dominante	A/A	84	86.6	12	63.2	1	.	.	0.0260	103.3
	A/G	12	12.4	7	36.8	4.08	1.34	12.41		
	G/G	1	1	0	0	0	.	.		
Dominante	A/A	84	86.6	12	63.2	1	.	.	0.0224	102.2
	A/G-G/G	13	13.4	7	36.8	3.77	1.25	11.32		
Recesivo	A/A-A/G	96	99	19	100	1	.	.	1.0000	107.1
	G/G	1	1	0	0	0	.	.		
Sobre-dominante	A/A-G/G	85	87.6	12	63.2	1	.	.	0.0157	101.6
	A/G	12	12.4	7	36.8	4.13	1.36	12.55		
Aditivo	0,1,2	97	83.6	19	16.4	2.96	1.07	8.23	0.0260	103.4

Según el valor del AIC se elegirían los modelos dominante y sobre-dominante, sin embargo en ninguno de los dos casos las odds-ratio estimadas son estadísticamente distintas de

SNP rs3753380 (gen PTGFR)

Modelo	Genot.	Grupo: Positivo		Grupo: Negativo		OR	IC 05% para OR		p-valor	AIC
		n	%	n	%		Inf.	Sup.		
Co-dominante	G/G	47	48.5	14	73.7	1	.	.	0.0915	104.7
	A/G	38	39.2	3	15.8	0.27	0.07	0.99		
	A/A	12	12.4	2	10.5	0.56	0.11	2.8		
Dominante	G/G	47	48.5	14	73.7	1	.	.	0.0399	103.2
	A/G-A/A	50	51.5	5	26.3	0.34	0.11	1		
Recesivo	G/G-A/G	85	87.6	17	89.5	1	.	.	0.8187	107.4
	A/A	12	12.4	2	10.5	0.83	0.17	4.07		
Sobredominante	G/G-A/A	59	60.8	16	84.2	1	.	.	0.0396	103.2
	A/G	38	39.2	3	15.8	0.29	0.08	1.07		
Aditivo	0,1,2	97	83.6	19	16.4	0.52	0.23	1.2	0.1045	104.8

1. En el modelo dominante, portar el alelo A sería un factor de protección, y en el modelo over-dominante, ser heterocigoto en este SNP es factor de protección.

6.6 Asociación alélica

El primer paso para realizar esta aproximación fue comprobar el contraste acerca del equilibrio Hardy-Weinberg en los no respondedores. Todos los SNPs mostrados se encuentran en equilibrio, solo hay un marcador, el rs7545762(gen MGC27382) que mostraría una distribución inconsistente con la hipótesis del equilibrio en la muestra de nos respondedores, sin embargo, el p-valor ajustado para comparaciones múltiples utilizando el método de false-discovery rate (Benjamini 1995) está próximo a 1. En el caso del SNP rs1417103 (MGC27382) no es posible realizar el contraste ya que todos los pacientes portan T/T en esta muestra.

A continuación, aparece la tabla 7, resumida únicamente para los SNPs significativos, con el porcentaje de casos y controles en cada alelo observado y un intervalo de confianza (IC) del 95% para el mismo (la tabla completa se presenta en el anexo 9.8). También se muestra el porcentaje de cada alelo en la población CEU y se marca en rojo aquellos alelos que se observan significati-

vamente mayores en la muestra recogida y en verde los significativamente menores.

Gen	SNP	Al.	CEU	Grupo: Positivo				Grupo: Negativo				p-valor chi-cuad.	p-valor exacto
				n	%	IC 95% para el %		n	%	IC 95% para el %			
						Inf.	Sup.			Inf.	Sup.		
PTGFR	rs6686438	G	73.1	137	70.62	64.21	77.03	35	92.11	83.53	100.00	0.0195	0.0076
		T	26.9	57	29.38	22.97	35.79	3	7.89	0.00	16.47		
PTGFR	rs6672484	C	73.8	142	73.20	66.96	79.43	20	52.63	36.76	68.51	0.0104	0.0182
		T	26.2	52	26.80	20.57	33.04	18	47.37	31.49	63.24		
PTGFR	rs1328441	A	41.3	91	46.91	39.88	53.93	28	73.68	59.68	87.69	0.0154	0.0037
		G	58.7	103	53.09	46.07	60.12	10	26.32	12.31	40.32		
PTGFR	rs10782665	G	59.7	120	61.22	54.40	68.05	32	84.21	72.62	95.80	0.0190	0.0106
		T	40.3	76	38.78	31.95	45.60	6	15.79	4.20	27.38		
PTGFR	rs11578155	A	94.6	180	92.78	89.14	96.42	31	81.58	69.25	93.90	0.0260	0.0375
		G	5.4	14	7.22	3.58	10.86	7	18.42	6.10	30.75		

Tabla 7: Asociación alélica

En la tabla 8, se marcan en verde los factores de protección y en rojo los factores de riesgo al portar el alelo minoritario, de lo que se establece que:

- Portar T en lugar de C en el rs6672484 proporciona un riesgo 5.1 veces mayor de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost.
- Portar G en lugar de A en el rs11578155 genera un riesgo 4.0 veces mayor de ser no

Gen	SNP		OR	IC 95% OR	
				Inf.	Sup
PTGFR	rs6686438	G>T	0.2195	0.0597	0.8068
	rs6672484	C>T	5.1562	1.5336	17.3363
	rs1328441	A>G	0.4134	0.1230	1.3421
PTGRF	rs10782665	G>T	0.2298	0.0697	0.7573
	rs11578155	A>G	4.0833	1.3441	12.4051

Tabla 8: Odds ratios de los SNPs significativos en la asociación alélica

respondedor a la terapia con Latanoprost.

- Portar T en lugar de G en el rs6686438 aporta una posibilidad cinco veces mayor de ser respondedor a la terapia con Latanoprost.
- Portar T en lugar de G en el rs10782665 genera una posibilidad cinco veces mayor de ser respondedor al Latanoprost.

6.7 Análisis de haplotipos

A continuación se presentan los haplotipos y sub-haplotipos para cada uno de los 6 genes estudiados:

6.7.1 PTGFR.

Cromosoma 1, el orden de los SNPs en los haplotipos es el siguiente:

	SNP	Posición		SNP	Posición
1	rs6686438	78769947	17	rs674345	78894934
2	rs7545762	78772285	18	rs518341	78896492
3	rs1328449	78790397	19	rs10782665	78921860
4	rs12568630	78791488	20	rs11578155	78934566
5	rs1581920	78791784	21	rs6692239	78937828
6	rs1581918	78792117	22	rs11162494	78938709
7	rs6672484	78793647	23	rs3753380	78956432
8	rs1328441	78797784	24	rs3766355	78957441
9	rs1417103	78799291	25	rs3766354	78957550
10	rs724159	78799414	26	rs1555541	78961585
11	rs2352039	78819945	27	rs12748050	78984588
12	rs10873978	78821497	28	rs520171	78989850
13	rs1034186	78836468	29	rs473027	78992202
14	rs10489950	78842265	30	rs4650581	79000203
15	rs1999012	78892701	31	rs3766332	79001994
16	rs11162488	78894362	32	rs12731181	79002589

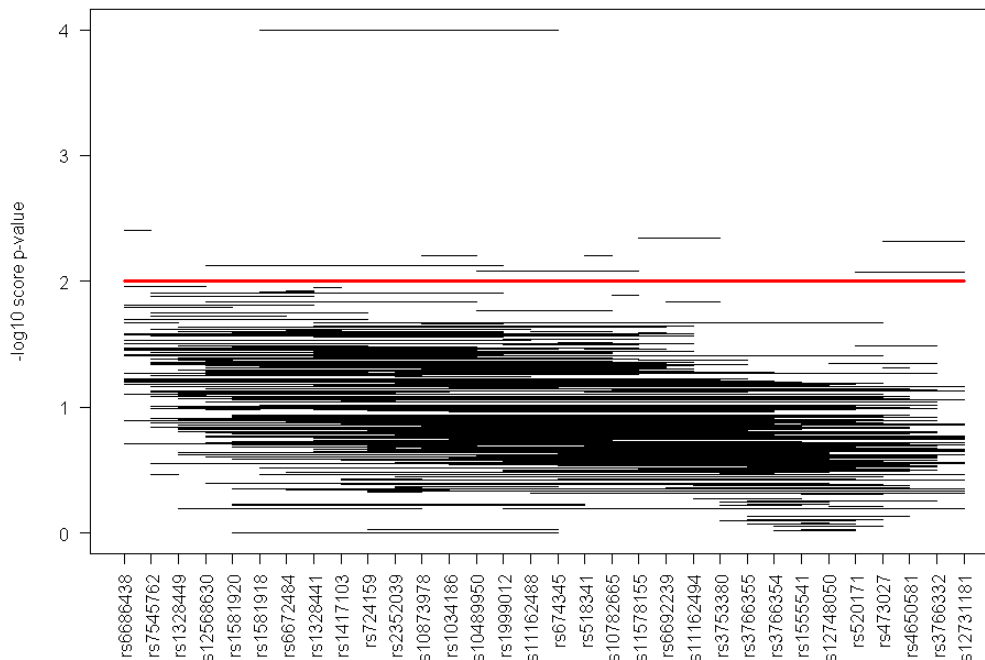
Con respecto a los contrastes globales, este haplotipo no tiene un efecto significativo con el caso/control. Las frecuencias y estadístico “score” para los haplotipos consistentes en casos y controles se presentan en el **Anexo 9.9**.

Sub-haplotipos del gen PTGFR

SNPs*	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs6686438	0.0039	0.0046
2	rs518341	0.0062	0.0067
3	rs10873978	0.0062	0.0069
3	rs473027	0.0097	0.0160
4	rs11578155	0.0045	0.0055
4	rs473027	0.0049	0.0098
5	rs520171	0.0085	0.0160
7	rs10489950	0.0083	0.0117
12	rs12568630	0.0075	0.0170
12	rs1581918	0.0000	0.0002
21	rs1328441	0.0097	0.0129

Se consideran los sub-haplotipos con p-valor <0.01. Hay 11 sub-haplotipos con este nivel de significación. La tabla completa con todos los subhaplotipos se muestra en el **anexo 9.9**.

Sub-haplotipos PTGFR



En esta gráfica de subhaplotipos del gen PTGFR, se encuentran situados sobre la línea roja aquellos que son significativos y se describen en detalle a continuación, mostrando las frecuencias y estadístico “score” para los haplotipos consistentes en casos y en controles de cada uno:

1. Sub-haplotipo rs1581918 – rs674345 (12 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	ACATTGCTCCAA	0.0314	0.0284	0.0526	0.5442	0.5863	0.7010
2	ACATTTCTCCAA	0.0550	0.0538	0.0491	0.6869	0.4922	0.5280
3	ACATTTCTCCAG	0.0254	0.0186	0.0825	2.1006	0.0357	0.0330
4	GCGTCGCTCCAA	0.0103	0.0000	0.0263	1.0933	0.2743	0.1600
5	GCGTCGCTCGAG	0.1293	0.1450	0.0526	-1.6023	0.1091	0.1470
6	GCGTCGTTCCCG	0.0619	0.0610	0.0526	-1.0324	0.3019	0.3130
7	GCGTCGTTTCAA	0.0214	0.0153	0.0526	1.4724	0.1409	0.0750
8	GCGTTGTTCCCG	0.1065	0.1169	0.0263	-1.1493	0.2504	0.1840
9	GTATTGCTCCAA	0.0873	0.0761	0.1614	1.4533	0.1461	0.1420
10	GTATTGCTCCAG	0.1166	0.1003	0.2070	1.7112	0.0870	0.1070
11	GTATTGCTCGAG	0.0631	0.0541	0.0789	1.2127	0.2252	0.2390
12	GTATTGTTCCCG	0.0141	0.0123	0.0263	0.6685	0.5038	0.9030

Los haplotipos más frecuentes son el H5 y H10 (~12%) y no tienen un efecto estadísticamente significativo. Se detecta un haplotipo con un efecto significativo, el H3 con una frecuencia del 3% en la muestra global, 2% en los controles y 8% en los casos, por lo tanto el tener este haplotipo representa un factor de riesgo a ser no respondedor a la terapia con Latanoprost.

2. Subhaplotipo rs6686438-rs7545762 (2 SNPs):

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	GA	0.3683	0.3268	0.6022	2.9735	0.0029	0.0071
2	GT	0.3718	0.3776	0.3189	-0.4313	0.6663	0.7316
3	TA	0.2599	0.2957	0.0557	-2.7662	0.0057	0.0047
4	TT	0.0000	0.0000	0.0232	-0.0004	0.9996	0.4901

Los haplotipos más frecuentes son el H1 y H2 (~37%), de ellos el H1 es significativo con una frecuencia del 33% en el grupo de controles y del 60% en el de casos. Además el H3 es también significativo, con una frecuencias del 26% en la muestra global, 30% en los controles y sólo 6% en los casos. Este haplotipo (TA) favorece el presentar una respuesta positiva al Latanoprost.

3. Sub-haplotipo rs11578155-rs3753380 (4 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	ACAA	0.2273	0.2401	0.1579	-1.1789	0.2384	0.2434
2	ACAG	0.1007	0.1156	0.0263	-1.6779	0.0934	0.0791
3	ACTG	0.1764	0.1804	0.1579	-0.3235	0.7464	0.7784
4	ATAG	0.3350	0.3123	0.4474	1.5661	0.1173	0.1132
5	GCTG	0.0905	0.0722	0.1842	2.1956	0.0281	0.0152

El haplotipo más frecuente es el H4 (~34%) y no tiene un efecto estadísticamente significativo. Se detecta un haplotipo con un efecto significativo, el H5 con una frecuencias del 9% en la muestra global, 7% en los controles y 18% en los casos. Tener este haplotipo (GCTG) es un factor de riesgo para ser no respondedor al Latanoprost.

4. Sub-haplotipo rs473027-rs12731181 (4 SNPs):

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	AATA	0.0353	0.0353	0.0284	-0.2836	0.7767	0.7750
2	AATG	0.0193	0.0112	0.0829	1.8393	0.0659	0.0620
3	ATTA	0.6327	0.6620	0.4676	-1.8596	0.0629	0.0530
4	GATG	0.1274	0.1354	0.0729	-0.4734	0.6359	0.6480
5	GTAA	0.0641	0.0714	0.0263	-1.0766	0.2816	0.2500
6	GTTA	0.1055	0.0767	0.2671	2.9979	0.0027	0.0040
7	GTTG	0.0156	0.0064	0.0548	2.1040	0.0354	0.0510

El haplotipo más frecuente es el H3 (~63%) y tiene un efecto al borde de la significación, con un 66% en la muestra de controles y un 47% en la de casos. Se detectan dos haplotipos con un efecto significativo, el H6 con una frecuencia del 11% en la muestra global, 8% en los controles y 27% en los casos, y el H7 con una frecuencia del 2% en la muestra global, 0.6% en los controles y 6% en los casos. Ambos haplotipos (GTTA, GTTG) aumentan el riesgo de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost.

5. Sub-haplotipo rs518341 – rs10782665 (2 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	CG	0.0650	0.0726	0.0263	-1.0954	0.2733	0.4370
2	TG	0.5846	0.5396	0.8158	3.1706	0.0015	0.0020
3	TT	0.3504	0.3878	0.1579	-2.6384	0.0083	0.0127

El haplotipo más frecuente es el H2 (~59%) y tiene un efecto significativo, con un 54% en la muestra de controles y un 82% en la de casos, tener este haplotipo (TG) incrementa el riesgo de no responder al Latanoprost.

Además se detecta otro haplotipo con un efecto significativo, el H3 con una frecuencia del 35% en la muestra global, 39% en los controles y 16% en los casos, este haplotipo (TT) favorece el presentar una respuesta positiva al Latanoprost.

6. Sub-haplotipo rs10873978 – rs10489950 (3 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	CAC	0.0559	0.0617	0.0263	-0.8957	0.3704	0.4322
2	CTC	0.5723	0.5454	0.7105	2.0428	0.0411	0.0439
3	TTC	0.3462	0.3776	0.1842	-2.3855	0.0171	0.0133
4	TTT	0.0256	0.0153	0.0789	2.3020	0.0213	0.0055

El haplotipo más frecuente es el H2 (~57%) y tiene un efecto significativo, con un 55% en la muestra de controles y un 71% en la de casos, este haplotipo (CTC) es un factor de riesgo de ser no respondedor.

Se detectan además 2 haplotipos con un efecto significativo:

- El H3 con una frecuencia del 35% en la muestra global, 38% en los controles y 18% en los casos, este haplotipo (TTC) favorece la posibilidad de ser respondedor positivo al Latanoprost.
- El H4 con una frecuencia del 3% en la muestra global, 2% en los controles y 8% en los casos, tener este haplotipo (TTT) es un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost.

7. Sub-haplotipo rs12568630 – rs1999012 (12 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	ACACATTTCTCC	0.0341	0.0179	0.1053	2.7085	0.0068	0.0080
2	ACACATTTTTTC	0.0072	0.0034	0.0263	1.5416	0.1232	0.1640
3	TCACATTGCTCC	0.0385	0.0357	0.0789	0.5065	0.6125	0.3780
4	TCACATTTACC	0.0569	0.0631	0.0000	-0.9201	0.3575	0.4190
5	TCGCGTCGCTCC	0.0101	0.0062	0.0000	1.1315	0.2578	0.2860
6	TCGCGTCGCTCG	0.1281	0.1428	0.0526	-1.5823	0.1136	0.1420
7	TCGCGTCGTTCC	0.1390	0.1597	0.0526	-1.7102	0.0872	0.1030
8	TCGCGTCGTTTC	0.0183	0.0085	0.0526	1.7562	0.0790	0.0850
9	TCGTATTGCTCC	0.2183	0.1950	0.3684	1.9503	0.0511	0.0580
10	TCGTATTGCTCG	0.0619	0.0533	0.0789	1.2590	0.2080	0.2140
11	TCGTATTGTTCC	0.0197	0.0180	0.0263	0.3346	0.7379	0.9230
12	TTGCGTTGTTCC	0.1211	0.1292	0.0789	-0.8292	0.4070	0.4740

El haplotipo más frecuente es el H9 (~21%) y tiene un efecto al borde de la significación, con un 19% en la muestra de controles y un 37% en la de casos. Se detecta 1 haplotipo con un efecto significativo, el H1 con una frecuencia del 3% en la muestra global, 2% en los controles y 11% en los casos. Tener este haplotipo (ACACATTTCTCC) representa un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost.

8. Sub-haplotipo rs10489950 – rs11578155 (7 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	CCAATGA	0.1511	0.1620	0.1053	-0.8539	0.3932	0.4566
2	CCAATGG	0.0910	0.0727	0.1842	2.1797	0.0293	0.0455
3	CCAGTGA	0.1820	0.1609	0.3158	1.9221	0.0546	0.0556
4	CCCGTTA	0.2393	0.2653	0.1053	-2.0545	0.0399	0.0329
5	CGAGTGA	0.1306	0.1304	0.1053	0.0205	0.9836	0.9368
6	CGAGTTA	0.0764	0.0810	0.0526	-0.5936	0.5528	0.5451
7	TCAATGA	0.0256	0.0135	0.0789	2.3020	0.0213	0.0354

El haplotipo más frecuente es el H4 (~24%) y tiene un efecto significativo, con un 27% en la muestra de controles y un 11% en la de casos. Este haplotipo (CCCGTTA) aumenta la posibilidad de ser respondedor positivo.

Se detectan además otros dos haplotipos con un efecto significativo: el H2 (CCAATGG) con una frecuencia del 9% en la muestra global, 7% en los controles y 18% en los casos y el H7 (TCAATGA) con una frecuencia del 3% en la muestra global, 1% en los controles y 8% en los casos. Ambos haplotipos aumentan la posibilidad de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost.

9. Sub-haplotipo rs520171 – rs12731181 (5 SNPs)

Haplotipo Total	Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score			
	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado		
1	AATTA	0.1456	0.1535	0.0492	-0.7329	0.4636	0.4950
2	AGATG	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.6600
3	AGTTA	0.0211	0.0149	0.0730	2.2018	0.0277	0.0270
4	CAATA	0.0349	0.0349	0.0283	-0.2723	0.7854	0.8380
5	CAATG	0.0193	0.0112	0.0491	1.8385	0.0660	0.0430
6	CATTA	0.4875	0.5088	0.4166	-1.2710	0.2037	0.2140
7	CGATG	0.1275	0.1354	0.0710	-0.4725	0.6365	0.6580
8	CGTAA	0.0641	0.0714	0.0263	-1.0766	0.2816	0.4710
9	CGTTA	0.0844	0.0620	0.1961	2.9112	0.0036	0.0030
10	CGTTG	0.0156	0.0064	0.0546	2.1016	0.0356	0.0380

El haplotipo más frecuente es el H6 (~49%) y no tiene un efecto significativo. Se detectan tres haplotipos con un efecto significativo, el H9 (CGTTA) con una frecuencia del 8% en la muestra global, 6% en los controles y 20% en los casos, el H3 (AGTTA) con una frecuencia del 2% en la muestra global, 1.5% en los controles y 7% en los casos y el H10 (CGTTG) con una frecuencia del 1.5% en la muestra global, 0.7% en los controles y 5.5% en los casos.

10. Sub-haplotipo rs473027 – rs3766332 (3 SNPs)

Haplotipo Total	Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score			
	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado		
1	AAT	0.0556	0.0464	0.1297	0.8928	0.3720	0.3706
2	ATA	0.0000	0.0000	0.0000	-0.0003	0.9998	0.2613
3	ATT	0.6324	0.6630	0.4492	-1.9269	0.0540	0.0623
4	GAT	0.1203	0.1311	0.0545	-0.4478	0.6543	0.6942
5	GTA	0.0641	0.0714	0.0263	-1.0766	0.2816	0.4121
6	GTT	0.1277	0.0881	0.3403	3.2773	0.0010	0.0038

Todos ellos incrementan la posibilidad de no respuesta al Latanoprost.

El haplotipo más frecuente es el H3 (~63%) y tiene un efecto al borde de la significación, con una frecuencia del 66% en la muestra de controles y 45% en la de casos. Se detecta un haplotipo con un efecto significativo, el H6 (GTT) con una frecuencia del 13% en la muestra global, 9% en los controles y 34% en los casos, aumentando la posibilidad de ser no respondedor.

11. Sub-haplotipo rs1328441- rs520171 (21 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	ATTGCTCCAATGGCTGGCACC	0.0729	0.0612	0.1842	2.5077	0.0122	0.0270
2	ATTGCTCCAGTGATAGGCGTC	0.0357	0.0242	0.1053	1.3382	0.1808	0.3040
3	ATTGCTCGAGTGATAGGCGCC	0.0254	0.0102	0.0789	3.4775	0.0005	0.0070
4	ATTGCTCGAGTTACAAGCACC	0.0118	0.0073	0.0263	0.7986	0.4245	0.3330
5	ATTGTTCCCGTTACAAGCACC	0.0152	0.0131	0.0263	0.6313	0.5279	0.9110
6	GTCGCTCGAGTGATAGGCGCA	0.0166	0.0145	0.0263	0.5224	0.6014	0.6820
7	GTCGCTCGAGTTACAAGCACC	0.0155	0.0134	0.0263	0.6063	0.5443	0.9040
8	GTCGTTCAATGACTGGCACC	0.0214	0.0126	0.0526	1.4724	0.1409	0.1160
9	GTTGTTCCCGTTACAAGCACA	0.0154	0.0163	0.0263	0.2811	0.7786	0.9010

Se detectan dos haplotipos con efecto significativo, el H1 (ATTGCTCCAATGGCTGGCACC) con una frecuencia del 7% en la muestra global, 6% en los controles y 18% en los casos; y el H3 (ATTGCTCGAGTGATAGGCGCC) con una frecuencia del 2.5% en la muestra global, 1% en los controles y 8% en los casos, ambos haplotipos aumentan el riesgo de no responder al Latanoprost.

6.7.2 MMP-1

Cromosoma 11, el orden de los SNPs que fueron evaluados en los haplotipos es:

	SNP	Posición
1	rs17293823	102660407
2	rs7945189	102660564
3	rs470215	102661099
4	rs7125062	102663503
5	rs7125320	102663708
6	rs11225426	102664591
7	rs2071232	102665669
8	rs5031036	102666164
9	rs470358	102668702
10	rs514921	102669230
11	rs475007	102669312

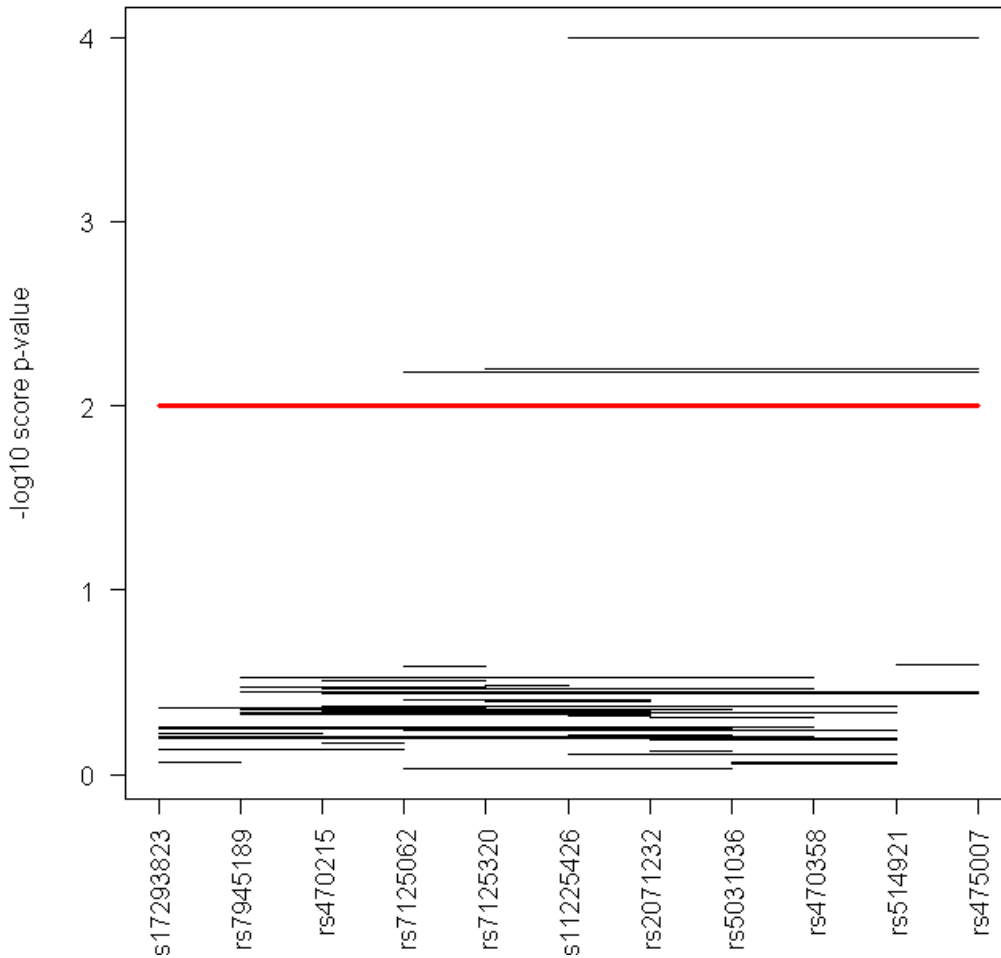
Con respecto a los contrastes globales, los haplotipos formados por estos 11 SNPs no tienen un efecto significativo con el estado caso/control. Las frecuencias y estadístico “score” para los haplotipos consistentes en casos y controles se muestran en el **anexo 9.10**.

Sub-haplotipos para MMP-1:

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
3	rs470358	<0.0001	0.0142
4	rs5031036	<0.0001	0.0060
5	rs2071232	<0.0001	0.0139
6	rs11225426	<0.0001	0.0180
7	rs7125320	0.0063	0.0730
8	rs7125062	0.0066	0.0779

Resultan significativos los sub-haplotipos que tienen en cuenta entre 3 y 8 marcadores finales de este gen. Consideramos los sub-haplotipos con p-valor ≤ 0.01 . Hay 6 sub-haplotipos con este nivel de significación, la tabla completa de todos los subhaplotipos para este gen se incluye en el **anexo 9.10**.

Sub-haplotipos MMP1



En esta gráfica se muestran sobre la línea roja aquellos sub-haplotipos que son significativos. A continuación se detallan los seis subhaplotipos que muestran un nivel de significación de $p < 0.01$ con sus frecuencias y estadístico “score” para los haplotipos consistentes en casos y controles.

1. Sub-haplotipo rs11225426 – rs475007 (6 SNPs)

	Haplotipo Total	Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	CCACGA	0.0228	0.0252	0.0140	0.1661	0.8681	0.9810
2	CCATAA	0.0521	0.0134	0.1842	3.0663	0.0022	0.0080
3	CTACAA	0.1795	0.1942	0.1103	0.4991	0.6177	0.6320
4	CTACAT	0.1276	0.1210	0.2581	0.5351	0.5926	0.5940
5	CTACGA	0.1237	0.0934	0.1842	0.6609	0.5087	0.5110
6	CTATAA	0.1153	0.1261	0.1265	-0.1418	0.8872	0.8990
7	CTATAT	0.0662	0.0660	0.0314	-0.4611	0.6447	0.6680
8	CTATGA	0.0064	0.0072	0.0000	-0.3432	0.7314	0.8070
9	TTACAT	0.0175	0.0000	0.0000	0.5298	0.5962	0.9920
10	TTATAA	0.0391	0.0440	0.0526	-0.4473	0.6547	0.6770
11	TTATAT	0.0487	0.0492	0.0000	-1.1009	0.2710	0.2090
12	TTATGA	0.0073	0.0079	0.0000	-0.2092	0.8343	0.9090

El haplotipo más frecuente es el H3 (~17%) y no tiene un efecto estadísticamente significativo. Se detecta un haplotipo con efecto significativo, el H2 (CCATAA) con una frecuencia del 5% en la muestra global, 1% en los controles y 18% en los casos, por lo que puede representar un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost.

2. Sub-haplotipo rs2071232 – rs475007 (5 SNPs)

	Haplotipo Total	Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	CACGA	0.0242	0.0265	0.0132	0.0966	0.9231	0.9890
2	CATAA	0.0505	0.0112	0.1842	3.1666	0.0015	0.0020
3	TACAA	0.1894	0.2009	0.1109	0.2802	0.7793	0.7880
4	TACAT	0.1426	0.1245	0.2575	0.7720	0.4401	0.4720
5	TACGA	0.1181	0.0958	0.1842	0.7862	0.4318	0.4520
6	TATAA	0.1580	0.1733	0.1786	-0.4215	0.6734	0.6900
7	TATAT	0.1140	0.1154	0.0320	-1.1335	0.2570	0.2770
8	TATGA	0.0139	0.0150	0.0000	-0.4023	0.6874	0.9490
9	TGCAT	0.0268	0.0206	0.0263	-0.0214	0.9829	1.0000

El haplotipo más frecuente es el H3 (~19%) y no tiene un efecto estadísticamente significativo. Se detecta un haplotipo con efecto significativo, el H2 (CATAA), con una frecuencia

del 5% en la muestra global, 1% en los controles y 18% en los casos, este haplotipo aumentaría la posibilidad de ser no respondedor al Latanoprost.

El haplotipo más frecuente es el H4 (~18%) y no tiene un efecto estadísticamente

3. Sub-haplotipo rs7125320 –rs475007 (7 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	GTTATAA	0.0150	0.0243	0.0263	-0.7037	0.4816	0.4830
2	TCCACGA	0.0223	0.0241	0.0153	0.1883	0.8507	0.9530
3	TCCATAA	0.0573	0.0190	0.1842	2.9594	0.0031	0.0120
4	TCTACAA	0.1836	0.1920	0.1103	0.2540	0.7995	0.7920
5	TCTACAT	0.1413	0.1223	0.2581	0.8445	0.3984	0.4120
6	TCTACGA	0.1168	0.0986	0.1842	0.8130	0.4162	0.4560
7	TCTATAA	0.1213	0.1267	0.1265	-0.1391	0.8894	0.8850
8	TCTATAT	0.0611	0.0619	0.0314	-0.4236	0.6718	0.7050
9	TTTACGA	0.0047	0.0012	0.0000	1.2551	0.2094	0.3210
10	TTTATAA	0.0138	0.0128	0.0263	0.3752	0.7075	0.8230

significativo. Se detecta un haplotipo con efecto significativo, el H3 (TCCATAA), con una frecuencia del 6% en la muestra global, 2% en los controles y 18% en los casos. Este haplotipo aumenta el riesgo de ser no respondedor.

4. Sub-haplotipo rs7125062-rs475007 (8 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	CGTTATAA	0.0150	0.0243	0.0263	-0.7040	0.4814	0.5230
2	CGTTATAT	0.0596	0.0593	0.0000	-1.0613	0.2885	0.2950
3	CTCCACGA	0.0218	0.0235	0.0096	0.2158	0.8291	0.8150
4	CTCCATAA	0.0573	0.0191	0.1842	2.9552	0.0031	0.0150
5	TTCTACAA	0.1837	0.1923	0.1103	0.2531	0.8002	0.8150
6	TTCTACAT	0.1412	0.1219	0.2581	0.8461	0.3975	0.4180
7	TTCTACGA	0.1172	0.0990	0.1842	0.8027	0.4221	0.4230
8	TTCTATAA	0.1213	0.1265	0.1265	-0.1395	0.8891	0.8940
9	TTCTATAT	0.0611	0.0619	0.0314	-0.4222	0.6729	0.7090
10	TTTTACGA	0.0047	0.0010	0.0000	1.2980	0.1943	0.0000
11	TTTTATAA	0.0138	0.0129	0.0263	0.3778	0.7056	1.0000

El haplotipo más frecuente es el H5 (~18%) y no tiene un efecto estadísticamente significativo. Se detecta un haplotipo con efecto significativo, el H4 (CTCCATAA) con una frecuencia del 6% en la muestra global, 2% en los controles y 18% en los casos, este haplotipo incrementa la posibilidad de ser no respondedor.

5. Sub-haplotipo rs470358 – rs475007(3 SNPs)

Haplotipo Total		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado	
1	CAA	0.2003	0.2190	0.1093	-0.2056	0.8371	0.8360
2	CAT	0.1756	0.1539	0.2854	0.7273	0.4671	0.4350
3	CGA	0.1444	0.1248	0.2105	0.7491	0.4538	0.4280
4	TAA	0.2089	0.1850	0.3643	1.8116	0.0701	0.0730
5	TAT	0.1588	0.1768	0.0304	-1.4420	0.1493	0.1360
6	TGA	0.0151	0.0176	0.0000	-0.4462	0.6555	0.8550

Los haplotipos más frecuentes son el H1 y H4 (~20%). Este último (TAA) es el único haplotipo que muestra un efecto al borde de la significación, con una frecuencia del 19% en la muestra de controles y de 36% en la de casos.

5. Sub-haplotipo rs5031036–rs475007 (4 SNPs)

Haplotipo		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Total	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado
1	ACAA	0.1858	0.1968	0.1098	0.1761	0.8602	0.8667
2	ACAT	0.1477	0.1301	0.2586	0.7895	0.4298	0.4239
3	ACGA	0.1456	0.1265	0.2105	0.7148	0.4747	0.4815
4	ATAA	0.2093	0.1862	0.3638	1.7511	0.0799	0.0733
5	ATAT	0.1581	0.1756	0.0309	-1.3677	0.1714	0.1753
6	ATGA	0.0145	0.0167	0.0000	-0.4563	0.6481	0.8765
7	GCAT	0.0290	0.0257	0.0263	-0.1112	0.9115	1.0000

El haplotipo más frecuente es el H4 (ATAA) (~21%) y muestra un efecto al borde de la significación, con una frecuencia del 19% en la muestra de controles y de un 36% en la de casos.

6.7.3 MMP-2

Cromosoma 16. El orden de los SNPs estudiados en los haplotipos es el siguiente.

	SNP	Posición
1	rs1053605	55519607
2	rs866770	55520060
3	rs2241145	55522200
4	rs12923011	55525160
5	rs243845	55526487
6	rs11541998	55536763
7	rs1861320	55541040

De forma global, los haplotipos formados por estos 7 SNPs no tienen un efecto significativo con el estado caso/control. Sus frecuencias haplotípicas y estadístico “score” se presentan en el **anexo 9.11**

Sub-haplotipos MMP-2

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs1053605	0.2504	0.1960
	rs866770	0.2339	0.2050
	rs2241145	0.8809	0.9210
	rs12923011	0.4552	0.4780
	rs243845	0.3768	0.3930
	rs11541998	0.4565	0.4750
3	rs1053605	0.3902	0.3970
	rs866770	0.4359	0.4400
	rs2241145	0.2816	0.2540
	rs12923011	0.4925	0.4700
	rs243845	0.5725	0.6150
4	rs1053605	0.5747	0.5800
	rs866770	0.3220	0.3280
	rs2241145	0.1627	0.1600
	rs12923011	0.5286	0.5210
5	rs1053605	0.4546	0.4640
	rs866770	0.2088	0.1800
	rs2241145	0.2194	0.2390
6	rs1053605	0.3008	0.2850
	rs866770	0.2468	0.2220

No hay subhaplotipos que muestren un efecto significativo.

6.7.4 MMP-3

Cromosoma 11. Los SNPs, ordenados por sub-haplotipos son:

	SNP	Posición
1	rs569444	102707305
2	rs650108	102708787
3	rs520540	102709425
4	rs3025066	102710483

De forma global, los haplotipos formados por estos 4 SNPs no tienen un efecto significativo con el estado caso/control. Las frecuencias y estadístico “score” para los haplotipos consistentes en casos y en controles son presentados en el **anexo 9.12**.

Sub-haplotipos MMP-3

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs569444	0.3897	0.3920
	rs650108	0.5057	0.5110
	rs520540	0.7268	0.7050
3	rs569444	0.5953	0.5990
	rs650108	0.5246	0.5460

No hay subhaplotipos que muestren un efecto significativo.

6.7.5 MMP-9

Cromosoma 20. El orden de los SNPs estudiados en los haplotipos es:

	SNP	Posición
1	rs3918249	44638136
2	rs2274755	44639692
3	rs3918256	44640959
4	rs3787268	44641731

De forma global, los haplotipos formados por estos 7 SNPs no tienen un efecto significativo con el estado caso/control. Las frecuencias y estadístico “score” para los haplotipos consistentes en casos y en controles se presentan en el **anexo 9.13**.

Sub-haplotipos MMP-9

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs3918249	0.6662	0.6730
	rs2274755	0.6914	0.7170
	rs3918256	0.6689	0.6510
3	rs3918249	0.8430	0.8350
	rs2274755	0.8046	0.8350

No hay subhaplotipos que muestren un efecto significativo.

6.7.6 MMP-17:

Cromosoma 12. El orden de los SNPs en los haplotipos es:

	SNP	Posición
1	rs4964926	132316224
2	rs4964927	132316248
3	rs10751699	132323784
4	rs7484577	132324972
5	rs10902456	132330531
6	rs12099648	132330718
7	rs10751701	132330735
8	rs3087864	132331373
9	rs11246851	132331532
10	rs11613757	132332237

De forma global, los haplotipos formados por estos 10 SNPs no tienen un efecto significativo con el estado respondedor/ no respondedor. Las frecuencias y estadístico “score” para los haplotipos consistentes en casos y en controles se muestran en el **anexo 9.14**.

Sub-haplotipos MMP-17: No hay sub-haplotipos que muestren un efecto significativo:

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs4964926	0.7474	0.7450
	rs4964927	0.5356	0.5430
	rs10751699	0.6444	0.5920
	rs7484577	0.3878	0.4090
	rs10902456	0.6464	0.6230
	rs12099648	0.9810	0.9630
	rs10751701	0.7633	0.6720
	rs3087864	0.3430	0.3480
	rs11246851	0.5963	0.5820
3	rs4964926	0.7061	0.6500
	rs4964927	0.8199	0.7970
	rs10751699	0.3410	0.3370
	rs7484577	0.6336	0.6300
	rs10902456	0.4951	0.4720
	rs12099648	0.5742	0.5370
	rs10751701	0.5320	0.5090
	rs3087864	0.6143	0.6580
4	rs4964926	0.7521	0.7590
	rs4964927	0.5526	0.5920
	rs10751699	0.5032	0.4970
	rs7484577	0.4853	0.4910
	rs10902456	0.9280	0.9301
	rs12099648	1.0000	0.9770
	rs10751701	0.7163	0.7320
5	rs4964926	0.6573	0.6690
	rs4964927	0.7053	0.7150
	rs10751699	0.6119	0.5950
	rs7484577	0.9339	0.9440
	rs10902456	0.6414	0.6620
	rs12099648	1.0000	0.9820
6	rs4964926	0.7471	0.7910
	rs4964927	0.6759	0.6860
	rs10751699	0.8412	0.8380
	rs7484577	0.8735	0.8860
	rs10902456	0.6726	0.6690

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
7	rs4964926	0.7327	0.7640
	rs4964927	0.8485	0.8560
	rs10751699	0.7140	0.7320
	rs7484577	0.8044	0.8110
8	rs4964926	0.7994	0.8140
	rs4964927	0.7391	0.7780
	rs10751699	0.8347	0.8520
9	rs4964926	0.7691	0.7680
	rs4964927	0.8274	0.8470

6.8 Comparaciones múltiples en cada gen candidato

	Contrastes marginales de SNP		Contrastes haplotípicos		Contraste Resumen	
	minP test (WYZ)	p-valor (pWYZ)	minP test (HFT)	p-valor (pHFT)	minP test (OMNI)	p-valor (pOMNI)
PTGFR	0.0029	0.023	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MMP1	0.0614	0.711	<0.0001	0.036	0.036	0.041
MMP3	0.2290	0.830	0.3897	0.616	0.616	0.776
MMP17	0.0944	0.828	0.341	0.944	0.828	0.937
MMP2	0.1359	0.796	0.1627	0.564	0.564	0.677
MMP9	0.3366	0.928	0.6662	0.869	0.869	0.952

Las comparaciones múltiples en el conjunto de genes candidatos, fijando el valor del FDR en el 5% se encontró un gen significativo asociado con el estado no respondedor / respondedor (caso/control): el gen PTGFR.

Al nivel del 10% se encontraron dos genes: PTGFR y MMP-1. Los demás genes candidatos estudiados no mostraron diferencias significativas en el hecho de ser respondedor o no respondedor.

	p-value	q-value
PTGFR	<0.0001	<0.0001
MMP1	0.041	0.093
MMP3	0.776	0.952
MMP17	0.937	0.952
MMP2	0.677	0.952
MMP9	0.952	0.952

7 DISCUSIÓN

7.1 Limitaciones del presente estudio

Las posibles limitaciones del presente trabajo pueden ser las siguientes: la definición del concepto de no respondedor a latanoprost, el tamaño muestral, la medición única de la PIO durante el fenotipado, posibles causas de falsas asociaciones como asumir que el fenotipado ha sido realizado de forma correcta en todos los centros participantes en el estudio y que no hay constancia de que existe un cumplimiento óptimo de la terapia farmacológica por parte de los sujetos evaluados.

7.1.1 Concepto de no respondedor

Como ya se ha mencionado en la introducción, uno de los obstáculos cuando se estudia la respuesta a los análogos de prostaglandinas es la ausencia de una definición unificada del concepto del no respondedor a la terapia con Latanoprost.

Ya se ha mencionado que el porcentaje esperado de reducción de la PIO basal con el fin de definir la no respuesta varía según los diferentes autores y estudios:

- Reducción < 10% de la PIO basal (Ikeda 2006 , Susanna 2001, Gandolfi 2003, Sakurai 2007)
- Reducción < 15% de la PIO basal (Aung 2001, Martínez 2002, Choplin 2004, Rossetti 2006 y Camras 2003)

Existe una gran variabilidad en los porcentajes descritos por diferentes autores respecto a la respuesta a la terapia con Latanoprost, dependiendo de la raza de las poblaciones en las cuales se realizaron los estudios y que oscilan desde el 4.1% hasta el 51.5%:

Asiáticos – Sureste del Asia y Japón

Aung et al, realizaron un estudio con una muestra de 56 sujetos del sureste asiático en el que se encontró un 5.4% de no respondedores a la terapia con Latanoprost tras un periodo de tratamiento de cuatro semanas y se tomó como no respuesta una reducción de la PIO menor de un 15% del valor basal (*Aung 2001*).

Ikeda et al realizaron un estudio de una población japonesa de 62 pacientes con GPAA (de los cuales el 49% tenían glaucoma normotensional), el porcentaje de sujetos no respondedores al Latanoprost después de 12 meses de tratamiento fue de 31.8%. Se tomó como no respuesta una reducción menor del 10% de la PIO basal (*Ikeda 2006*).

Sakuari et al estudiaron la respuesta al Latanoprost en una población japonesa de 100 voluntarios sanos encontrando un 19% de sujetos que clasificaron como bajos respondedores por presentar una reducción de la PIO basal menor al 10% (*Sakurai 2007*).

Población americana – hispánica

En una población de Brasil, Susanna et al encontraron un 10% de no respondedores al Latanoprost tras un periodo de tratamiento de ocho semanas (se tomó como no respondedores a una reducción de la PIO menor del 10% del valor basal), este trabajo describe el factor racial de la muestra de 54 pacientes (Blanco/ Hispánico: n=36 , raza negra n=14, asiáticos= 1 y otros grupos= 3). (*Susanna 2001*)

Población americana de origen europeo

Scherer describe un porcentaje de no respondedores al Latanoprost del 25% en una población americana de origen europeo. Se trata de un estudio retrospectivo con un tamaño muestral muy pequeño (n= 20) pero coincide con los resultados del “Latanoprost study

group” (LSG) que describen un 20% de sujetos no respondedores, definido como no respondedor, un sujeto cuya reducción de la PIO es menor del 15% tras dos semanas de tratamiento con Latanoprost. Posteriormente, en el LSG el porcentaje de no respondedores se reduce debido al efecto prolongado del Latanoprost sobre la ECM y así al tercer mes de tratamiento, un 26% de los no respondedores presentaron una respuesta positiva (Scherer 2002) (*Camras 2003*)

Los resultados del “Travoprost study group” comparan la respuesta entre Latanoprost y Travoprost encontrando un 13.5% de no respondedores al Latanoprost 0.005% comparado con un 8.6% de no respondedores al Travoprost 0.004% y un 22.5% de no respondedores al Timolol, tras doce meses de tratamiento en una población de origen mayoritario caucásico (Caucásico= 73%, Negro=22%, Asiático=1% y otros grupos = 4%).

El “bimatoprost/latanoprost study group” describe un porcentaje de sujetos no respondedores de un 51.5% tras seis meses de tratamiento con Latanoprost, tomado como una disminución menor del 15% de la PIO basal. (*Choplin 2004*)

Población Europea – Italia y España

El estudio de Rossetti et al cuyo fin fue evaluar el porcentaje de no respondedores a Latanoprost en una población europea, se realizó con una población italiana, incluyendo 340 sujetos con GPAA ó hipertensión ocular y dio como resultado un número de sujetos no respondedores a la terapia con Latanoprost tras un mes de tratamiento de 4.1% y de sujetos hiperrespondedores del 41%. Los criterios que se tomaron para definir cada grupo fueron: no respondedores, si la reducción de la PIO fue menor del 15% de la PIO basal; respondedores de un 15-30% de reducción de la PIO e hiperrespondedores si la reducción de la PIO

fue mayor del 30% (Rosetti 2006).

Gandolfi et al estudiaron la respuesta al Bimatoprost en sujetos no respondedores al Latanoprost, tomando como falta de respuesta una reducción de la PIO menor del 10% de la PIO basal, tras dos meses de tratamiento con Latanoprost. Este estudio destaca que el porcentaje real de LNR era desconocido al momento de su publicación. En su estudio, 13 de 15 sujetos no respondedores al Latanoprost presentaron una respuesta positiva tras el tratamiento con Bimatoprost (*Gandolfi 2003*).

En el presente trabajo se tomó como no respondedor, el obtener una reducción menor del 15% de la PIO basal tras un mes de tratamiento con Latanoprost. Se ha elegido el mismo porcentaje de reducción de la PIO que adopta el Latanoprost study group (LSG) con el fin de tener un criterio uniforme, tomando como base los criterios de quienes desarrollaron y estudiaron primariamente este fármaco (*Camras 2003*).

El porcentaje de no respondedores en el presente trabajo se encuentra dentro de lo descrito en la población de origen Europeo habiendo en la muestra total un 16% de sujetos no respondedores. Estos resultados coinciden además con un trabajo realizado en 2002 en una muestra de población española, donde durante un periodo de 12 meses se trataron 53 sujetos con GPAA con Latanoprost y se encontró un 11.7% de sujetos no respondedores. (*Martínez 2002*).

Tiempo de tratamiento estimado para definir la no respuesta al Latanoprost

En este estudio todos los sujetos incluidos fueron tratados con Latanoprost (Xalatan 0.0005% Pfizer Labs.) durante un periodo mínimo de un mes (SD:24.55, rango: 1-115 meses). Otros estudios tienen un tiempo diferente de seguimiento para la evaluación de la respuesta al fármaco:

- Rossetti et al: un mes
- Susanna et al: 2 meses
- Latanoprost study group – Camras: tres meses
- Ikeda et al: tres meses
- Martínez et al: 12 meses
- Travoprost study group – Netland et al: 12 meses

Cabe destacar el hecho que el único estudio publicado en relación a la asociación entre los SNPs del gen PTGFR y la respuesta al Latanoprost – realizado por Sakurai et al, fue realizado en voluntarios sanos y se evaluó la respuesta al Latanoprost tras solo siete días de tratamiento.

En el presente trabajo se ha elegido un periodo de tiempo mayor (un mes) que en el estudio LSG con el fin de evaluar mejor la respuesta ya que está demostrado que existe una proporción de sujetos no respondedores que se convierten en respondedores positivos al cabo de varias semanas de tratamiento por el mecanismo de remodelación continuada de la ECM (*Gaton 2001, Camras 2003*).

Influencia de la raza en la reducción de la PIO ante el tratamiento con Latanoprost

El “Travoprost study group” encontró un 13.5% de no respondedores al Latanoprost (n= 193) y un 8.6% de no respondedores al Travoprost (n= 202). Además se observó que tras la administración de Travoprost 0.004% , los sujetos de raza negra tenían una mayor reducción de la PIO (hasta 2.4 mmHg más de reducción) comparada con el tratamiento con

Latanoprost. Basándose en este hecho, Netland et al. han sugerido que sujetos con los iris más pigmentados pueden presentar una respuesta mayor a los análogos de prostaglandinas y coincide con el estudio de Aung et al. realizado con una población de origen asiático que presenta mayor pigmento en el iris y la dermis que los caucásicos europeos y en el que muestran un porcentaje muy bajo de no respondedores (5.4%).

En el estudio de Susanna et al en una población brasileña, en un 80% de los sujetos enrolados tenían el iris de color marrón y el porcentaje de no respondedores fue del 10%.

En nuestro estudio uno de los criterios de inclusión fue el ser caucásico, con el fin de obtener una muestra homogénea en lo que se refiere al factor racial y aunque no se determinó específicamente el color del iris de los pacientes, en un estudio de Teus et al realizado en población española el color predominante del iris fue el marrón (88.3%) (Teus 2002) y esta mayor concentración de pigmento en el iris de la población española sujeto de nuestro estudio podría explicar la existencia de una respuesta positiva al Latanoprost mayor que en otros estudios.

Influencia del valor de la PIO basal en la respuesta al Latanoprost

En la población japonesa el porcentaje de no respondedores fue mayor cuando la PIO basal era menor de 15 mmHg (hubo 7 no respondedores de un total de 9 sujetos con PIO menor de 15 mmHg). En nuestro estudio, los sujetos con PIO basales menores de 20 mmHg, presentan siete veces más posibilidades (OR:0.1410) de ser no respondedor al Latanoprost.

Rulo et al describen una mayor dificultad para reducir la PIO en sujetos con PIOs basales bajas como es el caso del glaucoma normotensional (Rulo 1996), y por lo tanto una de las causas de un mayor porcentaje de no respondedores en la población japonesa puede ser la

presencia de un mayor porcentaje de glaucomas normo-tensionales (2-3 veces más que el porcentaje de GPAA) (Iwase 2004)

7.1.2 Número de sujetos enrolados en el estudio

Este es un factor limitante en este estudio ya que fue muy difícil incluir sujetos no respondedores al Latanoprost dado que su porcentaje es muy bajo, coincidiendo con lo descrito por Rossetti et al. que describen un porcentaje del 4.1% de sujetos no respondedores al Latanoprost en una población de origen Italiano. Asumiendo que la población española examinada en este trabajo es étnicamente comparable en lo que respecta a la respuesta al Latanoprost, es esperable que el porcentaje de sujetos no respondedores sea igualmente bajo.

Inicialmente, el tamaño calculado con el fin de lograr una potencia estadística del 80% fue de 860 muestras: 430 casos (no respondedores) y 430 controles (respondedores positivos). Este cálculo se realizó teniendo en cuenta el porcentaje descrito de posibles no respondedores y asumiendo las siguientes tres condiciones: que los loci candidatos no están ligados, que existe un equilibrio de Hardy-Weinberg y que los no respondedores se distribuyen independientemente en la población.

Dado el tamaño de la muestra se planificó un estudio multicéntrico entre varios hospitales españoles que encontró serias dificultades por los diferentes requisitos de los comités de ética e investigación de cada centro resultando muy difícil lograr la colaboración de los investigadores principales a los que inicialmente se invitó.

De un total de 45 centros invitados a participar en el estudio, 21 respondieron positivamente con la intención de colaborar y 11 consiguieron obtener una aprobación del protoco-

lo por parte de sus comités de ética e investigación clínica. Finalmente solo 5 centros lograron realizar de forma exitosa el fenotipado y la recolección de muestras según los criterios del protocolo de este estudio.

Este escaso número de casos (no respondedores) dificulta el análisis estadístico y fue una limitante importante para el análisis genético donde idealmente se requieren poblaciones más grandes para obtener resultados con una mayor potencia estadística.

Sin embargo, el tamaño de la muestra del presente estudio ($n=117$) es similar al de otros trabajos realizados en el tema como el de Sakurai et al ($n=100$) y el de Peng et al ($n=76$). (Sakuari 2007, Peng 2007)

7.1.3 Medición de la PIO

Todas las mediciones en este estudio fueron realizadas con tonometría de aplanación usando un tonómetro de Goldmann. Aunque el espesor central de la córnea es un factor de sesgo de la PIO, se decidió no evaluarlo en el presente estudio porque para la estimación de la respuesta al fármaco se han tomado los valores absolutos de porcentaje de reducción de la PIO.

Se sabe que la PIO presenta fluctuaciones circadianas, con una variación de 5 mmHg en sujetos sanos y en sujetos con glaucoma primario de ángulo abierto puede llegar a ser de 9 mmHg (Jonas 2010); lo deseable, con el fin de evaluar estas fluctuaciones de la PIO es el realizar varias tomas de la PIO cuando se estudia una población. El estudio de Sakurai realiza tres tomas de la PIO a las 09:00, 13:30 y 18:00h; en el estudio de Rossetti se hacen dos tomas separadas por dos horas y en el estudio de Susanna et al se mide la PIO a las 10:00 y 17:00 horas. En el estudio de Ikeda et al se realizó solo una toma de la PIO, al igual que en

nuestro estudio.

En el presente trabajo se ha tomado una toma única de la PIO como valor basal y valor post-tratamiento, sin embargo, lo ideal hubiese sido tener la posibilidad de obtener varias mediciones de la PIO de los sujetos a estudio a lo largo del día (curvas tensionales) y aunque esta es una limitación importante de este estudio, en la práctica clínica habitual es difícil realizar curvas tensionales en la consulta de glaucoma dados los horarios de los centros hospitalarios y por los gastos que conlleva al sistema sanitario en términos de recursos y personal.

7.1.4 Otras causas de posibles falsas asociaciones: fenotipado y cumplimiento de la terapia farmacológica

Uno de los aspectos a considerar es que se asume el correcto fenotipado y estricto cumplimiento de los criterios de inclusión de los sujetos por parte de todos los investigadores de los cinco centros participantes en el estudio, hecho crucial para poder clasificar los sujetos en casos (no respondedores al Latanoprost) y controles (respondedores positivos al Latanoprost). Aunque la medida de la PIO es un procedimiento objetivo, existen factores subjetivos como la evaluación de la papila del nervio óptico que pueden llevar a una clasificación de la patología y por tanto a un fenotipado erróneo, aunque esta es una posibilidad real, el hecho de contar con centros de referencia y examinadores altamente experimentados supone que se ha reducido este factor al máximo posible.

Habitualmente, en los estudios multicéntricos como el propuesto, se realizan reuniones iniciales con los investigadores principales de cada centro para unificar los criterios del estudio. Como se ha mencionado este estudio encontró enormes dificultades para la colaboración de otros centros y tratándose de un número pequeño de centros colaboradores, esta reunión

no se realizó por motivos de disponibilidad de tiempo por parte de los investigadores principales y las distancias entre los centros, aunque se tuvo un intenso intercambio de correos y comunicaciones vía telefónica con el responsable del estudio, con el fin de solucionar todas las dudas que surgieron y que fueron principalmente sobre la recogida de las muestras y su envío sin tener diferencias en los criterios de inclusión. Ninguno de los investigadores involucrados en el estudio encontró dificultades para fenotipar los pacientes por falta de claridad de los criterios de inclusión.

Además se está asumiendo que los sujetos estudiados han cumplido su tratamiento y que los casos no respondedores se deben realmente a la falta de acción del fármaco y no a un mal cumplimiento de la terapia farmacológica. Se estima que puede existir hasta un 30% de incumplimiento en el tratamiento entre los pacientes con glaucoma (Kholdebarin 2008, Schwartz 2008) y que solo el 64% de los pacientes realiza una correcta adherencia a la terapia farmacológica (Dreer 2012).

Teniendo en cuenta el porcentaje de incumplimiento de la terapia, es muy difícil controlar este sesgo aunque existen dispositivos que pueden mejorar el cumplimiento como es el dispositivo electrónico Travalert™, diseñado específicamente para el travoprost (Travatan®), que ayuda a recordar al paciente el momento de la instilación del colirio y que además mide el número de veces que se han instilado las gotas (Sanchez 2011). Desafortunadamente, este dispositivo no está disponible para el fármaco motivo de este estudio (Xalatan®).

7.2 Alternativas al estudio genético realizado – GWAS

Otra opción para realizar este estudio sería el GWAS (*genome-wide association study*) estudio de casos y controles en el cual la variación genética es medida como SNPs que forman

haplotipos a lo largo de todo el genoma y es comparada entre sujetos afectados por una determinada patología y sujetos no afectados, con el fin de buscar regiones asociadas de forma significativa con la patología y que se encuentran de una manera más frecuente de lo esperado por el simple azar (*Nussbaum 2004*).

Los GWAS al igual que los estudios de asociación génica deben ser interpretados con cautela por el riesgo de falsos positivos y la posibilidad de una estratificación de la población que puede llevar a asociaciones alélicas falsas. El principal inconveniente del GWAS es el tamaño muestral ya que la tendencia actual es realizarlo con miles de sujetos como es el caso de los estudios para hipertensión arterial y enfermedades cardiovasculares en el cual se valoraron 200.000 sujetos (*Ehret 2011*). El enorme tamaño muestral requerido para un GWAS impide que el presente trabajo (con una muestra de $n=117$) fuera evaluado mediante ese tipo de estudio de asociación.

En glaucoma, se han realizado varios GWAS, uno de los pioneros fue el GWAS del “*Beaver Dam Eye Study*” en el cual se estudió una subpoblación de 1.979 individuos y se encontraron dos regiones en los cromosomas 2 y 19 asociadas con la presión intraocular y que ya habían sido identificadas además como *loci* ligados a la presión sanguínea (*Duggal 2007*). El primer GWAS que encontró una asociación causal con un tipo de glaucoma fue el de Thorleifsson et al, realizado en 2007 en una población de Islandia de 16.000 sujetos y que identificó una asociación entre el glaucoma pseudoexfoliativo y dos SNPs en el exón 1 del gen LOXL1 (*Thorleifsson 2007*)

7.3 Tecnología de genotipado

En la actualidad existen diferentes métodos para realizar el genotipado de muestras como

son: Genechip (Affimetrix), Bead array y Veracode (Illumina) y Mass Array (Sequenom), todas ellas con posibilidad de un elevado grado de multiplexar (explorar diferentes variantes sobre una muestra) con el fin de utilizar el mínimo de DNA y reducir costes económicos.

En el presente trabajo se ha utilizado la tecnología de genotipado iPlex-gold, que implica una reacción de discriminación alélica de extensión de base única (*SBE – single base extension*) donde el cebador (“*primer*”) hibrida próximo al sitio polimórfico y extiende una base en función del polimorfismo. Su resultado final es un espectro de masas de múltiples productos que se obtienen usando “*primers*” de extensión de diferentes longitudes en una reacción única que genera grupos de picos suficientemente espaciados. El software genera primers de PCR (*polymerase chain reaction*) y extensión para cada SNP y asigna de manera automatizada masas a cada uno. En el diseño de los “*primers*” se puede indicar las regiones que contienen otros SNPs o las secuencias que se deseen excluir. El ensayo se puntea directamente desde una placa de 384 pocillos en un chip creando 384 puntos para la detección. El equipo tiene la capacidad de leer hasta 10 chips secuencialmente de forma automática. Posteriormente, el software de análisis asigna genotipos a los SNPs en cada ensayo, en función de las masas obtenidas. Como se ha mencionado previamente, esta tecnología tiene una tasa de éxito para SNPs incorporados en ensayos (número de loci correctamente genotipados) del 95-98% y su concordancia con el genotipado es del 99.8 – 99.9%.

7.4 Interpretación y discusión de los resultados

Como se ha mencionado se obtuvieron 124 muestras de sujetos glaucomatosos, de las cuales fue necesario eliminar siete: dos de ellas por presentar parentesco de primer grado y las otras cinco porque su genotipado no fue fiable (por presencia de picos fuera del intervalo

de 4500 - 9000 Daltons)

7.4.1 Variables

La edad, el sexo y la presencia de patologías como la diabetes o hipertensión arterial no mostraron un efecto significativo en la posibilidad de ser no respondedor al Latanoprost, según los modelos de regresión logística utilizados (Anexo 8). Este resultado coincide con lo observado en otros estudios (*Ikeda 2006, Sakurai 2007*) donde el porcentaje de sujetos no respondedores fue independiente del género y la edad de los sujetos estudiados.

La procedencia demográfica tampoco tiene un efecto significativo sobre la probabilidad de ser no respondedor.

7.4.2 Modelos de herencia en asociación genotípica

Se encontraron siete SNPs con modelos significativos, todos asociados con el gen del receptor PTGFR sin existir modelos significativos asociados con los genes de las MMPs analizadas. No hay descritas asociaciones clínicas para estos polimorfismos, excepto el SNP rs3753380 que ha sido descrito por Sakurai et al como un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost.

SNP6686438: localizado en la posición 78769947 del cromosoma 1, no tiene descrito aún un significado clínico asociado y ha sido validado por el proyecto *1000 genome project*. Tomando el valor del AIC se elige el modelo aditivo, según el cual cada copia de T es un factor de protección de forma aditiva ante el riesgo de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost. (OR= 0.2)

SNP RS6672484: situado en la posición 78793647 del cromosoma 1, no hay datos dis-

ponibles de su significado clínico. Ha sido validado por el proyecto 1000 genome. En el modelo dominante según el valor del AIC, portar el alelo T es un factor de riesgo de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost. (OR=4.91)

SNP RS1328441: situado en la posición 78797784 del cromosoma 1, no hay datos de un significado clínico asociado. Se elige el modelo aditivo con el cual cada copia de G en este alelo protege del riesgo de ser no respondedor al Latanoprost. (OR=0.33)

SNP RS10489950: se encuentra situado en la posición 788442265 del cromosoma 1. Ha sido validado por el proyecto 1000 genome. En el modelo co-dominante el hecho de ser C/T en este polimorfismo aumenta la posibilidad de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost (OR= 5.94)

SNP RS10782665: localizado en la posición 78921860 del cromosoma 1, validado también en el proyecto 1000 genome, tiene un modelo dominante, según el cual portar el alelo T en este SNP es un factor de protección ante el hecho de ser no respondedor al Latanoprost. (OR= 0.22)

SNP RS11578155: se localiza en la posición 78934566 del cromosoma 1, validado por el proyecto 1000 genome, en el modelo sobre-dominante el ser portador del genotipo A/G en este SNP es un factor de riesgo de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost. (OR= 4.13)

SNP RS3753380: localizado en la posición 78956432 del gen PTGFR en el cromosoma 1, se encuentra como factor de protección (en el borde de la significancia estadística) a la no respuesta al Latanoprost en dos situaciones: el portar el alelo A en un modelo dominante y ser heterocigoto A/G en un modelo sobre-dominante. Este marcador ya ha sido estudiado

por Sakurai et al, quienes proponen tres grupos de respondedores en función del porcentaje de disminución de la PIO (según el nivel de reducción de la PIO basal: respondedor bajo menos del 10%, respondedor medio de 10-25% de reducción e hiperrespondedores si la reducción de la PIO es mayor del 25%), encontrando que portar GG es un riesgo asociado a ser no respondedor. En esta muestra, ser GG es también un factor de riesgo, pero está en el borde de la significación estadística. Este resultado contradictorio puede deberse a diferencias en la agrupación.

7.4.3 Asociación alélica

Todos los SNPs se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, salvo el rs7545762, pero su p-valor ajustado para las comparaciones múltiples es próximo a 1. Se encontraron 4 SNPs significativos en la asociación alélica con el tipo de respuesta al Latanoprost, todos ellos asociados con modelos de herencia significativos:

SNP RS6686438: cuenta con un modelo de herencia aditivo en el cual las copias de T son un factor protector de ser no respondedor al Latanoprost. En la asociación alélica, el ser portador de T en lugar de G aporta una posibilidad cinco veces mayor responder positivamente a la terapia con Latanoprost. (OR= 0.21, IC 95%: 0.05-0.80)

SNP RS6672484: identificado en el modelo de herencia dominante como un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost si se porta el alelo T. En la asociación alélica, portar T en lugar de C aporta una posibilidad cinco veces mayor de ser no respondedor a la terapia con Latanoprost. (OR= 5.15, IC 95%: 1.53-17.33)

SNP RS10782665: en un modelo de herencia dominante, el portar T en este SNP au-

menta la posibilidad de responder positivamente a la terapia con Latanoprost. En la asociación alélica el portar T en lugar de G genera una posibilidad cinco veces mayor de ser respondedor al Latanoprost. (OR= 0.22, IC 95%: 0.06-0.75)

SNP RS11578155: en un modelo de herencia sobre-dominante el portar el genotipo A/G es un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost. En la asociación alélica el hecho de portar G en lugar de A genera una posibilidad cinco veces mayor de presentar una respuesta negativa al tratamiento con Latanoprost. (OR= 4.08, IC 95%: 1.34-12.40)

7.4.4 Análisis de sub-haplotipos

7.4.4.1 Gen PTGFR

Para el gen PTGFR se encontraron 11 sub-haplotipos significativos con p-valor <0.01. Las correlaciones más importantes son las siguientes:

Sub-haplotipo formado por los SNPs comprendidos entre rs1581918 – rs674345 (12

SNPs): Es el más consistente de todos los sub-haplotipos del gen PTGFR y se encontró un haplotipo con efecto significativo (ACATTTCTCCAG) que tiene una frecuencia del 3% en la muestra global y un 8% en los casos de no respondedores.

Este sub-haplotipo incluye en su conjunto el SNP rs6672484 que ya se ha asociado como un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost, tanto en el modelo de herencia como en la asociación alélica.

Subhaplotipo formado por los SNPs comprendidos entre rs11578155 – rs3753380 (4

SNPs): es otro sub-haplotipo significativo, posee un haplotipo con efecto significativo (GCTG) con una frecuencia del 18% en los casos de no respondedores y de un 9% de la

muestra global. Incluye el SNP rs11578155 que se ha identificado como un factor de riesgo de ser no respondedor al Latanoprost y el rs375330 que Sakurai et al han identificado como un factor de riesgo a la no respuesta al Latanoprost.

Sub-haplotipo formado por los SNPs comprendidos entre rs10489959 – rs11578155 (7 SNPs): posee tres haplotipos significativos: (CCCGTTA) que es más frecuente en los respondedores (26%) que en los casos de no respondedores (10%). Este sub-haplotipo incluye el SNP rs10782665 que se ha asociado con una respuesta positiva al Latanoprost tanto en el modelo de herencia como en la asociación alélica.

Los otros haplotipos significativos son: (CCAATGG) más frecuente en los casos de no respuesta al fármaco (18%) que en los respondedores (7%) y el (TCAATGA) también más frecuente en los no respondedores (7%) que en los respondedores (1%). De nuevo se incluye el SNP rs11578155 que se ha asociado con respuesta negativa al Latanoprost tanto en el modelo de herencia como en la asociación alélica.

7.4.4.2 Gen de MMP-1

Para este gen se encontraron 6 sub-haplotipos con p-valor < 0.01. El más significativo de los seis es el subhaplotipo formado por los SNPs comprendidos entre rs11225426 – rs4750507 (6 SNPs). El haplotipo más frecuente es el (TCCATAA) que tiene una frecuencia del 2% en los respondedores y del 18% en los no respondedores.

7.4.4.3: Genes MMP-2,-3,-9 y -17

No se detectaron haplotipos ni sub-haplotipos significativos, excepto el haplotipo (CGGCCCG) que tiene un efecto al borde de la significación con un 26% en los respondedores y un 13% en los no respondedores al Latanoprost, p-valor = 0.0936.

Sin embargo, es importante anotar que la ausencia de haplotipos o sub-haplotipos significativos para estos genes puede deberse al tamaño reducido de la muestra estudiada.

7.4.5 Comparaciones múltiples

Este análisis permite reducir la posibilidad de obtener falsos positivos, para lo cual se utilizó el método de dos pasos donde primero se resume cada asociación de un gen con la enfermedad en un p-valor que combina análisis de SNPs simples y bloques haplotípicos y en un segundo paso, los p-valores por gen son ajustados utilizando el procedimiento de false discovery rate (FDR) descrito anteriormente. (Benjamini 1995, Rosenberg 2006)

Tras el análisis de comparaciones múltiples de cada gen candidato y fijando el nivel del FDR en el 5% se encontró un gen significativo: el PTGFR ($p_{\text{OMNI}} < 0.0001$) y fijando el nivel de FDR al nivel del 10% son significativos los genes PTGFR y MMP-1 ($p_{\text{OMNI}} 0.041$). Al realizar el valor corregido para el gen se obtiene un q-valor de 0.093 para el gen de MMP-1.

Este es un hallazgo importante ya que hasta el momento no hay descritas asociaciones de polimorfismos del gen de MMP-1 con la respuesta al Latanoprost, aunque la significación del gen MMP-1 está en el límite. Nuevamente el tamaño de la muestra puede ser un factor que influya en la falta de una asociación más sólida.

7.5 Comparación con otros estudios

Sakurai et al, han identificado una asociación entre dos polimorfismos (rs3753380 y rs3766355) en las regiones promotora y del intrón 1 del gen del receptor FP (PTGFR) y la respuesta a corto plazo al Latanoprost en sujetos sanos (Sakurai 2006). Sus resultados indican que estos SNPs hipo-regulan la expresión del gen del receptor FP resultando en

una disminución del efecto del Latanoprost sobre la PIO. Sin embargo, este estudio tiene debilidades como el hecho de haber sido realizado tras un tratamiento de tan solo 7 días y que de los 100 sujetos sometidos a tratamiento se tomó al azar un grupo de 24 con el fin de analizar su DNA, con lo que la muestra real es muy pequeña. Su principal limitación es el tratarse de una población sana, con una edad media de 24.3 años (SD= 0.2 años).

En el presente estudio se ha encontrado una asociación significativa en el análisis de sub-haplotipos entre el SNP rs3753380 y la no respuesta al latanoprost, donde individuos con el haplotipo GCTG tienen mayor frecuencia de no respuesta al Latanoprost y se encuentra además una asociación que está al borde de la significación a nivel individual del mismo modelo planteado por Sakurai et al.

Contrariamente, McCarthy et al no encontraron una asociación entre los SNPs rs3753380, rs3766355 y rs34550074 y la respuesta a los análogos de prostaglandinas (McCarthy 2012). Este estudio evaluó una población de origen europeo de 267 sujetos con glaucoma o hipertensión ocular y el nivel de respuesta / no respuesta se fijó como una reducción de la PIO basal > 20%. Estos hallazgos difieren con los resultados del presente trabajo y del estudio de Sakurai et al. Una diferencia muy importante a destacar es que el trabajo de McCarthy et al. no especifica cual de los análogos de prostaglandinas se utilizó en su estudio ya que únicamente menciona que se empleó un fármaco diferente al Latanoprost (quedando como posibilidades: el Tafluprost, el Travoprost ó la Unoproston) lo cual no permite extrapolar de una manera fiable sus resultados a otros trabajos.

El presente trabajo cuenta con una serie de ventajas al ser comparado con los estudios mencionados:

- Ha sido realizado en una población con glaucoma y no en voluntarios sanos.
- El tiempo mínimo de tratamiento ha sido de 4 semanas en todos los casos.
- Se ha tomado el mismo parámetro del “Latanoprost study group” para definir los no respondedores, teniendo como criterio de no respuesta una reducción de la PIO menor del 15% de la PIO basal.
- Se ha realizado en una población caucásica europea uniforme.
- Todos los sujetos fueron tratados con la misma molécula de Latanoprost (Xalatan® Pfizer Labs.) con el fin de eliminar otras causas de no respuesta debidas a la farmacodinámica de otros tipos de Latanoprost disponibles en el mercado.

7.6 Implicaciones clínicas y futuro de la línea de investigación

En la actualidad la fisiopatología del glaucoma, segunda causa de ceguera a nivel mundial, continúa siendo poco conocida. Recientemente, se han descrito posibles implicaciones de polimorfismos de la MMP-9 en la patogenia del GAC en poblaciones de origen caucásico europeo (Awadalla 2012), aunque en el caso del GPAA se han estudiado SNPs de las MMPs -1,-2 y -9 sin haber logrado encontrar -de momento- una asociación entre estos SNPs y la patogenia de la enfermedad (Mössbock 2010).

Este trabajo ha identificado varios polimorfismos del gen PTGFR asociados con el tipo de respuesta positiva o negativa al Latanoprost en una población caucásica europea y estos hallazgos podrían estar relacionados con la patogenia del GPAA en esta población española, sin embargo, esta posible asociación deberá probarse con estudios adicionales.

Los resultados obtenidos pueden facilitar el desarrollo de un chip de diagnóstico genético específico para la detección de los polimorfismos asociados con el riesgo de ser no respondedor, que permita de forma fácil el determinar previamente a iniciar un tratamiento aquellos sujetos que pueden ser no respondedores al Latanoprost, empezando así la instauración de tratamientos basados en la farmacogenética y que serían el inicio de una terapia anti-glaucomatosa realmente personalizada.

La continuidad de esta línea de investigación debería seguir el esquema de un estudio multicéntrico intentando incluir un número mayor de centros hospitalarios, gracias a la colaboración de entidades como la red de investigación sanitaria (RETICS), con el fin de alcanzar el objetivo de obtener un número adecuado de muestras de sujetos no respondedores que proporcione una potencia estadística mayor al trabajo y así determinar si los otros genes estudiados en el presente trabajo y que en el análisis de comparaciones múltiples se encuentran en el borde de la significación (MMP-1) o no significativos, tengan realmente un papel definitivo en la respuesta al Latanoprost, que en el presente estudio no sea demostrable por un tamaño muestral reducido.

Sería interesante aprovechar la oportunidad de un futuro estudio multicéntrico para analizar de forma simultánea otros análogos de prostaglandinas (APs) (Travoprost y Tafluprost) y prostamidas (Bimatoprost), con el fin de encontrar otras posibles asociaciones entre polimorfismos de los genes candidatos involucrados en su mecanismo de acción y la respuesta farmacológica.

Un punto adicional a estudiar sería incluir el color del iris de los sujetos a estudio con el fin de determinar si existe una asociación entre el fenotipo y el genotipo: es decir, si los sujetos

con iris más pigmentados se asocian con una mayor respuesta a los APs y si a su vez estos sujetos poseen SNPs asociados a una respuesta positiva al fármaco.

En el futuro inmediato, el primer paso a seguir con el fin de dar continuidad al presente trabajo es realizar la replicación de los resultados del estudio hecho en una población japonesa (Sakurai 2007) con los resultados de este trabajo, ya que se ha encontrado el mismo SNP (rs3753380) involucrado en la respuesta al Latanoprost.

7.7 Conclusiones

- Existe un componente genético que determina la respuesta positiva ó negativa al Latanoprost en el que están involucrados polimorfismos de los genes del receptor PTGFR y MMP-1.
- Existe una relación entre ciertos polimorfismos del gen PTGFR en una población española caucásica europea y la respuesta al Latanoprost.
- Se han encontrado por primera vez, polimorfismos del gen de la MMP-1 que determinan la respuesta al Latanoprost, aunque esta asociación debe confirmarse mediante estudios adicionales con muestras más amplias ya que por la limitación del tamaño de la muestra esta asociación se encuentra en el borde de la significación.

- Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, Rushmore TH, Bayne MA, Metters KM, Slipetz DM, Grygorczyk R. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* 1994 ; 269: 2632-6
- Awadalla MS, Burdon KP, Kuot A, Hewitt AW, Craig JE. Matrix metalloproteinase-9 genetic variation and primary angle closure glaucoma in a Caucasian population. *Mol Vis* 2011; 17: 1420-4.
- Alexander JP, Samples JR, Van Buskirk EM, Acott TS. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 172-80
- Alm A, Villumsen J, Törnquist P et al. Intraocular pressure reducing effect of PhXA41 in patients with increased eye pressure. A one-month study. *Ophthalmology* 1993; 100: 1312-17
- American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care* 2008; 31: 596-615
- Anthony TL, Lindsey JD, Aihara M, Weinreb RN. Detection of prostaglandin EP1, EP2 y FP receptor in human sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 3182-6
- 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: 3705-11.
- Antón A, Andrada MT, Mujica V, Calle MA, Portela J, Mayo A. Prevalence of primary open-angle glaucoma in a Spanish population: the Segovia study. *J Glaucoma* 2004; 13: 371-6.
- Aung T, Chew PT, Yip CC, Chan YH, See JL, Khng CG, Hoh ST, Ng LH, Lee HM. A randomized double-masked crossover study comparing latanoprost 0.005% with unoprostone 0.12% in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Am J Ophthalmol* 2001;131: 636-42
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115:3719-27

- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B Methodol* 1995; 57: 289-300
- Bernatchez SF, Tabatabay C, Belin D. Urokinase-type plasminogen activator in human aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 2687-92
- Besag J, Cifford P. Sequential Monte Carlo p-Values. *Biométrica* 1991; 78: 301-304
- Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase “receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 1998; 273: 871-80.
- Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997; 244: 653-7.
- Camras CB, Hedman K; US Latanoprost Study Group. Rate of response to latanoprost or timolol in patients with ocular hypertension or glaucoma. *J Glaucoma* 2003; 12: 466-9
- Chalkidou K, Rawlings SM. Pharmacogenetics and cost-effectiveness analysis: a two-way Street. *Drug Discov Today* 2011; 16: 873-7
- Chen D, Fong HW, Davis JS. Induction of c-fos and c-jun messenger ribonucleic acid expression by prostaglandin F2alpha is mediated by a protein kinase C-dependent extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway in bovine luteal cells. *Endocrinology* 2001; 142: 887-95
- Chen BE, Sadoka LC, Hsing AW, Rosenberg PS. Resampling-Based Multiple Hypothesis Testing Procedures for Genetic Case-Control Association Studies. *Genet Epidemiol* 2006; 30: 495-507
- Chen KK, Poth EJ. Racial differences as illustrated by the mydriatic action of cocaine, ephthalamine and ephedrine. *J Pharmacol Exp Ther* 1929; 36: 429- 45

- Choplin N, Bernstein P, Batoosingh AL, Whitcup SM; Bimatoprost/Latanoprost Study Group. A randomized, investigator-masked comparison of diurnal responder rates with bimatoprost and latanoprost in the lowering of intraocular pressure. *Surv Ophthalmol* 2004; 49 Suppl 1: S19-25
- Clark IM, Rowan AD, Edwards DR, Bech-Hansen T, Mann DA, Bahr MJ, Cawston TE. Transcriptional activity of the human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) gene in fibroblasts involves elements in the promoter, exon 1 and intron 1. *Biochem J* 1997; 324: 611-7
- Clayton D, Leung HT (2011). *snpMatrix: The snp.matrix and X.snp.matrix classes*. R package version 1.14.6. <http://www.gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software/>
- Diaz-Meco MT, Quiñones S, Municio MM, Sanz L, Bernal D, Cabrero E, Saus J, Moscat J. Protein kinase C-independent expression of stromelysin by platelet-derived growth factor, ras oncogene, and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *J Biol Chem* 1991; 266: 22597-602
- Dreer L, Girkin C, Mansberger SL. Determinants of medication adherence to topical glaucoma therapy. *J Glaucoma* 2012; 21: 234-240
- Duggal P, Klein AP, Lee KE, Klein R, Klein BE, Bailey-Wilson JE. Identification of novel genetic loci for intraocular pressure: a genomewide scan of the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2007; 125: 74-9
- Duncan A, Anderson L, Funk CD, Abramovitz M, Adam M. Chromosomal localization of the human prostanoid receptor gene family. *Genomics* 1995; 25: 740-742
- Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, et al. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 2011; 478:103-9
- European Glaucoma Society. Terminology and guidelines for glaucoma. 2nd Edition. Savona – Italy. Dogma Eds, 2003; 18
- Flannery CR, Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie LA, Chockalingam PS, Hebert T, Mackie SA, McDonagh T, Crawford TK, Tomkinson KN, La Vallie ER, Morris EA. Autocatalytic clea-

vage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. *J Biol Chem.* 2002; 277: 42775-80

- Formstone CJ, Byrd PJ, Ambrose HJ, Riley JH, Hernandez D, McConville CM, Taylor AM. The order and orientation of a cluster of metalloproteinase genes, stromelysin 2, collagenase, and stromelysin, together with D11S385, on chromosome 11q22-q23. *Genomics* 1993; 16: 289-91
- Forner K. Allelic: A fast, unbiased and exact allelic exact test 2006. R package version 0.1.
- Forsman E, Kivelä T, Vesti E. Lifetime visual disability in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *J Glaucoma* 2007; 16: 313-9
- Gandolfi SA, Cimino L. Effect of bimatoprost on patients with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension who are nonresponders to latanoprost. *Ophthalmology* 2003 Mar; 110: 609-14
- Gatton DD, Sagara T, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL, Weinreb RN. Increased matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 in the monkey uveoscleral outflow pathway after topical prostaglandin F(2 alpha)-isopropyl ester treatment. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1165-70
- Gerhard DS, Jones C, Bauer EA, Eisen AZ, Goldberg GI. Human collagenase gene is localized to 11q. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 46: 619
- Glick H, Brainski A, McDonald RC. The cost of glaucoma in the United States in 1988. *Chibret Int J Ophthalmol* 1994; 10: 6-12
- González JR, Armengol L, Guinó E, Solé X, Moreno V. SNPAssoc: SNPs-based whole genome association studies 2012. R package version 1.8-4. <http://CRAN.R-project.org/package=SNPAssoc>
- Gray SF, Spry PG, Brookes ST, Peters TJ, Spencer IC, Baker IA, Sparrow JM, Easty DL. The Bristol shared care glaucoma study: outcome at follow up at 2 years. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 456-63
- Guedj M, Wojcik J, Della-Chiesa E, Nuel G, Forner K. A fast, unbiased and exact allelic test for case-control association studies. *Hum Hered* 2006; 61: 210-21
- Hattenhauer MG, Johnson DH, Ing HH, Herman DC, Hodge DO, Yawn BP, Butterfield LC,

- Gray DT. The probability of blindness from open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 1998; 105: 2099-104
- Higgingbotham EJ, Schuman JS, Goldberg I, Gross RL, VanDenburgh AM, Chen K. One-year randomized study comparing bimatoprost and timolol in glaucoma and ocular hypertension. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 1286-93
 - Hodapp E, Parrish RK, Anderson DR. *Clinical decisions in glaucoma*. St. Louis-MO. Mosby. 1993. 52-9
 - Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem*.1990; 265: 11077-82
 - Ikeda Y, Mori K, Ishibashi T, Naruse S, Nakajima N, Kinoshita S. Latanoprost nonresponders with open-angle glaucoma in the Japanese population. *Jpn J Ophthalmol* 2006; 50: 153-7
 - Ishikawa T. Fine structure of the ciliary muscle. *Invest Ophthalmol* 1962; 1:587-608
 - Iskedijian M, Walter J, Vicente C. Costs of glaucoma in Canada: analyses base don visual field and physician's assessment. *J Glaucoma* 2003; 12: 456-62
 - Iwase A, Suzuki Y, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, Kuwayama Y, Mishima HK, Shimizu H, Tomita G, Inoue Y, Kitazawa Y, Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology* 2004; 111: 1641-8
 - Jonas JB, Budde WM, Stroux A, Oberacher-Velten IM, Juenemann AG. Circadian intraocular pressure profiles in chronic open angle glaucomas. *J Ophthalmic Vis Res* 2010; 5: 92-100
 - Kim J-W, Lindsey J, Wang N, Weinreb RN. Increased human scleral permeability with prostaglandin exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1514-1521
 - Knepper PA, Goossens W, Hvizd M, Palmberg PF. Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1360-7

- Kholdebarin R, Campbell RJ, Jin YP, Buys YM. Multicenter study of compliance and drop administration in glaucoma. *Can J Ophthalmol* 2008; 43: 454-61
- Lafuma A, Brézin A, Lopatriello S, Hieke K, Hutchinson J, Mimaud V, Berdeaux G. Evaluation of non-medical costs associated with visual impairment in four European countries: France, Italy, Germany and the UK. *Pharmacoeconomics* 2006;24(2):193-205
- Lee AY, Raya AK, Kymes SM. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br J Ophthalmol* 2009; 93: 610-13
- Levin MC, Marullo S, Muntaner O. The myocardium protective Gly-49 variant of the beta-1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 2002; 277: 30429-35
- Liebler DC, Guengerich FP. Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 110-20
- Lindsey JD, To HD, Weinreb RN. Induction of c-fos by prostaglandin F2 alpha in human ciliary smooth muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 242-50
- Lindsey JD, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Weinreb RN. Prostaglandin action on ciliary smooth muscle extracellular matrix metabolism: implications for uveoscleral outflow. *Surv Ophthalmol*. 1997;42 Suppl 2:S53-9.
- Lindsey JD, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Weinreb RN. Prostaglandins alter extracellular matrix adjacent to human ciliary muscle cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2214-23
- Martínez García A, Pérez García R. Efficacy of latanoprost monotherapy treatment in primary open-angle glaucoma. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2002; 77: 269-74
- Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta-1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 12670-4

- McCarty CA, Burmester JK, Mukesh BN. Intraocular pressure response to topical beta-blockers associated with an ADRB2 single-nucleotide polymorphism. *Arch Ophthalmol* 2008; 126: 959-63
- McCarty CA, Berg R, Patchett R, Wilke RA, Burmester JK. Lack of association between polymorphisms in the prostaglandin F2 α receptor and solute carrier organic anion transporter family 2A1 genes and intraocular pressure response to prostaglandin analogs. *Ophthalmic Genet* 2012; 33: 74-6.
- McLaren NC, Moroi SE. Clinical implications of pharmacogenetics for glaucoma therapeutics. *Pharmacogenomics J* 2003; 3:197-201
- Melville S (2012). NCBI2R: NCBI2R-An R package to navigate and annotate genes and SNPs. R package version 1.4.2. <http://CRAN.R-project.org/package=NCBI2R>
- Mossböck G, Weger M, Faschinger C, Zimmermann C, Schmut O, Renner W, El-Shabrawi Y. Role of functional single nucleotide polymorphisms of MMP1, MMP2, and MMP9 in open angle glaucomas. *Mol Vis* 2010; 16: 1764-70
- Mossböck G, Faschinger C. Glaucoma pharmacogenetics. *European Ophthalmic Review* 2012; 6: 146-8
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999 30; 274: 21491-4
- Nagasubramanian S, Sheth G, Hitchings R, Stjernchantz J. Intraocular pressure- reducing effect of PhXA41 in ocular hypertension. Comparison of dose regimens. *Ophthalmology* 1993; 100:1305-11
- Netland PA, Landry T, Sullivan EK, Andrew R, Silver L, Weiner A, Mallick S, Dickerson J, Bergamini MV, Robertson SM, Davis AA; Travoprost Study Group. Travoprost compared with latanoprost and timolol in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Am J Ophthalmol* 2001; 132: 472-84
- Nieminen T, Uusitalo H, Mäenpää J. Polymorphisms of genes CYP2D6, ADRB1 and GNAS1 in pharmacokinetics and systemic effects of ophthalmic timolol. A pilot study. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61: 811-9

- Nussbaum RL, McInnes RR. Thompson & Thompson. Genetics in medicine. 5th edition. Ed: Masson. 2004
- Ocklind A. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res* 1998; 67: 179-91
- Oh DJ, Martin JL, Williams AJ, Russell P, Birk DE, Rhee DJ. Effect of latanoprost on the expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3887-95.
- Oh DJ, Martin JL, Williams AJ, Peck RE, Pokorny C, Russell P, Birk DE, Rhee DJ. Analysis of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human ciliary body after latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 953-63
- Pang IH, Fleenor DL, Hellberg PE, Stropki K, McCartney MD, Clark AF. Aqueous out-flow-enhancing effect of tert-butylhydroquinone: involvement of AP-1 activation and MMP-3 expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3502-10
- Peng HB, Zahary MN, Tajudin LS, Lin CL, Teck CM, Sidek MR, Zulkiffi A, Zilfalil BA. A novel single nucleotide polymorphism, IVS2 -97A>T, in the prostaglandin F2alpha receptor gene was identified among the Malaysian patients with glaucoma. *Kobe J Med Sci* 2007; 53: 49-52
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 1992; 11: 1-20
- Puente XS, Pendás AM, Llano E, López-Otín C. Localization of the human membrane type 4-matrix metalloproteinase gene (MMP17) to chromosome 12q24. *Genomics* 1998; 54: 578-9
- Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 2262-267
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing 2012. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

- Richter M, Krauss AH, Woodward DF, Lütjen-Drecoll E. Morphological changes in the anterior eye segment after long-term treatment with different receptor selective prostaglandin agonists and a prostamide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4419-26
- Rosenberg PS, Che A, Chen BE. Multiple hypothesis testing strategies for genetic case-control association studies. *Statist Med* 2006, 25: 3134-49
- Rossetti L, Gandolfi S, Traverso C, Montanari P, Uva M, Manni G, Carassa R, Mastropasqua L, Quaranta L, Marchini G, Ratiglia R, Orzalesi N. An evaluation of the rate of nonresponders to latanoprost therapy. *J Glaucoma* 2006; 15: 238-43
- Rulo AH, Greve EL, Geijssen HC, Hoyng PF. Reduction of intraocular pressure with treatment of latanoprost once daily in patients with normal-pressure glaucoma. *Ophthalmology* 1996; 103: 1276-82
- Sagara T, Gatton DD, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL, Weinreb RN. Topical prostaglandin F2 alpha treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 794-801
- Salazar M, Shimada K, Patil PN. Iris pigmentation and atropine mydriasis. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 197:79-88
- Sakurai M, Higashide T, Takahashi M, Sugiyama K. Association between genetic polymorphisms of the prostaglandin F2alpha receptor gene and response to latanoprost. *Ophthalmology*. 2007; 114: 1039-45.
- Sánchez-Pulgarín M, Martínez-de-la-Casa JM, Escalada A, Sáenz-Francés F, García-Feijóo J, García Sánchez J. The influence of the Travalert[®] dosing aid on medical treatment compliance and the quality of life of glaucoma patients. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011; 86: 282-6
- Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score test for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet* 2002, 70: 425-434
- Schwartz GF, Quigley HA. Adherence and persistence with glaucoma therapy. *Surv Ophthalmol*

mol 2008; 53 Suppl1: S57-68

- Scherer WJ. A retrospective review of non-responders to latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002; 18: 287-91.
- Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, Nüsing RM. Expression and localization of FP and EP prostanoid receptor subtypes in human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1475-87
- Sharif NA, Kelly CR, Crider JY. Human trabecular meshwork cell responses induced by bimatoprost, travoprost, unoprostone, and other FP prostaglandin receptor agonist analogues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 715-21
- Spurr NK, Gough AC, Gosden J, Rout D, Porteous DJ, van Heyningen V, Docherty AJ. Restriction fragment length polymorphism analysis and assignment of the metalloproteinases stromelysin and collagenase to the long arm of chromosome 11. *Genomics* 1988; 2: 119-27
- St Jean PL, Zhang XC, Hart BK, Lamlum H, Webster MW, Steed DL, Henney AM, Ferrell RE. Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene (CLG4B), localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease. *Ann Hum Genet* 1995; 59: 17-24
- Storey JD. A direct approach to false discovery rates. *J R Statist Soc B* 2002; 64: 479-98
- Storey JD. The positive false discovery rate: A bayesian interpretation and the qvalue. *Annals of Statistics* 2003; 31: 2013-35
- Storey JD, Taylor JE, Siegmund D. Strong control, conservative point estimation, and simultaneous conservative consistency of false discovery rates. A unified approach. *J R Statist Soc B* 2004; 66: 187-205
- Susanna R Jr, Giampani J Jr, Borges AS, Vessani RM, Jordao ML. A double-masked, randomized clinical trial comparing latanoprost with unoprostone in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Ophthalmology* 2001; 108: 259-63.

- Teus MA, Arranz-Márquez E, Lucea-Suescun P. Incidence of iris colour change in latanoprost treated eyes. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 1085-8.
- Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, Walters GB, Gudbjartsson DF, Stefansson H, Jonsson T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Stefansdottir G, Masson G, Hardarson GA, Petursson H, Arnarsson A, Motallebipour M, Wallerman O, Wadelius C, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Jonasson F, Stefansson K. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 2007; 317:1397-400
- Traverso CE, 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, Azua-ra-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; 89: 1245-9
- Volotinen M, Turpelnem N, Tolonen A. Timolol metabolism in human liver microsomes is mediated principally by CYP2D6. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1135-41
- Warnes G, with contributions from Gregor Gorjanc, Friedrich Leisch and Michael Man. *Genetics 2012: Population Genetics*. R package version 1.3.7. <http://CRAN.R-project.org/package=genetics>
- Wax MB, Molinoff PB. Distribution and properties of beta-adrenergic receptors in human iris-ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 420-30
- Weinreb RN, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Tsukahara S, Lindsey JD. Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2772-80.
- Weinreb RN, Lindsey JD. Metalloproteinase gene transcription in human ciliary muscle cells with latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 716-22
- Weinreb RN, Lindsey JD, Marchenko G, Marchenko N, Angert M, Strongin A. Prostaglandin

FP agonists alter metalloproteinase gene expression in sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4368-77

- Westfall PH, Young SS. Resampling-based multipled testing: examples and methods for p-value adjustment. New York: Wiley, 1993
- Westfall PH, Zaykin DV, Young SS. Multiple test for genetic effects in association studies. *Methods Mol Biol* 2002; 184: 143- 68
- Yuan H, Yu M, Yang Y. Association of CYP2D6 single-nucleotide polymorphism with response to ophthalmic timolol in primary open-angle glaucoma. A pilot study. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26: 497-501
- Zhou SF, Di YM, Chan E. Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab* 2008; 9: 738-84

ANEXO 1: Formulario para respondedor negativo**Formulario de recolección de datos Proyecto Glaucoma 1
Respondedor NEGATIVO a Latanoprost**

Iniciales del centro de referencia: _____.

Código del paciente: _____.

Fecha de la visita de elección para el estudio: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL PACIENTE:

El paciente deberá cumplir TODOS los siguientes criterios para su inclusión en el estudio:

- () Paciente ambulatorio de raza caucásica, mayor de 18 años.
- () Diagnóstico de Glaucoma Primario de Ángulo Abierto.
- () Haber iniciado un tratamiento con Latanoprost (Xalatan)
- () No respuesta en términos de reducción de la PIO ante el tratamiento después de 4 semanas de tratamiento continuado.
- () Haber recibido información suficiente del estudio y haber firmado el consentimiento informado del mismo.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- () Cualquier otro glaucoma diferente del glaucoma primario de ángulo abierto.
- () Pacientes en quienes no es preciso el diagnóstico de glaucoma.
- () No cumplir todos los criterios de inclusión.

FILIACIÓN DEL PACIENTE:

Fecha de nacimiento: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

Sexo: Varón () Mujer ()

Antecedentes personales:

Diabetes Sí () No ()

Hipertensión arterial Sí () No ()

Cefalea tipo Migraña Sí () No ()

Antecedentes familiares de primer grado de glaucoma Sí () No ()

Exploraciones realizadas para llegar al diagnóstico:

Tonometría de aplanación Sí () No ()

Gonioscopia Sí () No ()

Examen de la papila Sí () No ()

Campimetría Sí () No ()

Paciente RESPONDEDOR NEGATIVO a Latanoprost:

Fecha primera visita ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

PIO previa al tratamiento con Latanoprost

OD _____ mmHg OI: _____ mmHg Fecha: ___/___/___ (dd/mm/aa)

PIO después de iniciado el tratamiento con Latanoprost:

OD: _____ mmHg OI: _____ mmHg Fecha: ___/___/___ (dd/mm/aa)

ANEXO 2 Formulario para respondedor positivo

Formulario de recolección de datos Proyecto Glaucoma 1 –

Respondedor POSITIVO a Latanoprost

Iniciales del centro de referencia: _____.

Código del paciente: _____.

Fecha de la visita de elección para el estudio: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL PACIENTE:

El paciente deberá cumplir TODOS los siguientes criterios para su inclusión en el estudio:

- () Paciente ambulatorio de raza caucásica, mayor de 18 años.
- () Diagnóstico de Glaucoma Primario de Ángulo Abierto.
- () Haber iniciado un tratamiento con Latanoprost (Xalatan®)
- () Respuesta POSITIVA en términos de reducción de la PIO ante el tratamiento después de 4 semanas de tratamiento continuado.
- () Haber recibido información suficiente del estudio y haber firmado el consentimiento informado del mismo.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- () Cualquier otro glaucoma diferente del glaucoma primario de ángulo abierto.
- () Pacientes en quienes no es preciso el diagnóstico de glaucoma.
- () No cumplir todos los criterios de inclusión.

FILIACIÓN DEL PACIENTE:

Fecha de nacimiento: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

Sexo: Varón () Mujer ()

Antecedentes personales:

Diabetes Sí () No ()

Hipertensión arterial Sí () No ()

Cefalea tipo Migraña Sí () No ()

Antecedentes familiares de primer grado de glaucoma Sí () No ()

Exploraciones realizadas para llegar al diagnóstico:

Tonometría de aplanación Sí () No ()

Gonioscopia Sí () No ()

Examen de la papila Sí () No ()

Campimetría Sí () No ()

Paciente Respondedor POSITIVO a Latanoprost:

Fecha primera visita ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

PIO previa al tratamiento con Latanoprost

OD _____ mmHg OI: _____ mmHg Fecha: ___/___/___ (dd/mm/aa)

PIO después de iniciado el tratamiento con latanoprost:

OD: _____ mmHg OI: _____ mmHg Fecha: ___/___/___(dd/mm/aa)

ANEXO 3 : SNPs seleccionados para estudio

SEQID	Cromosoma		SEQID	Cromosoma
1328441	1		10782665	1
1328449	1		10873978	1
1417103	1		10902456	12
1555541	1		11162463	1
1581918	1		11162488	1
1581920	1		11162494	1
1861320	16		11225426	11
1999012	1		11246851	12
2071232	11		11541998	16
2241145	16		11578155	1
2274755	20		11613757	12
2352039	1		11835665	12
3025066	11		12099648	12
3087864	12		12568630	1
3753380	1		12731181	1
3766332	1		12748050	1
3766354	1		12923011	16
3766355	1		17293823	11
3787268	20		243845	16
3918249	20		470215	11
3918256	20		470358	11
4650581	1		473027	1
4964926	12		475007	11
4964927	12		514921	11
5031036	11		518341	1
6672484	1		520171	1
6686438	1		520540	11
6692239	1		569444	11
7125062	11		650108	11
7125320	11		674345	1
7484577	12		724159	1
7545762	1		866770	16
7945189	11		1034186	1
10489950	1		1053605	16
10751699	12			
10751700	12			
10751701	12			

ANEXO 4: Modelo de consentimiento informado

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO:

Asociación de polimorfismos de un simple nucleótido (SNPs) de los genes de las metaloproteinasas con la respuesta al latanoprost en pacientes glaucomatosos.
Proyecto Glaucoma I

Investigador principal: Fernando Ussa, Universidad de Valladolid- IOBA

ussa@ioba.med.uva.es)

Centro e Investigador responsable:

Hospital _____ Dr. _____

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el desarrollo del estudio en el que se le propone participar. Su participación en el estudio consiste en donar una muestra de sangre para su estudio genético en caso de tener su aprobación de éste documento.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Su participación es voluntaria y puede revocar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio en sus cuidados médicos. En caso de retirar el consentimiento para participar en el estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de un nuevo análisis.

FUNDAMENTO

El estudio que se va a llevar a cabo es un estudio realizado con el apoyo de la Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria 062 y con el Instituto Gallego de Oftalmología y que se coordinará desde el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada con el fin de averiguar si determinados polimorfismos de los genes (variaciones genéticas) que codifican para las metaloproteinasas (MMPs-1,-2,-3,-9 y -17) (las metaloproteinasas son proteínas de tipo enzimas que regulan el funcionamiento de las células y la matriz extracelular) pudieran servir como elementos de predicción frente a la respuesta hipotensora a los análogos de prostaglandinas (Latanoprost) en el tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto.

OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El glaucoma es la segunda causa de ceguera irreversible a nivel mundial. Su tratamiento hasta el momento, se limita a la reducción de la presión intraocular principalmente por medio de fármacos, láser ó cirugía filtrante. Uno de los problemas de la terapia médica es la falta de eficacia en la respuesta al tratamiento farmacológico. Se estima que hasta un 20% de los pacientes tratados con Latanoprost puedan no responder adecuadamente a este medicamento y ello puede estar influido por variaciones genéticas entre los individuos.

El objetivo final del estudio es identificar si existen variaciones genéticas en los pacientes no respondedores a la terapia con latanoprost y para ello se realizará la extracción de sangre de éstos pacientes y se analizará la presencia de tales polimorfismos comunes presentes en 5 genes (MMPs-1,-2,-3,-9 y-17).

BENEFICIOS ESPERADOS

Es poco probable que se produzcan beneficios inmediatos y directos sobre mi persona por participar en el estudio; sin embargo, es posible que colabore a aclarar un aspecto muy im-

portante para el tratamiento del glaucoma que, en un futuro, nos ayude a diseñar mejores tratamientos. Cualquier nueva información referente a las técnicas utilizadas en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada.

RIESGOS E INCONVENIENTES

Entre los posibles inconvenientes que puede suponer mi participación es la de percibir una molestia mínima derivada de la extracción de sangre. Muy infrecuentemente se puede producir un hematoma leve. Dado a que no es esperable que aparezcan acontecimientos adversos en lo que concierne a los sujetos que participan en la investigación, no se han tomado especiales medidas orientadas a su tratamiento. No esperamos riesgos adicionales derivados de su participación en el estudio Glaucoma I

También es posible que tras la participación en este estudio, sea necesario con posterioridad contactar con usted nuevamente con el fin de obtener nuevos datos. Sin embargo, la muestra obtenida será utilizada sólo para el fin indicado en el presente documento. De ser necesaria su utilización para nuevos proyectos, se le solicitará nuevamente y por escrito su expresa autorización.

CONFIDENCIALIDAD

Una vez realizada la extracción de sangre, los tubos y las planilla de recogida de datos serán codificados con un sistema de código de barras de manera de asegurar el tratamiento confidencial de las mismas. De esta manera, todas las muestras que se obtengan para el estudio serán codificadas de forma tal que su identificación será confidencial y únicamente será conocida por su médico tratante y el responsable del estudio quienes se comprometen al manejo más estricto y ético de sus datos

Todos los datos recogidos para el estudio, procedentes de su Historia Clínica o facilitados por usted mismo, serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento

de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal. Debe saber que tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de los mismos en cualquier momento. Sólo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación la realizará el Investigador Principal/Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo el investigador principal/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

OTROS ASPECTOS DE INTERÉS

Los resultados obtenidos a partir de este estudio es posible que permitan orientar la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, y con ello el diseño de nuevos fármacos para prevenir y/o tratar el glaucoma.

Este proyecto será financiado parcialmente por la Red Temática de Investigación Cooperativa Carlos III. Este proyecto no tiene ningún interés comercial.

En caso de necesitar cualquier información o por cualquier otro motivo no dude en contactar con los investigadores principales del estudio en el teléfono 983 184761. Así mismo, en caso de dudas respecto a sus derechos debe dirigirse al Servicio de Atención al Paciente del hospital.

Firma del paciente: Nombre: Fecha:

Firma del investigador: Nombre: Fecha:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

Título del Estudio: Glaucoma I

Código de protocolo:

Promotor: Universidad de Valladolid- IOBA

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido suficiente información sobre el estudio. He hablado con el Doctor:

..... (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1o Cuando quiera

2o Sin tener que dar explicaciones.

3o Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha : Firma del participante Fecha : Firma del investigador

Título del Estudio: Glaucoma I

Código de protocolo:

Promotor: Universidad de Valladolid- IOBA

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido suficiente información sobre el estudio. He hablado con el Doctor:

..... (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1o Cuando quiera

2o Sin tener que dar explicaciones.

3o Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha : Firma del participante Fecha : Firma del investigador

ANEXO 5: Estimación de frecuencias alélicas y genotípicas, expresadas en porcentaje de cada SNP evaluado

Gen	SNP	Genotipo	Población CEU	n	%	IC 95% para el %		Frecuencias alélicas			
						Inf.	Sup.	A	C	G	T
PTGFR	rs6686438	GG	54.44	64	55.17	46.12	64.22	.	.	74.14	25.86
		GT	36.67	44	37.93	29.10	46.76				
		TT	8.89	8	6.90	2.29	11.51				
PTGFR	rs7545762	AA	37.80	44	37.61	28.83	46.38	62.82	.	.	37.18
		AT	46.95	59	50.43	41.37	59.49				
		TT	15.24	14	11.97	6.08	17.85				
PTGFR	rs1328449	CC	1.27	0	0.00	0.00	0.00	.	7.69	.	92.31
		CT	12.66	18	15.38	8.85	21.92				
		TT	86.08	99	84.62	78.08	91.15				
PTGFR	rs12568630	AA	0.00	0	0.00	0.00	0.00	6.47	.	.	93.53
		AT	10.11	15	12.93	6.82	19.04				
		TT	89.89	101	87.07	80.96	93.18				
PTGFR	rs1581920	CC	61.11	78	67.24	58.70	75.78	.	81.47	.	18.53
		CT	36.67	33	28.45	20.24	36.66				
		TT	2.22	5	4.31	0.61	8.01				
PTGFR	rs1581918	AA	3.33	6	5.13	1.13	9.13	21.37	.	78.63	.
		AG	27.78	38	32.48	23.99	40.96				
		GG	68.89	73	62.39	53.62	71.17				
PTGFR	rs6672484	CC	54.44	59	50.86	41.76	59.96	.	69.83	.	30.17
		CT	34.44	44	37.93	29.10	46.76				
		TT	11.11	13	11.21	5.47	16.95				
PTGFR	rs1328441	AA	32.95	33	28.45	20.24	36.66	51.29	.	48.71	.
		AG	45.45	53	45.69	36.62	54.75				
		GG	21.59	30	25.86	17.89	33.83				
PTGFR	rs1417103	CC	0.00	1	0.85	0.00	2.52	.	5.98	.	94.02
		CT	12.73	12	10.26	4.76	15.75				
		TT	87.27	104	88.89	83.19	94.58				
PTGFR	rs724159	CC	10.91	10	8.62	3.51	13.73	.	30.17	.	69.83
		CT	40.61	50	43.10	34.09	52.12				
		TT	48.48	56	48.28	39.18	57.37				

PTGFR	rs2352039	GG	74.39	77	65.81	57.22	74.41	.	.	82.48	17.52
		GT	24.39	39	33.33	24.79	41.88				
		TT	1.22	1	0.85	0.00	2.52				
PTGFR	rs10873978	CC	40.00	45	38.46	29.65	47.28	.	62.82	.	37.18
		CT	48.48	57	48.72	39.66	57.78				
		TT	11.52	15	12.82	6.76	18.88				
PTGFR	rs1034186	AA	0.00	0	0.00	0.00	0.00	5.6	.	.	94.4
		AT	12.36	13	11.21	5.47	16.95				
		TT	87.64	103	88.79	83.05	94.53				
PTGFR	rs10489950	CC	86.67	111	94.87	90.87	98.87	.	97.44	.	2.56
		CT	13.33	6	5.13	1.13	9.13				
		TT	0.00	0	0.00	0.00	0.00				
PTGFR	rs1999012	CC	73.03	74	63.79	55.05	72.54	.	79.31	20.69	.
		CG	26.97	36	31.03	22.62	39.45				
		GG	0.00	6	5.17	1.14	9.20				
PTGFR	rs11162488	AA	48.89	68	58.12	49.18	67.06	75.64	.	24.36	.
		AC	40.00	41	35.04	26.40	43.69				
		CC	11.11	8	6.84	2.26	11.41				
PTGFR	rs674345	AA	10.91	18	15.52	8.93	22.11	37.07	.	62.93	.
		AG	47.88	50	43.10	34.09	52.12				
		GG	41.21	48	41.38	32.42	50.34				
PTGFR	rs518341	CC	1.11	0	0.00	0.00	0.00	.	6.47	.	93.53
		CT	20.00	15	12.93	6.82	19.04				
		TT	78.89	101	87.07	80.96	93.18				
PTGFR	rs10782665	GG	37.20	51	43.59	34.60	52.58	.	.	64.96	35.04
		GT	46.34	50	42.74	33.77	51.70				
		TT	16.46	16	13.68	7.45	19.90				
PTGFR	rs11578155	AA	86.67	96	82.76	75.88	89.63	90.95	.	9.05	.
		AG	13.33	19	16.38	9.64	23.11				
		GG	0.00	1	0.86	0.00	2.54				
PTGFR	rs6692239	CC	38.18	39	33.62	25.02	42.22	.	59.48	.	40.52
		CT	44.24	60	51.72	42.63	60.82				
		TT	17.58	17	14.66	8.22	21.09				

PTGFR	rs11162494	AA	55.15	64	55.17	46.12	64.22	72.84	.	.	27.16
		AT	40.61	41	35.34	26.65	44.04				
		TT	4.24	11	9.48	4.15	14.81				
PTGFR	rs3753380	AA	11.59	14	12.07	6.14	18.00	29.74	.	70.26	.
		AG	41.46	41	35.34	26.65	44.04				
		GG	46.95	61	52.59	43.50	61.67				
PTGFR	rs3766355	GG	79.17	83	70.94	62.71	79.17	.	.	84.19	15.81
		GT	20.83	31	26.50	18.50	34.49				
		TT	0.00	3	2.56	0.00	5.43				
PTGFR	rs3766354	CC	80.61	91	78.45	70.97	85.93	.	89.22	.	10.78
		CT	18.18	25	21.55	14.07	29.03				
		TT	1.21	0	0.00	0.00	0.00				
PTGFR	rs1555541	AA	42.94	47	40.52	31.58	49.45	62.07	.	37.93	.
		AG	42.33	50	43.10	34.09	52.12				
		GG	14.72	19	16.38	9.64	23.11				
PTGFR	rs12748050	CC	66.67	85	72.65	64.57	80.73	.	85.04	.	14.96
		CT	27.27	29	24.79	16.96	32.61				
		TT	6.06	3	2.56	0.00	5.43				
PTGFR	rs520171	AA	1.82	5	4.27	0.61	7.94	16.67	83.33	.	.
		AC	30.30	29	24.79	16.96	32.61				
		CC	67.88	83	70.94	62.71	79.17				
PTGFR	rs473027	AA	47.27	56	48.70	39.56	57.83	69.13	.	30.87	.
		AG	43.64	47	40.87	31.88	49.85				
		GG	9.09	12	10.43	4.85	16.02				
PTGFR	rs4650581	AA	8.99	5	4.50	0.65	8.36	17.12	.	.	82.88
		AT	40.45	28	25.23	17.15	33.30				
		TT	50.56	78	70.27	61.77	78.77				
PTGFR	rs3766332	AA	0.61	0	0.00	0.00	0.00	6.47	.	.	93.53
		AT	11.59	15	12.93	6.82	19.04				
		TT	87.80	101	87.07	80.96	93.18				
PTGFR	rs12731181	AA	67.88	84	71.79	63.64	79.95	83.76	.	16.24	.
		AG	27.27	28	23.93	16.20	31.66				
		GG	4.85	5	4.27	0.61	7.94				

MMP1	rs17293823	AA	2.22	2	1.72	0.00	4.09	12.93	.	87.07	.
		AG	20.00	26	22.41	14.82	30.00				
		GG	77.78	88	75.86	68.07	83.65				
MMP1	rs7945189	CC	75.00	91	77.78	70.24	85.31	.	87.61	.	12.39
		CT	24.39	23	19.66	12.46	26.86				
		TT	0.61	3	2.56	0.00	5.43				
MMP1	rs470215	AA	43.29	50	42.74	33.77	51.70	65.38	.	34.62	.
		AG	44.51	53	45.30	36.28	54.32				
		GG	12.20	14	11.97	6.08	17.85				
MMP1	rs7125062	CC	7.27	8	6.84	2.26	11.41	.	23.93	.	76.07
		CT	41.21	40	34.19	25.59	42.78				
		TT	51.52	69	58.97	50.06	67.89				
MMP1	rs7125320	GG	1.21	1	0.86	0.00	2.54	.	.	8.62	91.38
		GT	10.30	18	15.52	8.93	22.11				
		TT	88.48	97	83.62	76.89	90.36				
MMP1	rs11225426	CC	86.67	90	77.59	70.00	85.18	.	87.93	.	12.07
		CT	12.12	24	20.69	13.32	28.06				
		TT	1.21	2	1.72	0.00	4.09				
MMP1	rs2071232	CC	2.42	4	3.45	0.13	6.77	.	15.52	.	84.48
		CT	38.18	28	24.14	16.35	31.93				
		TT	59.39	84	72.41	64.28	80.55				
MMP1	rs5031036	AA	83.33	107	91.45	86.39	96.52	95.73	.	4.27	.
		AG	16.67	10	8.55	3.48	13.61				
		GG	0.00	0	0.00	0.00	0.00				
MMP1	rs470358	CC	34.97	41	36.94	27.96	45.92	.	58.56	.	41.44
		CT	51.53	48	43.24	34.03	52.46				
		TT	13.50	22	19.82	12.40	27.24				
MMP1	rs514921	AA	47.27	65	55.56	46.55	64.56	74.36	.	25.64	.
		AG	41.82	44	37.61	28.83	46.38				
		GG	10.91	8	6.84	2.26	11.41				
MMP1	rs475007	AA	31.46	38	32.76	24.22	41.30	56.9	.	.	43.1
		AT	44.94	56	48.28	39.18	57.37				
		TT	23.60	22	18.97	11.83	26.10				

MMP3	rs569444	AA	1.11	0	0.00	0.00	0.00	13.68	.	86.32	.
		AG	16.67	32	27.35	19.27	35.43				
		GG	82.22	85	72.65	64.57	80.73				
MMP3	rs650108	AA	4.44	7	5.98	1.69	10.28	30.34	.	69.66	.
		AG	38.89	57	48.72	39.66	57.78				
		GG	56.67	53	45.30	36.28	54.32				
MMP3	rs520540	AA	27.78	23	19.83	12.57	27.08	45.69	.	54.31	.
		AG	60.00	60	51.72	42.63	60.82				
		GG	12.22	33	28.45	20.24	36.66				
MMP3	rs3025066	AA	84.24	99	84.62	78.08	91.15	91.88	.	8.12	.
		AG	15.15	17	14.53	8.14	20.92				
		GG	0.61	1	0.85	0.00	2.52				
MMP17	rs4964926	CC	78.16	88	75.86	68.07	83.65	.	86.21	13.79	.
		CG	21.84	24	20.69	13.32	28.06				
		GG	0.00	4	3.45	0.13	6.77				
MMP17	rs4964927	CC	32.32	39	33.62	25.02	42.22	.	58.19	.	41.81
		CT	47.56	57	49.14	40.04	58.24				
		TT	20.12	20	17.24	10.37	24.12				
MMP17	rs10751699	GG	20.61	26	22.22	14.69	29.76	.	.	44.44	55.56
		GT	47.27	52	44.44	35.44	53.45				
		TT	32.12	39	33.33	24.79	41.88				
MMP17	rs7484577	CC	44.24	62	53.91	44.80	63.02	.	70.43	.	29.57
		CT	41.82	38	33.04	24.45	41.64				
		TT	13.94	15	13.04	6.89	19.20				
MMP17	rs10902456	GG	44.51	66	56.41	47.42	65.40	.	.	73.5	26.5
		GT	44.51	40	34.19	25.59	42.78				
		TT	10.98	11	9.40	4.11	14.69				
MMP17	rs12099648	AA	3.14	6	5.56	1.24	9.88	22.22	.	77.78	.
		AG	21.38	36	33.33	24.44	42.22				
		GG	75.47	66	61.11	51.92	70.31				
MMP17	rs10751701	CC	0.00	0	0.00	0.00	0.00	.	10.26	89.74	.
		CG	8.99	24	20.51	13.20	27.83				
		GG	91.01	93	79.49	72.17	86.80				

MMP17	rs3087864	AA	62.42	53	45.69	36.62	54.75	68.53	.	31.47	.
		AG	28.48	53	45.69	36.62	54.75				
		GG	9.09	10	8.62	3.51	13.73				
MMP17	rs11246851	AA	21.33	36	31.30	22.83	39.78	54.78	.	.	45.22
		AT	61.33	54	46.96	37.83	56.08				
		TT	17.33	25	21.74	14.20	29.28				
MMP17	rs11613757	CC	90.00	90	77.59	70.00	85.18	.	87.93	.	12.07
		CT	10.00	24	20.69	13.32	28.06				
		TT	0.00	2	1.72	0.00	4.09				
MMP2	rs1053605	CC	83.64	108	93.10	88.49	97.71	.	96.12	.	3.88
		CT	15.15	7	6.03	1.70	10.37				
		TT	1.21	1	0.86	0.00	2.54				
MMP2	rs866770	AA	76.14	68	58.62	49.66	67.58	76.29	.	23.71	.
		AG	23.86	41	35.34	26.65	44.04				
		GG	0.00	7	6.03	1.70	10.37				
MMP2	rs2241145	CC	21.11	16	13.79	7.52	20.07	.	34.05	65.95	.
		CG	52.22	47	40.52	31.58	49.45				
		GG	26.67	53	45.69	36.62	54.75				
MMP2	rs12923011	CC	35.56	67	57.26	48.30	66.23	.	73.5	.	26.5
		CT	48.89	38	32.48	23.99	40.96				
		TT	15.56	12	10.26	4.76	15.75				
MMP2	rs243845	CC	40.00	38	32.48	23.99	40.96	.	57.69	.	42.31
		CT	44.24	59	50.43	41.37	59.49				
		TT	15.76	20	17.09	10.27	23.92				
MMP2	rs11541998	CC	80.61	92	79.31	71.94	86.68	.	89.66	10.34	.
		CG	18.18	24	20.69	13.32	28.06				
		GG	1.21	0	0.00	0.00	0.00				
MMP2	rs1861320	GG	30.49	49	41.88	32.94	50.82	.	.	61.97	38.03
		GT	54.27	47	40.17	31.29	49.05				
		TT	15.24	21	17.95	10.99	24.90				
MMP9	rs3918249	CC	9.55	13	11.11	5.42	16.81	.	37.61	.	62.39
		CT	52.87	62	52.99	43.95	62.04				
		TT	37.58	42	35.90	27.21	44.59				

MMP9	rs2274755	GG	69.09	89	76.72	69.03	84.41	.	.	87.93	12.07
		GT	28.48	26	22.41	14.82	30.00				
		TT	2.42	1	0.86	0.00	2.54				
MMP9	rs3918256	AA	29.09	30	25.86	17.89	33.83	54.74	.	45.26	.
		AG	53.33	67	57.76	48.77	66.75				
		GG	17.58	19	16.38	9.64	23.11				
MMP9	rs3787268	AA	2.22	7	5.98	1.69	10.28	26.07	.	73.93	.
		AG	28.89	47	40.17	31.29	49.05				
		GG	68.89	63	53.85	44.81	62.88				

ANEXO 6: Asociación genotípica para cada SNP evaluado

Gen	SNP	Genot.	CEU	Grupo: Positivo				Grupo: Negativo				p-valor
				n	%	IC 95% para el %		n	%	IC 95% para el %		
						Inf.	Sup.			Inf.	Sup.	
PTGFR	rs6686438	GG	54.44	48	49.48	39.53	59.43	16	84.21	67.81	100.00	0.0195 (*)
		GT	36.67	41	42.27	32.44	52.10	3	15.79	0.00	32.19	
		TT	8.89	8	8.25	2.77	13.72	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs7545762	AA	37.80	38	38.78	29.13	48.42	6	31.58	10.68	52.48	0.1112 (*)
		AT	46.95	46	46.94	37.06	56.82	13	68.42	47.52	89.32	
		TT	15.24	14	14.29	7.36	21.21	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs1328449	CC	1.27	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	0.2993 (*)
		CT	12.66	17	17.35	9.85	24.84	1	5.26	0.00	15.30	
		TT	86.08	81	82.65	75.16	90.15	18	94.74	84.70	100.00	
PTGFR	rs12568630	AA	0.00	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	0.0702 (*)
		AT	10.11	10	10.31	4.26	16.36	5	26.32	6.52	46.12	
		TT	89.89	87	89.69	83.64	95.74	14	73.68	53.88	93.48	
PTGFR	rs1581920	CC	61.11	62	63.92	54.36	73.47	16	84.21	67.81	100.00	0.2898 (*)
		CT	36.67	30	30.93	21.73	40.13	3	15.79	0.00	32.19	
		TT	2.22	5	5.15	0.75	9.55	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs1581918	AA	3.33	5	5.10	0.75	9.46	1	5.26	0.00	15.30	0.5697 (*)
		AG	27.78	30	30.61	21.49	39.74	8	42.11	19.90	64.31	
		GG	68.89	63	64.29	54.80	73.77	10	52.63	30.18	75.08	
PTGFR	rs6672484	CC	54.44	55	56.70	46.84	66.56	4	21.05	2.72	39.38	0.0104 (*)
		CT	34.44	32	32.99	23.63	42.35	12	63.16	41.47	84.85	
		TT	11.11	10	10.31	4.26	16.36	3	15.79	0.00	32.19	
PTGFR	rs1328441	AA	32.95	23	23.71	15.25	32.18	10	52.63	30.18	75.08	0.0154 (*)
		AG	45.45	45	46.39	36.47	56.32	8	42.11	19.90	64.31	
		GG	21.59	29	29.90	20.79	39.01	1	5.26	0.00	15.30	
PTGFR	rs1417103	CC	0.00	1	1.02	0.00	3.01	0	0.00	.	.	0.3393 (*)
		CT	12.73	12	12.24	5.75	18.74	0	0.00	.	.	
		TT	87.27	85	86.73	80.02	93.45	19	100.00	.	.	
PTGFR	rs724159	CC	10.91	10	10.31	4.26	16.36	0	0.00	.	.	0.2638 (*)
		CT	40.61	43	44.33	34.44	54.22	7	36.84	15.15	58.53	
		TT	48.48	44	45.36	35.45	55.27	12	63.16	41.47	84.85	

PTGFR	rs2352039	GG	74.39	65	66.33	56.97	75.68	12	63.16	41.47	84.85	0.8268 (*)
		GT	24.39	32	32.65	23.37	41.94	7	36.84	15.15	58.53	
		TT	1.22	1	1.02	0.00	3.01	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs10873978	CC	40.00	34	34.69	25.27	44.12	11	57.89	35.69	80.10	0.1827 (*)
		CT	48.48	51	52.04	42.15	61.93	6	31.58	10.68	52.48	
		TT	11.52	13	13.27	6.55	19.98	2	10.53	0.00	24.33	
PTGFR	rs1034186	AA	0.00	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	0.6909 (*)
		AT	12.36	12	12.37	5.82	18.92	1	5.26	0.00	15.30	
		TT	87.64	85	87.63	81.08	94.18	18	94.74	84.70	100.00	
PTGFR	rs10489950	CC	86.67	95	96.94	93.53	100.00	16	84.21	67.81	100.00	0.0534 (*)
		CT	13.33	3	3.06	0.00	6.47	3	15.79	0.00	32.19	
		TT	0.00	0	.	.	.	0	0.00	0.00	0.00	
PTGFR	rs1999012	CC	73.03	60	61.86	52.19	71.52	14	73.68	53.88	93.48	0.1468 (*)
		CG	26.97	33	34.02	24.59	43.45	3	15.79	0.00	32.19	
		GG	0.00	4	4.12	0.17	8.08	2	10.53	0.00	24.33	
PTGFR	rs11162488	AA	48.89	54	55.10	45.25	64.95	14	73.68	53.88	93.48	0.3068 (*)
		AC	40.00	36	36.73	27.19	46.28	5	26.32	6.52	46.12	
		CC	11.11	8	8.16	2.74	13.58	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs674345	AA	10.91	14	14.43	7.44	21.43	4	21.05	2.72	39.38	0.7465 (*)
		AG	47.88	42	43.30	33.44	53.16	8	42.11	19.90	64.31	
		GG	41.21	41	42.27	32.44	52.10	7	36.84	15.15	58.53	
PTGFR	rs518341	CC	1.11	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	0.4595 (*)
		CT	20.00	14	14.43	7.44	21.43	1	5.26	0.00	15.30	
		TT	78.89	83	85.57	78.57	92.56	18	94.74	84.70	100.00	
PTGFR	rs10782665	GG	37.20	37	37.76	28.16	47.35	14	73.68	53.88	93.48	0.019 (*)
		GT	46.34	46	46.94	37.06	56.82	4	21.05	2.72	39.38	
		TT	16.46	15	15.31	8.18	22.43	1	5.26	0.00	15.30	
PTGFR	rs11578155	AA	86.67	84	86.60	79.82	93.38	12	63.16	41.47	84.85	0.026 (*)
		AG	13.33	12	12.37	5.82	18.92	7	36.84	15.15	58.53	
		GG	0.00	1	1.03	0.00	3.04	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs6692239	CC	38.18	35	36.08	26.53	45.64	4	21.05	2.72	39.38	0.4529 (*)
		CT	44.24	48	49.48	39.53	59.43	12	63.16	41.47	84.85	
		TT	17.58	14	14.43	7.44	21.43	3	15.79	0.00	32.19	
PTGFR	rs11162494	AA	55.15	56	57.73	47.90	67.56	8	42.11	19.90	64.31	0.3168 (*)
		AT	40.61	33	34.02	24.59	43.45	8	42.11	19.90	64.31	
		TT	4.24	8	8.25	2.77	13.72	3	15.79	0.00	32.19	

PTGFR	rs3753380	AA	11.59	12	12.37	5.82	18.92	2	10.53	0.00	24.33	0.11 (*)
		AG	41.46	38	39.18	29.46	48.89	3	15.79	0.00	32.19	
		GG	46.95	47	48.45	38.51	58.40	14	73.68	53.88	93.48	
PTGFR	rs3766355	GG	79.17	69	70.41	61.37	79.45	14	73.68	53.88	93.48	1 (*)
		GT	20.83	26	26.53	17.79	35.27	5	26.32	6.52	46.12	
		TT	0.00	3	3.06	0.00	6.47	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs3766354	CC	80.61	76	78.35	70.15	86.55	15	78.95	60.62	97.28	1 (*)
		CT	18.18	21	21.65	13.45	29.85	4	21.05	2.72	39.38	
		TT	1.21	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs1555541	AA	42.94	41	42.27	32.44	52.10	6	31.58	10.68	52.48	0.6306 (*)
		AG	42.33	40	41.24	31.44	51.03	10	52.63	30.18	75.08	
		GG	14.72	16	16.49	9.11	23.88	3	15.79	0.00	32.19	
PTGFR	rs12748050	CC	66.67	72	73.47	64.73	82.21	13	68.42	47.52	89.32	0.7463 (*)
		CT	27.27	23	23.47	15.08	31.86	6	31.58	10.68	52.48	
		TT	6.06	3	3.06	0.00	6.47	0	0.00	.	.	
PTGFR	rs520171	AA	1.82	5	5.10	0.75	9.46	0	0.00	.	.	0.6444 (*)
		AC	30.30	23	23.47	15.08	31.86	6	31.58	10.68	52.48	
		CC	67.88	70	71.43	62.48	80.37	13	68.42	47.52	89.32	
PTGFR	rs473027	AA	47.27	50	52.08	42.09	62.08	6	31.58	10.68	52.48	0.2095 (*)
		AG	43.64	37	38.54	28.81	48.28	10	52.63	30.18	75.08	
		GG	9.09	9	9.38	3.54	15.21	3	15.79	0.00	32.19	
PTGFR	rs4650581	AA	8.99	5	5.43	0.80	10.07	0	0.00	.	.	0.4027 (*)
		AT	40.45	21	22.83	14.25	31.40	7	36.84	15.15	58.53	
		TT	50.56	66	71.74	62.54	80.94	12	63.16	41.47	84.85	
PTGFR	rs3766332	AA	0.61	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	0.4595 (*)
		AT	11.59	14	14.43	7.44	21.43	1	5.26	0.00	15.30	
		TT	87.80	83	85.57	78.57	92.56	18	94.74	84.70	100.00	
PTGFR	rs12731181	AA	67.88	73	74.49	65.86	83.12	11	57.89	35.69	80.10	0.127 (*)
		AG	27.27	20	20.41	12.43	28.39	8	42.11	19.90	64.31	
		GG	4.85	5	5.10	0.75	9.46	0	0.00	.	.	
MMP1	rs17293823	AA	2.22	2	2.06	0.00	4.89	0	0.00	.	.	0.2189 (*)
		AG	20.00	19	19.59	11.69	27.49	7	36.84	15.15	58.53	
		GG	77.78	76	78.35	70.15	86.55	12	63.16	41.47	84.85	
MMP1	rs7945189	CC	75.00	76	77.55	69.29	85.81	15	78.95	60.62	97.28	1 (*)
		CT	24.39	19	19.39	11.56	27.21	4	21.05	2.72	39.38	
		TT	0.61	3	3.06	0.00	6.47	0	0.00	.	.	

MMP1	rs470215	AA	43.29	40	40.82	31.09	50.55	10	52.63	30.18	75.08	0.6441 (*)
		AG	44.51	46	46.94	37.06	56.82	7	36.84	15.15	58.53	
		GG	12.20	12	12.24	5.75	18.74	2	10.53	0.00	24.33	
MMP1	rs7125062	CC	7.27	6	6.12	1.38	10.87	2	10.53	0.00	24.33	0.5687 (*)
		CT	41.21	35	35.71	26.23	45.20	5	26.32	6.52	46.12	
		TT	51.52	57	58.16	48.40	67.93	12	63.16	41.47	84.85	
MMP1	rs7125320	GG	1.21	1	1.03	0.00	3.04	0	0.00	.	.	0.4142 (*)
		GT	10.30	17	17.53	9.96	25.09	1	5.26	0.00	15.30	
		TT	88.48	79	81.44	73.71	89.18	18	94.74	84.70	100.00	
MMP1	rs11225426	CC	86.67	74	76.29	67.82	84.75	16	84.21	67.81	100.00	0.8322 (*)
		CT	12.12	21	21.65	13.45	29.85	3	15.79	0.00	32.19	
		TT	1.21	2	2.06	0.00	4.89	0	0.00	.	.	
MMP1	rs2071232	CC	2.42	2	2.06	0.00	4.89	2	10.53	0.00	24.33	0.1912 (*)
		CT	38.18	24	24.74	16.15	33.33	4	21.05	2.72	39.38	
		TT	59.39	71	73.20	64.38	82.01	13	68.42	47.52	89.32	
MMP1	rs5031036	AA	83.33	89	90.82	85.10	96.53	18	94.74	84.70	100.00	1 (*)
		AG	16.67	9	9.18	3.47	14.90	1	5.26	0.00	15.30	
		GG	0.00	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	
MMP1	rs470358	CC	34.97	35	37.63	27.79	47.48	6	33.33	11.56	55.11	0.8421 (*)
		CT	51.53	39	41.94	31.91	51.96	9	50.00	26.90	73.10	
		TT	13.50	19	20.43	12.24	28.62	3	16.67	0.00	33.88	
MMP1	rs514921	AA	47.27	52	53.06	43.18	62.94	13	68.42	47.52	89.32	0.1805 (*)
		AG	41.82	40	40.82	31.09	50.55	4	21.05	2.72	39.38	
		GG	10.91	6	6.12	1.38	10.87	2	10.53	0.00	24.33	
MMP1	rs475007	AA	31.46	30	30.93	21.73	40.13	8	42.11	19.90	64.31	0.2284 (*)
		AT	44.94	46	47.42	37.49	57.36	10	52.63	30.18	75.08	
		TT	23.60	21	21.65	13.45	29.85	1	5.26	0.00	15.30	
MMP3	rs569444	AA	1.11	0	.	.	.	0	0.00	.	.	0.4636
		AG	16.67	25	25.51	16.88	34.14	7	36.84	15.15	58.53	
		GG	82.22	73	74.49	65.86	83.12	12	63.16	41.47	84.85	
MMP3	rs650108	AA	4.44	6	6.12	1.38	10.87	1	5.26	0.00	15.30	0.4734 (*)
		AG	38.89	50	51.02	41.12	60.92	7	36.84	15.15	58.53	
		GG	56.67	42	42.86	33.06	52.66	11	57.89	35.69	80.10	
MMP3	rs520540	AA	27.78	20	20.62	12.57	28.67	3	15.79	0.00	32.19	0.6368 (*)
		AG	60.00	48	49.48	39.53	59.43	12	63.16	41.47	84.85	
		GG	12.22	29	29.90	20.79	39.01	4	21.05	2.72	39.38	

MMP3	rs3025066	AA	84.24	82	83.67	76.36	90.99	17	89.47	75.67	100.00	0.7779 (*)
		AG	15.15	15	15.31	8.18	22.43	2	10.53	0.00	24.33	
		GG	0.61	1	1.02	0.00	3.01	0	0.00	.	.	
MMP17	rs4964926	CC	78.16	75	76.53	68.14	84.92	13	72.22	51.53	92.91	0.6716 (*)
		CG	21.84	20	20.41	12.43	28.39	4	22.22	3.02	41.43	
		GG	0.00	3	3.06	0.00	6.47	1	5.56	0.00	16.14	
MMP17	rs4964927	CC	32.32	32	32.99	23.63	42.35	7	36.84	15.15	58.53	0.8412 (*)
		CT	47.56	47	48.45	38.51	58.40	10	52.63	30.18	75.08	
		TT	20.12	18	18.56	10.82	26.29	2	10.53	0.00	24.33	
MMP17	rs10751699	GG	20.61	21	21.43	13.30	29.55	5	26.32	6.52	46.12	0.4973 (*)
		GT	47.27	42	42.86	33.06	52.66	10	52.63	30.18	75.08	
		TT	32.12	35	35.71	26.23	45.20	4	21.05	2.72	39.38	
MMP17	rs7484577	CC	44.24	52	54.17	44.20	64.13	10	52.63	30.18	75.08	0.8805 (*)
		CT	41.82	32	33.33	23.90	42.76	6	31.58	10.68	52.48	
		TT	13.94	12	12.50	5.88	19.12	3	15.79	0.00	32.19	
MMP17	rs10902456	GG	44.51	56	57.14	47.34	66.94	10	52.63	30.18	75.08	0.5574 (*)
		GT	44.51	34	34.69	25.27	44.12	6	31.58	10.68	52.48	
		TT	10.98	8	8.16	2.74	13.58	3	15.79	0.00	32.19	
MMP17	rs12099648	AA	3.14	5	5.49	0.81	10.18	1	5.88	0.00	17.07	1 (*)
		AG	21.38	30	32.97	23.31	42.63	6	35.29	12.58	58.01	
		GG	75.47	56	61.54	51.54	71.53	10	58.82	35.43	82.22	
MMP17	rs10751701	CC	0.00	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	1 (*)
		CG	8.99	20	20.41	12.43	28.39	4	21.05	2.72	39.38	
		GG	91.01	78	79.59	71.61	87.57	15	78.95	60.62	97.28	
MMP17	rs3087864	AA	62.42	47	48.45	38.51	58.40	6	31.58	10.68	52.48	0.2673 (*)
		AG	28.48	41	42.27	32.44	52.10	12	63.16	41.47	84.85	
		GG	9.09	9	9.28	3.50	15.05	1	5.26	0.00	15.30	
MMP17	rs11246851	AA	21.33	32	32.99	23.63	42.35	4	22.22	3.02	41.43	0.5973 (*)
		AT	61.33	45	46.39	36.47	56.32	9	50.00	26.90	73.10	
		TT	17.33	20	20.62	12.57	28.67	5	27.78	7.09	48.47	
MMP17	rs11613757	CC	90.00	76	78.35	70.15	86.55	14	73.68	53.88	93.48	0.3846 (*)
		CT	10.00	20	20.62	12.57	28.67	4	21.05	2.72	39.38	
		TT	0.00	1	1.03	0.00	3.04	1	5.26	0.00	15.30	
MMP2	rs1053605	CC	83.64	91	93.81	89.02	98.61	17	89.47	75.67	100.00	0.4363 (*)
		CT	15.15	5	5.15	0.75	9.55	2	10.53	0.00	24.33	
		TT	1.21	1	1.03	0.00	3.04	0	0.00	.	.	

MMP2	rs866770	AA	76.14	54	55.67	45.78	65.56	14	73.68	53.88	93.48	0.3106 (*)
		AG	23.86	36	37.11	27.50	46.73	5	26.32	6.52	46.12	
		GG	0.00	7	7.22	2.07	12.37	0	0.00	0.00	0.00	
MMP2	rs2241145	CC	21.11	14	14.43	7.44	21.43	2	10.53	0.00	24.33	0.5169 (*)
		CG	52.22	37	38.14	28.48	47.81	10	52.63	30.18	75.08	
		GG	26.67	46	47.42	37.49	57.36	7	36.84	15.15	58.53	
MMP2	rs12923011	CC	35.56	56	57.14	47.34	66.94	11	57.89	35.69	80.10	1 (*)
		CT	48.89	32	32.65	23.37	41.94	6	31.58	10.68	52.48	
		TT	15.56	10	10.20	4.21	16.20	2	10.53	0.00	24.33	
MMP2	rs243845	CC	40.00	34	34.69	25.27	44.12	4	21.05	2.72	39.38	0.5264 (*)
		CT	44.24	48	48.98	39.08	58.88	11	57.89	35.69	80.10	
		TT	15.76	16	16.33	9.01	23.64	4	21.05	2.72	39.38	
MMP2	rs11541998	CC	80.61	75	77.32	68.99	85.65	17	89.47	75.67	100.00	0.3552 (*)
		CG	18.18	22	22.68	14.35	31.01	2	10.53	0.00	24.33	
		GG	1.21	0	0.00	.	.	0	0.00	.	.	
MMP2	rs1861320	GG	30.49	40	40.82	31.09	50.55	9	47.37	24.92	69.82	0.716 (*)
		GT	54.27	41	41.84	32.07	51.60	6	31.58	10.68	52.48	
		TT	15.24	17	17.35	9.85	24.84	4	21.05	2.72	39.38	
MMP9	rs3918249	CC	9.55	12	12.24	5.75	18.74	1	5.26	0.00	15.30	0.7691 (*)
		CT	52.87	52	53.06	43.18	62.94	10	52.63	30.18	75.08	
		TT	37.58	34	34.69	25.27	44.12	8	42.11	19.90	64.31	
MMP9	rs2274755	GG	69.09	74	76.29	67.82	84.75	15	78.95	60.62	97.28	1 (*)
		GT	28.48	22	22.68	14.35	31.01	4	21.05	2.72	39.38	
		TT	2.42	1	1.03	0.00	3.04	0	0.00	.	.	
MMP9	rs3918256	AA	29.09	24	24.74	16.15	33.33	6	31.58	10.68	52.48	0.69 (*)
		AG	53.33	56	57.73	47.90	67.56	11	57.89	35.69	80.10	
		GG	17.58	17	17.53	9.96	25.09	2	10.53	0.00	24.33	
MMP9	rs3787268	AA	2.22	6	6.12	1.38	10.87	1	5.26	0.00	15.30	0.7752 (*)
		AG	28.89	41	41.84	32.07	51.60	6	31.58	10.68	52.48	
		GG	68.89	51	52.04	42.15	61.93	12	63.16	41.47	84.85	

ANEXO 7: Modelos de herencia significativos

gen	SNP	Co-dominante	Dominante	Recesivo	Over-Dominante	Aditivo
PTGFR	rs6686438	0.0195	0.0035	0.3498	0.0217	0.0195
	rs7545762	0.1112	0.5494	0.1217	0.0833	0.1112
	rs1328449	0.1378
	rs12568630	0.0801
	rs1581920	0.2898	0.0692	0.5895	0.1606	0.2898
	rs1581918	0.6170	0.3423	0.9768	0.3357	0.4332
	rs6672484	0.0136	0.0036	0.5063	0.0146	0.0191
	rs1328441	0.0100	0.0144	0.0112	0.7311	0.0029
	rs1417103	0.3393	0.1234	1.0000	0.2108	0.3393
	rs724159	0.2638	0.1543	0.3642	0.5443	0.2638
	rs2352039	0.8268	0.7908	1.0000	0.7247	0.8268
	rs10873978	0.1643	0.0606	0.7382	0.0987	0.1134
PTGFR	rs1034186	0.3299
	rs10489950	0.0474
	rs1999012	0.1851	0.3169	0.2944	0.0982	0.7098
	rs11162488	0.3068	0.1243	0.3506	0.3747	0.3068
	rs674345	0.7656	0.6590	0.4811	0.9234	0.5008
	rs518341	0.2319
	rs10782665	0.0142	0.0037	0.1987	0.0307	0.0049
	rs11578155	0.0260	0.0224	1.0000	0.0157	0.0260
	rs6692239	0.4138	0.1900	0.8795	0.2726	0.3304
rs11162494	0.3945	0.2115	0.3354	0.5045	0.1734	
PTGFR	rs3753380	0.0915	0.0399	0.8187	0.0396	0.1045
	rs3766355	1.0000	0.7717	1.0000	0.9845	1.0000
	rs3766354	0.9538
	rs1555541	0.6262	0.3796	0.9392	0.3613	0.5796
	rs12748050	0.7463	0.6553	1.0000	0.4634	0.7463
	rs520171	0.6444	0.7929	0.5904	0.4634	0.6444
	rs473027	0.2460	0.0985	0.4268	0.2573	0.1150
	rs4650581	0.4027	0.4633	0.5858	0.2149	0.4027
	rs3766332	0.2319
	rs12731181	0.1270	0.1537	0.5904	0.0536	0.1270

MMP1	rs17293823	0.2189	0.1729	1.0000	0.1154	0.2189
	rs7945189	1.0000	0.8929	1.0000	0.8682	1.0000
	rs470215	0.6345	0.3431	0.8303	0.4154	0.4163
	rs7125062	0.6356	0.6840	0.5103	0.4211	0.9697
	rs7125320	0.4142	0.1105	1.0000	0.1336	0.4142
	rs11225426	0.8322	0.4339	1.0000	0.5538	0.8322
	rs2071232	0.2793	0.6737	0.1119	0.7278	0.3381
	rs5031036	0.5541
	rs470358	0.8153	0.7277	0.7091	0.5288	0.9773
	rs514921	0.2289	0.2115	0.5103	0.0917	0.4741
rs475007	0.1614	0.3502	0.0614	0.6779	0.1138	
MMP3	rs569444	0.3222
	rs650108	0.4798	0.2290	0.8832	0.2551	0.2817
	rs520540	0.5449	0.4232	0.6214	0.2726	0.8165
	rs3025066	0.7779	0.5043	1.0000	0.5752	0.7779
MMP17	rs4964926	0.8603	0.6983	0.6175	0.8624	0.6172
	rs4964927	0.6714	0.7466	0.3728	0.7390	0.4925
	rs10751699	0.4397	0.1999	0.6445	0.4340	0.2911
	rs7484577	0.9292	0.9024	0.7035	0.8816	0.7875
	rs10902456	0.6202	0.7173	0.3285	0.7923	0.4709
	rs12099648	0.9781	0.8335	0.9493	0.8524	0.8453
	rs10751701	0.9494
	rs3087864	0.2451	0.1714	0.5462	0.0944	0.4254
	rs11246851	0.6094	0.3531	0.5091	0.7783	0.3340
rs11613757	0.5352	0.6605	0.2669	0.9660	0.4613	
MMP2	rs1053605	0.4363	0.5178	1.0000	0.4031	0.4363
	rs866770	0.3106	0.1359	0.5973	0.3588	0.3106
	rs2241145	0.5050	0.3941	0.6418	0.2434	0.7063
	rs12923011	0.9956	0.9516	0.9663	0.9270	0.9797
	rs243845	0.4828	0.2304	0.6243	0.4760	0.2878
	rs11541998	0.2023
rs1861320	0.6983	0.5977	0.7048	0.3982	0.8771	
MMP9	rs3918249	0.5853	0.5412	0.3366	0.9726	0.3647
	rs2274755	1.0000	0.8002	1.0000	0.8756	1.0000
	rs3918256	0.6691	0.5407	0.4299	0.9895	0.3892
	rs3787268	0.6657	0.3706	0.8832	0.3982	0.4232

ANEXO 8: Asociación alélica

Gen	SNP	Al.	CEU	Grupo: Positivo				Grupo: Negativo				p-valor chi-cuad.	p-valor exacto
				n	%	IC 95% para el %		n	%	IC 95% para el %			
						Inf.	Sup.			Inf.	Sup.		
PTGFR	rs6686438	G	73.1	137	70.62	64.21	77.03	35	92.11	83.53	100.00	0.0195	0.0076
		T	26.9	57	29.38	22.97	35.79	3	7.89	0.00	16.47		
PTGFR	rs7545762	A	59.2	122	62.24	55.46	69.03	25	65.79	50.71	80.87	0.1112	0.7079
		T	40.8	74	37.76	30.97	44.54	13	34.21	19.13	49.29		
PTGFR	rs1328449	C	7.3	17	8.67	4.73	12.61	1	2.63	0.00	7.72	0.2993	0.2993
		T	92.7	179	91.33	87.39	95.27	37	97.37	92.28	100.00		
PTGFR	rs12568630	A	4.7	10	5.15	2.04	8.27	5	13.16	2.41	23.91	0.0702	0.0702
		T	95.3	184	94.85	91.73	97.96	33	86.84	76.09	97.59		
PTGFR	rs1581920	C	82.3	154	79.38	73.69	85.07	35	92.11	83.53	100.00	0.2898	0.0792
		T	17.7	40	20.62	14.93	26.31	3	7.89	0.00	16.47		
PTGFR	rs1581918	A	16.9	40	20.41	14.77	26.05	10	26.32	12.31	40.32	0.5697	0.5254
		G	83.1	156	79.59	73.95	85.23	28	73.68	59.68	87.69		
PTGFR	rs6672484	C	73.8	142	73.20	66.96	79.43	20	52.63	36.76	68.51	0.0104	0.0182
		T	26.2	52	26.80	20.57	33.04	18	47.37	31.49	63.24		
PTGFR	rs1328441	A	41.3	91	46.91	39.88	53.93	28	73.68	59.68	87.69	0.0154	0.0037
		G	58.7	103	53.09	46.07	60.12	10	26.32	12.31	40.32		
PTGFR	rs1417103	C	6.5	14	7.14	3.54	10.75	0	0.00	.	.	0.3393	0.1537
		T	93.5	182	92.86	89.25	96.46	38	100	.	.		
PTGFR	rs724159	C	33.3	63	32.47	25.88	39.06	7	18.42	6.10	30.75	0.2638	0.1175
		T	66.7	131	67.53	60.94	74.12	31	81.58	69.25	93.90		
PTGFR	rs2352039	G	81.8	162	82.65	77.35	87.95	31	81.58	69.25	93.90	0.8268	1.0000
		T	18.2	34	17.35	12.05	22.65	7	18.42	6.10	30.75		
PTGFR	rs10873978	C	63.3	119	60.71	53.88	67.55	28	73.68	59.68	87.69	0.1827	0.1381
		T	36.7	77	39.29	32.45	46.12	10	26.32	12.31	40.32		
PTGFR	rs1034186	A	4.7	12	6.19	2.80	9.58	1	2.63	0.00	7.72	0.6909	0.4694
		T	95.3	182	93.81	90.42	97.20	37	97.37	92.28	100.00		
PTGFR	rs10489950	C	95.3	193	98.47	96.75	100.00	35	92.11	83.53	100.00	0.0534	0.0534
		T	4.7	3	1.53	0.00	3.25	3	7.89	0.00	16.47		
PTGFR	rs1999012	C	86.7	153	78.87	73.12	84.61	31	81.58	69.25	93.90	0.1468	0.8341
		G	13.3	41	21.13	15.39	26.88	7	18.42	6.10	30.75		
PTGFR	rs11162488	A	66.2	144	73.47	67.29	79.65	33	86.84	76.09	97.59	0.3068	0.1078
		C	33.8	52	26.53	20.35	32.71	5	13.16	2.41	23.91		

PTGFR	rs674345	A	38.8	70	36.08	29.32	42.84	16	42.11	26.41	57.80	0.7465	0.5979
		G	61.2	124	63.92	57.16	70.68	22	57.89	42.20	73.59		
PTGFR	rs518341	C	10	14	7.22	3.58	10.86	1	2.63	0.00	7.72	0.4595	0.4595
		T	90	180	92.78	89.14	96.42	37	97.37	92.28	100.00		
PTGFR	rs10782665	G	59.7	120	61.22	54.40	68.05	32	84.21	72.62	95.80	0.0190	0.0106
		T	40.3	76	38.78	31.95	45.60	6	15.79	4.20	27.38		
PTGFR	rs11578155	A	94.6	180	92.78	89.14	96.42	31	81.58	69.25	93.90	0.0260	0.0375
		G	5.4	14	7.22	3.58	10.86	7	18.42	6.10	30.75		
PTGFR	rs6692239	C	61.4	118	60.82	53.96	67.69	20	52.63	36.76	68.51	0.4529	0.3543
		T	38.6	76	39.18	32.31	46.04	18	47.37	31.49	63.24		
PTGFR	rs11162494	A	74.3	145	74.74	68.63	80.86	24	63.16	47.82	78.50	0.3168	0.1867
		T	25.7	49	25.26	19.14	31.37	14	36.84	21.50	52.18		
PTGFR	rs3753380	A	33.5	62	31.96	25.40	38.52	7	18.42	6.10	30.75	0.1100	0.1505
		G	66.5	132	68.04	61.48	74.60	31	81.58	69.25	93.90		
PTGFR	rs3766355	G	89.6	164	83.67	78.50	88.85	33	86.84	76.09	97.59	1.0000	0.6486
		T	10.4	32	16.33	11.15	21.50	5	13.16	2.41	23.91		
PTGFR	rs3766354	C	90	173	89.18	84.80	93.55	34	89.47	79.72	99.23	1.0000	1.0000
		T	10	21	10.82	6.45	15.20	4	10.53	0.77	20.28		
PTGFR	rs1555541	A	68.5	122	62.89	56.09	69.68	22	57.89	42.20	73.59	0.6306	0.6033
		G	31.5	72	37.11	30.32	43.91	16	42.11	26.41	57.80		
PTGFR	rs12748050	C	84	167	85.20	80.23	90.17	32	84.21	72.62	95.80	0.7463	1.0000
		T	16	29	14.80	9.83	19.77	6	15.79	4.20	27.38		
PTGFR	rs520171	A	18.2	33	16.84	11.60	22.08	6	15.79	4.20	27.38	0.6444	1.0000
		C	81.8	163	83.16	77.92	88.40	32	84.21	72.62	95.80		
PTGFR	rs473027	A	74.8	137	71.35	64.96	77.75	22	57.89	42.20	73.59	0.2095	0.1331
		G	25.2	55	28.65	22.25	35.04	16	42.11	26.41	57.80		
PTGFR	rs4650581	A	27.3	31	16.85	11.44	22.26	7	18.42	6.10	30.75	0.4027	1.0000
		T	72.7	153	83.15	77.74	88.56	31	81.58	69.25	93.90		
PTGFR	rs3766332	A	5.4	14	7.22	3.58	10.86	1	2.63	0.00	7.72	0.4595	0.4595
		T	94.6	180	92.78	89.14	96.42	37	97.37	92.28	100.00		
PTGFR	rs12731181	A	83.6	166	84.69	79.65	89.73	30	78.95	65.98	91.91	0.1270	0.4976
		G	16.4	30	15.31	10.27	20.35	8	21.05	8.09	34.02		
MMP1	rs17293823	A	13.1	23	11.86	7.31	16.40	7	18.42	6.10	30.75	0.2189	0.2936
		G	86.9	171	88.14	83.60	92.69	31	81.58	69.25	93.90		
MMP1	rs7945189	C	88.6	171	87.24	82.57	91.92	34	89.47	79.72	99.23	1.0000	0.8068
		T	11.4	25	12.76	8.08	17.43	4	10.53	0.77	20.28		

MMP1	rs470215	A	63.8	126	64.29	57.58	70.99	27	71.05	56.63	85.47	0.6441	0.4641
		G	36.2	70	35.71	29.01	42.42	11	28.95	14.53	43.37		
MMP1	rs7125062	C	26.6	47	23.98	18.00	29.96	9	23.68	10.17	37.20	0.5687	1.0000
		T	73.4	149	76.02	70.04	82.00	29	76.32	62.80	89.83		
MMP1	rs7125320	G	6.3	19	9.79	5.61	13.98	1	2.63	0.00	7.72	0.4142	0.2169
		T	93.7	175	90.21	86.02	94.39	37	97.37	92.28	100.00		
MMP1	rs11225426	C	93	169	87.11	82.40	91.83	35	92.11	83.53	100.00	0.8322	0.4459
		T	7	25	12.89	8.17	17.60	3	7.89	0.00	16.47		
MMP1	rs2071232	C	20.3	28	14.43	9.49	19.38	8	21.05	8.09	34.02	0.1912	0.3477
		T	79.7	166	85.57	80.62	90.51	30	78.95	65.98	91.91		
MMP1	rs5031036	A	91.5	187	95.41	92.48	98.34	37	97.37	92.28	100.00	1.0000	0.6983
		G	8.5	9	4.59	1.66	7.52	1	2.63	0.00	7.72		
MMP1	rs470358	C	61.4	109	58.60	51.52	65.68	21	58.33	42.23	74.44	0.8421	1.0000
		T	38.6	77	41.40	34.32	48.48	15	41.67	25.56	57.77		
MMP1	rs514921	A	70.9	144	73.47	67.29	79.65	30	78.95	65.98	91.91	0.1805	0.5528
		G	29.1	52	26.53	20.35	32.71	8	21.05	8.09	34.02		
MMP1	rs475007	A	53.9	106	54.64	47.63	61.64	26	68.42	53.64	83.20	0.2284	0.1563
		T	46.1	88	45.36	38.36	52.37	12	31.58	16.80	46.36		
MMP3	rs569444	A	9.2	25	12.76	8.08	17.43	7	18.42	6.10	30.75	0.4636	0.3988
		G	90.8	171	87.24	82.57	91.92	31	81.58	69.25	93.90		
MMP3	rs650108	A	23.1	62	31.63	25.12	38.14	9	23.68	10.17	37.20	0.4734	0.3077
		G	76.9	134	68.37	61.86	74.88	29	76.32	62.80	89.83		
MMP3	rs520540	A	57.7	88	45.36	38.36	52.37	18	47.37	31.49	63.24	0.6368	0.8576
		G	42.3	106	54.64	47.63	61.64	20	52.63	36.76	68.51		
MMP3	rs3025066	A	92.8	179	91.33	87.39	95.27	36	94.74	87.64	100.00	0.7779	0.5584
		G	7.2	17	8.67	4.73	12.61	2	5.26	0.00	12.36		
MMP17	rs4964926	C	88.9	170	86.73	81.99	91.48	30	83.33	71.16	95.51	0.6716	0.6230
		G	11.1	26	13.27	8.52	18.01	6	16.67	4.49	28.84		
MMP17	rs4964927	C	57.1	111	57.22	50.25	64.18	24	63.16	47.82	78.50	0.8412	0.5907
		T	42.9	83	42.78	35.82	49.75	14	36.84	21.50	52.18		
MMP17	rs10751699	G	47.7	84	42.86	35.93	49.79	20	52.63	36.76	68.51	0.4973	0.3135
		T	52.3	112	57.14	50.21	64.07	18	47.37	31.49	63.24		
MMP17	rs7484577	C	65.7	136	70.83	64.40	77.26	26	68.42	53.64	83.20	0.8805	0.8606
		T	34.3	56	29.17	22.74	35.60	12	31.58	16.80	46.36		
MMP17	rs10902456	G	68.2	146	74.49	68.39	80.59	26	68.42	53.64	83.20	0.5574	0.5723
		T	31.8	50	25.51	19.41	31.61	12	31.58	16.80	46.36		

MMP17	rs12099648	A	15	40	21.98	15.96	27.99	8	23.53	9.27	37.79	1.0000	1.0000
		G	85	142	78.02	72.01	84.04	26	76.47	62.21	90.73		
MMP17	rs10751701	C	4.7	20	10.20	5.97	14.44	4	10.53	0.77	20.28	1.0000	1.0000
		G	95.3	176	89.80	85.56	94.03	34	89.47	79.72	99.23		
MMP17	rs3087864	A	70.6	135	69.59	63.11	76.06	24	63.16	47.82	78.50	0.2673	0.4374
		G	29.4	59	30.41	23.94	36.89	14	36.84	21.50	52.18		
MMP17	rs11246851	A	53.6	109	56.19	49.20	63.17	17	47.22	30.91	63.53	0.5973	0.3787
		T	46.4	85	43.81	36.83	50.80	19	52.78	36.47	69.09		
MMP17	rs11613757	C	91.4	172	88.66	84.20	93.12	32	84.21	72.62	95.80	0.3846	0.5928
		T	8.6	22	11.34	6.88	15.80	6	15.79	4.20	27.38		
MMP2	rs1053605	C	92	187	96.39	93.77	99.02	36	94.74	87.64	100.00	0.4363	0.6638
		T	8	7	3.61	0.98	6.23	2	5.26	0.00	12.36		
MMP2	rs866770	A	89.7	144	74.23	68.07	80.38	33	86.84	76.09	97.59	0.3106	0.1054
		G	10.3	50	25.77	19.62	31.93	5	13.16	2.41	23.91		
MMP2	rs2241145	C	50	65	33.51	26.86	40.15	14	36.84	21.50	52.18	0.5169	0.7244
		G	50	129	66.49	59.85	73.14	24	63.16	47.82	78.50		
MMP2	rs12923011	C	57.7	144	73.47	67.29	79.65	28	73.68	59.68	87.69	1.0000	1.0000
		T	42.3	52	26.53	20.35	32.71	10	26.32	12.31	40.32		
MMP2	rs243845	C	63.3	116	59.18	52.30	66.06	19	50.00	34.10	65.90	0.5264	0.3640
		T	36.7	80	40.82	33.94	47.70	19	50.00	34.10	65.90		
MMP2	rs11541998	C	90	172	88.66	84.20	93.12	36	94.74	87.64	100.00	0.3552	0.3552
		G	10	22	11.34	6.88	15.80	2	5.26	0.00	12.36		
MMP2	rs1861320	G	53.3	121	61.73	54.93	68.54	24	63.16	47.82	78.50	0.7160	1.0000
		T	46.7	75	38.27	31.46	45.07	14	36.84	21.50	52.18		
MMP9	rs3918249	C	36	76	38.78	31.95	45.60	12	31.58	16.80	46.36	0.7691	0.4371
		T	64	120	61.22	54.40	68.05	26	68.42	53.64	83.20		
MMP9	rs2274755	G	84.6	170	87.63	83.00	92.26	34	89.47	79.72	99.23	1.0000	0.7926
		T	15.4	24	12.37	7.74	17.00	4	10.53	0.77	20.28		
MMP9	rs3918256	A	55.6	104	53.61	46.59	60.63	23	60.53	44.98	76.07	0.6900	0.4405
		G	44.4	90	46.39	39.37	53.41	15	39.47	23.93	55.02		
MMP9	rs3787268	A	18.3	53	27.04	20.82	33.26	8	21.05	8.09	34.02	0.7752	0.5397
		G	81.7	143	72.96	66.74	79.18	30	78.95	65.98	91.91		

ANEXO 9: Gen PTGFR frecuencias y subhaplotipos

Haplotipo		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Total	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado
1	GATTCGTATTGCTCCAATGGCTGGCACCATTA	0.0513	0.0353	0.1316	1.6948	0.0901	0.1390
2	GATTCGTATTGCTCCAGTGATAGGCACCATTA	0.0095	0.0294	0.0263	0.7338	0.4631	0.4450
3	GATTCGTATTGCTCCAGTGATAGGC GCCGTTA	0.0467	0.0153	0.1579	2.2514	0.0244	0.0840
4	GATTCGTATTGCTCCAGTGATAGGC GTCATTA	0.0110	0.0056	0.0263	1.2520	0.2106	0.1940
5	GATTCGTATTGCTCGAGTGATAGGC GCCGTTA	0.0046	0.0000	0.0263	1.5047	0.1324	0.1890
6	GTTTCGCGTCGCTCGAGTGATAGGC CAATTA	0.0128	0.0102	0.0263	0.8133	0.4161	0.4620
7	GTTTCGCGTCGCTCGAGTTACAAGCACCATTA	0.0264	0.0157	0.0263	0.4620	0.6441	0.7510
8	GTTTCGCGTCGTTCCCGTTACAGGC GTCGATG	0.0342	0.0357	0.0263	-0.2971	0.7664	1.0000

El haplotipo más frecuente es el H1 (~5%) y no tiene un efecto estadísticamente significativo. Se detecta 1 haplotipo con un efecto al borde de la significación, el H3 con una frecuencias del 5% en la muestra global, 2% en los controles y 16% en los casos.

Subhaplotipos: gen PTGFR

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs6686438	0.0039	0.0046
	rs7545762	0.3423	0.3330
	rs1328449	0.0810	0.0650
	rs12568630	0.0527	0.0370
	rs1581920	0.1911	0.2020
	rs1581918	0.0122	0.0086
	rs6672484	0.0119	0.0113
	rs1328441	0.0113	0.0143
	rs1417103	0.0430	0.0470
	rs724159	0.2118	0.2170
	rs2352039	0.4335	0.4338
	rs10873978	0.1060	0.1190
	rs1034186	0.0549	0.0430
	rs10489950	0.0699	0.0870
	rs1999012	0.1561	0.1520
	rs11162488	0.2197	0.2560
	rs674345	0.3063	0.3230
	rs518341	0.0062	0.0067
	rs10782665	0.0129	0.0157
	rs11578155	0.0255	0.0300
	rs6692239	0.0751	0.0740
	rs11162494	0.0708	0.1010
	rs3753380	0.1938	0.1960
	rs3766355	0.8036	0.8470
	rs3766354	0.7956	0.7990
	rs1555541	0.8316	0.8540
	rs12748050	0.2738	0.3470
	rs520171	0.3105	0.3260
	rs473027	0.0487	0.0510
	rs4650581	0.5510	0.6310
	rs3766332	0.4609	0.4550

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
3	rs6686438	0.0213	0.0332
	rs7545762	0.0993	0.0950
	rs1328449	0.0426	0.0370
	rs12568630	0.1051	0.1120
	rs1581920	0.0310	0.0280
	rs1581918	0.0122	0.0143
	rs6672484	0.0246	0.0340
	rs1328441	0.0296	0.0300
	rs1417103	0.0882	0.0840
	rs724159	0.4703	0.4795
	rs2352039	0.3015	0.3297
	rs10873978	0.0062	0.0069
	rs1034186	0.1576	0.0760
	rs10489950	0.0513	0.0560
	rs1999012	0.1901	0.1910
	rs11162488	0.1730	0.1600
	rs674345	0.0305	0.0240
	rs518341	0.0101	0.0135
	rs10782665	0.0634	0.0920
	rs11578155	0.0441	0.0430
	rs6692239	0.0144	0.0118
	rs11162494	0.2245	0.1910
	rs3753380	0.3382	0.3260
	rs3766355	0.7305	0.7290
	rs3766354	0.8743	0.8920
	rs1555541	0.9286	0.8990
	rs12748050	0.6123	0.6150
	rs520171	0.1464	0.1647
	rs473027	0.0097	0.0160
	rs4650581	0.2250	0.2230

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
4	rs6686438	0.0109	0.0180
	rs7545762	0.0437	0.0700
	rs1328449	0.0750	0.0660
	rs12568630	0.0259	0.0260
	rs1581920	0.0310	0.0220
	rs1581918	0.0251	0.0210
	rs6672484	0.0522	0.0570
	rs1328441	0.0407	0.0480
	rs1417103	0.3723	0.3677
	rs724159	0.4595	0.4080
	rs2352039	0.0824	0.1020
	rs10873978	0.0216	0.0360
	rs1034186	0.0787	0.0290
	rs10489950	0.0460	0.0370
	rs1999012	0.1784	0.1700
	rs11162488	0.0250	0.0300
	rs674345	0.0318	0.0500
	rs518341	0.0347	0.0380
	rs10782665	0.0606	0.0760
	rs11578155	0.0045	0.0055
	rs6692239	0.1235	0.1470
	rs11162494	0.3181	0.2960
	rs3753380	0.6074	0.6240
	rs3766355	0.5889	0.6190
	rs3766354	0.9579	0.8674
	rs1555541	0.4874	0.5070
	rs12748050	0.3192	0.3526
	rs520171	0.0323	0.0427
rs473027	0.0049	0.0098	

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
5	rs6686438	0.0160	0.0160
	rs7545762	0.0762	0.1030
	rs1328449	0.0230	0.0170
	rs12568630	0.0259	0.0180
	rs1581920	0.0530	0.0490
	rs1581918	0.0530	0.0400
	rs6672484	0.1181	0.1080
	rs1328441	0.3014	0.2950
	rs1417103	0.3756	0.3124
	rs724159	0.2026	0.2190
	rs2352039	0.0914	0.1243
	rs10873978	0.0230	0.0460
	rs1034186	0.0704	0.0590
	rs10489950	0.0647	0.0490
	rs1999012	0.0319	0.0350
	rs11162488	0.0214	0.0340
	rs674345	0.0448	0.0450
	rs518341	0.0312	0.0350
	rs10782665	0.0847	0.0750
	rs11578155	0.0424	0.0530
	rs6692239	0.1675	0.1520
	rs11162494	0.5282	0.5110
	rs3753380	0.5690	0.5590
	rs3766355	0.8537	0.8136
	rs3766354	0.8801	0.8780
	rs1555541	0.3764	0.4200
	rs12748050	0.0450	0.0465
	rs520171	0.0085	0.0160

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
6	rs6686438	0.0296	0.0260
	rs7545762	0.0189	0.0280
	rs1328449	0.0230	0.0250
		0.0409	0.0390
	rs1581920	0.0530	0.0400
	rs1581918	0.1176	0.1160
	rs6672484	0.6038	0.4780
	rs1328441	0.1918	0.2268
	rs1417103	0.1233	0.1249
	rs724159	0.0384	0.0704
	rs2352039	0.0572	0.1040
		0.0347	0.0390
	rs1034186	0.1078	0.1220
		0.0172	0.0210
	rs1999012	0.0290	0.0310
		0.1081	0.1190
	rs674345	0.0457	0.0500
	rs518341	0.0646	0.0770
		0.0742	0.0710
		0.0682	0.0600
rs6692239	0.3396	0.3540	
	0.4210	0.4070	
rs3753380	0.7974	0.8290	
rs3766355	0.7873	0.8040	
rs3766354	0.7291	0.7590	
rs1555541	0.1779	0.1950	
	0.0678	0.0680	

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
7	rs6686438	0.0296	0.0200
	rs7545762	0.0131	0.0170
	rs1328449	0.0324	0.0320
	rs12568630	0.0409	0.0290
	rs1581920	0.1176	0.1130
	rs1581918	0.5847	0.4480
	rs6672484	0.4530	0.4340
	rs1328441	0.0401	0.0406
	rs1417103	0.1246	0.1480
	rs724159	0.0437	0.0780
	rs2352039	0.4311	0.4340
	rs10873978	0.0315	0.0330
	rs1034186	0.0511	0.0530
	rs10489950	0.0083	0.0117
	rs1999012	0.1352	0.1380
	rs11162488	0.1086	0.1070
	rs674345	0.0845	0.0730
	rs518341	0.0762	0.0790
	rs10782665	0.1087	0.0930
	rs11578155	0.2175	0.2420
rs6692239	0.3436	0.3410	
rs11162494	0.4444	0.4690	
rs3753380	0.4661	0.4740	
rs3766355	0.5518	0.6010	
rs3766354	0.4427	0.4835	
rs1555541	0.1364	0.1230	

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
8	rs6686438	0.0156	0.0170
	rs7545762	0.0178	0.0240
	rs1328449	0.0324	0.0280
	rs12568630	0.0707	0.0700
	rs1581920	0.5847	0.4330
	rs1581918	0.4475	0.4080
	rs6672484	0.0339	0.0752
	rs1328441	0.0276	0.0590
	rs1417103	0.1030	0.1330
	rs724159	0.9406	0.9490
	rs2352039	0.3529	0.3550
	rs10873978	0.0453	0.0440
	rs1034186	0.0411	0.0390
	rs10489950	0.0357	0.0510
	rs1999012	0.1016	0.0980
	rs11162488	0.1627	0.1900
	rs674345	0.1042	0.1150
	rs518341	0.0848	0.1040
	rs10782665	0.2511	0.2650
	rs11578155	0.2260	0.2160
rs6692239	0.4643	0.4750	
rs11162494	0.2405	0.2620	
rs3753380	0.4179	0.4210	
rs3766355	0.2945	0.3227	
rs3766354	0.2805	0.2867	

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
9	rs668)6438	0.0202	0.0102
	rs7545762	0.0178	0.0220
	rs1328449	0.0776	0.0800
	rs12568630	0.1899	0.1330
	rs1581920	0.4475	0.4180
	rs1581918	0.0334	0.0694
	rs6672484	0.0255	0.0340
	rs1328441	0.1041	0.1270
	rs1417103	0.4068	0.4690
	rs724159	0.4045	0.4450
	rs2352039	0.1839	0.1970
	rs10873978	0.0636	0.0890
	rs1034186	0.0627	0.0630
	rs10489950	0.0359	0.0310
	rs1999012	0.2416	0.2620
	rs11162488	0.1586	0.1500
	rs674345	0.0905	0.1030
	rs518341	0.1962	0.2340
	rs10782665	0.2718	0.2970
	rs11578155	0.3031	0.3520
rs6692239	0.4090	0.4490	
rs11162494	0.2812	0.3160	
rs3753380	0.2484	0.2490	
rs3766355	0.2186	0.2248	

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
10	rs6686438	0.0202	0.0240
	rs7545762	0.0454	0.0520
	rs1328449	0.6452	0.5580
	rs12568630	0.2458	0.1968
	rs1581920	0.0334	0.0716
	rs1581918	0.0253	0.0420
	rs6672484	0.1621	0.1640
	rs1328441	0.1824	0.2200
	rs1417103	0.2386	0.2930
	rs724159	0.2195	0.2660
	rs2352039	0.1727	0.1870
	rs10873978	0.0468	0.0700
	rs1034186	0.0629	0.0600
	rs10489950	0.1394	0.1420
	rs1999012	0.1770	0.1960
	rs11162488	0.1514	0.1500
	rs674345	0.2078	0.2140
	rs518341	0.2257	0.2270
	rs10782665	0.3569	0.3870
	rs11578155	0.3556	0.3910
rs6692239	0.4359	0.4870	
rs11162494	0.1275	0.1560	
rs3753380	0.2156	0.2430	

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
11	rs6686438	0.0267	0.0410
	rs7545762	0.0562	0.0940
	rs1328449	0.0613	0.0900
	rs12568630	0.0145	0.0390
	rs1581920	0.0253	0.0430
	rs1581918	0.1622	0.1790
	rs6672484	1.0000	1.0000
	rs1328441	0.1758	0.2080
	rs1417103	0.1936	0.2370
	rs724159	0.0847	0.1350
	rs2352039	0.0857	0.1200
	rs10873978	0.0499	0.0620
	rs1034186	0.2393	0.2720
	rs10489950	0.1570	0.1400
	rs1999012	0.1588	0.1600
	rs11162488	0.3772	0.3760
	rs674345	0.2322	0.2270
	rs518341	0.3710	0.4170
	rs10782665	0.2263	0.2250
	rs11578155	0.3081	0.3300
rs6692239	0.2645	0.2970	
rs11162494	0.0879	0.1080	

Anexo 10 Gen MMP-1 frecuencias y estadístico score / subhaplotipos

Haplotipo		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Total	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado
1	ACATTCTACAA	0.1169	0.1047	0.0526	1.2475	0.2122	0.2830
2	GCACGTTATAA	0.0143	0.0236	0.0263	-0.8456	0.3978	0.3610
3	GCACTCCACGA	0.0099	0.0091	0.0146	-0.0599	0.9522	1.0000
4	GCACTCCATAA	0.0539	0.0191	0.1842	2.6442	0.0082	0.0200
5	GCACTCCATGA	0.0181	0.0198	0.0117	-0.0663	0.9472	0.8670
6	GCATTCTATAA	0.0574	0.0616	0.0395	-0.2525	0.8006	0.8570
7	GCATTCTATAT	0.0137	0.0080	0.0395	1.0691	0.2850	0.2090
8	GCATTTTACGA	0.0103	0.0069	0.0263	1.0688	0.2852	0.3290
9	GCGTTCTACAA	0.0756	0.0878	0.0658	-0.8696	0.3845	0.4080
10	GCGTTCTACAT	0.1229	0.1253	0.0658	-0.6695	0.5031	0.4960
11	GCGTTCTACGA	0.0971	0.0917	0.1579	0.1803	0.8569	0.8480
12	GTATTCTATAA	0.0738	0.0708	0.1053	0.1161	0.9075	0.9070

Los haplotipos más frecuentes son el H10 y H1 (~12%) y no tienen un efecto estadísticamente significativo. Se detecta 1 haplotipo con un efecto significativo, el H4 con una frecuencias del 5% en la muestra global, 2% en los controles y 18% en los casos.

Subhaplotipos gen MMP-1

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs17293823	0.8555	0.6920
	rs7945189	0.5636	0.5700
	rs470215	0.6806	0.6580
	rs7125062	0.2577	0.2430
	rs7125320	0.3309	0.2850
	rs11225426	0.4791	0.5180
	rs2071232	0.7405	0.5280
	rs5031036	0.8534	0.8760
	rs470358	0.8537	0.9000
	rs514921	0.2559	0.2660

3	rs17293823	0.6030	0.6160
	rs7945189	0.6230	0.6130
	rs470215	0.3112	0.3360
	rs7125062	0.3903	0.3810
	rs7125320	0.3989	0.3930
	rs11225426	0.6148	0.6400
	rs2071232	0.4883	0.4880
	rs5031036	0.8674	0.8810
	rs470358	<0.0001	0.0142
4	rs17293823	0.7306	0.7240
	rs7945189	0.3372	0.3430
	rs470215	0.4548	0.4380
	rs7125062	0.3903	0.3950
	rs7125320	0.9337	0.8580
	rs11225426	0.5490	0.5690
	rs2071232	0.6508	0.6491
	rs5031036	<0.0001	0.0060
5	rs17293823	0.4364	0.4190
	rs7945189	0.4725	0.4930
	rs470215	0.4548	0.4730
	rs7125062	0.9293	0.8420
	rs7125320	0.4268	0.4380
	rs11225426	0.7729	0.7840
	rs2071232	<0.0001	0.0139
6	rs17293823	0.5501	0.5700
	rs7945189	0.4725	0.4660
	rs470215	0.6321	0.5320
	rs7125062	0.4275	0.4250
	rs7125320	0.5764	0.5884
	rs11225426	<0.0001	0.0180
7	rs17293823	0.5501	0.5420
	rs7945189	0.4446	0.4600
	rs470215	0.3397	0.3390
	rs7125062	0.5798	0.5649
	rs7125320	0.0063	0.0730
8	rs17293823	0.5585	0.5500
	rs7945189	0.2957	0.3030
	rs470215	0.4224	0.4277
	rs7125062	0.0066	0.0779

9	rs17293823	0.6167	0.6340
	rs7945189	0.4603	0.4900
	rs470215	0.3653	0.4230
10	rs17293823	0.6382	0.6790
	rs7945189	0.3527	0.4160

ANEXO 11: MMP-2 frecuencias, estadístico score y subhaplotipos

Haplotipo		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Total	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado
1	CACCCG	0.0226	0.0140	0.0526	1.4016	0.1610	0.1210
2	CACTCCT	0.1488	0.1368	0.2250	1.0664	0.2862	0.3080
3	CACTCGT	0.0983	0.1071	0.0382	-1.0944	0.2738	0.2130
4	CAGCTCG	0.3059	0.2912	0.4157	1.2844	0.1990	0.2080
5	CAGCTCT	0.1084	0.1065	0.0698	-0.0434	0.9654	0.9640
6	CGGCCCG	0.2385	0.2594	0.1316	-1.6768	0.0936	0.0660
7	TACCCCG	0.0347	0.0311	0.0316	0.5987	0.5494	0.5150

El haplotipo más frecuente es el H4 (~31%) y no tiene un efecto estadísticamente significativo. Otro haplotipo muy frecuente es el H6 (~24%) con un efecto al borde de la significación: 26% en la muestra de controles y 13% en la de casos.

Subhaplotipos MMP-2

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs1053605	0.2504	0.1960
	rs866770	0.2339	0.2050
	rs2241145	0.8809	0.9210
	rs12923011	0.4552	0.4780
	rs243845	0.3768	0.3930
	rs11541998	0.4565	0.4750
3	rs1053605	0.3902	0.3970
	rs866770	0.4359	0.4400
	rs2241145	0.2816	0.2540
	rs12923011	0.4925	0.4700
	rs243845	0.5725	0.6150
4	rs1053605	0.5747	0.5800
	rs866770	0.3220	0.3280
	rs2241145	0.1627	0.1600
	rs12923011	0.5286	0.5210
5	rs1053605	0.4546	0.4640
	rs866770	0.2088	0.1800
	rs2241145	0.2194	0.2390
6	rs1053605	0.3008	0.2850
	rs866770	0.2468	0.2220

No hay subhaplotipos que muestren un efecto significativo.

ANEXO 12: Gen MMP-3, frecuencias estadístico score y subhaplotipos

Haplotipo		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Total	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado
1	AGGA	0.1368	0.1276	0.1579	1.0141	0.3105	0.3830
2	GAGA	0.3034	0.3163	0.2105	-1.0595	0.2894	0.3280
3	GGAA	0.3751	0.3662	0.4737	0.6112	0.5411	0.5140
4	GGAG	0.0812	0.0867	0.0000	-0.6954	0.4868	0.4920
5	GGGA	0.1035	0.1032	0.1053	0.0380	0.9697	0.8900

El haplotipo más frecuente es el H3 (~38%). No hay haplotipos que muestren un efecto significativo.

Subhaplotipos gen MMP-3

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs569444	0.3897	0.3920
	rs650108	0.5057	0.5110
	rs520540	0.7268	0.7050
3	rs569444	0.5953	0.5990
	rs650108	0.5246	0.5460

No hay subhaplotipos que muestren un efecto significativo.

ANEXO 13: Gen MMP-9 frecuencias, estadístico score y subhaplotipos

Haplotipo		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Total	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado
1	CGGA	0.2564	0.2653	0.2105	-0.7190	0.4721	0.5360
2	CTGG	0.1197	0.1224	0.1053	-0.3073	0.7586	0.7200
3	TGAG	0.5503	0.5397	0.6053	0.8121	0.4167	0.4700
4	TGGG	0.0693	0.0675	0.0789	0.2480	0.8042	0.8540

El haplotipo más frecuente es el H3 (~55%). No hay haplotipos que muestren un efecto significativo.

Subhaplotipos

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs3918249	0.6662	0.6730
	rs2274755	0.6914	0.7170
	rs3918256	0.6689	0.6510
3	rs3918249	0.8430	0.8350
	rs2274755	0.8046	0.8350

No hay subhaplotipos que muestren un efecto significativo.

ANEXO 14: Gen MMP-17 frecuencias, estadístico score y subhaplotipos

Haplotipo		Frecuencias haplotípicas			Estadístico Score		
		Total	Control	Caso	Score	p-valor	p-valor simulado
1	CCGTGAGGTC	0.0385	0.0316	0.0526	0.5056	0.6132	0.6110
2	CCTCGGAAC	0.3514	0.3587	0.3397	-0.1455	0.8843	0.9290
3	CCTCTGGAAC	0.0100	0.0067	0.0000	0.8877	0.3747	0.1770
4	CTGTGGGATC	0.0260	0.0229	0.0287	0.0222	0.9823	0.9210
5	CTGTTGGATC	0.1382	0.1410	0.1579	0.0031	0.9975	1.0000
6	CTGTTGGGTC	0.0447	0.0370	0.0502	0.9680	0.3330	0.3530
7	CTTCGGCAAC	0.0748	0.0693	0.0789	0.1114	0.9113	0.7910
8	GCGCGAGGTC	0.0389	0.0360	0.0526	0.4904	0.6239	0.5980
9	GCGCGAGGTT	0.0831	0.0775	0.1053	0.5687	0.5696	0.5820
10	GCGCGGGGTT	0.0085	0.0051	0.0180	1.3058	0.1916	0.3220

El haplotipo más frecuente es el H2 (~35%). No hay haplotipos que muestren un efecto significativo.

Subhaplotipos

N SNPs	SNP inicial	p-valor	p-valor sim
2	rs4964926	0.7474	0.7450
	rs4964927	0.5356	0.5430
	rs10751699	0.6444	0.5920
	rs7484577	0.3878	0.4090
	rs10902456	0.6464	0.6230
	rs12099648	0.9810	0.9630
	rs10751701	0.7633	0.6720
	rs3087864	0.3430	0.3480
	rs11246851	0.5963	0.5820
3	rs4964926	0.7061	0.6500
	rs4964927	0.8199	0.7970
	rs10751699	0.3410	0.3370
	rs7484577	0.6336	0.6300
	rs10902456	0.4951	0.4720
	rs12099648	0.5742	0.5370
	rs10751701	0.5320	0.5090
	rs3087864	0.6143	0.6580
4	rs4964926	0.7521	0.7590
	rs4964927	0.5526	0.5920
	rs10751699	0.5032	0.4970
	rs7484577	0.4853	0.4910
	rs10902456	0.9280	0.9301
	rs12099648	1.0000	0.9770
	rs10751701	0.7163	0.7320
5	rs4964926	0.6573	0.6690
	rs4964927	0.7053	0.7150
	rs10751699	0.6119	0.5950
	rs7484577	0.9339	0.9440
	rs10902456	0.6414	0.6620
	rs12099648	1.0000	0.9820
6	rs4964926	0.7471	0.7910
	rs4964927	0.6759	0.6860
	rs10751699	0.8412	0.8380
	rs7484577	0.8735	0.8860
	rs10902456	0.6726	0.6690

7	rs4964926	0.7327	0.7640
	rs4964927	0.8485	0.8560
	rs10751699	0.7140	0.7320
	rs7484577	0.8044	0.8110
8	rs4964926	0.7994	0.8140
	rs4964927	0.7391	0.7780
	rs10751699	0.8347	0.8520
9	rs4964926	0.7691	0.7680
	rs4964927	0.8274	0.8470