



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Biomarcadores sanguíneos predictivos de respuesta al tratamiento anti-VEGF en degeneración macular asociada a la edad
Autor/es
Ana Isabel Oca Lázaro
Director/es
Ignacio Larráyz Roldán y Sara Velilla Osés
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



Biomarcadores sanguíneos predictivos de respuesta al tratamiento anti-VEGF en degeneración macular asociada a la edad, tesis doctoral de Ana Isabel Oca Lázaro, dirigida por Ignacio Larráyoz Roldán y Sara Velilla Osés (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2022
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**



TESIS DOCTORAL:

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS PREDICTIVOS
DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTI-VEGF EN
DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA
EDAD**



Ana Isabel Oca Lázaro

Dirigida por:
Dr. Ignacio Larráyoiz Roldán
Dra. Sara Velilla Osés

Logroño, 2022



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**



TESIS DOCTORAL:

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS PREDICTIVOS
DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTI-VEGF
EN DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA
EDAD**

Presentada por Ana Isabel Oca Lázaro para optar al grado
de doctora por la Universidad de La Rioja

Dirigida por:

Dr. Ignacio Larráyoiz Roldán Dra. Sara Velilla Osés

A mi padre, madre y hermano.

Índice

Agradecimientos	i
Financiación.....	iii
Abreviaturas.....	v
Lista de tablas.....	viii
Lista de figuras	ix
1. Introducción	1
1.1. Definición	1
1.2. Prevalencia e incidencia	3
1.3. Factores de riesgo y biomarcadores	5
1.3.1. Biomarcadores de susceptibilidad.....	6
1.3.1.1. Edad	6
1.3.1.2. Sexo	6
1.3.1.3. Hipertensión arterial.....	7
1.3.1.4. Diabetes mellitus	7
1.3.2. Biomarcadores de heredabilidad y genética	7
1.3.3. Biomarcadores de enfermedad y progresión	9
1.3.3.1. Biomarcadores proteómicos	9
1.3.3.1.1. Carboxietilpirrol.....	9
1.3.3.1.2. Homocisteína.....	9
1.3.3.1.3. Otros.....	9
1.3.3.2. Biomarcadores séricos	10
1.3.3.2.1. Proteína C reactiva.....	10
1.3.3.2.2. Autoanticuerpos circulantes	10
1.3.3.2.3. Colesterol	10
1.3.3.2.4. Proteína 10 inducida por el interferón gamma y eotaxina.....	10

1.3.3.2.5.	Factor de crecimiento endotelial vascular	10
1.3.3.2.6.	Tirosina quinasa-1 soluble similar a fms.....	11
1.3.3.3.	Metabólica	11
1.3.3.4.	MicroRNA	11
1.3.4.	Biomarcadores de exposición	12
1.3.4.1.	Tabaco.....	12
1.3.4.2.	Luz solar	12
1.3.4.3.	Dieta	12
1.3.4.4.	Alcohol.....	12
1.4.	Fisiopatología.....	13
1.5.	Clasificación	14
1.5.1.	Diferentes sistemas de clasificación de la DMAE	14
1.5.1.1.	Clasificación <i>Beckham Initiative for Macular Research Classification Committee</i>	15
1.5.2.	Clasificación de la DMAE avanzada neovascular, húmeda o exudativa.....	16
1.5.2.1.	<i>Macular Photocoagulation Study</i>	16
1.5.2.2.	Vasculopatía coroidea polipoidea idiopática	16
1.5.2.3.	Membranas neovasculares de tipo 1 y tipo 2.....	17
1.5.2.4.	Proliferación angiomatosa retiniana.....	17
1.5.2.5.	Clasificación basada en hallazgos tomográficos	18
1.5.3.	Un nuevo sistema de clasificación	18
1.6.	Diagnóstico	19
1.6.1.	Síntomas.....	19
1.6.1.1.	Agudeza visual	20
1.6.1.2.	Metamorfopsia	20
1.6.2.	Signos	21

1.6.2.1.	Drusas	22
1.6.2.2.	Anomalías del epitelio pigmentario de la retina	22
1.6.2.3.	Otros signos.....	23
1.6.2.3.1.	Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina.....	23
1.6.2.3.2.	Atrofia geográfica	23
1.6.2.4.	Signos en la DMAE neovascular, húmeda o exudativa	24
1.6.3.	Evaluación mediante imagen multimodal.....	25
1.6.3.1.	Angiografía con fluoresceína	28
1.6.3.2.	Tomografía de coherencia óptica	30
1.6.3.2.1.	Biomarcadores tomográficos	32
1.6.3.2.1.1.	Espesor central de la retina.....	36
1.6.3.2.1.2.	Fluido quístico intrarretiniano	37
1.6.3.2.1.3.	Fluido subretiniano	40
1.6.3.2.1.4.	Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina.....	42
1.7.	Tratamiento.....	43
1.7.1.	DMAE precoz.....	43
1.7.2.	DMAE intermedia	43
1.7.3.	DMAE avanzada	44
1.7.3.1.	DMAE avanzada neovascular, húmeda o exudativa	44
1.7.3.1.1.	Fotocoagulación láser	44
1.7.3.1.2.	Terapia fotodinámica	45
1.7.3.1.3.	Radioterapia	45
1.7.3.1.4.	Tratamiento quirúrgico para la DMAE hemorrágica	45
1.7.3.1.5.	Inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular.....	46
1.7.3.1.5.1.	Fármacos	46

1.7.3.1.5.1.1.	Pegaptanib.....	46
1.7.3.1.5.1.2.	Bevacizumab	47
1.7.3.1.5.1.3.	Ranibizumab	47
1.7.3.1.5.1.4.	Aflibercept	52
1.7.3.1.5.1.5.	Brolucizumab	54
1.7.3.1.5.1.6.	Faricimab	55
1.7.3.1.5.2.	Regímenes de tratamiento con farmacoterapia anti-VEGF.....	55
1.7.3.1.5.2.1.	Inyección fija	55
1.7.3.1.5.2.2.	Pro Re Nata	55
1.7.3.1.5.2.3.	Tratar y extender.....	56
1.7.3.1.5.3.	Limitaciones de la farmacoterapia anti-VEGF ..	56
1.7.3.1.5.3.1.	No respondedores	56
1.7.3.1.5.3.2.	Coste.....	58
1.7.3.1.6.	Terapias emergentes en la DMAE neovascular	58
1.7.3.2.	DMAE avanzada atrófica	58
1.8.	Predicción de la respuesta al tratamiento anti-VEGF.....	58
1.8.1.	Genes	59
1.8.1.1.	Polimorfismos del gen del factor H del complemento ...	70
1.8.1.2.	Polimorfismos del gen del factor 3 del complemento....	78
1.8.1.3.	Polimorfismos del gen del factor 2 del complemento y factor B del complemento	79
1.8.1.4.	Polimorfismos del gen ARMS2 A69S/HTRA1	80
1.8.1.5.	Polimorfismos del gen VEGF	84
1.8.1.5.1.	Polimorfismos del gen VEGFA	84
1.8.1.5.2.	Polimorfismos del gen VEGFR2	87
1.8.1.5.3.	Otros genes relacionados con la vía de VEGF.....	89

1.8.1.5.3.1. VEGFR3 (FLT4), VEGFR1 (FLT1) y VEGFC ...	89
1.8.1.5.3.2. KCNMA1, SOCS y OTX2	90
1.8.1.6. Polimorfismos del gen apolipoproteína E	90
1.8.1.7. Otros genes	91
1.8.1.7.1. PLA2G12A.....	91
1.8.1.7.2. IL-8	92
1.8.1.7.3. Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos, trombospondina 1 y factor de crecimiento del tejido conectivo	92
1.8.1.7.4. SERPINF1.....	93
1.8.2. Metabolómica.....	93
1.8.3. MicroRNA.....	94
2. Justificación	95
3. Hipótesis y objetivos.....	96
3.1. Hipótesis	96
3.2. Objetivos	96
4. Material y métodos	97
4.1. Tipo de estudio.....	97
4.2. Población de estudio.....	97
4.3. Criterios de inclusión y exclusión	98
4.3.1. Criterios de inclusión.....	98
4.3.2. Criterios de exclusión.....	98
4.4. Recogida de datos clínicos	100
4.5. Visitas de estudio.....	101
4.5.1. Visita número 1	101
4.5.2. Visita número 2	102
4.5.3. Visita número 3	102
4.5.4. Visita número 4.....	102

4.5.5. Visita número 5	102
4.6. Exploración	103
4.6.1. Agudeza visual.....	103
4.6.2. Biomicroscopía con lámpara de hendidura	103
4.6.3. Angiografía con fluoresceína	105
4.6.4. Tomografía de coherencia óptica.....	106
4.7. Inyección de ranibizumab intravítreo.....	108
4.8. Evaluación de la respuesta	109
4.9. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	111
4.10. Purificación de RNA	111
4.11. Secuenciación de próxima generación	111
4.12. Análisis transcriptómico y bioinformática	112
4.13. Procesamiento de datos y selección de características	113
5. Resultados.....	115
5.1. Descripción de la cohorte.....	115
5.2. Diferencias en la expresión del RNA mensajero entre pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores.....	154
5.3. Diferencias en la expresión de microRNAs entre pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores.....	160
5.4. Modelo de clasificación a partir de los datos de RNA	172
5.5. Modelo de clasificación a partir de los datos de miRNA	173
5.6. Modelo de clasificación a partir de los datos combinados de RNA y miRNA.....	174
6. Discusión	176
7. Conclusiones	195
Divulgación científica	196
Bibliografía.....	197
Anexo.....	234

Agradecimientos

Desde que se me ofreció la posibilidad de realizar este trabajo hasta hoy, han pasado varios años, muchos momentos y diferentes personas, todo ello ha contribuido a que yo pudiera desarrollarlo y finalizarlo. No ha sido una tarea fácil, pues como es lógico, a lo largo de un periodo prolongado de tiempo, una vive situaciones fáciles y difíciles, momentos de alegría y momentos de tristeza, pero a todas las diferentes circunstancias, situaciones y emociones doy gracias, pues es por todo ello que he podido llegar hasta aquí. No sólo he aprendido ciencia, sino que también he podido aprender sobre mí y sobre las personas, sobre la vida.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis dos directores, el Dr. Ignacio Larráyoz Roldán y la Dra. Sara Velilla Osés. Gracias Iñaki y Sara por haber ejercido como excelentes directores, haberme ayudado tantísimo y por todo el trabajo y tiempo dedicado.

Gracias al Servicio de Oftalmología del Hospital San Pedro, lugar en el que trabajo y al que acudo cada día agradecida por la función que allí desempeño. Gracias a todos los compañeros que colaborasteis conmigo reclutando pacientes para la inclusión en el estudio. Gracias al personal de enfermería por su ayuda en la realización de las pruebas complementarias.

Gracias a todos los pacientes, que como siempre digo, son lo mejor de mi trabajo, por haber aceptado participar y colaborar de manera altruista y desinteresada. Sin todos ellos hubiera sido imposible la realización de esta investigación. Gracias por enseñarme todos los días tanto sobre la enfermedad y otros aspectos de la vida.

Gracias a mis amigas y amigos por querer compartir vuestros caminos conmigo.

Gracias a mi padre, madre y hermano. Gracias por toda vuestra ayuda, colaboración y aportaciones a este trabajo. Más allá de esto, gracias papá y mamá no sólo por haberme dado la vida, sino lo que es mucho más importante, por haberme dado esta vida, y a ti tato por ayudarme siempre, escucharme y ser fuente de superación para mi desde bien pequeñita. Sois los mejores.

¡Muchas gracias a todos!

Financiación

Esta investigación ha sido financiada por un contrato Miguel Servet (CP15/00198) del Instituto de Salud Carlos III-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, una forma de construir Europa) y por una beca (PI19/01805) del Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “A way to build Europe” (“Una forma de construir Europa”).

Abreviaturas

AG	Atrofia Geográfica
AGF	Angiografía con Fluoresceína
Anti-VEGF	<i>Anti-Vascular Endothelial Growth Factor</i> (anti-factor del crecimiento endotelial vascular)
ApoE	Apolipoproteína E
AUC	<i>Area Under Curve</i> (área bajo la curva)
AV	Agudeza Visual
AVMC	Agudeza Visual Mejor Corregida
C	Clásico
CC	Coriocapilar
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido dexosirribonucleico complementario)
CFB	<i>Complement Factor B</i> (Factor B del Complemento)
CFH	<i>Complement Factor H</i> (Factor H del Complemento)
CI	Consentimiento Informado
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i> (factor de crecimiento del tejido conectivo)
DDS	Depósitos Drusenoides Subretinianos
DEP	Desprendimiento del Epitelio Pigmentario de la retina
DHA	<i>Docosa-Hexaenoic-Acid</i> (ácido docosahexaenoico)
DM	Diabetes Mellitus
DMAE	Degeneración Macular Asociada a la edad
DMAEnv	DMAE neovascular
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido dexosirribonucleico)
DD	Diámetro de Disco
ECR	Espesor Central de la Retina
ED	Expresión Diferencial
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea de Medicamentos)
EPR	Epitelio Pigmentario de la Retina
ETDRS	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i> (Estudio del tratamiento temprano de la retinopatía diabética)

FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FFC	Fotografía del Fondo de ojo en Color
FGFR2	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i> (receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos)
FIR	Fluido Intrarretiniano
FQI	Fluido Quístico Intrarretiniano
FSR	Fluido Subretiniano
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i> (estudio de asociación del genoma completo)
HSR	Hemorragia Subretiniana
HTA	Hipertensión Arterial
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMC	Índice de Masa Corporal
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto)
MAE	Maculopatía Asociada a la Edad
MC	Mínimamente Clásico
MEC	Matriz Extracelular
miRNA	<i>micro Ribonucleic Acid</i> (micro ácido ribonucleico)
MLI	Membrana Limitante Interna
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i> (metaloproteinasas de matriz)
MNV	Membrana Neovascular
MPS	<i>Macular Photocoagulation Study</i> (Estudio de fotocoagulación macular)
mtDNA	<i>mitochondrial Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido dexosirribonucleico mitocondrial)
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kappa Beta</i> (factor nuclear-kappa beta)
NV	Neovascularización
NVC	Neovascularización Coroidea
O	Oculto
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i> (tomografía de coherencia óptica)

PA	Presión Arterial
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (células mononucleares de sangre periférica)
pb	Pares de bases
PC	Predominantemente Clásico
PCR	Proteína C Reactiva
PGF	<i>Placental Growth Factor</i> (factor de crecimiento placentario)
PIO	Presión Intraocular
PRN	<i>Pro re nata</i> (a demanda)
RAP	<i>Retinal Angiomatous Proliferation</i> (proliferación angiomatosa retiniana)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
RNA-Seq	Secuenciación de RNA
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (característica operativa del receptor)
SD-OCT	<i>Spectral Domain-OCT</i> (OCT de dominio espectral)
sFlt-1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> (tirosina quinasa-1 soluble similar a fms)
SMO	<i>Sequential Minimal Optimization</i> (optimización mínima secuencial)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (polimorfismo de un solo nucleótido)
SS-OCT	<i>Swept Source-OCT</i>
TFD	Terapia Fotodinámica
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i> (factor de crecimiento tranformante-beta)
THBS1	<i>Thrombospondin 1</i> (trombospondina 1)
VCPI	Vasculopatía Coroidea Polipoidea Idiopática
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (factor de crecimiento endotelial vascular)
VEGFR2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular)
ZAF	Zona Avascular Foveal

Lista de tablas

Tabla 1. DMAE seca vs. DMAE húmeda	2
Tabla 2. 34 locus identificados para DMAE avanzada.....	8
Tabla 3. Clasificación <i>Beckham Initiative for Macular Research Classification Committee</i>	15
Tabla 4. Características de las técnicas de imagen empleadas en el diagnóstico de la DMAE	26
Tabla 5. Resumen de biomarcadores en DMAE.....	33
Tabla 6. Vitaminas antioxidantes y suplementos vitamínicos usados en el estudio AREDS2	44
Tabla 7. Propiedades de los agentes anti-VEGF.....	53
Tabla 8. Descripción general de las posibles causas de resistencia a la terapia anti-VEGF y sus posibles enfoques terapéuticos.	57
Tabla 9. Resumen estudios farmacogenética.....	60
Tabla 10. Respuesta a la terapia anti-VEGF en DMAEnv	110
Tabla 11. Características demográficas y anatómicas basales..	115
Tabla 12. RNAs expresados diferencialmente en PBMCs de buenos y pobres respondedores.	155
Tabla 13. Vías de KEGG alteradas por los RNA TOP25. Los RNA TOP25 se sometieron a análisis exploratorio..	159
Tabla 14. miRNAs expresados diferencialmente en PBMCs de pacientes buenos y pobres respondedores.....	160
Tabla 15. Lista de genes putativos regulados por hsa-miR-20a-5p según la base de datos TargetScan v7.2.....	167

Lista de figuras

Figura 1. Descripción esquemática de cómo la acumulación aleatoria de daño y la respuesta inflamatoria del huésped interactúan en la DMAE.	14
Figura 2. Nuevo sistema de clasificación de la DMAE.....	19
Figura 3. Rejilla de Amsler.....	21
Figura 4. Fotografía del fondo de ojo en color dónde se observan drusas y cambios pigmentarios.....	22
Figura 5. Fotografía del fondo de ojo en color dónde se observa atrofia geográfica del área macular	23
Figura 6. Imágenes de autofluorescencia dónde se observa la presencia de atrofia geográfica del área macular como un área hipoautofluorescente. ...	24
Figura 7. Lesiones asociadas a la DMAEnv.. ..	24
Figura 8. Fotografía del fondo de ojo en color dónde se observa una lesión fibrótica en el área macular.	25
Figura 9. Imagen obtenida mediante angiografía con fluoresceína de una lesión macular compatible con una membrana neovascular secundaria a una degeneración macular asociada a la edad de tipo neovascular.	28
Figura 10. Nomenclatura Internacional para la terminología de OCT normal. Imagen de retina sana con Heidelberg Spectralis.	31
Figura 11. Representación típica de degeneración macular asociada a la edad de tipo neovascular en OCT y biomarcadores asociados.	35
Figura 12. Espesor central de la retina en imagen de SD-OCT	36
Figura 13. Imagen de SD-OCT dónde se observa fluido quístico intrarretiniano.	38
Figura 14. Imagen de SD-OCT dónde se observa fluido subretiniano... ..	40
Figura 15. Imagen de SD-OCT dónde se observa desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina.....	42
Figura 16. Estudio MARINA.....	48
Figura 17. Estudio ANCHOR.	49
Figura 18. Estudio PIER.	50
Figura 19. Diagrama con las 9 regiones del mapa macular ETDRS....	107

Figura 20. Medida de la agudeza visual mejor corregida mediante la escala ETDRS en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento.	118
Figura 21. Medida de la agudeza visual mejor corregida mediante la escala ETDRS en el grupo de pacientes pobres respondedores y buenos respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento.	119
Figura 22. Medida de la agudeza visual mejor corregida mediante la escala ETDRS en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.	120
Figura 23. Medida del espesor central de la retina en μm en el grupo de pacientes con pobre y buena respuesta previamente al inicio del tratamiento	121
Figura 24. Medida del espesor central de la retina en μm en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento.	122
Figura 25. Medida del espesor central de la retina en μm en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.	123
Figura 26. Medida del volumen macular en mm^3 en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento.	124
Figura 27. Medida del volumen macular en mm^3 en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al primer mes del inicio del tratamiento.	125
Figura 28. Medida del volumen macular en mm^3 en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.	126
Figura 29. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.	127
Figura 30. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento.	128

Figura 31. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.....	129
Figura 32. Fluido intrarretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.....	130
Figura 33. Fluido intrarretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento	131
Figura 34. Fluido intrarretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento..	132
Figura 35. Fluido subretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.....	133
Figura 36. Fluido subretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento.	134
Figura 37. Fluido subretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.	135
Figura 38. Fluido quístico intrarretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.....	136
Figura 39. Fluido quístico intrarretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento.....	137
Figura 40. Fluido quístico intrarretiniano en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.....	138
Figura 41. Hemorragia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.....	139
Figura 42. Hemorragia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento.....	140
Figura 43. Hemorragia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.....	141
Figura 44. Exudación en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.....	142

Figura 45. Exudación en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes del inicio del tratamiento.	143
Figura 46. Exudación en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento..	144
Figura 47. Atrofia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.	145
Figura 48. Atrofia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento.	146
Figura 49. Atrofia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento.	147
Figura 50. Fibrosis en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento..	148
Figura 51. Fibrosis en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento..	149
Figura 52. Fibrosis en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento.	150
Figura 53. Localización angiográfica de las membranas neovasculares (MNVs) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.	151
Figura 54. Tamaño angiográfico en diámetros de disco de las membranas neovasculares en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento.	152
Figura 55. Patrón o tipo angiográfico de las membranas neovasculares en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento.	153
Figura 56. Miembros de la ruta de señalización de NF-Kb regulados por RNAs expresados diferencialmente (TOP25).....	158
Figura 57. Regulación de la endocitosis por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente.	162
Figura 58. Miembros de la unión gap regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente.....	163
Figura 59. Miembros de la vía de señalización de Hippo regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente..	164

Figura 60. Miembros de la vía de señalización de la hormona tiroidea regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente.	165
Figura 61. Miembros KEGG de Pathways-in-Cancer regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente..	166
Figura 62. Rendimiento del modelo de clasificación a partir de datos informativos de RNA.	173
Figura 63. Rendimiento del modelo de clasificación a partir de datos informativos de miRNA.....	174
Figura 64. Rendimiento del modelo de clasificación a partir de datos informativos de RNA y miRNA.	175

1. Introducción

1.1. Definición

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) fue descrita por primera vez en la literatura como una “enfermedad coriorretiniana central simétrica en personas ancianas” en 1874 [1]. Más adelante, los términos “maculopatía asociada a la edad” (MAE), “DMAE” [2] y “enfermedad macular asociada a la edad” [3], fueron reconocidos como descripciones de la discapacidad visual central asociada a la edad [1].

La DMAE es un proceso por el cual la estructura y función de la mácula, zona central especializada de la retina responsable de la visión central y fina [4], se deteriora a lo largo del tiempo en asociación con signos distintivos y síntomas que de manera típica se hacen clínicamente evidentes más allá de los 50 años de edad y no parecen ser secundarios a otros procesos como la miopía patológica, coriorretinopatía serosa central, enfermedades hereditarias monogénicas de la retina, síndromes uveícticos coriorretinianos, infecciones o traumatismos. La característica destacada de la DMAE es la acumulación de depósitos extracelulares en la mácula incluyendo depósitos drusenoides subretinianos (DDS), depósitos lineales basales y depósitos laminares basales. Los ojos con DMAE manifiestan neovascularización (NV) y/o atrofia [5] y es una de las principales causas de discapacidad visual y pérdida de visión grave en todo el mundo [6].

El fundamento sólido biológico de la DMAE es multifactorial, una serie de factores de riesgo incluidos genéticos, ambientales y comportamientos de salud, están involucrados en el desarrollo de la enfermedad. La variedad de factores de riesgo en la DMAE podría incluso implicar que varias vías fisiopatológicas parcialmente superpuestas pudieran estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad y finalmente converger en una manifestación clínica común [7]. Aunque la fisiopatología de la DMAE es heterogénea, la edad sigue siendo el factor de riesgo más importante y firmemente establecido [8].

La DMAE clásicamente ha sido clasificada en dos categorías, neovascular, húmeda o exudativa, y no-neovascular, seca o atrófica, o una

mezcla de los dos, todas ellas resultantes en la pérdida de visión central parcial o completa [9] (Tabla 1).

Tabla 1. DMAE seca vs. DMAE húmeda [10]. DMAE= Degeneración Macular Asociada a la Edad. VEGF= *Vascular Endothelial Growth Factor* (factor de crecimiento endotelial vascular).

Seca (atrofia geográfica)	Húmeda (neovascular)
En torno al 90% de los casos de DMAE	En torno al 10% de los casos de DMAE
Se puede convertir en “húmeda”	Representa el 90% de pérdida visual central
Drusas en la mácula	Neovascularización de la mácula
No angiogénesis	Angiogénesis mediada por VEGF
No hay tratamiento actual	Se trata con agentes anti-VEGF intravítreos

Entre ambos subtipos la prevalencia de la DMAE seca es aproximadamente del 85-90% y la de la forma neovascular del 10-15% aproximadamente [11]. Aunque menos común que la DMAE seca la DMAE húmeda o DMAE neovascular (DMAEnv) es responsable de casi el 90% de la ceguera asociada a esta enfermedad [12].

El hallazgo definitorio de la forma neovascular es la formación de neovasos que se originan bien en la coroides o en la retina y resultan en una NV que puede manifestarse con una pérdida de visión rápida y aguda. El descubrimiento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) condujo a un notable éxito en el tratamiento de la DMAEnv resultando en una mejora de la agudeza visual (AV) por primera vez en la historia [13]. Después de dos años de tratamiento con agentes anti-factor del crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) más del 95% de los pacientes pueden esperar permanecer dentro de las tres líneas de su AV basal y hasta el 40% pueden esperar mejorar tres líneas en el ojo afectado sobre esta [14]. En la actualidad se dispone de varios agentes anti-VEGF. Aunque se han mostrado clínicamente equivalentes en los ensayos clínicos a gran escala, los pacientes pueden responder de manera diferente a

cada uno de ellos [10]. Por este motivo y buscando el manejo individualizado de la enfermedad y consiguiente éxito del tratamiento, las investigaciones han buscado saber qué perfil genético de los pacientes se corresponde con el éxito del tratamiento utilizado [15].

La forma no neovascular de la enfermedad se caracteriza por drusas maculares y alteraciones del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que conducen a una pérdida de este, de los fotorreceptores y de la coriocapilar (CC) subyacente, manifestando en último lugar atrofia geográfica (AG) en el estadio avanzado de la enfermedad [16]. Aunque no hay terapia aprobada para esta forma de la enfermedad, un estilo de vida sano y la ingesta dietética de antioxidantes pueden reducir el riesgo o retrasar su progresión [17].

1.2. Prevalencia e incidencia

Múltiples estudios han contribuido al conocimiento actual de que la DMAE es una enfermedad frecuente en la población anciana. La prevalencia, incidencia y progresión de la enfermedad, así como sus características más asociadas, por ejemplo, las drusas, aumentan con la edad [18]. La prevalencia de la DMAE también varía en función de la etnia [19].

Diversos estudios poblacionales que aportaron datos sobre la prevalencia de la enfermedad se llevaron a cabo durante la década de los años 1980 [20,21] y 1990 [22-24]. De entre estos, en el *Beaver Dam Eye Study*, el cual tiene principalmente una base de población caucásica, la prevalencia de cualquier tipo de DMAE denominada en este estudio como MAE, fue de menos del 10% en personas con edades comprendidas entre los 43 años y 54 años de edad, siendo más del triple en personas con edades comprendidas entre los 75 años y 85 años de edad [22]. Este estudio demostró que el desarrollo de cualquier tipo de DMAE en un periodo de 10 años era del 4.2% para las personas de entre 43 años y 54 años y del 46% para aquellos de 75 años o mayor edad [25]. También identificó que las drusas blandas y las alteraciones del EPR incrementan su frecuencia con la edad y poseen un alto valor predictivo para la progresión de la enfermedad a formas más avanzadas.

Más adelante, a partir del año 2000 *Los Angeles Latino Eye Study* calculó que la prevalencia de la DMAE avanzada se incrementaba del 0% en individuos

con edades comprendidas entre los 40 años y 49 años de edad al 8.5% en aquellos de 80 años de edad en adelante [26]. El estudio *The Proyecto Vision Evaluation and Research*, con participantes hispanos en Arizona, detectó que la prevalencia de la DMAE avanzada se incrementaba del 0.1% en personas de entre 50 años a 59 años de edad al 4.3% en aquellos de 80 años o mayor edad [27].

Las observaciones del *Barbados Eye Study* [28], el *Baltimore Eye Study* [29] y el *Macular Photocoagulation Study* (MPS) [30], sugirieron que los estadios tardíos de la DMAE eran más frecuentes entre los caucásicos. Los hallazgos del *Multi-ethnic Study of Atherosclerosis* también sugirieron que la DMAE env podría ser más común en caucásicos que en afroamericanos [19]. Una revisión sistemática y metaanálisis más reciente informó de una mayor prevalencia de la DMAE en europeos que en asiáticos o africanos, sin existir diferencia entre estos últimos [31].

La prevalencia global de la DMAE en cualquiera de sus estadios es de en torno al 8,7% de la población mundial, unos doscientos millones de personas se vieron afectadas en el año 2020, habiéndose estimado que unos 288 millones de personas se verán afectadas en el año 2040 [32]. Conocemos que probablemente su prevalencia siga aumentando como consecuencia del envejecimiento exponencial de la población, particularmente en pacientes por encima de los 65 años de edad, siendo actualmente la DMAE la causa más frecuente de pérdida de visión irreversible en este grupo de edad en los países industrializados [6].

En Europa, las tasas de prevalencia del conjunto de personas de ascendencia europea y su región geográfica fueron mayores del 8.7% de la estimación global (12.3% y 18.3%, respectivamente) [32]. Aproximadamente en este continente 67 millones de personas están actualmente afectadas por cualquier estadio de la enfermedad y se espera que esta cifra aumente en un 15% hasta el año 2050 [33].

En España, los datos acerca de la prevalencia e incidencia de la DMAE son limitados. En el año 2011 los resultados publicados por el *Spanish Eyes Epidemiological Study Group* indicaron que la prevalencia de las formas iniciales de la DMAE precoz e intermedia, en su muestra de individuos españoles de 65

años de edad o más, era del 10.3%, mientras que la prevalencia de la DMAE avanzada atrófica o neovascular fue del 3.4%. Por lo tanto, los resultados de este trabajo sugirieron que en España aproximadamente 255.000 personas padecían DMAE en su forma avanzada, mientras que 773.000 personas tenían algún grado de DMAE previo a estos estadios finales de la enfermedad, y por lo tanto, estaban en riesgo de progresar a formas más avanzadas [34]. En el año 2021 con el objetivo de evaluar la prevalencia de la DMAE entre los usuarios de sistemas de telemedicina e identificar factores de riesgo de la enfermedad, Zapata y cols. [35] realizaron un análisis retrospectivo de una base de datos nacional que incluyó fotografías de fondo de ojo de 119.877 pacientes. En sus resultados comunicaron una prevalencia general del 7.6%. La prevalencia de la DMAE precoz, intermedia y avanzada, fue del 2.9%, 2.7% y 2.0%, respectivamente.

Sin embargo, contraria a la noción predominante de que la DMAE es una consecuencia inevitable asociada al envejecimiento, hay informes que han indicado que la incidencia de esta enfermedad está decreciendo en varias poblaciones [36]. Esta disminución en la incidencia es una reminiscencia de la tendencia histórica de otras dos importantes enfermedades relacionadas con la edad, llamadas enfermedades cardiovasculares y demencia [37], hecho que pudiera estar relacionado con una mejora en el estilo de vida [38,39]. Un trabajo demostró que el riesgo a 5 años de desarrollar DMAE era dramáticamente inferior para las generaciones nacidas en el final del siglo XX que aquellos nacidos a principios de este siglo. Aunque los autores de este trabajo fueron incapaces de identificar los factores que explicaban este cambio, el estudio sugirió que la actual epidemia de la DMAE entre los ancianos de hoy puede cambiar con el tiempo y que la investigación futura puede descubrir oportunidades para la prevención primaria de este trastorno que amenaza la visión [40].

1.3. Factores de riesgo y biomarcadores

Hasta la fecha una gran cantidad de dianas genéticas, ambientales, proteómicas y celulares, han sido identificadas como factores de riesgo, así como potenciales biomarcadores para la DMAE.

Un biomarcador puede ser una sustancia, estructura, alteración bioquímica o molecular, medida en partes del cuerpo humano, fluidos o productos, que puede afectar o predecir la incidencia de la enfermedad [1]. La definición de biomarcador ha sido formalmente definida como “una característica medible de manera objetiva y evaluable, como un indicador de procesos biológicos normales, patológicos o farmacológicos, en respuesta a una intervención terapéutica” [41]. En la práctica los biomarcadores pueden proporcionar los medios para comprender mejor la predicción, causa, diagnóstico, progresión o regresión de la enfermedad, así como el resultado del tratamiento [42].

El desarrollo de biomarcadores en la DMAE está centrado en la identificación de factores de riesgo y son vitales para la identificación de poblaciones de pacientes susceptibles y exposiciones que pueden llevar al desarrollo adelantado de la enfermedad [1].

1.3.1. Biomarcadores de susceptibilidad

1.3.1.1. Edad

La edad es el factor de riesgo demográfico más fuertemente asociado a la DMAE [11,25,43-54]. Debido a los mecanismos dependientes del tiempo en esta enfermedad, específicamente a la formación de drusas y NV, la edad probablemente permanecerá siendo el principal factor de riesgo para su desarrollo [55].

1.3.1.2. Sexo

La evidencia actual relativa al sexo y el riesgo asociado de desarrollar DMAE es contradictoria [1]. Varios estudios han concluido que el sexo no tiene un aumento significativo del riesgo de padecer esta enfermedad [11,43,50,56]. Aunque existen resultados que relacionan el sexo femenino con un riesgo aumentado, más estudios epidemiológicos son necesarios para llegar a conclusiones definitivas sobre la asociación entre el sexo y la DMAE [55].

1.3.1.3. Hipertensión arterial

Si la presión arterial alta incrementa el riesgo de DMAE es una cuestión controvertida. Algunos estudios han demostrado que la hipertensión arterial (HTA) contribuye a la fisiopatología de la enfermedad [57,58]. Por otro lado, existen estudios que no relacionan la HTA con el aumento de riesgo de desarrollar DMAE [44,59].

1.3.1.4. Diabetes mellitus

La contribución de la diabetes mellitus (DM) al desarrollo de la DMAE no está aclarada. Varios estudios han presentado una correlación positiva entre la DM y el desarrollo de la DMAE [60,61], pero la mayoría de los estudios no han demostrado tal influencia [62-67].

1.3.2. Biomarcadores de heredabilidad y genética

Los estudios han demostrado que existe una fuerte correlación entre la historia familiar de la DMAE y el posterior desarrollo tanto de formas precoces como tardías de la enfermedad. A pesar de la existencia de una fuerte influencia genética en el desarrollo de la DMAE, existe una importante disputa entre los genes asociados patológicos frente a los causantes. Para los trastornos monogénicos en los que una mutación es necesaria y suficiente para causar los síntomas de una enfermedad hay criterios aceptados para los que una mutación se considera causante de la patogénesis. Para los desórdenes complejos, como es la DMAE, esos estándares de prueba de causalidad son mucho más difíciles de obtener [1].

A pesar de estas complejidades el progreso ha hecho posible la identificación de 52 variantes genéticas independientemente asociadas, comunes y raras, distribuidas a través de 34 locus, las cuales se identificaron en un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) en 2016 [68] (Tabla 2).

Tabla 2. 34 locus identificados para DMAE avanzada [69]. *El nombre del locus es una etiqueta de la región que usa el gen o genes más cercanos, pero no indica necesariamente el gen responsable.

Variante principal	Cromosoma	Alelo mayor/menor	Nombre del locus*
Rs10922109	1	C/A	CFH
Rs62247658	3	T/C	ADAMTS9-AS2
Rs140647181	3	T/C	COL8A1
Rs10033900	4	C/T	CFI
Rs62358361	5	G/T	C9
Rs116503776	6	G/A	C2/CFB/SKIV2L
Rs943080	6	T/C	VEGFA
Rs79037040	8	T/G	TNFRSF10A
Rs1626340	9	G/A	TGFBR1
Rs3750846	10	T/C	ARMS2/HTRA1
Rs9564692	13	C/T	B3GALTL
Rs61985136	14	T/C	RAD51B
Rs2043085	15	T/C	LIPC
Rs5817082	16	C/CA	CETP
Rs2230199	19	C/G	C3
Rs429358	19	T/C	APOE
Rs5754227	22	T/C	SYN3/TIMP3
Rs8135665	22	C/T	SLC16A8
Rs11884770	2	C/T	COL4A3
Rs114092250	5	G/A	PRLR/SPEF2
Rs7803454	7	C/T	PILRB/PILRA
Rs1142	7	C/T	KMT2E/SRPK2
Rs71507014	9	GC/G	TRPM3
Rs10781182	9	G/T	MIR6130/RORB
Rs2740488	9	A/C	ABCA1
Rs12357257	10	G/A	ARHGAP21
Rs3138141	12	C/A	RDH5/CD63
Rs61941274	12	G/A	ACAD10

Rs72802342	16	C/A	CTRB2/CTRB1
Rs11080055	17	C/A	TMEM97/VTN
Rs6565597	17	C/T	NPLOC4/TSPAN10
Rs67538026	19	C/T	CNN2
Rs142450006	20	TTTTTC/T	MMP9
Rs201459901	20	T/TA	C2orf85

1.3.3. Biomarcadores de enfermedad y progresión

1.3.3.1. Biomarcadores proteómicos

El descubrimiento de biomarcadores proteómicos a partir del plasma humano ha tenido un impacto significativo en las aplicaciones clínicas, así como en la detección temprana de la enfermedad.

1.3.3.1.1. Carboxietilpirrol

El interés por la investigación de la identificación temprana de individuos con susceptibilidad para la DMAE ha encontrado al carboxietilpirrol, una proteína generada a partir de la oxidación inducida de radicales libres de ácido docosahexaenoico (DHA), como posible biomarcador para esta enfermedad [70-72].

1.3.3.1.2. Homocisteína

Se piensa que la homocisteína está significativamente más elevada en pacientes con DMAE [73-75] y que esta elevación es mayor en pacientes con DMAEnv que en pacientes con la forma no neovascular o seca [76-78]. Aunque, en general, los datos entre la relación de la homocisteína plasmática y la DMAE resultan controvertidos.

1.3.3.1.3. Otros

La proteína plasmática N^ε-carboximetilisina y la pentosidina han sido cuantificadas con el objetivo de ser utilizadas como biomarcadores en la DMAE, habiendo encontrado niveles más elevados de estas en los pacientes con esta enfermedad [72].

1.3.3.2. Biomarcadores séricos

1.3.3.2.1. Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) elevada es un factor de riesgo para la DMAE [79]. Varios estudios han encontrado niveles elevados de PCR en plasma de pacientes con DMAE respecto a los controles [80-84]. Un grupo de investigadores españoles observó que las mujeres con altos niveles de PCR mostraban un mayor riesgo de desarrollar DMAE húmeda que los hombres, lo que sugiere que los niveles de PCR sistémicos podrían ser útiles como un factor multiplicador importante para los factores genéticos ya establecidos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad [85].

1.3.3.2.2. Autoanticuerpos circulantes

Los autoanticuerpos séricos también pueden ser útiles biomarcadores con un papel mecanicista en la DMAE [86-90].

1.3.3.2.3. Colesterol

Los niveles elevados séricos de colesterol pueden estar asociados a un aumento del riesgo de padecer DMAE. Los niveles de LDL están aumentados mientras que los de HDL están disminuidos en pacientes con DMAE avanzada, tanto en su forma neovascular como atrófica, en comparación con los controles. Además, se ha informado de un aumento significativo del riesgo de desarrollar DMAE en pacientes con niveles altos de colesterol total [91].

1.3.3.2.4. Proteína 10 inducida por el interferón gamma y eotaxina

La proteína 10 inducida por el interferón gamma (IP-10) y la eotaxina en suero pueden servir como biomarcadores séricos para la detección precoz de la DMAE [92].

1.3.3.2.5. Factor de crecimiento endotelial vascular

Los niveles elevados de VEGF en suero son uno de los responsables de la patogenia de la enfermedad [55]. Se han detectado niveles más elevados de VEGF en plasma de pacientes con DMAE que en controles sanos [93].

1.3.3.2.6. Tirosina quinasa-1 soluble similar a fms

La tirosina quinasa-1 soluble similar a fms (sFlt-1) es también conocida como el receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular. sFlt-1 actúa secuestrando al factor proangiogénico VEGFA, neutralizando su efecto mediante la estimulación de su receptor y así previniendo el inicio de la cascada angiogénica. sFlt-1 actúa como una trampa para VEGFA secretado extracelularmente [94].

Existe evidencia de que los niveles de sFlt-1 son significativamente más bajos en los pacientes con DMAEnv comparados con aquellos con formas precoces de la enfermedad y aquellos libres de esta [95].

1.3.3.3. Metabólica

El metaboloma es el conjunto colectivo de metabolitos producidos o presentes en un sistema biológico y su estudio ha emergido desde finales de 1990. Varios estudios han incorporado esta metodología a la DMAE. Mediante la misma se ha identificado la asociación de la neuroprotectina D1, un lípido bioactivo derivado del DHA, y la DMAE [96]. Un estudio de asociación del metaboloma completo identificó un mapa de diversos metabolitos entre los que se incluyen los péptidos, los ácidos biliares y la vitamina D, hasta vías más amplias como el metabolismo de la tirosina, pudiendo ser único en pacientes con esta enfermedad [97].

1.3.3.4. MicroRNA

Los microRNAs (miRNAs) juegan un papel importante tanto en el desarrollo como el mantenimiento de la retina [98].

Algunos miRNAs individuales intervienen funcionalmente en el desarrollo y la progresión de la DMAE. Están involucrados en varios procesos fisiopatológicos importantes como son la respuesta inmunitaria e inflamatoria, la angiogénesis patológica y la respuesta al estrés oxidativo, todos fenómenos asociados a la patogénesis y progresión de esta enfermedad [99].

La manipulación de los niveles de miRNA pudiera ser una nueva diana terapéutica para los pacientes con trastornos vasculares como la DMAEnv [100] [101].

1.3.4. Biomarcadores de exposición

La exposición ambiental puede influenciar la expresión de determinantes genéticos de la DMAE y la susceptibilidad genética puede empeorar los efectos de la exposición ambiental [102].

1.3.4.1. Tabaco

El tabaco es el factor de riesgo de exposición ambiental más fuertemente asociado con el desarrollo de la DMAE [55,103] y es responsable del aumento doble o triple del riesgo [104,105].

1.3.4.2. Luz solar

La determinación de la asociación entre el desarrollo de la DMAE y la exposición a la luz del sol muestra resultados contradictorios en la literatura, es complejo cuantificar las diferencias en esta exposición.

Existen publicaciones en las que la exposición a la luz del sol puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad [106-108], pero otros estudios han mostrado poca o ninguna asociación [43,109].

1.3.4.3. Dieta

Tanto el aumento de la ingesta de grasas en la dieta como la obesidad están positivamente asociadas con el aumento de riesgo de la incidencia de la DMAE y su progresión [1]. Se ha detectado un riesgo aumentado de padecer DMAE en individuos que tienen una ingesta alta de grasas saturadas y colesterol y en aquellos con un índice de masa corporal (IMC) más elevado [60].

1.3.4.4. Alcohol

Otro posible factor de riesgo considerado en la literatura con resultados poco concluyentes es el consumo de alcohol [110-112].

1.4. Fisiopatología

La DMAE es una enfermedad ocular compleja definida por la muerte de los fotorreceptores y la degeneración del EPR y de la CC. El mecanismo responsable de la masiva y progresiva degeneración retiniana no es completamente conocido [113]. Es un trastorno multifactorial en el que se implica la desregulación de las vías del complemento, los lípidos, la angiogénesis, la inflamación y la matriz extracelular (MEC) [6]. Los procesos patológicos subyacentes que eventualmente conducen a la DMAE son complejos, pero el envejecimiento y la inflamación parecen ser los denominadores comunes [37].

Los eventos que inician la enfermedad ocurren en un lugar u otro dependiendo del tipo de DMAE [113].

La formación de grandes drusas confluentes e hiperpigmentación del EPR, que puede estar fomentada por la disfunción del mismo, son las alteraciones iniciales en la DMAE seca, la cual puede progresar hacia la AG con la reabsorción de las drusas e hipopigmentación inducida por la pérdida del EPR [114]. La disfunción y eventual pérdida de los fotorreceptores y de la CC son secundarios a esta.

En la DMAEnv la alteración inicial en el complejo fotorreceptor/EPR/membrana de Bruch/CC es la pérdida de la vascularización coroidea que puede estar producida por una reducción del flujo sanguíneo inducida por la estenosis de los grandes vasos. Este ambiente es un medio proinflamatorio que acumula moléculas que favorecen la inflamación durante la progresión de la enfermedad [115]. El EPR permanece intacto, pero se vuelve hipóxico y comienza a producir sustancias proangiogénicas como VEGF que estimula la formación de nuevos vasos en la CC. Estos eventos resultan en la muerte de los fotorreceptores fundamentalmente por la falta de nutrientes.

Ambos tipos de DMAE se caracterizan por la disfunción y/o muerte de los componentes del complejo fotorreceptor/EPR/membrana de Bruch/CC como estructuras mutuamente y funcionalmente integradas.

En su fase precoz la DMAE seca puede progresar bien hacia la AG o hacia la DMAEnv, pero el mecanismo exacto por el cual se produce esta transformación es desconocido [113]. El 10-20% de las formas secas pueden progresar a formas neovasculares [116].

Se ha propuesto como modelo que los cambios que se producen en la retina, EPR y coroides, consecuencia del envejecimiento, la acumulación de lípidos, la disminución de los procesos de autofagia y la influencia del estrés oxidativo, favorecen la acumulación de daño molecular que a su vez puede verse acelerado por la exposición a ciertos hábitos de vida no saludables como el tabaco, o por el contrario, pueden verse apaciguados por la mejora en el estilo de vida. La acumulación del daño molecular genera una respuesta inflamatoria del huésped en la que interviene el sistema del complemento y otras interleuquinas (IL) inflamatorias, pudiendo esto desembocar en el desarrollo de la enfermedad [117] (Figura 1).

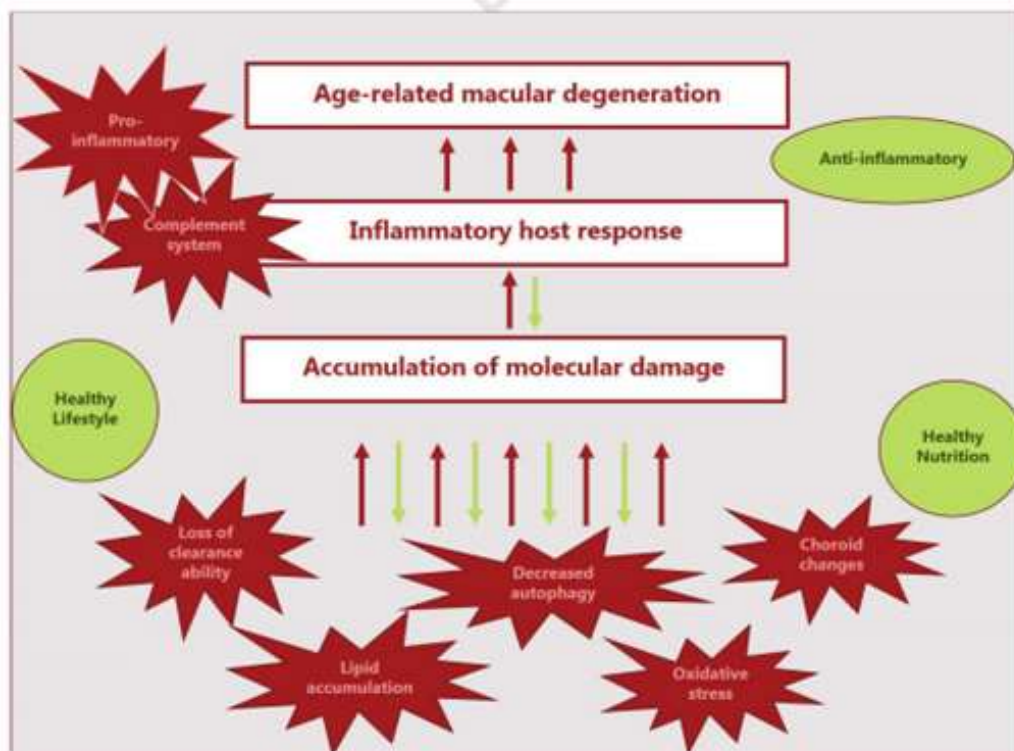


Figura 1. Descripción esquemática de cómo la acumulación aleatoria de daño y la respuesta inflamatoria del huésped interactúan en la DMAE [117].

1.5. Clasificación

1.5.1. Diferentes sistemas de clasificación de la DMAE

A lo largo de la historia de la enfermedad se han propuesto diferentes sistemas de clasificación [118-123] [124].

1.5.1.1. Clasificación *Beckham Initiative for Macular Research Classification Committee*

Tener un marco para describir el fenotipo clínico de la DMAE es esencial para facilitar la evaluación eficiente de los enfoques terapéuticos y mejorar la comunicación entre los especialistas en oftalmología y sus pacientes, por eso en el año 2013 usando un método Delphi modificado se propuso un sistema de clasificación basado en el fenotipo clínico de la DMAE. Este sistema evalúa la presencia de drusas y alteraciones pigmentarias que conducen a la DMAEnv, AG o ambas. La identificación de las características fenotípicas mediante un equipo común de oftalmología incluyendo un oftalmoscopio y una lámpara de hendidura con lentes accesorias, mejora la extensión de su aplicabilidad en todo el mundo, la comunicación entre oftalmólogos y la atención a los pacientes. Esta escala de clasificación clínica básica propuesta parece ser de valor en la predicción del riesgo de progresión de la enfermedad [119] (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación *Beckham Initiative for Macular Research Classification Committee* [119]. DMAE= Degeneración Macular Asociada a la Edad. *Anomalías pigmentarias asociadas a la DMAE= cualquier anomalía hiper- o hipopigmentada definida asociada con drusas medianas o grandes, pero no asociada con entidades patológicas conocidas.

Clasificación de la DMAE	Definición (lesiones evaluadas dentro de 2 diámetros de disco de la fóvea en cualquier ojo)
No cambios aparentes asociados al envejecimiento	No drusas y no anomalías pigmentarias asociadas a la DMAE*
Cambios normales asociados al envejecimiento	Sólo drupas (drusas pequeñas $\leq 63 \mu\text{m}$) y no anomalías pigmentarias asociadas a la DMAE
DMAE Precoz	Drusas medianas $\geq 63 \mu\text{m}$ y $\leq 125 \mu\text{m}$ y no anomalías pigmentarias asociadas a la DMAE
DMAE Intermedia	Drusas grandes $\geq 125 \mu\text{m}$ y/o cualquier anomalía pigmentaria asociada a la DMAE
DMAE Avanzada	DMAE neovascular y/o cualquier atrofia geográfica

1.5.2. Clasificación de la DMAE avanzada neovascular, húmeda o exudativa

1.5.2.1. *Macular Photocoagulation Study*

El MPS fue un ensayo clínico que evaluó el efecto del láser (verde argón o kriptón rojo) en el tratamiento de los ojos con neovascularización coroidea (NVC) extrafoveal, yuxtafoveal y subfoveal, secundaria a la DMAE, comparando sus resultados con la evolución natural de la enfermedad en los ojos que no recibieron tratamiento [125-127].

El criterio principal para la inclusión de los pacientes en el estudio fue la evidencia de NVC mediante la única modalidad de imagen disponible en ese momento, la angiografía con fluoresceína (AGF). La demarcación clara de los límites fue esencial para determinar la localización de las lesiones, importante en la predicción del resultado visual.

Los patrones angiográficos que fueron útiles en el MPS fueron descritos como NVC de tipo:

- Clásico (C), o de bordes bien demarcados; área de hiperfluorescencia precoz bien definida con acumulación progresiva de fuga de colorante en el espacio subretiniano suprayacente en las fases tardías del angiograma que normalmente oscurece los límites de la NVC.

- Oculto (O), o pobremente definido, que a su vez se clasificó en dos patrones:

- Desprendimiento fibrovascular del EPR; hiperfluorescencia punteada tras uno o dos minutos después de la inyección de la fluoresceína con tinción permanente o fuga de colorante en el espacio subretiniano suprayacente durante diez minutos.

- Fuga tardía de origen indeterminado; moteado hiperfluorescente tardío en ausencia de bordes bien demarcados con acúmulo de colorante en el espacio subretiniano suprayacente.

1.5.2.2. Vasculopatía coroidea polipoidea idiopática

En 1990 se comunicó la existencia de una forma exudativa de degeneración macular que no parecía encajar dentro de las categorías

previamente definidas y que se denominó vasculopatía coroidea polipoidea idiopática (VCPI) [128]. Múltiples desprendimientos serosos y hemorrágicos del EPR y de la retina neurosensorial parecían resultar de una red peculiar de vasos coroideos. Las características clínicas y demográficas de este trastorno difieren de la DMAE y de otras enfermedades asociadas a NVC. Es reconocida la importancia de la identificación de esta condición pues pudiera tener factores de riesgos específicos, así como un curso clínico y manejo diferente. En la actualidad esta entidad se ha redefinido como neovascularización aneurismática de tipo 1 [129].

1.5.2.3. Membranas neovasculares de tipo 1 y tipo 2

Debido a las discrepancias en las observaciones que Gass obtuvo en los resultados visuales tras la cirugía de membranas neovasculares (MNV) secundarias al síndrome de presunta histoplasmosis ocular y a la DMAE, en el año 1994 este hizo pública la posible implicación y relevancia de la localización del complejo neovascular respecto al EPR. Así, propuso una clasificación alternativa a la angiográfica e introdujo los términos MNV tipo 1, haciendo referencia a vasos confinados al espacio subEPR, y MNV tipo 2, que hace referencia a vasos proliferantes por encima del EPR en el espacio subretina neurosensorial.

No obstante, él mismo reconoce que “la distinción biomicroscópica y mediante AGF entre las membranas subretinianas y subEPR no es fácil y en algunos casos resulta imposible [130].

1.5.2.4. Proliferación angiomasosa retiniana

En 2001 se describió una nueva forma de DMAEnv llamada proliferación angiomasosa retiniana (RAP). Esta nueva entidad se origina en la retina y se extiende posteriormente en el espacio subretiniano, comunicando eventualmente en algunos casos con nuevos vasos coroideos.

Debe señalarse que esta forma de NV fue originalmente descrita por Hartnett y cols. [132] como “complejos anómalos vasculares retinianos profundos”. Más tarde, Yannuzi y cols. [131] acuñaron el término RAP que es el término que ha predominado en la literatura.

1.5.2.5. Clasificación basada en hallazgos tomográficos

Con el uso clínico generalizado de la tomografía de coherencia óptica (OCT) en el manejo de la DMAE y basándose en la clasificación histológica descrita por Gass [130], se propuso una nueva clasificación más reproducible y menos subjetiva [133].

Esta clasificación divide a las MNVs en diferentes tipos:

- MNV de tipo 1: la NV ocurre debajo del EPR.
- MNV de tipo 2: el tejido neovascular ha penetrado el complejo EPR/membrana de Bruch y prolifera en el espacio subretiniano sobre la monocapa del EPR.
- MNV de tipo 3: es una NV intrarretiniana. Es el nuevo nombre propuesto para lo que anteriormente se había denominado RAP.
- Lesiones mixtas: lesiones compuestas por más de un tipo de los anteriormente mencionados.

1.5.3. Un nuevo sistema de clasificación

De acuerdo con los autores de este nuevo sistema de clasificación los modelos previos de DMAE eran incompletos y no abarcaban multitud de conocimientos sobre la enfermedad de los que disponemos actualmente. En contraste con los sistemas de clasificación más antiguos, el sistema propuesto abarca las presentaciones relevantes de la enfermedad y predice con mayor exactitud el curso futuro del paciente. El desarrollo de este nuevo sistema de clasificación evita algunas de las dificultades de los sistemas más antiguos como son la falta de exhaustividad o predicción. Este modelo es una teoría basada en el conocimiento actual y busca crear un marco para abarcar posteriores hallazgos maculares relacionados con la construcción de la enfermedad como los que provea el desarrollo de la imagen, los estudios epidemiológicos y los test genéticos [134] (Figura 2).

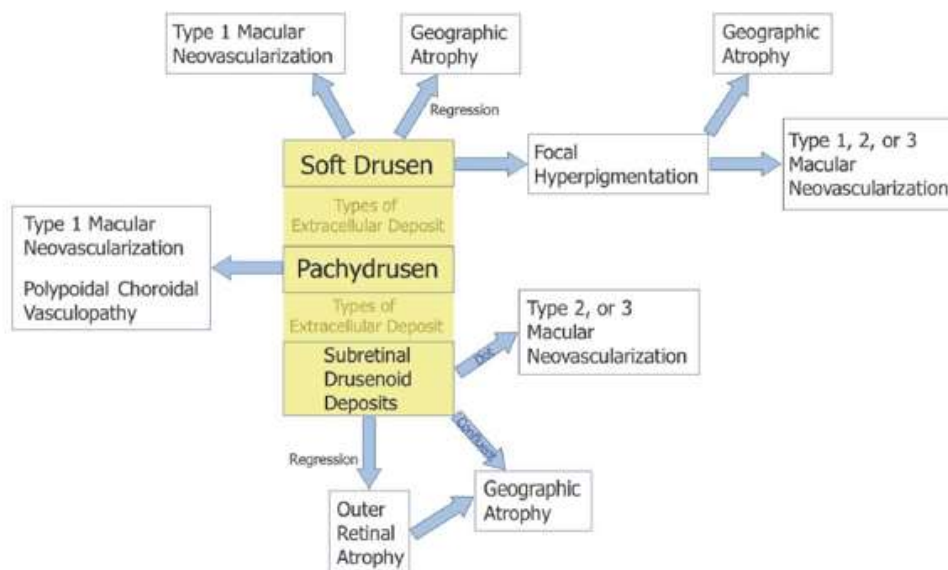


Figura 2. Nuevo sistema de clasificación de la DMAE [134].

1.6. Diagnóstico

La DMAEnv es una enfermedad de inicio agudo y rápida progresión que produce un impacto en la visión central. La detección precoz de la enfermedad y el seguimiento continuado de los pacientes es obligatorio porque la pérdida visual se convierte en irreversible con el retraso en el diagnóstico y en el tratamiento. Los procedimientos de exploración generales oftalmológicos como la determinación de la agudeza visual mejor corregida (AVMC), la oftalmoscopia indirecta y la monitorización entre visitas, debe ser implementada. Cuando se sospecha DMAEnv medidas diagnósticas avanzadas como la AGF y la OCT se deben realizar para confirmar el diagnóstico. Numerosos ensayos clínicos han mostrado que los mejores resultados visuales finales pueden ser conseguidos con una mejor AV inicial. Desafortunadamente, en la mayoría de los ensayos clínicos, así como en la vida real las lesiones son detectadas normalmente cuando ya hay una considerable pérdida de AV [135].

1.6.1. Síntomas

En una persona de más de 55 años de edad con buena AV entre los síntomas de alarma se incluyen los siguientes: 1) disminución de la visión progresiva o súbita que no mejora con corrección óptica; 2) defecto visual central

(ya sea absoluto o relativo); 3) metamorfopsia, micropsia o macropsia; y/o 4) dificultades en las actividades de la vida diaria, por ejemplo, ver la televisión, bajar escaleras, reconocer gente o dar la vuelta a una esquina [136].

Para la evaluación de la función visual la toma de la AV y el uso de la rejilla de Amsler, la cual permite la detección de la metamorfopsia, han sido el *gold standard* [137] o test de referencia.

1.6.1.1. Agudeza visual

La prueba principal que se usa en un entorno clínico para la evaluación de la función visual en la DMAE es la AV y esta es actualmente el único criterio de valoración aceptado a nivel mundial para los tratamientos clínicos en esta enfermedad [138].

La AV se mide típicamente usando un gráfico que emplea un diseño basado en el logaritmo del ángulo mínimo de resolución como es el ETDRS (del inglés, *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*), considerado actualmente el test de AV *gold standard* para la monitorización de esta enfermedad [138]. Este test ha demostrado una mejora sobre test previos de AV como es la tabla de Snellen, ha resultado en una mayor habilidad para monitorizar el cambio y así para detectar el inicio de la progresión de la enfermedad [139]. Sin embargo, la AV frecuentemente es “normal” cuando se mide con este test, incluso con cambios avanzados en la retina [138]. Parece que hay una relación débil entre la severidad de los cambios en la retina y la AV, estando esta última influenciada por la localización [140,141] y la extensión de la lesión [142,143], además de por el estadio de la enfermedad. Por eso, se han investigado otros test de medida de AV que incluso se han mostrado más sensibles para la detección de la pérdida funcional en la DMAE comparados con los test convencionales [138].

1.6.1.2. Metamorfopsia

La metamorfopsia ha sido definida como la desviación tanto de las líneas verticales como horizontales, informada por el paciente, y consiste en la primera alteración visual que precede a la aparición clínica de la maculopatía [144]. Aunque se pensó que la metamorfopsia era una pura consecuencia de los cambios estructurales en la retina, resultante del desplazamiento de las capas

más externas junto con una transducción inapropiada de la señal de la luz, algunas teorías más recientes han enfatizado en la importancia de la combinación de procesos de la retina más interna y algunas veces procesos corticales [145].

El test subjetivo más ampliamente utilizado para la detección de la metamorfopsia es la rejilla de Amsler [144] (Figura 3), desarrollada en la mitad del siglo XX.

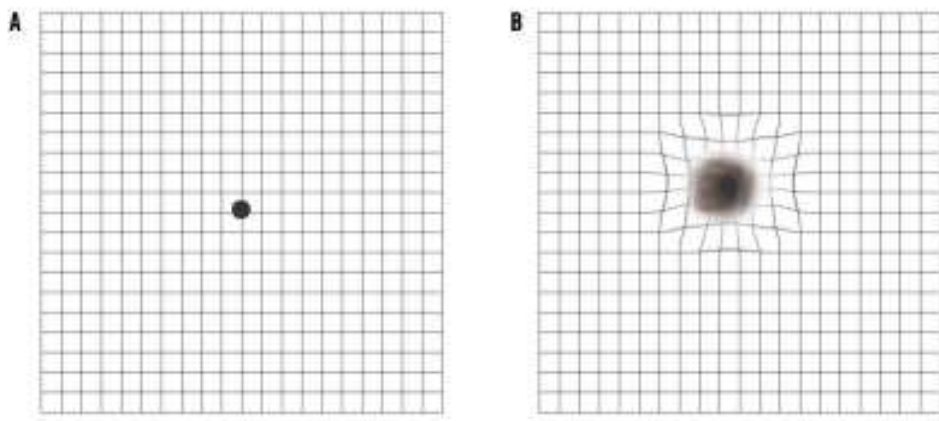


Figura 3. Rejilla de Amsler. (A) Una vista normal de una cuadrícula de Amsler y (B) la distorsión de las líneas rectas (metamorfopsia) y mancha negra (escotoma) como la puede ver un paciente con DMAE [146].

1.6.2. Signos

La DMAE es definida clínicamente mediante la exploración fundoscópica [147]. A pesar de una gran falta de consenso en su clasificación se acepta que los estadios precoces son típicamente asintomáticos y se caracterizan por la presencia de drusas y anomalías pigmentarias (Figura 4).

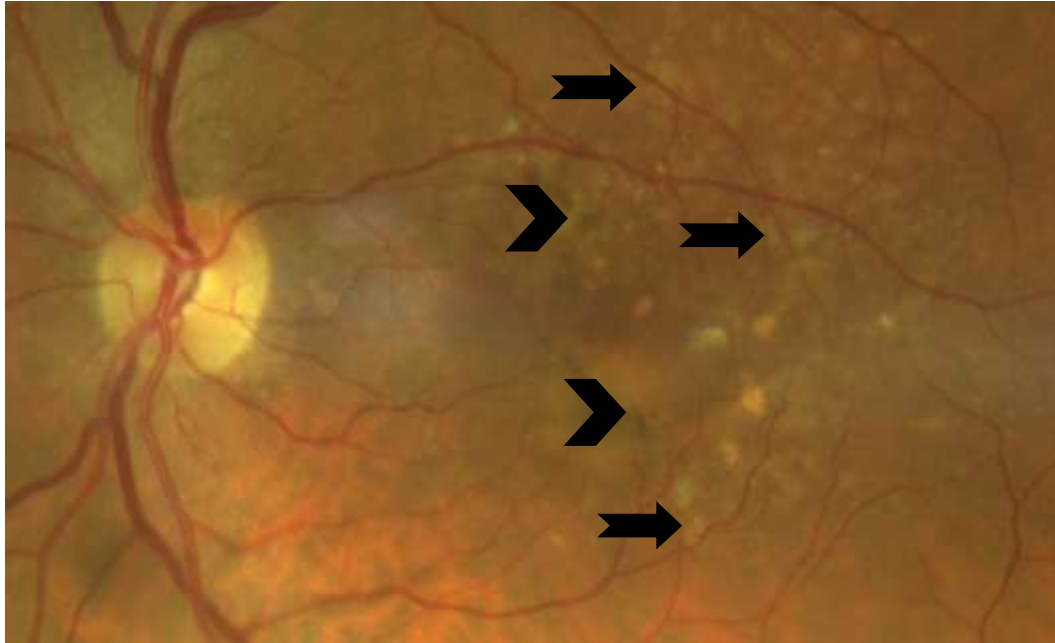


Figura 4. Fotografía del fondo de ojo en color dónde se observan drusas (flechas) y cambios pigmentarios (puntas de flecha).

1.6.2.1. Drusas

Las drusas son el signo definitorio de la DMAE y han sido clasificadas de acuerdo con su tamaño, márgenes y consistencia. Entre los diferentes tipos de drusas descritas se incluyen las drusas pequeñas (duras), medianas, grandes (blandas), cuticulares (laminares basales), mineralizadas (calcificadas), pseudodrusas reticulares (denominadas DDS mediante el uso de OCT) y paquidrusas. El número y tamaño de las drusas confieren un mayor riesgo de desarrollar AG y/o NV [148-150].

1.6.2.2. Anomalías del epitelio pigmentario de la retina

Las alteraciones del EPR son otro signo importante de la DMAE y presagian el riesgo de progresión hacia la atrofia y la NV [119]. Las células del EPR son capaces de sufrir hipertrofia, hiperplasia y migración intrarretiniana, cambios frecuentemente detectados en esta enfermedad [151-154].

1.6.2.3. Otros signos

1.6.2.3.1. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina

Un desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (DEP) es definido por la separación anatómica del EPR y su lámina basal de la capa colágena interna de la membrana de Bruch [155]. La DMAE es el contexto clínico más frecuente para su aparición. En función de su composición es clasificado como drusenoide, seroso, vascularizado o mixto [155,156]. En la exploración clínica se presenta como una elevación del EPR bien definida, amarilla o blanco amarillenta y contigua, frecuentemente, a otros signos de la enfermedad como son las drusas y las anomalías del EPR. Mediante OCT el DEP se muestra como una elevación de la banda hiperreflexiva del EPR pudiendo tener una apariencia ondulada.

1.6.2.3.2. Atrofia geográfica

La AG es actualmente definida como un área de pérdida del EPR y CC, con el soporte de los vasos coroideos y con una medida mayor de 175 μm de diámetro. Varias modalidades de imagen son efectivas en su identificación [157] (Figura 5) (Figura 6). Su morfología es oval o redondeada con predilección por la mácula central. Pequeñas áreas numulares de atrofia se pueden desarrollar en la región parafoveal y fusionarse gradualmente para acabar afectando a la fovea.

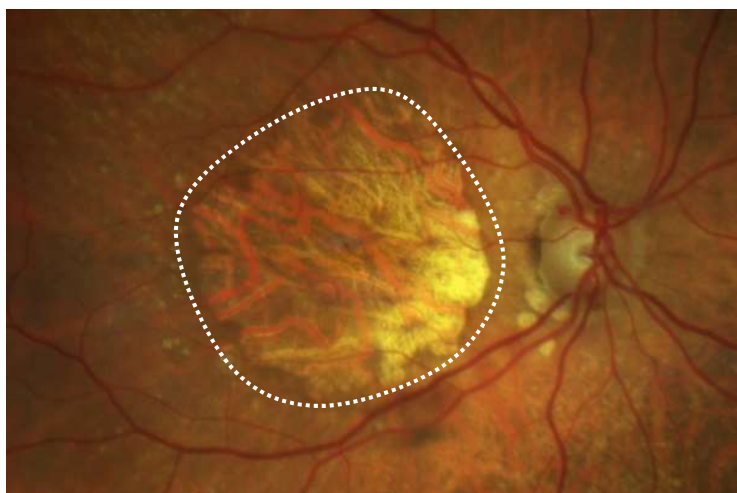


Figura 5. Fotografía del fondo de ojo en color dónde se observa atrofia geográfica del área macular (área demarcada por la línea de puntos blancos).

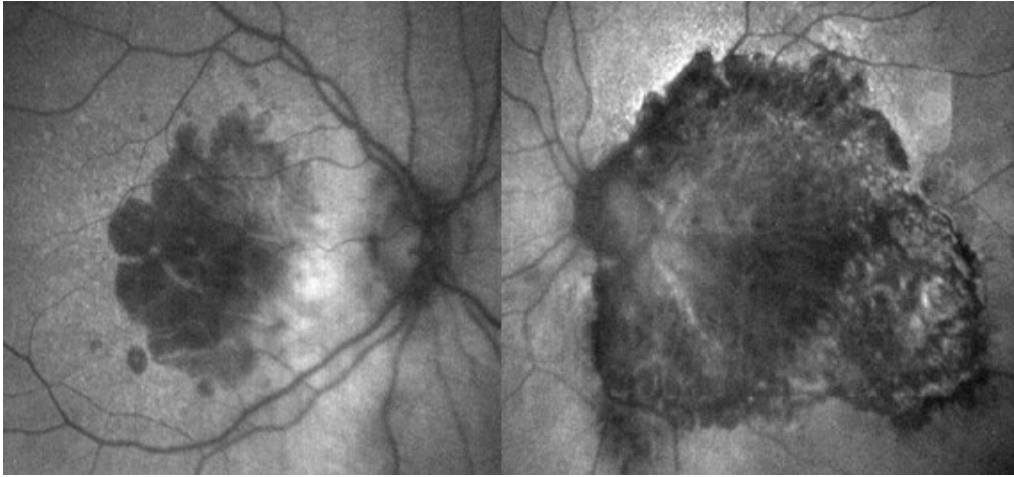


Figura 6. Imágenes de autofluorescencia dónde se observa la presencia de atrofia geográfica del área macular como un área hipoautofluorescente.

1.6.2.4. Signos en la DMAE neovascular, húmeda o exudativa

En la exploración clínica los primeros signos de NV incluyen la hemorragia, el fluido retiniano (Figura 7) o los vasos sanguíneos tortuosos perifoveales en las lesiones de tipo RAP [147].

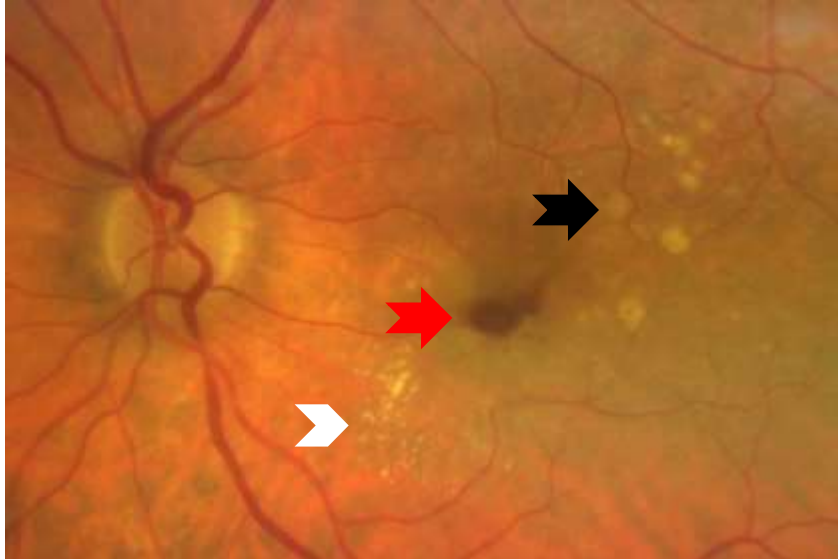


Figura 7. Lesiones asociadas a la DMAEnv. Imagen obtenida mediante fotografía del fondo de ojo en color en la que se observa una hemorragia macular (flecha roja), exudación (punta de flecha blanca) y drusas (flecha negra).

Sin embargo, el hallazgo patológico más frecuentemente encontrado en las exploraciones rutinarias oftalmológicas son las lesiones fibróticas (Figura 8), las cuales indican un diagnóstico tardío de la enfermedad neovascular [158].

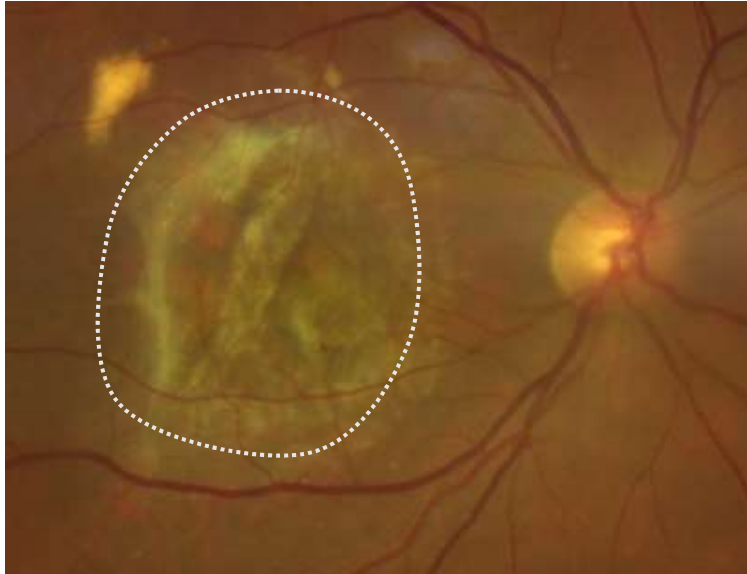


Figura 8. Fotografía del fondo de ojo en color dónde se observa una lesión fibrótica en el área macular (área demarcada por la línea de puntos blancos).

1.6.3. Evaluación mediante imagen multimodal

Los recientes avances tecnológicos en la obtención de imágenes de la retina han mejorado considerablemente la capacidad de detección de la DMAE, así como la identificación de biomarcadores asociados con la progresión y pronóstico de la enfermedad. Con el conocimiento actual, el uso de una única modalidad de obtención de imágenes puede que no permita el manejo óptimo de la enfermedad y la evaluación de los pacientes mediante imagen multimodal parece ser un enfoque más sensato en el diagnóstico y seguimiento de estos [159] (Tabla 4).

Tabla 4. Características de las técnicas de imagen empleadas en el diagnóstico de la DMAE [159]. FFC= Fotografía del Fondo de ojo en Color. AF= Autofluorescencia. SD-OCT= Tomografía de Coherencia Óptica de Dominio Espectral (del inglés, *Spectral Domain-OCT*). SS-OCT= *Swept Source-OCT*. AGF= Angiografía con Fluoresceína. AVI= Angiografía con Verde de Indocianina. EPR= Epitelio Pigmentario de la Retina. NV= Neovascularización. CC= Coriocapilar. DMAE= Degeneración Macular Asociada a la Edad. VCPI= Vasculopatía Coroidea Polipoidea Idiopática. RAP= Proliferación Angiomatosa Retiniana (del inglés, *Retinal Angiomatous Proliferation*). AG= Atrofia Geográfica.

Modalidad	Pros	Contras
FFC	<p><i>Gold standard</i> histórico.</p> <p>Se correlaciona estrechamente con la biomicroscopía.</p> <p>Permite visualizar una amplia gama de alteraciones fundoscópicas.</p> <p>Imagen robusta de hemorragias y cambios pigmentarios.</p>	<p>Contraste reducido.</p> <p>Confiabilidad limitada.</p> <p>Altamente afectada por la opacidad de medios.</p> <p>Incomodidad para el paciente.</p> <p>Se requiere experiencia por parte del examinador.</p>
AF	<p>Alto contraste.</p> <p>Aceptación regulatoria.</p> <p>Amplia experiencia.</p> <p>Se utilizada para la medida del objetivo final primario.</p> <p>La señal fuertemente disminuida se correlaciona con la pérdida de función.</p> <p>Permite un fenotipado refinado y un diagnóstico diferencial.</p>	<p>Sensible a la opacidad nuclear del cristalino y condensaciones vítreas.</p> <p>Evaluación de la región foveal difícil.</p> <p>La cuantificación semiautomática de la atrofia puede verse obstaculizada en determinadas ocasiones.</p> <p>Incomodidad del paciente.</p>
SD-OCT SS-OCT	<p>Ampliamente disponible.</p> <p>Morfología transversal de la retina, EPR y coroides.</p>	<p>Área de escaneo limitada.</p>

	<p>Correlacionada con la histología.</p> <p>Válido para evaluar la progresión de la atrofia del EPR y cambios neovasculares.</p> <p>Funciones de seguimiento anatómico para el reposicionamiento exacto de las exploraciones de seguimiento.</p> <p>Avances en la resolución lateral y velocidad de escaneo.</p> <p>Identificación de características preatróficas.</p> <p>Confortable para los pacientes.</p>	<p>Interpretación altamente dependiente de la calidad de la imagen.</p> <p>Falta de estándares en la industria.</p> <p>Los conjuntos de datos tridimensionales requieren <i>software</i> de análisis sofisticados y tiempos de lectura prolongados para análisis detallados de la retina y coroides.</p> <p>Segmentación automática imperfecta y dependiente del instrumento.</p> <p>La definición de los bordes de la atrofia y de ciertos biomarcadores pronósticos es controvertida.</p>
AGF	<p><i>Gold standard</i> para la evaluación de la NV.</p> <p>Evaluación de la CC en la atrofia.</p> <p>Provee información para el diagnóstico diferencial.</p>	<p>Método invasivo con riesgo de anafilaxia.</p> <p>Consume tiempo.</p> <p>La fuga del colorante puede ocultar los límites de la lesión.</p>
AVI	<p>Visualización de la patología subEPR.</p> <p>Ayuda en el diagnóstico diferencial, principalmente en DMAE exudativa (VCPI, RAP) pero también en AG.</p>	<p>Método invasivo con riesgo de anafilaxia.</p> <p>Consume tiempo.</p> <p>El diagnóstico diferencial se puede realizar con otras técnicas.</p>

1.6.3.1. Angiografía con fluoresceína

La AGF ha sido la técnica de imagen de elección en la detección y clasificación de la NV [160,161]. Actualmente muchas técnicas no invasivas como la OCT y la autofluorescencia proporcionan detalles de la información anatómica y datos funcionales precisos. A pesar de esto, la AGF continúa teniendo un papel importante en el proceso diagnóstico de la DMAE, por ejemplo, proporcionando la base para su clasificación clínica e inicio del manejo terapéutico. El papel de la AGF es visualizar la vascularización de la retina y las proliferaciones neovasculares retinianas/coroideas, así como las características dinámicas como son la perfusión y la exudación (Figura 9).



Figura 9. Imagen obtenida mediante angiografía con fluoresceína de una lesión macular compatible con una membrana neovascular secundaria a una degeneración macular asociada a la edad de tipo neovascular.

La AGF ha sido utilizada en todos los ensayos clínicos de fase 3 para el diagnóstico inicial de la DMAEnv [135].

La importancia histórica de las características angiográficas como biomarcadores para los resultados visuales proviene de la evidencia del MPS, estudio en el que la indicación para la aplicación del tratamiento láser, destructivo e irreversible, se basaba estrictamente en la composición de la lesión [162]. También para la aplicación de otro método terapéutico como es la terapia fotodinámica (TFD), la diferenciación entre lesiones de tipo O, C y mínimamente clásico (MC), mediante imágenes angiográficas, fue crítica para la indicación del tratamiento [163,164].

En contraste con las terapias basadas en el uso de láseres, los agentes anti-VEGF no están restringidos a una anatomía particular, proporcionando una eficacia excelente en todos los tipos de lesiones. El enfoque farmacológico que usa fármacos biológicos es independiente de la arquitectura vascular anatómica, ya que apunta a la fenestración vascular, permeabilidad de las paredes vasculares y proliferación endotelial. Por otra parte, la tecnología actual ha introducido una comprensión mayor de la naturaleza de las lesiones neovasculares. Hoy en día, la principal indicación para la realización de una AGF es su realización al diagnóstico de la enfermedad, como estudio complementario junto con la imagen de OCT y para consolidar el diagnóstico primario. Posteriormente, la monitorización de la enfermedad se realiza mediante imágenes de OCT y pudiera precisarse la realización de una AGF adicional cuando hubiera un cambio en el estatus clínico no explicado por los resultados tomográficos [165,166].

Entre los inconvenientes de la AGF se incluyen su carácter invasivo, los tiempos de examen relativamente largos, la inyección de colorante, el uso de una luz brillante que puede resultar incómoda para el paciente, el riesgo de reacción alérgica al contraste intravenoso inyectado [159] y la falta de capacidad de segmentación [157].

En los protocolos de imagen de los estudios clínicos, la AGF debe ser considerada al inicio de los ensayos clínicos en DMAE no neovascular para excluir la presencia de NV concurrente, debiéndose realizar cuando se sospecha NV incidente. En DMAEnv la AGF se recomienda al inicio, en visitas de seguimiento seleccionadas (aproximadamente cada seis meses) y al final del estudio [159].

1.6.3.2. Tomografía de coherencia óptica

Desde su concepción [167] e introducción en la oftalmología [168], la OCT se ha convertido en la principal herramienta diagnóstica en la oftalmología moderna, con un número creciente de aplicaciones, indicaciones y nuevas tecnologías [147].

La OCT juega un papel principal en la detección, pronóstico y vigilancia de todos los pacientes con DMAE, especialmente en aquellos con DMAEnv que requieren tratamiento con farmacoterapia anti-VEGF [169]. La OCT se ha establecido como la modalidad de imagen dominante, particularmente, en el diagnóstico y manejo de esta enfermedad [170].

Desde su introducción con la inicial tecnología de dominio temporal, esta modalidad de imagen ha continuado mejorando con la introducción de la tecnología de alta definición, OCT de dominio espectral (SD-OCT) y SS-OCT (del inglés, *Swept Source-OCT*), consiguiendo una mejor resolución, reproducibilidad y aplicabilidad que los dispositivos iniciales [171,172].

En contraste con las otras modalidades de imagen actualmente disponibles en la rutina clínica, la OCT proporciona una visualización transversal y de frente (del francés, *en face*) de la retina y del EPR [173]. Además, usando la técnica de adquisición de mejora de la imagen profunda (EDI, del inglés *Enhanced-Depth Imaging*) se pueden visualizar detalles adicionales a nivel de la coroides [174].

La correlación anatómica de las bandas y capas individuales identificadas en una imagen de OCT está ampliamente establecida [175] (Figura 10).

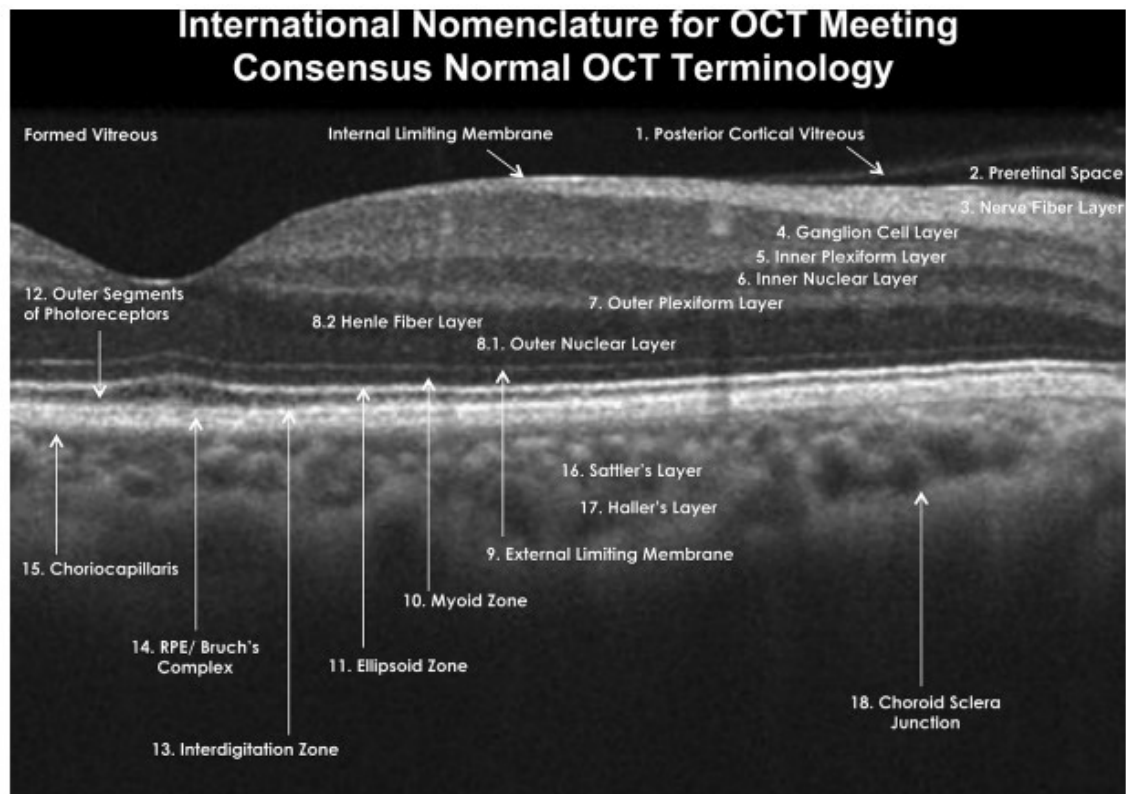


Figura 10. Nomenclatura Internacional para la terminología de OCT normal. Imagen de retina sana con Heidelberg Spectralis [175].

Además, las funciones de seguimiento anatómico incorporadas en algunos dispositivos permiten la alineación del seguimiento con las imágenes basales.

Hoy en día, la tecnología SD-OCT está ampliamente disponible y ha sido validada para evaluar y cuantificar la atrofia [176], además de ser una herramienta importante para clasificar y monitorizar la NV en la DMAE [177,178]. Esta tecnología ha desempeñado un papel integral en varios ensayos clínicos a gran escala [179]. Entre los dispositivos comercializados, sin embargo, los estándares de la industria relacionados con la compatibilidad de los datos y configuración de la adquisición hace que generalmente no sean compatibles con los fabricantes. Por lo que esta falta de cumplimiento afecta a la comparabilidad entre los exámenes obtenidos en diferentes aparatos, conduciendo a la fragmentación de las bases de datos de las imágenes y limitando la posibilidad de agrupar datos de diferentes dispositivos. Dentro de las posibilidades, es recomendable emplear similares aparatos de OCT en los diferentes sitios de estudio [159].

Entre sus inconvenientes se incluyen un campo de escaneo limitado, la dependencia de la calidad de la imagen para la interpretación, la imperfecta segmentación automatizada de las imágenes y que pocos grandes estudios han utilizado SD-OCT en comparación con la fotografía del fondo de ojo en color (FFC) o la AGF [157].

La OCT es actualmente la herramienta más útil para la evaluación de los cambios morfológicos porque es la modalidad de imagen que mejor refleja la recurrencia de la actividad neovascular y permite la evaluación de esta mediante mediciones y observaciones tanto cuantitativas como cualitativas [180]. Entre las recomendaciones para los estudios clínicos se incluye la realización de exámenes de SD-OCT o SS-OCT en cada visita, tanto en los ensayos de DMAEnv como no neovascular [159].

1.6.3.2.1. Biomarcadores tomográficos

Los cambios morfológicos específicos que son relevantes para la función visual, resultados en el tratamiento y manejo de la enfermedad, son cada vez más reconocidos. Existe una necesidad médica crítica insatisfecha de identificar biomarcadores validados que puedan proporcionar una orientación sólida para un tratamiento individualizado y eficiente con respecto a los resultados funcionales y manejo de la enfermedad. Tales biomarcadores permitirían al médico adoptar el tratamiento personalizado de la enfermedad y necesidad individual de cada paciente con el objetivo de proporcionar un control adecuado, minimizar las recurrencias y daño neurosensorial, así como limitar el número de intervenciones invasivas y costosas. Y lo que es más, biomarcadores de confianza que permitan predecir la progresión de la enfermedad.

Los diferentes biomarcadores específicos descritos en la literatura van desde datos clínicos como la edad del paciente o la AV, así como el trasfondo genético individual, a una gran cantidad de parámetros morfológicos obtenidos de imágenes *in vivo* de la retina [147] (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de biomarcadores en DMAE [147]. CFH= Factor H del Complemento (del inglés, *Complement Factor H*). HTRA1= *High Temperature Requirement Factor A1*. ARMS2= *Age Related Maculopathy Susceptibility 2*. VEGFA= Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor A*). AV= Agudeza Visual. RAP= Proliferación Angiomatosa Retiniana (del inglés, *Retinal Angiomatous Proliferation*). ECR= Espesor Central de la Retina. FQI= Fluido Quístico Intrarretiniano. FSR= Fluido Subretiniano. DEP= Desprendimiento del Epitelio Pigmentario de la retina. EPR= Epitelio Pigmentario de la Retina.

Biomarcador	Valor pronóstico	Magnitud del efecto	Observación
Farmacogenética (genes CFH, HTRA1, ARMS2, VEGFA)	Ganancia de AV pobre si alelos de riesgo presentes.	5-10 letras.	Datos contradictorios.
Edad del paciente	Ganancia visual más pobre en pacientes de mayor edad.	5 letras menos de ganancia por cada 14-19 años adicionales.	
AV basal	Ganancia visual más pobre con mejor AV basal. Mejor AV final con mejor AV basal.	0.65 letras menos de ganancia por cada letra adicional de mejor AV.	Efecto de interacción con la morfología de la retina basal.
Tipo de lesión	Mayor ganancia de AV con lesiones tipo RAP.	3 letras.	Datos contradictorios.
Hemorragia >50% de la lesión	AV basal más pobre, ganancia de AV similar.	5 letras.	
Tamaño de la lesión	Ganancia visual más pobre en	4-10 letras.	

	lesiones más grandes.		
ECR	AV más pobre si espesor retiniano por debajo o encima de lo normal.	Correlación débil.	La correlación se pierde durante el tratamiento.
FQI (exudativo)	AV más pobre si presente basalmente. Ganancia visual más pobre si presente basalmente. La extensión horizontal se correlaciona con los niveles de AV.	10 letras. 5 letras. Correlación fuerte (60%).	
FQI (degenerativo)	AV más pobre si presente en la semana doce.	15 letras.	
FSR	Mejor AV inicial si presente basalmente. Ganancia visual mayor si presente basalmente. Asociado a menor necesidad de retratamiento.	5 letras. 5 letras.	
DEP	Ganancia visual más pobre si	5 letras.	

	<p>presente basalmente.</p> <p>Factor de riesgo para la pérdida de AV durante la dosificación individualizada.</p>		
Atrofia del EPR	<p>Factor de riesgo para la pérdida de AV sostenida.</p>		

De los posibles biomarcadores candidatos en la DMAE, la información morfológica basada en la OCT es la modalidad diagnóstica más importante. Estos biomarcadores son los que muestran el potencial más consistente y prometedor como biomarcadores clínicamente aplicables [147] (Figura 11).

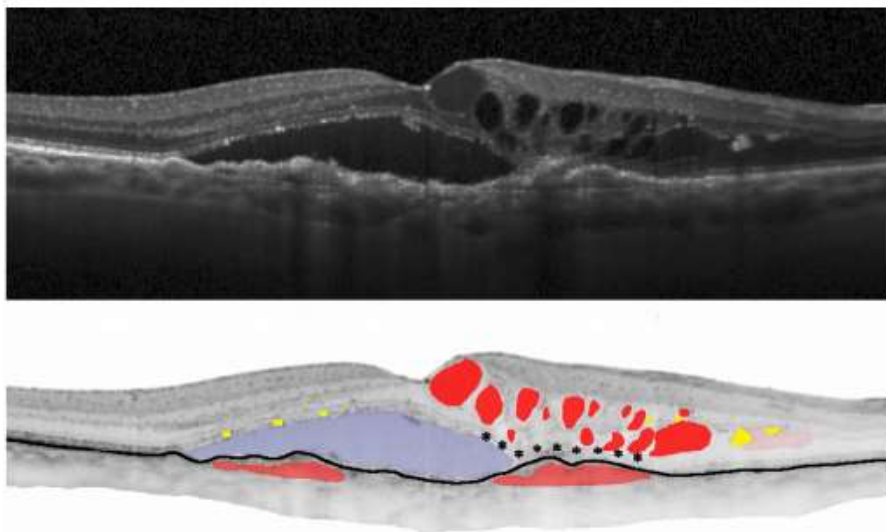


Figura 11. Representación típica de degeneración macular asociada a la edad de tipo neovascular en OCT y biomarcadores asociados. El fluido intrarretiniano aparece en rojo brillante, el fluido subretiniano en azul y el desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina en rojo oscuro. Las marcas amarillas ilustran focos hiperreflectivos y los asteriscos negros denotan alteraciones en la capa de los fotorreceptores [147].

1.6.3.2.1.1. Espesor central de la retina

La manera más rápida y obvia de cuantificar los cambios retinianos en los datos de OCT es la medida del espesor central de la retina (ECR) [181]. Desde los primeros dispositivos de OCT hacia delante los fabricantes han proporcionado algoritmos de *software* automatizados e integrados capaces de segmentar la membrana limitante interna (MLI) y el EPR o membrana de Bruch, como el límite interno y externo, respectivamente. Mediciones derivadas del ECR en varias localizaciones se pueden representar como mapas de color con el objetivo de permitir un juicio clínico de la actividad de la enfermedad a simple vista. El ECR en particular, que es el grosor medio de un campo circular de 1 mm de diámetro centrado en la fóvea, fue fácilmente aceptado tanto como variable de resultado cuantitativa en los ensayos clínicos, como medida para medir el efecto del tratamiento, permitiendo tomar decisiones de retratamiento en la práctica clínica [182,183] (Figura 12) .

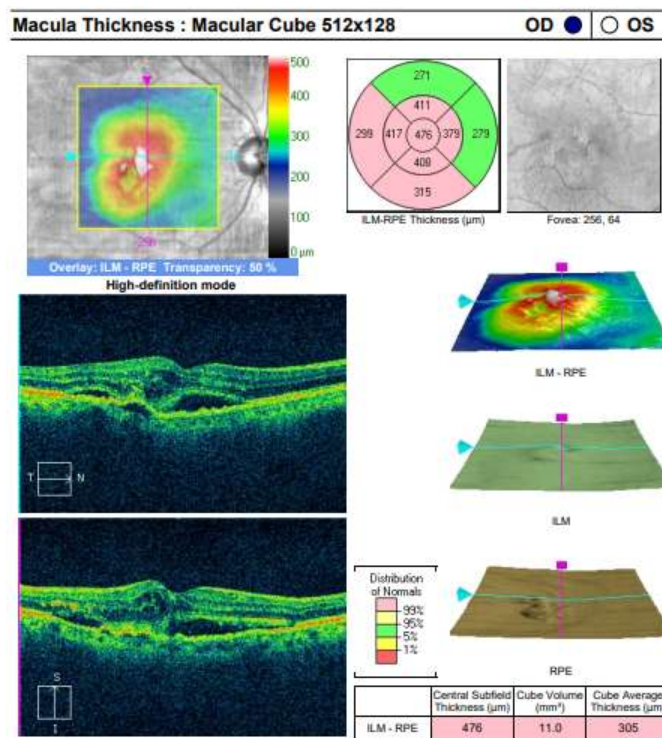


Figura 12. Espesor central de la retina en imagen de SD-OCT. Parte superior derecha: mapa de color con grosor medido en μm del espesor entre la membrana limitante interna y el epitelio pigmentario de la retina en diferentes localizaciones. Parte inferior derecha: tabla con espesor del subcampo central (μm), cubo de volumen (mm^3) y espesor medio del cubo (μm).

Sin embargo, en los últimos años se ha reconocido que el ECR no es un método ideal ni para identificar los cambios morfológicos en la DMAE ni para guiar el manejo de los pacientes.

Varios problemas técnicos limitan la aplicabilidad y reproductibilidad de las medidas del ECR. Existe una alta tasa de errores de segmentación incluso en los dispositivos más modernos de OCT [184,185]. La fijación pobre del paciente y el movimiento pueden llevar a errores en los registros [186].

En lugar del ECR se propuso el uso del volumen macular, sin embargo, ya que las medidas del área se fijan a los campos de la cuadrícula similares al ETDRS, las medidas del volumen son simplemente la multiplicación del grosor medio por un área (fija), y por lo tanto, no aporta información adicional [147].

Clínicamente, la principal limitación del ECR es que este incluye todos los diferentes compartimentos retinianos, y por lo tanto, falla en la diferenciación de los cambios sutiles a nivel de los componentes patológicos individuales. Los cambios en los diferentes compartimentos intrarretinianos pueden tener un efecto diametralmente diferente sobre la función visual. Estos efectos diferentes se pierden promediando sobre todo el espesor de la retina. Además, la relación entre la AV y el ECR de ninguna manera es lineal. Una baja AV se puede asociar tanto con retinas excesivamente gruesas como con retinas excesivamente delgadas [187]. Por lo tanto, no es sorprendente que el ECR ofrezca una pobre correlación con la función visual en la DMAEnv [188-191]. Mientras que los ojos con una retina más gruesa suelen demostrar una pobre AV al inicio del tratamiento con fármacos anti-VEGF, esta asociación se pierde generalmente tras la administración de unos pocos tratamientos, y por lo tanto, resulta inadecuada para su monitorización [192].

Debido a la pobre reproductibilidad, falta de correlación con los resultados anatómicos relevantes y baja sensibilidad para los cambios sutiles en los compartimentos retinianos, no se recomienda basar la toma de decisiones clínicas o resultados de los ensayos en las medidas del ECR [147].

1.6.3.2.1.2. Fluido quístico intrarretiniano

Uno de los eventos determinantes en la patogenia de la DMAEnv es la disrupción de la membrana limitante externa y el complejo fotorreceptor por la

invasión y proliferación de la lesión neovascular, lo que resulta en la fuga de fluido dentro de la retina neurosensorial. En las imágenes de OCT la acumulación de este fluido aparece como un engrosamiento difuso de la retina, o más frecuentemente, como espacios quísticos hiporreflectivos (Figura 13).

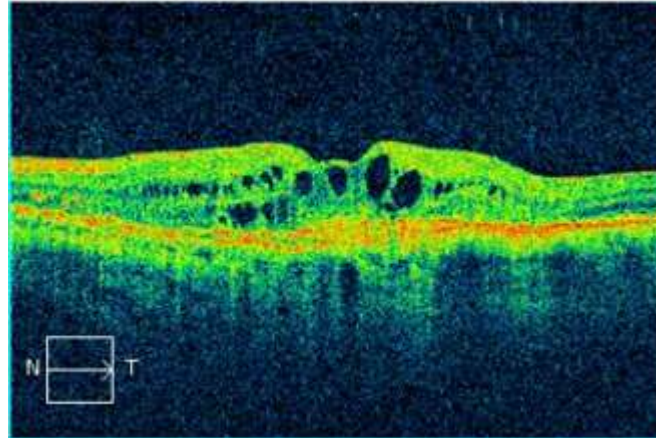


Figura 13. Imagen de SD-OCT donde se observa fluido quístico intrarretiniano (espacios quísticos hiporreflectivos).

En el tratamiento de la DMAEnv el fluido quístico intrarretiniano (FQI) es actualmente el factor predictivo más importante tanto de la mejor AV basal como de los resultados visuales. Los resultados de algunos estudios han detectado que hasta el 60% de la AV en ojos no tratados previamente o *naïve* podría ser explicada por los cambios quísticos en las capas neurosensoriales de la retina [193].

El FQI está más frecuentemente asociado con las lesiones clásicas, lesiones de tipo RAP o con los estadios tardíos de las lesiones ocultas, donde la red neovascular ha violado su confinamiento en el espacio subEPR y perjudica el soporte de la retina neurosensorial suprayacente. De acuerdo a la clasificación basada en los hallazgos tomográficos, el FQI es el signo más frecuentemente asociado a las lesiones de tipo 2 y 3, así como a los estadios tardíos de las lesiones de tipo 1 [133,194]. El FQI es un signo tanto de un tipo de lesión más agresiva como de la presentación tardía de una NV oculta [147].

Los ojos *naïve* con FQI en su presentación muestran una AV reducida una media aproximada de dos líneas en el optotipo ETDRS [187,192,193,195,196]. Mediante el uso de mioperimetría el FQI se ha asociado a una disminución de la sensibilidad macular [197,198].

No todo el fluido intrarretiniano (FIR) que aparece en la OCT es causado por exudación asociada a NV activa, por eso es de gran importancia diferenciar entre el fluido quístico causado por una lesión neovascular exudativa (FQI exudativo) y el fluido quístico asociado a la degeneración neurosensorial (FQI degenerativo). El FQI exudativo es relativamente circular, grande y los espacios ovoides frecuentemente están asociados a un DEP (lesiones tipo 1 o 3) o a tejido neovascular (lesiones tipo 2). Es exquisitamente respondedor al tratamiento anti-VEGF [199], y lo que es más, una reducción en el FQI exudativo está directamente y fuertemente correlacionada con la ganancia visual [193].

El FQI degenerativo o degeneración quística es típicamente pequeño, los espacios son hiporreflectivos y claramente delimitados. Este tipo de fluido recubre regiones de EPR disfuncional pudiéndose manifestar como atrofia del este o cicatriz [200,201]. Este tipo de fluido también puede presentarse en la DMAE no neovascular sin ninguna evidencia de fuga [202,203]. No es un signo de actividad de la enfermedad y no responde al tratamiento anti-VEGF incluso con la más intensa terapia de administración mensual [196,200].

La mayoría de los estudios sobre FQI en DMAEnv utilizan una clasificación dicotómica de la presencia o ausencia de este. Sólo unos pocos trabajos han intentado cuantificar el FQI en OCT, lo que supone un esfuerzo que consume tiempo y que en el futuro se verá facilitado por métodos de cuantificación [204,205]. Los estudios que han cuantificado el FQI mediante SD-OCT han concluido que el total de este está correlacionado linealmente con la función visual previamente al inicio del tratamiento, también, que el 20% del resultado visual obtenido está determinado por la presencia al inicio de daño neurosensorial irreversible mediado por quistes, independientemente de la intensidad de la terapia anti-VEGF que se administre [193].

En general, los cambios quísticos ocurren tras una enfermedad de larga duración con el crecimiento de neovasos más allá del espacio subretiniano. Se debe prestar atención para detectar y tratar la NV antes del desarrollo de estos quistes. Incluso un tratamiento intensivo puede no proporcionar niveles de beneficio funcional como en un mismo paciente sin estos cambios morfológicos. El tratamiento no debe ser continuado si existe degeneración quística sobre

áreas de atrofia del EPR o cicatrización. La respuesta de este fluido es limitada y se asocia un pronóstico, en general, desfavorable [147].

1.6.3.2.1.3. Fluido subretiniano

El fluido subretiniano (FSR) es un biomarcador de imagen particularmente intrigante en el sentido de que es el único parámetro morfológico “patológico” consistentemente asociado con efectos positivos en la AV [147] (Figura 14).

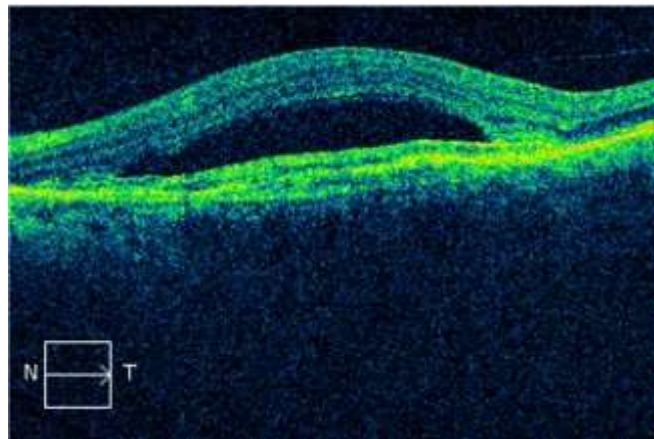


Figura 14. Imagen de SD-OCT dónde se observa fluido subretiniano (espacio hiporreflexivo entre la retina neurosensorial y el epitelio pigmentario de la retina).

La evidencia de que el FSR puede ser tolerado sin comprometer los resultados visuales ha sido señalada en algunos estudios [187,196], e incluso ha sido asociado a mayores mejoras en la AV [187,206]. Estos datos sugieren que la resolución completa del FSR puede no ser necesaria para alcanzar los mejores resultados visuales.

En los ensayos clínicos de fase III el 70-85% de los pacientes presentan FSR en el momento del diagnóstico [187,192]. Este fluido está asociado a todos los tipos de lesiones y típicamente es el primer signo exudativo de la NV de tipo 1 [133]. Numerosos grandes estudios han demostrado que la presencia de FSR en cualquier momento del seguimiento está asociada a niveles más altos de AV [187,196]. Es más, los pacientes con FSR obtienen mayor ganancia visual con el tratamiento anti-VEGF [196,207]. También, los ojos con FSR desarrollan con menor frecuencia atrofia del EPR incluso bajo tratamiento intensivo mensual [208,209].

Una posible explicación al efecto positivo del FSR en la función visual y mantenimiento de un EPR viable es la presencia de una red neovascular perfundida y/o una capa coriocapilar en el área foveal que proporciona supervivencia al EPR y a los fotorreceptores. En un ambiente hipóxico como es la DMAE, una lesión neovascular perfundida puede ser considerada un “factor de supervivencia” para la viabilidad del EPR y de los fotorreceptores. La presencia de FSR sin manifestación simultánea de FQI puede sugerir la presencia de una NV menos agresiva, incluso quizás un estado de “apoyo” más que un crecimiento destructivo de la retina neurosensorial. El FSR no tiende a localizarse directamente junto con el FQI y el DEP, lo que puede indicar que la lesión neovascular está localizada extrafovealmente con menor efecto sobre la AV [147].

El FSR en la DMAEnv no sólo parece influenciar positivamente la función visual sino también la necesidad de retratamiento. Los resultados de un estudio mostraron que los pacientes tratados con fármacos anti-VEGF siguiendo un protocolo que permitía tolerar cierta cantidad de FSR, alcanzaron resultados visuales comparables, pero con un menor número de inyecciones, a los pacientes del grupo en el que el tratamiento se administró de manera más estricta. Estos datos sugieren que tolerar cierta cantidad de este tipo de fluido puede proporcionar resultados visuales similares a no tolerarlo con un menor número de inyecciones de fármacos anti-VEGF [210].

Algunos estudios han investigado la densidad óptica del FSR concluyendo que un incremento en la reflectividad de este se asocia a una peor función visual y a un peor resultado tras el tratamiento [211,212]. Aunque el FSR normalmente responde al tratamiento de manera precoz también puede ser refractario en algunos pacientes, sin embargo, este hecho no se ha asociado con un pronóstico visual adverso [203]. Se reconoce también que la apariencia del FSR en la OCT puede resultar de un proceso no exudativo [213]. Es posible que el espacio subretiniano pueda existir tras el cese de una exudación de larga evolución con el posterior fallo de la retina para su reaplicación al EPR a través de las interdigitaciones. También es posible que la NV activa sea quiescente y resulte en una pequeña cantidad de FSR que no requiere tratamiento [210].

Los datos actuales sugieren que los ojos con FSR en su presentación es probable que presenten un curso de la enfermedad comparativamente más benigno y manejable, mediante farmacoterapia anti-VEGF en intervalos de tiempo más extendidos, que los ojos que no lo presentan [147].

1.6.3.2.1.4. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina

Un DEP es definido como una separación del EPR y su lámina basal de la lámina colágena interna de la membrana de Bruch [155] (Figura 15).

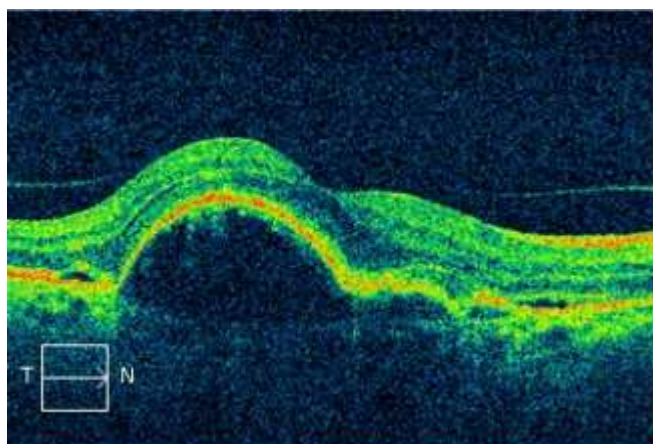


Figura 15. Imagen de SD-OCT dónde se observa desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (elevación de la monocapa hiperreflectiva que representa al epitelio pigmentario de la retina).

Los desprendimientos serosos, vascularizados y mixtos son característicos de la DMAEnv [157].

El DEP asociado a la reactivación de la NV es uno de los principales culpables de la pérdida de AV a largo plazo durante la terapia anti-VEGF. Por lo tanto, se reconoce que el DEP que rodea a la lesión neovascular primaria es un componente relevante de la enfermedad para el manejo del paciente [147].

El DEP estuvo presente en el 54%-80% de los pacientes que se reclutaron para algunos de los principales ensayos clínicos de farmacoterapia anti-VEGF en DMAEnv [187,192,214]. Dentro de este porcentaje se incluyen DEPs de tipo seroso (relleno de un fluido ópticamente vacío), de tipo fibrovascular (relleno de material hiperreflectivo heterogéneo) y de tipo mixto. En las lesiones de tipo 1 u ocultas el DEP representa el componente primario de la lesión con acumulación secundaria de FSR y el FQI sólo aparecerá en los estadios tardíos de la

enfermedad [133]. De hecho, en estas lesiones la MNV socava el EPR y se adhiere a la superficie interna de la monocapa de EPR elevada [215]. El DEP también es una característica definitoria de las lesiones neovasculares de tipo 3 [194].

El DEP se asocia a mínimos cambios en la función visual, principalmente metamorfopsia [147]. En la población típica de estudio de DMAEnv los ojos con DEP al inicio del tratamiento poseen una ligera mejor AV media que aquellos ojos sin DEP [187,214]. Por otro lado, la presencia de DEP se ha asociado con ganancias visuales ligeramente inferiores a lo largo del tiempo [196].

1.7. Tratamiento

1.7.1. DMAE precoz

La utilización de la combinación de vitaminas antioxidantes y minerales no reduce el riesgo de progresión de la DMAE precoz a su estadio intermedio. No existe evidencia que soporte el uso de suplementos para los pacientes que tienen formas de la enfermedad más leves a la intermedia [18].

1.7.2. DMAE intermedia

El estudio AREDS original utilizó un diseño mediante el cual los pacientes incluidos fueron aleatorizados a la toma de vitaminas, zinc, una combinación de vitaminas antioxidantes y minerales (zinc y cobre) o a la toma de placebo. En el estudio AREDS2 [216] se exploró la sustitución del beta-caroteno por luteína (10 mg) y zeaxantina (2 mg) junto con una dosis menor de óxido de zinc (25 mg) (Tabla 6).

Tabla 6. Vitaminas antioxidantes y suplementos vitamínicos usados en el estudio AREDS2 [217].

Suplemento	Dosis diaria
Vitamina C	500 mg
Vitamina E	400 UI
Luteína/Zeaxantina	10 mg/2 mg
Óxido de zinc	80 mg o 25 mg
Óxido cuproso	2 mg

En estos dos estudios los participantes que se beneficiaron de la toma de vitaminas antioxidantes y suplementación mineral fueron aquellos que presentaron DMAE intermedia en ambos ojos o DMAE intermedia en un ojo y avanzada en el contralateral. La tasa de desarrollo de DMAE avanzada a cinco años se redujo en un 25%. El riesgo de perder tres o más líneas de visión se redujo un 19%.

1.7.3. DMAE avanzada

1.7.3.1. DMAE avanzada neovascular, húmeda o exudativa

A pesar de los avances terapéuticos en el manejo de la DMAEnv ninguno de los tratamientos usados actualmente cura la enfermedad o invierte su curso [218].

1.7.3.1.1. Fotocoagulación láser

La fotocoagulación para el tratamiento de la DMAEnv se desarrolló gradualmente hasta que su efecto se evaluó en estudios a gran escala como el MPS [219,220] y otros [221,222]. Estos estudios se llevaron a cabo en una era donde la fotocoagulación era la única forma efectiva de tratamiento disponible para la DMAEnv. En el estudio MPS el pronóstico visual a largo plazo para las lesiones neovasculares fue mejorado significativamente por la fotocoagulación inmediata, intensa y confluyente de las mismas.

La fotocoagulación con láser ha demostrado beneficios en comparación con el curso natural de la enfermedad en determinados subtipos y estadios

seleccionados. Aunque actualmente superada por la inhibición farmacológica de VEGF mediante inyecciones intravítreas, esta antigua forma de tratamiento permanece siendo una opción racional para pacientes seleccionados en los que estos fármacos no son aconsejables [135]. La tendencia actual es utilizar agentes anti-VEGF en preferencia a la fotocoagulación con láser.

1.7.3.1.2. Terapia fotodinámica

El principio de la TFD en la DMAE condujo al desarrollo clínico y mercadotecnia de un producto farmacéutico único (Visudyne, Novartis Pharma AG, Basel, Suiza) con el ingrediente activo verteporfina. La acumulación semiselectiva de la verteporfina en las células endoteliales proliferativas y la consiguiente activación de la droga por una luz de 689 nm en la lesión neovascular permite el cierre de esta sin daño sobre la retina neurosensorial suprayacente o sus vasos sanguíneos [135].

La evidencia de que la TFD ofrece un beneficio funcional en los pacientes con DMAEnv proviene de los ensayos clínicos conocidos como TAP (del inglés, *Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy*) [163] y VIP (del inglés, *Verteporfin In Photodynamic Therapy*) [164].

1.7.3.1.3. Radioterapia

La radioterapia en monoterapia o combinada con tratamiento anti-VEGF ha sido estudiada como opción en el tratamiento de la DMAEnv [223-225]. Algunos estudios iniciales que investigaron la radiación externa mostraron mejores resultados que la evolución natural de la enfermedad, sin embargo, los resultados no se comparan favorablemente con los de la era de la farmacoterapia anti-VEGF [226].

1.7.3.1.4. Tratamiento quirúrgico para la DMAE hemorrágica

La hemorragia subretiniana (HSR) es una rara pero devastadora complicación de la DMAEnv [227] que conduce a una pobre AV. Una eliminación mecánica del coágulo hemorrágico subretiniano con o sin extracción del complejo neovascular subyacente es la razón fundamental para la cirugía macular en esta enfermedad.

Los resultados de los ensayos *Submacular Surgery Trials* [228] no demostraron el beneficio de la cirugía comparado con la observación. Ya que el uso de fármacos anti-VEGF para la DMAEnv está bien establecido su uso combinado con la cirugía ha sido motivo de investigación [229,230].

1.7.3.1.5. Inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular

1.7.3.1.5.1. Fármacos

El tratamiento médico de la DMAEnv experimentó un avance significativo debido a la introducción de la farmacoterapia anti-VEGF. Estos fármacos alteraron drásticamente el pronóstico de la enfermedad que pasó de ceguera “casi segura” [231] a un cambio significativo en la mejora de la AV (30%), al menos durante los dos primeros años de tratamiento [232-234]. La administración de estos fármacos con propiedades antiangiogénicas mediante inyecciones intravítreas se ha convertido en una vía efectiva para su liberación [235,236]. Es uno de los procedimientos más realizados en oftalmología y es la principal herramienta usada para el tratamiento de esta enfermedad [237]. De las diferentes moléculas que componen la familia de VEGF, se piensa que el principal tipo responsable de la angiogénesis es VEGFA, el cual directamente estimula la angiogénesis y los cambios en la permeabilidad [238]. Existen varias isoformas de VEGFA (VEGFA121, VEGFA145, VEGFA165, VEGFA189 y VEGFA206) las cuales se clasifican en función del número de aminoácidos [239], siendo VEGFA165 es el más potente y el más abundante. Actualmente para el tratamiento de esta enfermedad se dispone de varios fármacos con propiedades anti-VEGF.

1.7.3.1.5.1.1. Pegaptanib

El primer tratamiento intravítreo anti-VEGF desarrollado específicamente para la DMAEnv fue el pegaptanib sódico, Macugen®. Pegaptanib es un oligoribonucleótido pegilado (aptámero) que se une con alta especificidad y afinidad a VEGFA165, secuestrando, y por lo tanto, evitando que active a su receptor. Su uso se justifica al inhibir selectivamente la fuga patológica y la NV [240]. Es bien tolerado en humanos y tiene una vida media intravítrea de 10 días [135].

El estudio VISION (del inglés, *VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization*) se completó a finales del año 2004 y marcó una nueva era en el tratamiento de la DMAEnv [135]. Este estudio demostró la seguridad y eficacia de la inhibición intravítrea de VEGF para el tratamiento de esta enfermedad [241].

Macugen® fue aprobado para su uso en DMAEnv por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) en diciembre de 2004 y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para los países de la Unión Europea en enero de 2006. Sin embargo, debido a su pobre eficacia en comparación con otros agentes anti-VEGF actualmente disponibles ya no es recomendado su uso [218,242].

1.7.3.1.5.1.2. Bevacizumab

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe a VEGFA y fue desarrollado originalmente como una medicación para uso en combinación con la quimioterapia en el cáncer colorrectal metastásico [243,244].

Las inyecciones intravítreas de bevacizumab han sido usadas ampliamente como un tratamiento fuera de ficha técnica en la DMAEnv [245,246]. Se piensa que bevacizumab puede ser tan eficaz como ranibizumab en el tratamiento de esta enfermedad, así como en otros tipos de NV intraocular y puede proporcionar una alternativa menos cara respecto de las sustancias aprobadas específicamente para este uso [247-250].

Desde el año 2005 múltiples series de casos no controladas y retrospectivas han indicado que bevacizumab tiene un efecto beneficioso en el tratamiento de la DMAEnv [245,246,251]. Los datos con nivel de evidencia I para este fármaco derivan exclusivamente de ensayos de no inferioridad que comparan bevacizumab con ranibizumab con el objetivo de reducir costes asociados a los fármacos en la práctica clínica [135].

1.7.3.1.5.1.3. Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis®, Novartis, Basel, Suiza; Genentech, San Francisco, CA, EE. UU.) es un fragmento de anticuerpo monoclonal completamente humanizado que se une a múltiples isoformas de VEGFA [252]. El sitio de unión se localiza en los sitios de los aminoácidos 88-89. Se une e

inactiva a todas las isoformas de VEGF incluidas las isoformas solubles VEGF 110, 121, 165 y las isoformas unidas al tejido 189 y 206 [242,253]. Ranibizumab fue diseñado para un aclaramiento sistémico rápido eliminando el fragmento Fc de la molécula madre [254]. Por su bajo peso molecular de 76 kDa penetra bien en la retina tras la inyección intravítrea [255]. Su vida media intravítrea corta de 2-4 días y un rápido aclaramiento sistémico hace que su seguridad sistémica sea extremadamente alta [256]. Su aprobación original fue para el tratamiento de la DMAEnv [135].

La eficacia y seguridad del régimen de administración fija de inyecciones intravítreas con ranibizumab en DMAEnv ha sido evaluada en varios ensayos clínicos entre los que se incluyen MARINA [232,234], ANCHOR [233,257], PIER [258,259] y EXCITE [260].

MARINA (del inglés, *Minimally classic/occult trial of the Anti-VEGF antibody Ranibizumab in the treatment of Neovascular AMD*) fue un ensayo clínico diseñado para evaluar la eficacia y seguridad de ranibizumab intravítreo (0.3 mg y 0.5 mg) en pacientes con DMAEnv con membranas de tipo MC y O [232,234]. Los pacientes recibieron inyecciones mensuales de ranibizumab 0.3 mg, 0.5 mg o tratamiento simulado, continuamente durante veinticuatro meses. El 33% de los ojos en el grupo de ranibizumab 0.5 mg mejoró >15 letras. El 42% de los ojos obtuvo una AV igual o superior a 20/40. Los efectos funcionales y anatómicos se vieron rápidamente durante los tres primeros meses de la intervención y se mantuvieron durante todo el seguimiento [242,261] (Figura 16).

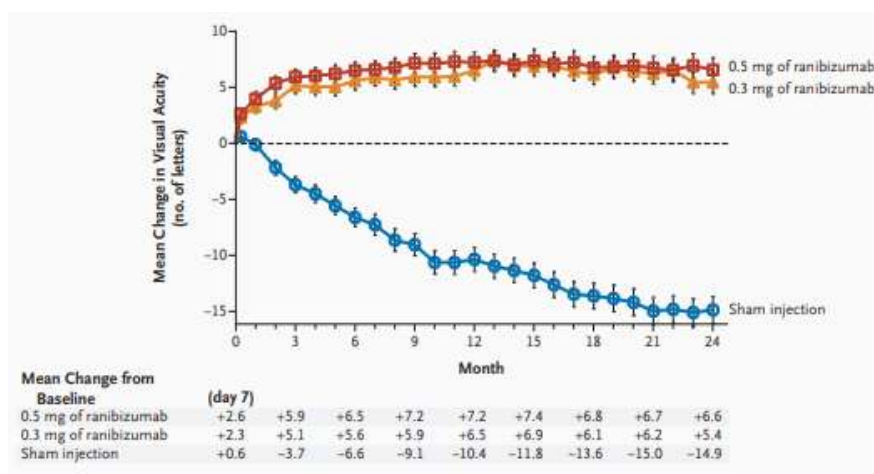


Figura 16. Estudio MARINA. Cambio medio de la agudeza visual en veinticuatro meses de seguimiento [232].

ANCHOR (del inglés, *Anti-vascular endothelial growth factor Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration*) fue un ensayo clínico aleatorizado y prospectivo que comparó la eficacia y seguridad de ranibizumab (0.3 mg y 0.5 mg) frente a la TFD con verteporfina en pacientes con DMAEnv con membranas subfoveales de tipo predominantemente clásico (PC) [233,257]. Los resultados tras dos años de seguimiento confirmaron un beneficio clínicamente significativo de ranibizumab intravítreo frente a la TFD (Figura 17).

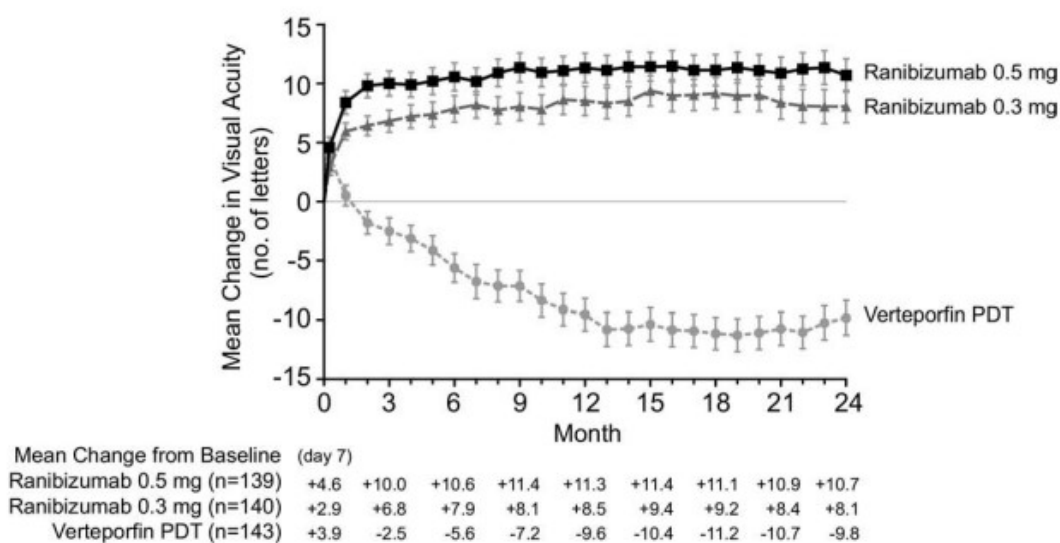


Figura 17. Estudio ANCHOR. Cambio medio de la agudeza visual en veinticuatro meses de seguimiento [257].

PIER fue un ensayo clínico controlado con inyección simulada que evaluó la eficacia y seguridad de ranibizumab (0.3 mg y 0.5 mg) en pacientes con DMAEnv con todo tipo de lesiones. Los pacientes fueron tratados trimestralmente tras recibir tres inyecciones mensuales como “fase de carga” [258,259]. A los doce meses de seguimiento el cambio medio en la AV fue -16.3 letras, -1.6 letras y -0.2 letras, para los grupos simulado, ranibizumab 0.3 mg y ranibizumab 0.5 mg, respectivamente [258] (Figura 18).

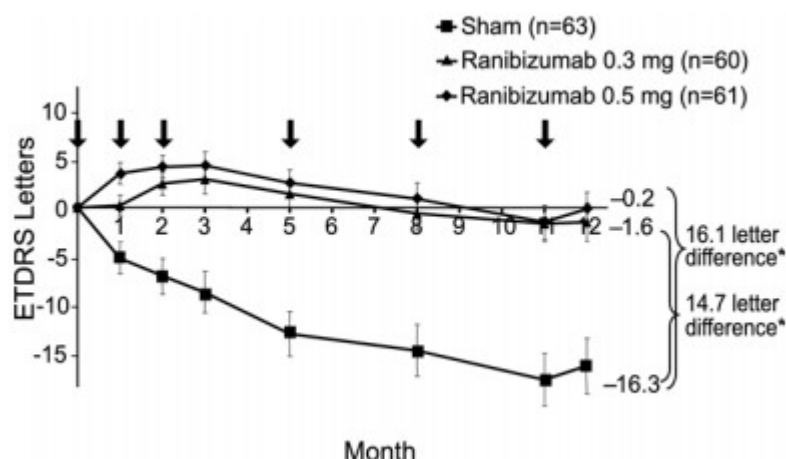


Figura 18. Estudio PIER. Cambio medio en la agudeza visual en doce meses de seguimiento [258].

A los veinticuatro meses de seguimiento la AV disminuyó en comparación con el inicio una media de -21.4 letras, -2.2 letras y -2.3 letras, en el grupo simulado, ranibizumab 0.3 mg y ranibizumab 0.5 mg, respectivamente [259]. Como la AV general volvió a la línea de base desde el tercer mes al duodécimo mes después de pasar de una administración mensual del fármaco a una administración trimestral, se sugirió que la dosis trimestral era inferior a la dosis mensual.

Estos resultados fueron confirmados en el estudio EXCITE [260].

Además de los regímenes fijos de administración intravítrea de ranibizumab estudiados en los ensayos clínicos previamente mencionados también se ha estudiado la administración flexible del fármaco en los ensayos clínicos PrONTO [182], CATT [262], SECURE [263] y HARBOR [264].

PrONTO fue un estudio pequeño, abierto, prospectivo y no aleatorizado, que evaluó la eficacia de la administración de tres inyecciones mensuales consecutivas de ranibizumab seguidas de un intervalo variable de dosis guiado por los hallazgos de OCT [182]. Con un menor número de inyecciones los resultados visuales fueron similares a aquellos obtenidos en los ensayos clínicos MARINA y ANCHOR, aunque la comparación es limitada por la existencia de diferencias sustanciales en el diseño del estudio. A pesar de sus limitaciones sus resultados indicaron que el retratamiento flexible guiado por OCT podía

mantener la ganancia visual con un menor número de inyecciones, un concepto que actualmente se ha convertido en un modelo popular en la práctica clínica actual [135].

En el estudio CATT a dos años de seguimiento cuando el grupo de pacientes que recibía ranibizumab mensual fue aleatorizado bien a un mismo régimen continuo mensual de tratamiento o a un tratamiento a demanda, el grupo que recibió inyecciones a demanda perdió -1.8 letras en comparación con aquellos que permanecieron en el régimen mensual. A lo largo de estos dos años de seguimiento la ganancia visual fue similar a los datos del primer año con +8.8 letras y +6.7 letras en el grupo de administración mensual y a demanda, respectivamente [262]. En otras palabras, cambiar a un régimen a demanda en el segundo año supuso perder el beneficio obtenido tras el tratamiento mensual del primer año.

SECURE [263] y HORIZON [265] son estudios prospectivos de extensión que fueron diseñados para evaluar la seguridad y eficacia de las inyecciones intravítreas de ranibizumab 0.5 mg a largo plazo en pacientes con DMAEnv. El estudio multicéntrico y abierto HORIZON tuvo un seguimiento de veinticuatro meses y en él se incluyeron pacientes que habían completado los ensayos MARINA, ANCHOR o FOCUS (del inglés, *RhuFAB V2 Ocular Treatment Combining the Use of Visudyne to Evaluate Safety*) [266]. SECURE fue un estudio de extensión de 4.2 años en el que se incluyeron pacientes con DMAEnv que habían completado un año de tratamiento con ranibizumab en los estudios EXCITE [263] o SUSTAIN [183]. Los resultados del estudio SECURE corroboraron los hallazgos del estudio HORIZON [265]. Hubo una disminución en las ganancias visuales que habían sido conseguidas con la administración de ranibizumab mensual en los estudios previos, conduciendo a una disminución gradual general de la AVMC de -7.5 letras al final del estudio. Esta pérdida de AV destaca la naturaleza progresiva de la enfermedad y muestra la necesidad de un estricto y continuo seguimiento y criterios rigurosos de retratamiento [135]. El seguimiento del estudio SEVEN-UP también informó de la persistencia de la actividad de la enfermedad a largo plazo en la mayoría de los pacientes [183].

HARBOR fue un estudio en el que por primera vez la monitorización de los pacientes se realizó empleando SD-OCT. Los sujetos fueron asignados

aleatoriamente en una proporción 1:1:1:1, a uno de cuatro grupos de tratamiento con ranibizumab 0.5 mg mensual, 0.5 mg *pro re nata* (PRN), 2.0 mg mensual y 2.0 mg PRN. Los resultados indicaron que ni la dosis más alta de ranibizumab 2.0 mg, ni la posología mensual estricta frente a la posología PRN, condujeron a resultados visuales mejores [264,267].

Por último, “tratar y extender” es otra estrategia de tratamiento flexible que se ha propuesto para reducir el número de retratamientos en esta enfermedad. Existen estudios que han demostrado resultados similares a la administración mensual del fármaco con esta pauta de tratamiento [268-271]. Este régimen de tratamiento con menor número de inyecciones y visitas parece ofrecer resultados similares a aquellos de los ensayos clínicos pivotaes con ranibizumab mensual.

Lucentis® fue aprobado por la FDA para su uso en DMAEnv en julio del 2006. La aprobación de la EMA para los países de la Unión Europea fue concedida en enero de 2007.

1.7.3.1.5.1.4. Aflibercept

Aflibercept (Eylea®; Bayer HealthCare, Berlin, Germany/Regeneron Pharmaceuticals Inc., Tarrytown, NY, EE. UU.) es una proteína de fusión (115 kDa) que comprende el segundo dominio Ig de VEGFR1 humano, el tercer dominio Ig de VEGFR1 humano y la región Fc de una IgG1 humana [272-274]. La afinidad de unión de aflibercept es más alta que la de ranibizumab y bevacizumab [135,275]. El tamaño molecular de aflibercept de 115 kDa resulta en una vida media intravítrea de 7.1 días, una bioactividad calculada en ojos humanos de 2.5 meses y una vida media en suero de 18 días debido a la presencia de la porción Fc [275]. El compuesto se une a todas las isoformas de VEGFA y VEGFB con una afinidad más alta que sus receptores nativos [274]. Aflibercept y ranibizumab se han mostrado igualmente efectivos en bloquear la proliferación de las células endoteliales y son diez veces más potentes que bevacizumab [276]. Aflibercept también se une al factor de crecimiento placentario presente en las células endoteliales y leucocitos [275].




La aprobación de aflibercept para el tratamiento de la DMAEnv se basó en los resultados de dos ensayos clínicos pivotaes paralelos de fase 3 conocidos como VIEW1 y VIEW2 (del inglés, *Investigation of Efficacy and Safety in Wet*

AMD) [277,278]. Los resultados concluyeron que la administración de aflibercept intravítreo mensual o bimestral no era inferior a la administración de ranibizumab mensual.

La aprobación por parte de la FDA y la EMA para aflibercept en el tratamiento de la DMAEnv a una dosis intravítrea recomendada de 2.0 mg se obtuvo en el año 2011 y 2012, respectivamente.

Estos tres fármacos previamente mencionados, aunque han obtenido resultados similares en los ensayos clínicos y estudios de práctica clínica real poseen diferentes propiedades [10] (Tabla 7).

Tabla 7. Propiedades de los agentes anti-VEGF [10]. VEGF= Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*). PDF= Factor de Crecimiento Placentario (del inglés, *Placental Growth Factor*). K_d = constante de disociación de equilibrio. DMAEnv= Degeneración Macular Asociada a la Edad de tipo neovascular. FDA= Administración de Medicamentos y Alimentos (del inglés, *Food and Drug Administration*). EMA= Agencia Europea de Medicamentos (del inglés, *European Medicines Agency*).

	Bevacizumab (Lucentis, Genetech)	Ranibizumab (Avastin, Genetech)	Aflibercept (Eylea, Regeneron)
Farmacología	Anticuerpo monoclonal 	Fragmento de anticuerpo 	VEGF-Trap (decoy) 
Peso molecular	149 kDa	48 kDa	115 kDa
Diana	Todas las isoformas de VEGFA	Todas las isoformas de VEGFA	Todas las isoformas de VEGFA, VEGFB y PGF
K_d para VEGF₁₆₅	58 pM	46 pM	0.49 pM

Vida media intravítrea estimada	5.6 días	3.2 días	4.8 días
Régimen de dosificación de inyección intravítrea para DMAEnv	1.25 mg cada 4 semanas	0.5 mg cada 4 semanas	2.0 mg en la semana 0, 4 y 8, luego cada 8 semanas, aunque algunos pacientes necesitan dosis cada 4 semanas. Después del primer año dosis cada 12 semanas en pacientes seleccionados.
Formulación	25 mg/mL; viales de 4 mL o 16 mL	0.3 mg o 0.5 mg/0.005 mL vial de un solo uso 0.5 mg/0.05 mL vial de un solo uso	2 mg/0.05 mL vial de un solo uso
Aprobación para DMAEnv por la FDA y EMA	No	Si	Si

1.7.3.1.5.1.5. Brolucizumab

Brolucizumab (Beovu®, Novartis, Basel, Suiza) es un fragmento de anticuerpo monocatenario de bajo peso molecular que se dirige a todas las formas de VEGFA con alta afinidad. Para su uso en DMAEnv fue aprobado por la FDA en octubre de 2019 [279] y por la EMA en febrero de 2020. La eficacia y seguridad de brolucizumab fue comparada con la de aflibercept en dos estudios

(HAWK y HARRIER) de diseño similar, no inferioridad (margen de no inferioridad de 4 letras), fase 3 y con diseño similar. Brolucizumab fue no inferior a aflibercept en la función visual en la semana 48 de estudio, aunque los resultados anatómicos favorecieron a brolucizumab sobre aflibercept [279]. La posibilidad de la administración trimestral de brolucizumab puede ayudar al manejo de la enfermedad por parte de los oftalmólogos, personalizar y optimizar los planes de tratamiento.[280].

1.7.3.1.5.1.6. Faricimab

Faricimab (Vabysmo™) es un nuevo anticuerpo biespecífico, anti-VEGFA y anti-angiopoyetina 2, derivado de la tecnología *CrossMab* de Roche. Los estudios TENAYA y LUCERNE [281] evaluaron los efectos de faricimab (6.0 mg administrados a intervalos fijos cada dos, tres o cuatro meses) y aflibercept (2.0 mg administrados a intervalos fijos de dos meses) en pacientes con DMAEnv, demostrando la no inferioridad de faricimab comparado con aflibercept. Los hallazgos clave mostraron una mayor durabilidad de faricimab comparado con los anti-VEGF previos. En enero de 2022 la FDA aprobó Vabysmo™ de Genentech (faricimab-svoa) para el tratamiento de la DMAEnv.

1.7.3.1.5.2. Regímenes de tratamiento con farmacoterapia anti-VEGF

En la actualidad existen diferentes regímenes de tratamiento para el manejo de los pacientes con DMAEnv mediante el uso de fármacos anti-VEGF.

1.7.3.1.5.2.1. Inyección fija

En los regímenes fijos los pacientes reciben inyecciones continuamente durante el periodo de seguimiento [282]. Las inyecciones fijas mensuales ofrecen el mejor resultado visual pero no se siguen frecuentemente fuera de los ensayos clínicos debido al incremento en el número de visitas [283].

1.7.3.1.5.2.2. Pro Re Nata

En el régimen PRN o régimen a demanda tras una “fase de carga” de tres inyecciones mensuales el seguimiento del paciente es mensual y sólo se

administra inyección intravítrea si existen signos de actividad o disminución de la AV, por lo tanto, es un régimen reactivo [284]. Este tipo de régimen aumenta el número de visitas y reduce el número de inyecciones [285]. Sin embargo, en resultados de vida real falla en conseguir la AV conseguida en los ensayos clínicos [285]. Esto puede ser debido a la falta de adherencia y a la pérdida de citas en el régimen mensual. Por lo tanto, no es la pauta de administración preferida de estos fármacos hoy en día [286].

1.7.3.1.5.2.3. Tratar y extender

Es un régimen proactivo en el que la clave es tratar al paciente antes de que haya actividad de la enfermedad. Fue creado para reducir la carga de inyecciones y es el régimen más aceptado de tratamiento hoy en día [285,287]. Tras la “fase de carga” de tres inyecciones mensuales, la administración del fármaco se extiende en el tiempo en intervalos de entre una o dos semanas de acuerdo a la actividad de la enfermedad [286]. Cuando se detecta actividad el intervalo entre tratamientos debe ser acortado al intervalo anterior [287]. Por el contrario, la ausencia de signos de actividad permite la extensión. El fundamento de los regímenes proactivos, como es el régimen de tratar y extender, es conseguir un tratamiento que se anticipe a las recaídas o recurrencias, y por lo tanto, evite la pérdida de visión mientras se individualiza el seguimiento del paciente [283]. Las pautas de tratamiento proactivas son las preferidas por los especialistas en retina en España. Sin embargo, su propia implementación es difícil debido a las limitaciones en los recursos de salud, así como a cuestiones de organización y logística [288].

La inyección oportuna es crítica en esta enfermedad y la duración del tratamiento es indefinida [285].

1.7.3.1.5.3. Limitaciones de la farmacoterapia anti-VEGF

1.7.3.1.5.3.1. No respondedores

Aunque la terapia anti-VEGF se ha convertido en el tratamiento estándar de la DMAEnv, muchos pacientes no responden adecuadamente o experimentan una pérdida lenta de la eficacia de estos agentes tras la administración repetida a

lo largo del tiempo. La resistencia puede ocurrir en cualquier punto durante el curso del tratamiento [289,290]. Los pacientes que no responden adecuadamente a la terapia anti-VEGF pueden ser clasificados en dos grupos, los llamados no respondedores iniciales (no responden a la “fase de carga” del fármaco) y los pacientes taquifilácticos (pacientes que responden a la “fase de carga” pero la respuesta decrece gradualmente tras repetidas administraciones) [290]. Un marco de las posibles causas de resistencia a la terapia anti-VEGF y sus posibles enfoques terapéuticos se muestra en la Tabla 8 [218].

Tabla 8. Descripción general de las posibles causas de resistencia a la terapia anti-VEGF y sus posibles enfoques terapéuticos [218]. anti-VEGF= anti-Factor del Crecimiento Endotelial Vascular (del inglés, *anti-Vascular Endothelial Growth Factor*). DMAE= Degeneración Macular Asociada a la Edad.

Resistencia a la terapia anti-VEGF	Efecto inicial incompleto causado por factores clínicos	Diagnóstico erróneo	Aclarar diagnóstico
		Variantes genéticas DMAE	Terapia individualizada
	Análisis farmacológico de resistencia a los agentes anti-VEGF	Tolerancia	Aumentar la dosis o acortar el intervalo entre tratamientos
		Taquifilaxia	Pausar tratamiento o cambiar a una droga similar
		Alteraciones de la arquitectura neovascular	Combinación de agentes antiinflamatorios o antifibróticos
	Otros factores angiogénicos y vías patógenas	Factores angiogénicos redundantes o compensatorios	Ajuste de dosis o combinar con otros inhibidores de la angiogénesis
		Activación sostenida del sistema del complemento y respuesta inflamatoria	Agentes antiinflamatorios o proteínas inmunomoduladoras

1.7.3.1.5.3.2. Coste

Las inyecciones intravítreas mensuales se asocian a una carga de tratamiento significativa para los pacientes, cuidadores y médicos, a menudo haciendo que un régimen adecuado de tratamiento no sea alcanzable en práctica clínica real [218]. Los pacientes normalmente reciben menos inyecciones anti-VEGF consiguiendo peores resultados visuales comparados con aquellos pacientes que reciben terapia frecuentemente de acuerdo a los regímenes fijados en los ensayos clínicos aleatorizados [291,292]. De hecho, la mejora de la AVMC se ha correlacionado con la intensidad del tratamiento en el primer año [293].

Además, las diferencias en el conjunto del enfoque del tratamiento y cómo los oftalmólogos utilizan la terapia anti-VEGF, puede influir críticamente en la eficacia en práctica clínica real [294].

1.7.3.1.6. Terapias emergentes en la DMAE neovascular

Se han propuesto nuevos enfoques para el tratamiento de la DMAE env. En efecto, VEGF es el principal, pero no el único participante en la fisiopatología de esta enfermedad [218]. Nuevas moléculas están siendo desarrolladas para intentar mejorar los resultados visuales y anatómicos, la seguridad, así como para intentar reducir la carga de tratamiento [284] [295].

1.7.3.2. DMAE avanzada atrófica

Actualmente no existe tratamiento para la DMAE avanzada de tipo atrófica. Un estilo de vida saludable y la ingesta dietética de antioxidantes pueden reducir el riesgo o retrasar la progresión de esta forma de la enfermedad [17,296]. No obstante, la investigación en este campo es amplia y varias opciones terapéuticas se encuentran en desarrollo [13].

1.8. Predicción de la respuesta al tratamiento anti-VEGF

Los investigadores han tratado de saber qué perfil genético del paciente se corresponde con el éxito del tratamiento usando suplementos nutricionales [297-300], terapia anti-VEGF [15,301-306], terapias supresoras del complemento

[307], TFD [308] o estrategias para modificar el metabolismo de los lípidos y retinoides [309,310].

Las opciones para el tratamiento de la DMAEnv son todavía limitadas normalmente a uno de los fármacos anti-VEGF disponibles en la actualidad [311]. El grado de la diferente respuesta a estos agentes es relativamente pequeño [312] y las diferencias en el coste son una fuerza impulsora importante para la elección del medicamento por parte de los médicos. Existen múltiples publicaciones que describen las diferentes tasas de respuesta a la medicación anti-VEGF en DMAEnv [301,302,304,305,313-321]. La mayoría de los nuevos agentes para el tratamiento de esta enfermedad están destinados a superar a los agentes anti-VEGF en eficacia, a proporcionar un efecto coadyuvante o a reducir la carga de tratamiento. A pesar de todos los test genéticos disponibles en la actualidad, ninguna prueba genética puede establecer claramente si un paciente va a tener éxito o fallar con un protocolo de tratamiento actual. Incluso si uno encuentra que una persona con ciertas variantes genéticas tiene más probabilidades de fracasar en un tratamiento actual para la DMAE, la imprecisión de esta predicción de forma individual es significativa [311].

La selección de terapias con base genética sólo será relevante cuando existan múltiples opciones de tratamiento con diferentes beneficios claramente definidos, riesgos y costes, de tal manera que se justifique el gasto adicional de los test genéticos [311].

1.8.1. Genes

La posible relación entre las variantes genéticas y la respuesta a la terapia con ranibizumab intravítreo ha sido y es objeto de estudios farmacogenéticos (Tabla 9).

Tabla 9. Resumen estudios farmacogenética. C= Caucásico. A= Asiático. RNB= Ranibizumab. BVZ= Bevacizumab. AFB= Aflibercept. TFD= Terapia Fotodinámica. R= Retrospectivo. P= Prospectivo. ECR= Espesor Central de la Retina. AV= Agudeza Visual. AVMC= Agudeza Visual Mejor Corregida. VEGF= Factor de Crecimiento Entotelial Vascular (del inglés, *Vascular Endotelial Growth Factor*). anti-VEGF= anti-Factor del Crecimiento Endotelial Vascular (del inglés, *anti-Vascular Endotelial Growth Factor*). SNP= Polimorfismo de un Solo Nucleótido (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*).

Referencia	País	Etnia (C, A)	Ojos (n)	Intervención	Edad media (años)	Seguimiento (meses)	Diseño (R, P)	Conclusión
[322]	EE. UU.	C	156	RNB 0.5mg/0.05ml	83	mínimo 9	R	Homocigotos para la variante genética CFH (CC) necesitan mayor número de inyecciones.
[323]	Polonia	C	90	RNB 0.5mg/0.05ml	71.62±8.4	12	P	La AV no mejoró en los pacientes homocigotos para ARMS2 69S a pesar de un descenso del ECR. La mejora de la AV fue relativamente más baja en el grupo homocigoto (CC) para CFH Y402H.
[324]	Suiza	C	309	RNB 0.5mg/0.05ml	78.9±7.0	12	P	Para CFH Y402H los pacientes con el genotipo CC tienen menor probabilidad de respuesta positiva comparado con aquellos con el genotipo CT y TT.

								La combinación del genotipo CT en CFH (rs1061170) con AG en FZD4 (rs10898563) tiene mayor probabilidad de resultado positivo.
[325]	EE. UU.	C	65	RNB 05mg/0.05ml	81.27	12	P	<p>El alelo menor en rs1065489 (CFH) y rs9399005 (CTGF) se asoció a un resultado visual peor.</p> <p>El alelo menor en C3 (rs2230205) se asoció a una mayor reducción del ECR.</p> <p>El alelo menor en VEGFA (rs833068, rs833069) y FLT1 (rs622227, rs10507386, rs615529) se asoció a un menor número de inyecciones, en CFH (rs3766404) a un mayor número.</p>
[326]	Australia	C	192	RNB, BVZ	80	12	P	La presencia del alelo ϵ 4 en ApoE confiere resultados significativamente mejores al tratamiento anti-VEGF que aquellos con el alelo ϵ 2.
[303]	EE. UU.		150	RNB y/o BVZ	80.88	23.01	R	No asociación estadísticamente significativa entre el genotipo y la respuesta a la terapia anti-VEGF.

[327]	Holanda		420	RNB 0.5mg/0.05ml		3	Serie de casos	Efecto acumulativo de los alelos de alto riesgo en CFH, ARMS2 y VEGFA; peor respuesta al tratamiento y edad de inicio más temprana.
[328]	Reino Unido	C	104	RNB	81.5	6	P	Resultado visual más favorable en los genotipos de riesgo en CFH (TC, CC), VEGF (TC, CC) y HTRA1 (GA, AA).
[329]				RNB, BVZ, TFD			Revisión sistemática	Los genotipos de riesgo CT y CC para CFH T1277C y CT y CC para VEGFA C+674T se asocian a una mejor respuesta.
[330]		C, A	1.510	RNB, BVZ, TFD			Metaanálisis	Peor respuesta al tratamiento los individuos homocigotos para el alelo C en rs1061170 CFH.
[99]	EE. UU.	C	106	RNB, BVZ	78.25	12	P	Asociación débil entre rs2285714 (alelo T) PLA2G12A y pobre respuesta.
[331]	EE. UU.		834	RNB, BVZ	78.5	12	Ensayo clínico	Los genotipos rs1061170 (CFH), rs10490924 (ARMS2), rs11200638 (HTRA1) y rs2230199 (C3), no predicen la respuesta a la terapia

								anti-VEGF (AV, resultados anatómicos, número de inyecciones).
[332]	Italia	C	64	R	76.25±7.49	3	P	Mejor respuesta funcional precoz en pacientes con el alelo -2578C VEGFA. Ausencia de respuesta funcional precoz en pacientes con el genotipo -2578AA VEGFA.
[333]	Japón	A	120	RNB	76.13	3	R	La mala resolución anatómica de la lesión estuvo asociada con la combinación de las variantes genotípicas GG en CFH I62V y TT en CFH Y402.
[334]	Corea	A	273	RNB	69 ± 8.5	5	P	Ninguno de los SNPs testados en CFH, HTRA1/ARMS2, CFB/C2, CFI, APOE y VEGF, mostró asociación con un resultado visual favorable.
[314]		A, C	9512	RNB, BVZ, pegaptanib, triamcinolona, TFD		1-40	Revisión sistemática	Los genotipos en los genes de riesgo para la DMAE tienen un efecto limitado en los resultados del tratamiento anti-VEGF siendo los factores clínicos más determinantes.
[335]	Brasil	C	92	RNB	73.9±8.8	12	R	Genotipo CC en rs1413711 VEGF (C674Y) tiene una respuesta

								funcional y anatómica a largo plazo peor que los genotipos TT y CT.
[336]	España	C	94	RNB	71.62±6.5	18.04±2.47	P	VEGFA rs833061; portadores del genotipo “protector” CC mayor probabilidad de mejoría visual. VEGFA rs699947; genotipo AA mayor probabilidad de aumentar su AVMC. No diferencia estadísticamente significativa para VEGFR rs2071559.
[337]			366	RNB	76.8±7.5	12	Serie de casos	rs4576072 y rs6828477 en el gen VEGFR2 asociados independientemente con una ganancia visual significativamente mejor.
[338]	Japón	A	41	RNB, AFB	75.6±8.0	6	P	No hubo diferencia significativa entre los pacientes con y sin alelos de riesgo para ARMS2 A69S (rs10490924), CFH Y402H (rs1061170) y I62V (rs800292).
[339]				RNB, BVZ		3-24	R, P	Los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo en CFH (CC) y en VEGF (TT) tienen peores resultados visuales.

								<p>SNPs de C3 y ARMS2 no están asociados a los resultados visuales.</p> <p>La asociación de los SNPs en HTRA1 y VEGF con los resultados visuales no está clara.</p> <p>No hay asociación clara o directa entre el genotipo y el resultado anatómico.</p> <p>No hay consenso entre el genotipo y el número de inyecciones.</p>
[315]			1347	RNB, BVZ		12	Estudios de cohorte dentro de ensayos clínicos aleatorizados (CATT e IVAN)	rs4576072 y rs6828477 en VEGFR2 no asociación con el cambio en la AV en respuesta al tratamiento anti-VEGF.
[340]	Canadá	C, A	70	RNB	80.8±7.6	6	P	Los pacientes que expresan los haplotipos protectores de CFH es más probable que presenten una ganancia visual ≥ 15 letras en

								comparación con los haplotipos de mayor riesgo.
[341]	Turquía	C	39	RNB		3	R	El genotipo TT en el SNP rs10490924 en ARMS2 es predictor de buena respuesta al tratamiento comparado con los genotipos GG y TG.
[342]	Italia	C	64	RNB	76.25±7.49	12	P	Genotipo TT en rs4073 IL-8 mejor respuesta funcional (AV). Genotipo CC en rs2071559 VEGFR2 mejor respuesta funcional (sensibilidad retiniana media).
[343]	Turquía	C	109	R	63.84±7.22	6	P	Mejor AV en los portadores del genotipo del polimorfismo ApoE ε4.
[344]	Japón	A	461	RNB	74.05	12	P	Ningún SNP mostró asociación significativa de todo el genoma con los resultados tras el tratamiento. El SNP rs10490924 ARMS2/HTRA1 puede ser útil para predecir la necesidad de tratamiento adicional.
[345]	España	C	103	RNB	77,45	48	P	Homocigotos para el alelo de riesgo (TT) en ARMS2 (rs10490924) necesitaron mayor número de inyecciones que heterocigotos o que el genotipo sin riesgo.

								Ni los SNPs de ARMS2 A69S, ni CFH Y402H, estuvieron asociados con el resultado visual.
[346]	Japón	A	100	RNB o AFB más TFD	72.9±8.6	24	R	Necesidad de retratamiento asociada a mayor edad, sexo masculino y a variantes de riesgo de ARMS2 A69 (alelo T).
[319]	China	C, A	1917	RNB, BVZ	75.5	4-12	Metaanálisis	rs833061 en VEGFA (genotipo CC vs. CT y TT) mejor respuesta al tratamiento anti-VEGF, especialmente en asiáticos.
[347]	Turquía	C	90	RNB	62.94	60	R	Los pacientes con el genotipo TT de CFH respondieron significativamente mejor al tratamiento que los pacientes con el genotipo CC.
[348]	Japón	A	919	RNB	71.5	3-12	P	rs17822656, rs76150532, rs17296444 y rs75165563, nivel sugerente de asociación con pérdida visual al tercer mes.
[85]	España	C	403	RNB	80.8	12	R	SERPINF1 rs12603486 (GA/GG) asociado a pobre respuesta funcional.

								CFB rs12614 y SERPINF1 rs1136287 (alelo C) asociados con buena respuesta funcional. SERPINF1 rs1136287 (alelo G), CFH rs1061170 y VEGFR1 rs7993418 (genotipos TC/CC), asociados con buena respuesta anatómica. CFH rs800292 (GA/GG) asociado con mácula seca en el duodécimo mes.
[349]	Bélgica	C	281	RNB, BVZ	77±8.9	12	R	Asociación entre FLT4/VEGFR3 (rs55667289) y KDR/VEGFR2 (rs7691507) con la falta de respuesta al tratamiento. Asociación significativa con la respuesta al tratamiento de VEGFC (rs3775194, rs12054587 y rs2046462).
[350]	Grecia	C	52	RNB	55-85	3	P	Los pacientes con el genotipo CC en CFH/Y402H tienen peor respuesta que el genotipo CT. Los portadores de la variante de riesgo (GT, TT) en ARMS2/A69S

								tienen un resultado significativamente peor comparado con la variante salvaje.
[351]	América, Japón, Australia, Reino Unido, Finlandia, China, Corea, Holanda, Canadá, Turquía, Malasia	C,A	4.00 8	AFB, BVZ, RNB, TFD	74.2	3-24	Metaanálisis	El alelo G en ARMS2 A69S presentó un mejor pronóstico clínico. Asociación significativa entre ARMS2 A69S y la respuesta al tratamiento, especialmente en población del este asiático.

1.8.1.1. Polimorfismos del gen del factor H del complemento

En el estudio de Lee y cols. publicado en el año 2009 se observó que los pacientes homocigotos (CC) para el alelo de riesgo del factor H del complemento (CFH) Y402H requirieron un mayor número de inyecciones de ranibizumab que los pacientes con el genotipo TT. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes genotipos (TT, TC, y CC) y el resultado visual tras el tratamiento [322]. Tampoco Teper y cols. un año después encontraron diferencia estadísticamente significativa de CFH Y402H en los resultados visuales, pero sí observaron que la mejora de la AV era relativamente menor en el grupo homocigoto (CC) [323].

En 2011 Kloeckener-Gruissem y cols. [324] en una cohorte de 309 ojos con DMAEnv estudiaron la posible asociación de la respuesta visual a ranibizumab y el genotipo de los pacientes, durante un periodo de seguimiento de doce meses. Los pacientes fueron genotipados para varios polimorfismos de riesgo ya conocidos (CFH, CFB, HTRA1, ARMS2 y VEGFA) así como para genes todavía no reconocidos como de riesgo (KDR, LRP5 y FZD4). En sus resultados los individuos con el genotipo CC del polimorfismo Y402H en CFH tuvieron una probabilidad reducida de obtener una buena respuesta al tratamiento comparado con los pacientes con los genotipos CT y TT. Además, en este estudio la combinación de los genotipos CT en CFH (rs1061170) y AG en FZD4 (rs10898563) presentó una mayor probabilidad de obtener un resultado positivo.

Ese mismo año Francis y cols. [325] señalaron que tener el alelo menor en rs1065489 (CFH) confería un resultado visual peor comparado con el alelo ancestral. En este trabajo los pacientes fueron tratados con ranibizumab mensual en un régimen a demanda durante un periodo de doce meses. El criterio principal de valoración fue el cambio en la AV (ETDRS). A los seis meses de seguimiento CFH estuvo significativamente asociado a un peor resultado visual, indicando una influencia consistente de las variantes de este gen en el resultado visual tras el tratamiento. También, aquellos pacientes con el alelo menor en el gen CFH necesitaron mayor número de inyecciones durante el tiempo de seguimiento. Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados los polimorfismos en

CFH confieren un peor resultado visual además de la necesidad de un mayor número de inyecciones.

Sin embargo, en el año 2012 el estudio publicado por Orlin y cols. no detectó asociación entre el genotipo CFH y la respuesta a la farmacoterapia anti-VEGF con ranibizumab [303]. Tampoco hubo asociación significativa entre el genotipo y el número de inyecciones requeridas durante el tiempo de seguimiento.

Ese mismo año otro estudio de farmacogenética evaluó el impacto de los alelos de alto riesgo de los genes CFH, ARMS2, VEGFA, receptor KDR de VEGF y de los genes involucrados en la angiogénesis, LRP5 y FZD4, en la respuesta al tratamiento con ranibizumab y la edad media de inicio del tratamiento. Con este fin los investigadores seleccionaron una cohorte de 420 ojos con DMAEnv y calcularon el cambio en la AVMC entre el inicio del tratamiento y tras tres inyecciones mensuales del fármaco. Tras el tratamiento con ranibizumab los pacientes con DMAEnv sin alelos de riesgo en los genes estudiados obtuvieron una mejora media de la AV superior a los pacientes que presentaban alelos de riesgo. Los pacientes con mayor número de alelos de riesgo fueron más jóvenes que los pacientes con uno o dos alelos de riesgo. La edad media a la que se administró la primera inyección de ranibizumab en los pacientes con mayor número de alelos de riesgo fue inferior a la de los pacientes con menor número. En este estudio el efecto acumulativo de los alelos de alto riesgo en CFH, AMRS2 y VEGFA, estuvo asociado a una edad más joven de inicio de la enfermedad en combinación con una tasa de respuesta a ranibizumab pobre [327].

También en 2012 otro estudio informó sobre la asociación entre los genotipos para tres SNPs fuertemente asociados con el desarrollo de la DMAEnv y su respuesta precoz al tratamiento con ranibizumab intravítreo. En este estudio se incluyeron 104 ojos de pacientes caucásicos con DMAEnv a los que se les administraron tres inyecciones mensuales del fármaco. Tras estas tres inyecciones los pacientes fueron seguidos durante seis meses y recibieron más inyecciones según fuera necesario de acuerdo con los criterios de retratamiento. La AVMC se recogió al inicio y en cada visita posterior. Se obtuvieron los genotipos para rs11200638 en HTRA1, rs1061170 en CFH y rs1413711 en

VEGF. Los datos se analizaron con la respuesta al tratamiento al sexto mes, tanto de forma binaria (mejora de >5 letras vs. ≤5 letras) como lineal. Se observó una tendencia hacia un resultado más favorable en los genotipos de riesgo para CFH. El cambio medio de AV tras seis meses de seguimiento fue de +1.6 letras, +5.9 letras y +7.2 letras, para los genotipos TT, TC y CC, respectivamente. Una ganancia de >5 letras se observó en el 34.6%, 56.6% y 56% de los pacientes, respectivamente. En este estudio los genotipos de mayor riesgo para la DMAEnv en CFH (TC, CC) pudieron influenciar la respuesta al tratamiento a corto plazo con ranibizumab. Para CFH una tendencia hacia un mejor resultado se observó con los genotipos considerados de aumento de riesgo (TC, CC) para el desarrollo de la enfermedad [328].

Resultados similares obtuvo la revisión sistemática de Agosta y cols. sobre los fármacos antiangiogénicos, bevacizumab y ranibizumab, y la TFD, en el manejo de la DMAEnv. En esta revisión los genotipos CT y CC en CFH T1277C podrían haber influido en la respuesta a corto plazo a ranibizumab con una tendencia hacia a un mejor resultado [329].

En el metaanálisis publicado por Chen y cols. [330] se investigó la asociación entre el polimorfismo rs1061170 (T1277C, Y402H) en el gen CFH y su respuesta al tratamiento con bevacizumab y ranibizumab, así como la respuesta a la TFD. En este trabajo se incluyeron diez estudios publicados hasta ese momento en los que habían participado un total de 1.510 pacientes. En sus resultados el SNP rs1061170 tuvo asociación con la respuesta al tratamiento, especialmente a los agentes anti-VEGF. Además de relacionarse el gen CFH con la susceptibilidad genética de padecer DMAEnv, seis de cada diez estudios mostraron al alelo C como predictor de mala respuesta al tratamiento anti-VEGF. También, los pacientes que poseían el alelo T en el gen CFH Y402 tuvieron una mejor respuesta al tratamiento que los homocigotos CC para este gen.

Hagstrom y cols. para evaluar la relación entre los genotipos conocidos de los SNPs asociados a la DMAE y su respuesta al tratamiento con ranibizumab y bevacizumab, diseñaron un ensayo clínico en el que participaron 834 pacientes de los 1.149 pacientes que habían sido incluidos en el ensayo clínico CATT. Cada paciente fue genotipado para los SNPs rs1061170 (CFH), rs10490924

(ARMS2), rs11200638 (HTRA1) y rs2230199 (C3). En sus resultados no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la respuesta al tratamiento en función del genotipo de los pacientes para ninguna de las medidas estudiadas. Sí que la asociación más fuerte en los resultados anatómicos en función del genotipo se detectó en el cambio medio del ECR en CFH, la asociación para una menor mejora se encontró en los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo (CC) y la mayor mejora en aquellos pacientes heterocigotos para el alelo de riesgo (CT). Aunque alelos específicos para CFH, ARMS2, HTRA1 y C3, podían predecir el desarrollo de DMAE, estos no predecían la respuesta a la terapia anti-VEGF [331].

En 2014 Matsumiya y cols. en un estudio retrospectivo evaluaron la respuesta precoz al tratamiento con ranibizumab intravítreo en 120 ojos de pacientes japoneses con DMAEnv. Los pacientes fueron tratados con tres inyecciones mensuales y como resultado primario se evaluó la resolución anatómica de las lesiones. Se analizó la asociación de la respuesta con los SNPs rs800292 (I62V) y rs1061170 (Y402H) en CFH y en rs10490924 (A69S) en ARMS2. El ECR medio de todos los pacientes disminuyó significativamente en el tercer mes tras el tratamiento inicial. En el análisis de regresión logística la pobre resolución anatómica de la lesión al tercer mes estuvo asociada con la combinación de las variantes CFH I62V + CFH Y402H. Tras el tratamiento los pacientes con la combinación de los genotipos en dos SNPs, GG en I62V y TT en Y402H, mostraron una tasa significativamente menor de ausencia de FSR o edema en las imágenes de OCT comparados con el resto de los pacientes [333].

También en 2014 otro estudio, en este caso prospectivo, investigó la asociación entre las variantes genéticas de riesgo para la DMAE y su respuesta al tratamiento con ranibizumab intravítreo. La cohorte estuvo formada por 273 ojos de pacientes coreanos y ninguno de los polimorfismos estudiados en CFH (rs1061170, rs800292, rs3753394, rs1410996, rs1329428, rs10737680, rs1329424) tuvo asociación estadísticamente significativa con un resultado visual favorable en el quinto mes de seguimiento. Por lo tanto, no existió un efecto estadísticamente significativo del genotipo en la respuesta visual temprana tras el tratamiento con ranibizumab [334].

En la revisión sistemática de Finger y cols. se evaluó la evidencia disponible sobre los predictores de respuesta al tratamiento con agentes anti-VEGF. Para los factores genéticos, la mayor evidencia hasta ese momento se había generado en los SNPs de los genes CFH y VEGFA. Poco menos de la mitad de los SNPs evaluados en el gen CFH tuvo asociación con el resultado visual o número de inyecciones requeridas durante el seguimiento. Alguna evidencia mostró asociación entre los malos resultados visuales, así como la edad más precoz de inicio del tratamiento, con un incremento del número de alelos de riesgo en los genes de riesgo conocidos, como es CFH. Los factores genéticos tenían un efecto limitado mientras que los factores clínicos fueron más importantes en la determinación de los resultados tras el tratamiento. La mayoría de la evidencia disponible informó de una fuerte asociación entre los factores clínicos como la edad, la AV al inicio y el tamaño de la lesión neovascular, con los resultados al tratamiento anti-VEGF. Los factores conductuales como el tabaco no influyeron en el resultado del tratamiento. Por lo tanto, esta revisión comunicó que el genotipo subyacente de los genes de riesgo conocidos y asociados a la DMAE tenía un efecto limitado, mientras que los factores clínicos fueron más importantes en la determinación de los resultados tras el tratamiento [314].

En 2015 y con el objetivo de evaluar los resultados visuales y anatómicos en pacientes con VCPI y otras formas de DMAEnv refractarios a tratamientos previos e investigar el efecto de los factores genéticos, se realizó un estudio que evaluó la respuesta al cambio de tratamiento de ranibizumab a aflibercept. Se compararon los resultados visuales y anatómicos (ECR) seis meses después de realizar este cambio. El genotipado se hizo en cada paciente para ARMS2 A69S (rs10490924), CFH Y402H (rs1061170) e I62V (rs800292), y se investigó la asociación entre el genotipo y la respuesta al fármaco. Mientras que los pacientes con VCPI ganaron alrededor de una línea de visión, los pacientes con otros tipos de DMAEnv no mostraron una mejora significativa en la AV a pesar del descenso del ECR. La prevalencia de una retina sin fluido fue mayor tras el tratamiento en los pacientes con VCPI. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con y sin alelos de riesgo para ninguno de los genes estudiados, entre los que se encontraba CFHY402H [338].

Para determinar la existencia de asociación entre la respuesta a los agentes anti-VEGF y el genotipo de los pacientes con DMAEnv, Dedania y cols. realizaron una revisión sistemática de la literatura en la que incluyeron dieciséis estudios que habían evaluado dieciocho genes diferentes y su asociación con la respuesta al tratamiento con ranibizumab y bevacizumab. Los resultados de los estudios revisados indicaron que los pacientes homocigotos para el alelo de alto riesgo (C) en CFH tenían resultados visuales más pobres que los pacientes heterocigotos u homocigotos para el alelo de bajo riesgo. En general, no hubo una asociación directa ni clara entre el genotipo y los resultados anatómicos, y tampoco hasta ese momento, hubo consenso sobre la existencia de relación entre el número de inyecciones y el genotipo. Los pacientes con el genotipo de bajo riesgo en el gen CFH asociaron mejores resultados visuales tras el tratamiento [339].

Un año después, en 2016, en un estudio prospectivo que incluyó setenta pacientes con DMAEnv tratados con ranibizumab intravítreo con tres dosis mensuales de “fase de carga” y posteriormente un régimen PRN durante seis meses de seguimiento, se evaluaron ocho SNPs asociados a la DMAE: (1) CFH rs1048663, rs3766405, rs412852, rs11582939, rs1066420, (2) C3 rs2230199, (3) ARMS2 rs10490924 y (4) ácido dexosirribonucleico (DNA) mitocondrial (mtDNA) A2917G. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación farmacogenética entre los haplotipos de CFH y los SNPs con la respuesta al tratamiento con ranibizumab. Los resultados de este estudio indicaron que los haplotipos protectores de CFH estaban asociados con una ganancia ≥ 15 letras a los seis meses de seguimiento. Los pacientes que presentaron estos haplotipos tuvieron más probabilidades de conseguir una ganancia visual mayor en comparación con los haplotipos de riesgo. No se encontró asociación para ninguno de los genotipos en C3, ARMS2 y mtDNA [340].

En el año 2017 Yamashiro y cols. llevaron a cabo un GWAS sobre el resultado del tratamiento anti-VEGF en DMAEnv. Para ello reclutaron 461 pacientes *naïve* en trece centros diferentes y todos ellos fueron tratados con tres inyecciones mensuales de ranibizumab 0.5 mg seguido de un régimen PRN durante un año de seguimiento. Los investigadores recolectaron DNA genómico de todos los pacientes y evaluaron la obtención de una mácula sin fluido después

del tratamiento inicial, el requisito de tratamiento adicional y los cambios en la AV durante el periodo de seguimiento. Además, evaluaron nueve SNPs en ocho genes previamente relacionados con la DMAE y su resultado con el tratamiento. Los polimorfismos estudiados en el gen CFH fueron rs800292 y rs1410996. De todos los SNPs estudiados ninguno mostró asociación significativa con el resultado del tratamiento [344].

Un grupo de investigadores españoles con el objetivo de estudiar la influencia de dos SNPs de susceptibilidad para la DMAE en los genes CFH (Y402H) y ARMS2 (A69S) sobre el número de inyecciones intravítreas requeridas durante un periodo de seguimiento de cuatro años, llevó a cabo un estudio prospectivo en el que se incluyeron 103 ojos de pacientes con DMAEnv [345]. Los pacientes fueron tratados con tres inyecciones mensuales iniciales como “fase de carga” seguido de un régimen PRN. Los pacientes fueron retratados ante la presencia de FSR y/o FQI en las imágenes de OCT o ante la aparición de una nueva hemorragia retiniana. Se examinaron los valores basales, los resultados visuales y la tasa de recurrencia. Se determinaron los polimorfismos CFH Y402H (rs1061170) y ARMS2 A69S (rs10490924) y su asociación con la recurrencia de la lesión y el resultado visual. El número medio total acumulado de inyecciones de ranibizumab al final de cada año de seguimiento fue de 5.3 ± 1.8 , 9.2 ± 2.9 , 12.6 ± 4.6 y 15.7 ± 6.1 . En sus resultados se detectó una gran variabilidad interpaciente. Diecinueve ojos (18.5%) no experimentaron recurrencia durante el primer año y cinco ojos (4.8%) permanecieron inactivos tras cuatro años de seguimiento. No se encontró asociación significativa entre el número de inyecciones y el cambio en la AVMC o AVMC final. Los genotipos no tuvieron influencia en las características basales ni en los resultados visuales, y aunque se encontró una asociación significativa entre el polimorfismo A69S y el número de inyecciones necesarias, esta misma asociación no se detectó para CFH Y402 (rs1061170) [345].

Otro grupo de investigadores españoles buscó determinar si los polimorfismos genéticos específicos de un solo nucleótido influían en la respuesta al tratamiento con ranibizumab en pacientes con DMAEnv. Un total de 403 pacientes caucásicos diagnosticados de DMAE exudativa fueron incluidos en este estudio. Tras tres inyecciones iniciales de “fase de carga” se aplicó con

un régimen PRN. Se genotiparon nueve SNPs de seis genes diferentes (CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1, VEGF). Los pacientes fueron clasificados como buenos respondedores y pobres respondedores de acuerdo con criterios funcionales (AV), anatómicos (ECR medido por OCT) y presencia o ausencia de fluido (medido por OCT). En sus resultados el genotipo protector de la variante rs800292 (CFH) fue asociado a una respuesta anatómica pobre [85].

Con el objetivo de evaluar también el papel de CFH en la respuesta a ranibizumab intravítreo en pacientes con DMAEnv, un grupo de investigadores diseñaron un estudio retrospectivo en el que incluyeron noventa ojos tratados con tres dosis mensuales de inicio y un posterior régimen PRN durante cinco años de seguimiento. Los pacientes fueron reinyectados en función de los resultados visuales y anatómicos (ECR). La AVMC en el grupo con el genotipo TT en el tercer, cuarto y quinto año, fue significativamente más alta que en los grupos con los genotipos TC y CC, mientras que los valores promedios de la AVMC en el grupo TC fueron significativamente más altos que en el grupo CC. En este trabajo los pacientes con el genotipo TT en CFH respondieron significativamente mejor al tratamiento después del tercer año que los pacientes con el genotipo CC, los cuales obtuvieron una respuesta más pobre [347].

Más recientemente, en el año 2020 otro estudio quiso determinar si los polimorfismos genéticos que están asociados a la DMAE tenían influencia en la respuesta a su tratamiento, específicamente, a la suplementación con antioxidantes en pacientes con DMAE seca, así como a la terapia anti-VEGF en pacientes con DMAEnv. Un total de 170 pacientes con DMAE seca y 52 pacientes con DMAEnv fueron genotipados para los siguientes SNPs: rs1061170/Y402H en el gen CFH, rs10490924/A69S en el gen ARMS2, rs9332739/E318D y rs547154/IVS10 en el gen C2 y rs4151667/L9H y rs2072633/IVS17 en el gen del factor B del complemento (CFB). La respuesta al tratamiento se evaluó comparando la AV y los resultados de OCT entre los datos basales y los datos al final del tratamiento. El grupo de pacientes con DMAE seca recibió suplementación diaria consistente en 6 mg de luteína y 0.5 mg de zeaxantina, 60 mg de vitamina C, 8.8 mg de vitamina E, 5 mg de zinc y 20 µg de selenio (Ocuvite Lutein forte), por un periodo de doce meses, mientras que el grupo con DMAEnv fue tratado con tres inyecciones mensuales de ranibizumab

a una dosis de 0.5 mg/0.05 ml. Las mediciones de la AV se repitieron a los doce meses de seguimiento tras la suplementación continua para el grupo de pacientes con DMAE seca y al mes de la tercera inyección en los pacientes con DMAEnv. La variante CFH/Y402H se asoció con la respuesta a los antioxidantes en los pacientes con DMAE seca. Los portadores de uno o dos alelos de riesgo en CFH tuvieron una menor probabilidad de responder en comparación con aquellos sin alelos de riesgo. En los pacientes con DMAEnv el análisis indicó que los pacientes homocigotos para Y402H (genotipo CC) tuvieron menos probabilidades de responder a la terapia anti-VEGF en comparación con los heterocigotos (genotipo TC). La eficacia de la suplementación y de la terapia anti-VEGF se diferenció en función del genotipo del paciente, por lo que la detección de las variantes genéticas asociadas con la respuesta al tratamiento podía conducir a la mejora de los resultados visuales a través de una terapia guiada por estas [350].

1.8.1.2. Polimorfismos del gen del factor 3 del complemento

Los genes CFH y C3 son genes de componentes implicados en la cascada del complemento. La alteración del sistema del complemento por algún polimorfismo genético desempeña claramente un papel importante en la patogénesis de la DMAE [322]. Aunque los polimorfismos del gen C3 se han relacionado con la DMAEnv, no se dispone de la misma evidencia científica que para los polimorfismos del gen CFH.

En el estudio de Francis y cols. [325] los resultados mostraron que la presencia del alelo menor (A) en el polimorfismo rs2230205 del gen C3 estuvo asociada con una reducción mayor del ECR, cuantificado por OCT, y con una mejora de la arquitectura retiniana, tanto en el sexto mes como en el duodécimo mes de seguimiento, tiempo durante el cual los pacientes fueron tratados con ranibizumab mediante un régimen a demanda.

En el estudio de Hagstrom y cols., que incluyó pacientes participantes del ensayo clínico CATT, se identificó la asociación más fuerte con la AV media en el SNP rs2230199 del gen C3. La asociación con una mejor AV fue para los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo (GG). Al no ser esta asociación

estadísticamente significativa los autores concluyeron que este alelo no podía predecir la respuesta a la terapia anti-VEGF [331].

En el año 2015 en la revisión sistemática realizada por Dedania y cols. [339] los SNPs de C3 no mostraron asociación con los resultados visuales tras el tratamiento con los fármacos anti-VEGF, bevacizumab o ranibizumab.

En el año 2016 en el estudio de Chaudhary y cols. no se detectó asociación entre ninguno de los genotipos de C3 (GG, GC, CC) y la ganancia visual y/o mejora anatómica a los seis meses de tratamiento con ranibizumab intravítreo [340].

1.8.1.3. Polimorfismos del gen del factor 2 del complemento y factor B del complemento

C2 y CFB son genes adyacentes en 6p21.3, por lo tanto, es difícil discernir la contribución individual de cada gen para el riesgo de DMAE [352].

Gold y cols. demostraron que la combinación de alelos raros en C2 y CFB reducía el riesgo individual de padecer DMAE. Además, el efecto protector era más significativo en aquellos pacientes que eran homocigotos para la variación Y402H de CFH [353]. Estos hallazgos fueron confirmados más adelante [354].

En la cohorte de pacientes coreanos con DMAEnv tratados con ranibizumab de Park y cols., los polimorfismos estudiados en C2 (rs9332739) y CFB (rs641153) no mostraron asociación estadísticamente significativa con un resultado visual favorable en el quinto mes de seguimiento. Por lo tanto, el genotipo careció de efecto estadísticamente significativo en la respuesta visual temprana de estos pacientes [334].

Tampoco en el GWAS de Yamashiro y cols. [344] el polimorfismo 547154 en C2/CFB mostró asociación estadísticamente significativa con los resultados tras el tratamiento con ranibizumab.

La variante genética rs12614 (CFB) en el trabajo realizado por un grupo de investigadores españoles predispuso a los pacientes con DMAEnv tratados con ranibizumab a una buena respuesta [85]. Los pacientes con el genotipo C/T vs. C/C-T/T en rs1264 (CFB) tuvieron más probabilidades de obtener mejores resultados visuales.

En el trabajo de Gourgouli y cols. en el año 2020 [350] se investigó la influencia de los polimorfismos rs9332739/E318D y rs547154/IVS10 en el gen C2 y rs4151667/L9H y rs2072633/IVS17 en CFB sobre la respuesta al tratamiento con suplementos antioxidantes y ranibizumab en pacientes con DMAE seca y neovascular, respectivamente. El análisis de las variantes genéticas de C2 y CFB (polimorfismos protectores) reveló que en los pacientes con DMAE seca la suplementación con antioxidantes fue mucho más efectiva en los portadores de estos SNPs frente a los que no lo eran. Sin embargo, no se detectó asociación con la respuesta a ranibizumab entre estos SNPs en el grupo de pacientes con DMAEnv.

1.8.1.4. Polimorfismos del gen ARMS2 A69S/HTRA1

Ambos genes, ARMS2 (del inglés, *Age Related Maculopathy Susceptibility 2*), antes conocido como LOC387715, y HTRA1 (del inglés, *High Temperature Requirement Factor A1*), se encuentran en el cromosoma 10q26. Dentro de ARMS2, rs10490924, codificando el cambio A69, ha sido asociado a fenotipos graves de DMAE como son el inicio precoz de la enfermedad y las lesiones neovasculares mayores. HTRA1 está altamente conservado entre las especies y tiene varias variantes que han sido asociadas consistentemente a esta enfermedad. Una de las variantes con mayor consistencia de asociación a la DMAE es el SNP rs11200638. Dado que estos genes dentro de 10q26 están en un alto desequilibrio de ligamiento es difícil distinguir la contribución individual de cada uno de ellos sobre la susceptibilidad general en la enfermedad [352].

Los resultados publicados en la literatura respecto a la influencia del genotipo ARMS2/HTRA1 en la respuesta a ranibizumab son discordantes.

Teper y cols. observaron que la variante ARMS2 A69S afectaba a la respuesta de la terapia con ranibizumab. En los sujetos homocigotos a pesar de existir una reducción en el ECR medido mediante OCT, la AVMC no mostró mejoría [323]. Sin embargo, en el trabajo de Kloeckener-Gruissem y cols. [324] aunque se confirmó la asociación genética de susceptibilidad con ARMS2 y HTRA1 para la DMAE, no hubo asociación entre estos genes y la respuesta visual a la terapia antiangiogénica. Hangstrom y cols. [331] tampoco hallaron

asociación entre los alelos de riesgo de ARMS2/HTRA1 y la respuesta a ranibizumab o bevacizumab.

En el estudio de Smailhodzic y cols. que, entre otros, evaluó el impacto de los alelos de alto riesgo en el gen ARMS2 y la respuesta al tratamiento con ranibizumab, así como la edad media de inicio del tratamiento, los pacientes sin alelos de riesgo obtuvieron una mejoría media de AV que no obtuvieron los pacientes con más alelos de riesgo. También los pacientes con más alelos de riesgo fueron más jóvenes que los pacientes con menor número y la edad media a la que se administró la primera inyección de ranibizumab en los pacientes con más alelos de riesgo fue menor que en los pacientes con ninguno o un alelo de riesgo. En este estudio el efecto acumulativo de los alelos de alto riesgo en los genes estudiados, incluido ARMS2, estuvo asociado con una edad más joven de inicio de la enfermedad en combinación con una tasa de respuesta a ranibizumab pobre [327].

McKibbin y cols. investigaron la asociación entre rs11200638 en HTRA1 y su respuesta precoz al tratamiento con ranibizumab intravítreo. En el modelo lineal hubo una tendencia a un resultado más favorable en los genotipos de riesgo para HTRA1. El cambio medio en la AV tras cinco meses de seguimiento fue de +2.2 letras, +7.5 letras y +2.9 letras, para los genotipos GG, GA y AA, respectivamente. En este estudio los genotipos de mayor riesgo para la DMAE en HTRA1 influenciaron la respuesta al tratamiento a corto plazo con ranibizumab. Una tendencia hacia un mejor resultado se observó con los polimorfismos considerados de aumento de riesgo para el desarrollo de DMAE [328].

En el trabajo de Park y cols. ninguno de los polimorfismos estudiados en ARMS2 (rs10490924, del443ins54) ni en HTRA1 (rs11200638) mostraron asociación estadísticamente significativa con un resultado visual favorable al quinto mes de seguimiento. En esta cohorte de pacientes no hubo efecto estadísticamente significativo del genotipo en la respuesta visual temprana tras la administración de ranibizumab intravítreo [334].

En la revisión de Finger y cols. sólo alguna evidencia mostró asociación entre los malos resultados visuales, así como la edad más precoz de inicio del tratamiento, con un incremento del número de alelos de riesgo en los genes de

riesgo conocidos ARMS2/HTRA1. El genotipo subyacente de los genes de riesgo conocidos y asociados a la DMAE tuvo un efecto limitado, mientras que los factores clínicos fueron más importantes en la determinación de los resultados tras el tratamiento [314].

Tampoco en el estudio de Kawashima y cols. la presencia o no de los alelos de riesgo para ARMS2 A69 tuvo influencia en los resultados visuales ni anatómicos tras el cambio de tratamiento de ranibizumab a aflibercept en pacientes refractarios [338].

De la misma manera, en la revisión de Dedania y cols. [339] los estudios revisados no mostraron asociación de los polimorfismos de ARMS2 con los resultados visuales y la asociación de los polimorfismos de HTRA1 con el resultado visual fue poco clara. En general, no hubo una asociación directa ni clara entre el genotipo y los resultados anatómicos. Tampoco hubo consenso sobre la posible relación entre el número de inyecciones y el genotipo. Los genotipos de bajo riesgo de los genes ARMS2 y HTRA1 podían estar asociados con mejores resultados visuales [339].

Bardak y cols. con el propósito de investigar la asociación entre ARMS2 rs10490924 y la respuesta al tratamiento intravítreo con ranibizumab en pacientes con DMAEnv, realizaron un estudio en el que incluyeron 39 pacientes y 250 individuos sanos. El grupo de pacientes fue dividido en tres subgrupos según el genotipo: GG (N=10), TG (N=14) y TT (N=15). Antes de iniciar el tratamiento intravítreo todos los pacientes presentaron FSR y/o FQI. El tratamiento consistió en tres inyecciones mensuales de ranibizumab. Al mes de la tercera inyección los pacientes fueron clasificados como pacientes respondedores o pacientes no respondedores en función de la presencia o ausencia de FSR, FQI o ambos. El riesgo de DMAE en los portadores del alelo de riesgo heterocigotos (TG) y homocigotos (TT) fue 8.56 y 39 veces más alto, respectivamente, que en los portadores homocigotos del alelo normal. La frecuencia alélica fue 0.537 y 0.10 en el grupo de pacientes y controles, respectivamente. Dentro del subgrupo de pacientes TT hubo diferencia estadísticamente significativa entre los respondedores y no respondedores. El genotipo TT en rs10490924 respondió gratamente al tratamiento intravítreo en términos de mejora anatómica. Tras la “fase de carga” con ranibizumab el

número de ojos sin FSR ni FQI cambió significativamente sólo en este genotipo. En este estudio el genotipo TT fue un predictor de buena respuesta al tratamiento a corto plazo comparado con los genotipos GG y TG [341].

En el GWAS de Yamashiro y cols. [344] rs10490924 en ARMS2/HTRA1 se asoció significativamente con el requisito de tratamiento adicional. Este polimorfismo de ARMS2/HTRA1 fue capaz de predecir la frecuencia de inyección tras el tratamiento inicial con ranibizumab [344].

En el estudio de los investigadores españoles Valverde-Megías y cols. no se detectó influencia de ARMS2 A69 en las características basales ni en los resultados visuales, pero sí se detectó asociación significativa entre el polimorfismo A69S y el número de inyecciones que fueron requeridas por los pacientes. Los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo T precisaron más retratamientos a lo largo de los 48 meses de seguimiento. El polimorfismo ARMS2 A69S mostró asociación con la tasa de recurrencia de la actividad neovascular [345].

La asociación entre la necesidad de retratamiento y ARMS2 A69S también fue estudiada en otro trabajo diseñado con el objetivo de comparar los resultados a dos años del tratamiento combinado de TFD con ranibizumab o aflibercept en pacientes con VCPI. Cien pacientes fueron tratados inicialmente con TFD combinada con ranibizumab o aflibercept y se compararon los resultados entre ambos grupos, también se investigaron los factores asociados con la mejora visual y el retratamiento durante veinticuatro meses de seguimiento. La AVMC mejoró significativamente en ambos grupos y se asoció al sexo femenino, a una peor AVMC al inicio, al menor tamaño de la lesión y al tratamiento con aflibercept. Entre los factores que se asociaron a la ausencia de necesidad de retratamiento se encontraron la menor edad, el sexo femenino y las variantes sin riesgo de ARMS2 A69S [346].

Más adelante, Gourgouli y cols. [350] identificaron que los pacientes con DMAEnv portadores de la variante de riesgo (variante T; GT o TT) experimentaban significativamente un peor resultado visual y tenían una menor probabilidad de respuesta al tratamiento con ranibizumab que los pacientes sin esta variante.

Por último, en un metaanálisis más reciente que incluyó veintiún estudios sobre la asociación entre el gen ARMS2 y la respuesta al tratamiento con farmacoterapia anti-VEGF en DMAEnv, se discutió si el polimorfismo ARMS2 A69S confería susceptibilidad a la respuesta con la terapia anti-VEGF. El conjunto de los resultados demostró que portar el alelo G para ARMS2 A69S ofrecía un pronóstico clínico mejor. Además, en el análisis por subgrupos basado en la etnia, los polimorfismos de ARMS2 tuvieron más posibilidades de presentar una respuesta positiva en los pacientes del este asiático. Por lo tanto, este metaanálisis ofreció una asociación significativa entre el polimorfismo ARMS2 A69S y la respuesta al tratamiento anti-VEGF en DMAEnv, especialmente en población del este asiático [351].

1.8.1.5. Polimorfismos del gen VEGF

La diana terapéutica para frenar la NV producida en la DMAE es la inhibición de VEGF. Por ello, muchos estudios de farmacogenética se han centrado en el análisis de las posibles variantes genéticas de esta molécula y su relación con la respuesta al tratamiento antiangiogénico.

1.8.1.5.1. Polimorfismos del gen VEGFA

McKibbin y cols. observaron una tendencia hacia un resultado más favorable en los genotipos de riesgo para la DMAE en el gen VEGFA. El cambio medio de letras tras cinco meses de seguimiento fue de +1.3 letras, +5.8 letras y +7.4 letras, para los genotipos TT, TC y CC, respectivamente. Una ganancia de >5 letras se observó en el 40%, 55.8% y 51.9% de los pacientes, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, los genotipos de mayor riesgo para la DMAE en el gen VEGF influyen la respuesta al tratamiento a corto plazo con ranibizumab, con una tendencia hacia un mejor resultado en los polimorfismos considerados de riesgo [328].

Con el objetivo de investigar la asociación del polimorfismo rs1413711 en VEGF (C674T) y la respuesta a ranibizumab en pacientes con DMAEnv, Veloso y cols. estudiaron a 92 pacientes genotipados para este polimorfismo y tratados con ranibizumab intravítreo con un régimen a demanda tras una “fase de carga” inicial de tres inyecciones mensuales durante un periodo de seguimiento de doce

meses. Las mediciones de la AV y el ECR se realizaron antes del inicio del tratamiento y en el primer mes, tercer mes, sexto mes y duodécimo mes de seguimiento. En este estudio la AV de los pacientes con los genotipos TT y CT mejoró en todas las visitas al compararla con los valores basales, en contraste con los pacientes con el genotipo CC. El ECR mejoró de manera estadísticamente significativa en todas las visitas para todos los genotipos. En este trabajo los pacientes con el genotipo CC obtuvieron una respuesta anatómica y funcional pobre a largo plazo con la terapia anti-VEGF [335].

Francis y cols. [325] al evaluar la influencia del gen VEGFA en la respuesta al tratamiento con ranibizumab y tomando como medida principal de estudio la AV (ETDRS), observaron que poseer el alelo menor de estos polimorfismos, rs833068 (AA) y rs833069 (GG), se asociaba a un requerimiento menor del número de inyecciones.

Otro trabajo reflejó que la presencia de los alelos de riesgo en el gen VEGFA, sobre todo combinados con alelos de riesgo en los genes CFH y ARMS2, estaba relacionada con una peor respuesta al tratamiento anti-VEGF y con una conversión más temprana de la DMAE hacia formas neovasculares [327].

En la revisión de Agosta y cols. se asoció el alelo G en el SNP rs699946 del gen VEGFA con una mejor respuesta a bevacizumab si se comparaba con la respuesta de los pacientes portadores del alelo A. Además, los genotipos CT y CC para VEGFA C+674T influyeron en la respuesta a corto plazo a ranibizumab [329].

Lazzeri y cols. investigaron la asociación de los SNPs rs699947 (-2578A/C) y rs1570360 (-1154G/A) con la respuesta precoz a ranibizumab en pacientes con DMAEnv. Diseñaron un estudio prospectivo en el que se incluyeron 64 ojos. Tras la administración de tres dosis mensuales de ranibizumab intravítreo se analizó la respuesta funcional (AVMC) y su asociación con estos SNPs. La diferencia de la AVMC antes y después del tratamiento intravítreo se consideró el resultado funcional. Ranibizumab fue significativamente más efectivo en los pacientes portadores del alelo -2578C VEGFA, mientras que los pacientes portadores del genotipo -2578AA VEGFA no tuvieron respuesta funcional precoz al fármaco. El SNP -2578A/C VEGFA fue un

determinante molecular importante en el resultado funcional precoz del tratamiento con ranibizumab [332].

Cabe destacar el estudio llevado a cabo en población española por el grupo de Cruz-González en el año 2014. Este trabajo encontró diferencia estadísticamente significativa en la distribución alélica del polimorfismo rs833061 en VEGFA y la respuesta a ranibizumab intravítreo en la mejora de la AV. Los pacientes con el genotipo protector CC tuvieron una probabilidad más alta de mejorar su AVMC. Además, cuando analizaron el polimorfismo rs699947 en VEGFA detectaron que los pacientes que expresaban el genotipo AA tenían mayor probabilidad de mejorar su AV. Los criterios de buena respuesta al tratamiento aportados por estos autores fueron tres: la mejora subjetiva de la AV percibida por el paciente, la ganancia de AV de al menos cinco letras en la escala EDTRS con respecto a la AV basal y la reducción superior a cien micras del ECR en comparación con el grosor macular basal [336].

En la cohorte de pacientes coreanos con DMAEnv de Park y cols. [334] no hubo efecto estadísticamente significativo del genotipo en la respuesta visual temprana tras el tratamiento con ranibizumab intravítreo, aunque el genotipo AA para rs699947 en VEGFA tuvo una mayor probabilidad de buena respuesta comparado con los otros genotipos.

En la revisión de Finger y cols. el 15% de los SNPs evaluados en el gen VEGFA tuvo asociación con el resultado visual o número de inyecciones requeridas durante el seguimiento. Alguna evidencia señaló la asociación entre los malos resultados visuales, así como la edad más precoz de inicio del tratamiento, con un incremento del número de alelos de riesgo en polimorfismos del gen VEGFA. El gen VEGFA tuvo un efecto limitado mientras que los factores clínicos fueron más importantes en la determinación de los resultados tras el tratamiento [314].

Otra revisión de la literatura publicada un año después señaló que los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo (TT) en VEGFA tenían resultados visuales más pobres que los pacientes heterocigotos u homocigotos para el alelo de bajo riesgo. Además, la asociación de los polimorfismos del gen VEGFA con el resultado visual fue poco clara. Los genotipos de bajo riesgo del gen VEGFA estuvieron asociados con mejores resultados visuales [339].

El GWAS realizado por Yamashiro y cols. [344] no encontró asociación entre el resultado del tratamiento anti-VEGF y el gen VEGFA.

Un metaanálisis investigó si los polimorfismos en los genes VEGFA y su receptor (VEGFR2) ejercían efecto sobre la respuesta al tratamiento con farmacoterapia anti-VEGF. Para los polimorfismos dentro de VEGFA el tratamiento con terapia anti-VEGF de los pacientes con DMAEnv fue mucho más efectivo en aquellos con el polimorfismo rs833061 (genotipo CC vs. CT y TT), particularmente en asiáticos. En un análisis por subgrupos, rs833061, tuvo más probabilidades de ser un predictor de respuesta para la terapia anti-VEGF, específicamente, cuando los pacientes sólo fueron tratados con ranibizumab o la AV se tomó como evaluación estandarizada del resultado. De acuerdo con estos resultados, la farmacogenética del polimorfismo rs833061 en VEGFA juega un papel positivo en la respuesta a la terapia anti-VEGF en la DMAEnv [319].

Por último, en una cohorte española la variante genética rs699947 (VEGFA) predispuso a los pacientes a una buena respuesta al tratamiento con ranibizumab [85].

1.8.1.5.2. Polimorfismos del gen VEGFR2

Las variaciones genéticas en el gen del receptor de VEGFA pueden estar asociadas con la respuesta al tratamiento anti-VEGF en la DMAEnv. Sin embargo, no son muchos los estudios realizados y estos muestran resultados contradictorios.

Para Hermann y cols. existen dos polimorfismos en el gen VEGFR2 asociados con la respuesta a ranibizumab intravítreo, rs4576072 y rs6828477 [337]. En su estudio la diferencia en la AV entre los pacientes con alelos menores (C) y aquellos sin los mismos fue aparente tras tres inyecciones intravítreas mensuales de ranibizumab. La AV aumentó aproximadamente en tres líneas tras el primer año de tratamiento. La AV se incrementó gradualmente con el número de alelos menores para ambos polimorfismos del gen VEGFR2. Esta serie de casos incluyó 366 ojos con DMAEnv a los que se les inyectó ranibizumab intravítreo mensualmente durante tres meses y posteriormente siguieron un régimen PRN hasta el duodécimo mes de seguimiento. Se genotiparon 126

SNPs en los genes que codifican la familia de VEGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD (FIGF), factor de crecimiento placentario (PGF); receptores de VEGF, VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR), y VEGFR3 (FLT4); y el gen PEDF (SERPIN1). Las medidas principales de resultado fueron los cambios en la AV tras tres inyecciones mensuales y al año de tratamiento y su asociación con los genotipos de VEGF y VEGFR. Sólo los polimorfismos en VEGFR2/KDR influenciaron significativamente el resultado visual en los pacientes tratados con ranibizumab.

Posteriormente, los datos aportados por el estudio de Heermann y cols. [337] fueron investigados por Hangstrom y cols [315]. Estos autores estudiaron si la asociación de los SNPs rs4576072 y rs6828477 en VEGFR2 con la respuesta a la terapia anti-VEGF se replicaba en una cohorte formada por 835 pacientes participantes del estudio CATT y 512 pacientes participantes del estudio IVAN. Cada paciente fue genotipado para estos dos polimorfismos y la medida de evaluación principal fue el cambio medio en la AV desde el inicio y tras un año de tratamiento con ranibizumab o bevacizumab. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el cambio medio de la AV entre los genotipos de ambos polimorfismos. Por lo tanto, los datos de los estudios CATT e IVAN no apoyaron la asociación farmacogenética entre los dos polimorfismos de VEGFR2, rs4576072 y rs6828477, y el cambio en la AV en respuesta a la terapia anti-VEGF en pacientes con DMAEnv.

Tampoco en el estudio de Cruz-González y cols. [336] para los polimorfismos rs2071559 en VEGFR2 se encontró asociación con la respuesta al tratamiento anti-VEGF.

Por el contrario, en un estudio llevado a cabo por Lazzeri y cols. la presencia del genotipo CC en el SNP rs2071559 en VEGFR2 se asoció a una mejor respuesta funcional medida mediante la sensibilidad retiniana. Para investigar esta posible asociación el estudio incluyó 64 ojos con DMAEnv a los que se les administró una dosis inicial de tres inyecciones mensuales de ranibizumab intravítreo seguido de un régimen PRN. En este estudio el genotipo rs2071559 en VEGFR2 representó un importante determinante molecular para modular los resultados finales en los pacientes con DMAE [342].

Al igual que en el estudio de Cruz-González y cols. [336] en el metaanálisis de Wu y cols. [319] el polimorfismo rs2071559 en VEGFR2 no mostró asociación significativa con los resultados a la terapia anti-VEGF.

Por último, en el trabajo de Balikova y cols. [349] el polimorfismo rs7691507, localizado cerca del final 3' del gen VEGFR2, se asoció con la falta de respuesta al tratamiento anti-VEGF. Este trabajo incluyó a 281 pacientes europeos tratados con ranibizumab o bevacizumab los cuáles fueron genotipados para 138 SNPs de la vía de VEGF. En cada paciente se registró la AVMC al inicio, tras tres inyecciones mensuales iniciales y a los doce meses de seguimiento. Además, se registró el número de inyecciones y los cambios en la morfología de la retina. El cambio en el ECR tras tres meses de seguimiento fue el criterio principal de valoración.

1.8.1.5.3. Otros genes relacionados con la vía de VEGF

1.8.1.5.3.1. VEGFR3 (FLT4), VEGFR1 (FLT1) y VEGFC

Francis y cols. [325] encontraron varios polimorfismos en VEGFR1 (FLT1) asociados al número de inyecciones intravítreas de fármacos anti-VEGF requeridas por los pacientes de su estudio. Poseer el alelo menor de cada polimorfismo de FLT1 (rs622227 GG, rs10507386 AA, rs615529 GG) resultó en la necesidad de un menor número de inyecciones de ranibizumab intravítreo a lo largo de doce meses de seguimiento.

En el estudio de Balikova y cols. [349] tener el genotipo A del SNP rs9513070, localizado intrónicamente en VEGFR1 (FLT1), se asoció con una mejor respuesta a la farmacoterapia anti-VEGF. En este mismo estudio, para FLT4, que codifica el receptor 3 de VEGF (VEGFR3), se observó asociación entre rs55667289 y la falta de respuesta al tratamiento. Finalmente, otros tres SNPs cerca del VEGFC se asociaron significativamente con la respuesta al tratamiento, rs3775194, rs12054587 y rs2046462.

En los resultados de Cobos y cols. [85] la variante genética rs7993418 (VEGFR1) predispuso a los pacientes a una buena respuesta a ranibizumab. Los genotipos TC/CC estuvieron asociados a una buena respuesta anatómica (grosor foveal medido por OCT).

1.8.1.5.3.2. KCNMA1, SOCS y OTX2

Akiyama y cols. realizaron un GWAS y un estudio de replicación para identificar factores asociados a la respuesta a ranibizumab en pacientes con DMAEnv [348]. Un total de 919 pacientes japoneses fueron tratados con ranibizumab intravítreo. En el análisis combinado del GWAS y del estudio de replicación ningún locus alcanzó un nivel significativo de todo el genoma, sin embargo, se encontraron 4 variantes que mostraron un nivel sugerente de asociación con la pérdida visual en el tercer mes de seguimiento (rs17822656, rs76150532, rs17296444 y rs75165563). De los genes candidatos dentro de estos locus, tres fueron relevantes para la vía relacionada con VEGF (KCNMA1, SOCS2 y OTX2). La proporción de pacientes que empeoraron su AV fue de 13.7%, 38.8%, 58% y 80%, en los pacientes con ninguna, una, dos y tres o más variantes identificadas de riesgo, respectivamente. Los cambios en la AV disminuyeron linealmente a medida que el número de variantes de riesgo aumentaba. Estos resultados ofrecieron variantes candidatas influyentes en la respuesta a la terapia con ranibizumab.

1.8.1.6. Polimorfismos del gen apolipoproteína E

Algunos alelos del gen Apolipoproteína E (ApoE) también se han vinculado a la respuesta al tratamiento antiangiogénico en la DMAEnv.

Wickremasinghe y cols. en un estudio que incluyó 168 ojos con DMAEnv tratados con ranibizumab o ranibizumab más bevacizumab, encontraron una mejor respuesta terapéutica en los pacientes portadores del alelo Apo ϵ 4 frente a los portadores del alelo Apo ϵ 2 [326]. La presencia del alelo Apo ϵ 4 incrementó significativamente la probabilidad de una mejora de dos líneas en la AV en el tercer mes de seguimiento, con significación límite en el sexto mes y duodécimo mes de estudio.

También la revisión publicada por Agosta y cols. asoció la presencia del alelo Apo ϵ 4 con una ganancia visual significativa tras la administración de ranibizumab intravítreo [329].

Sin embargo, en el año 2014 en el estudio prospectivo de Park y cols. [334] ninguno de los polimorfismos estudiados en ApoE (rs429358, rs7412) obtuvo

asociación estadísticamente significativa con un resultado visual favorable al quinto mes de seguimiento.

En el año 2016 Bakbak y cols. [343] informaron de que los portadores del polimorfismo ApoE ϵ 4 mostraban una mejora de la AV tras el tratamiento con ranibizumab. A los pacientes de este estudio se les administraron tres inyecciones mensuales iniciales con un régimen posterior PRN. Los pacientes fueron categorizados en tres grupos de acuerdo con cambio en la AV que presentaron al sexto mes tras la primera inyección: pérdida de AV > 5 letras ETDRS (grupo 1); cambio en la AV entre una ganancia o pérdida de 5 letras ETDRS (grupo 2); mejora de la AV > 5 letras ETDRS (grupo 3). Posteriormente se estudió la asociación entre los polimorfismos del gen ApoE y estos tres grupos de respuesta. Se observó una frecuencia más baja de ϵ 2 y más alta de ϵ 4 en el grupo 3 (2.9% y 25.7%, respectivamente). La mejora de la AV en más de 5 letras ETDRS se asoció significativamente con la presencia del genotipo ϵ 4.

Un año más tarde en el GWAS de Yamashiro y cols. [344] APO ϵ 4 no presentó asociación con la respuesta al tratamiento.

1.8.1.7. Otros genes

1.8.1.7.1. PLA2G12A

PLA2G12A participa en la respuesta inmunitaria de las células T adyuvantes [355] y ha sido asociado con el desarrollo de DMAE [356].

Wang y cols. realizaron un estudio para identificar SNPs que pudieran influir en el resultado del tratamiento con la terapia anti-VEGF en DMAEnv. Para ello 106 pacientes fueron tratados con ranibizumab o bevacizumab a demanda en un periodo de doce meses. Tras la inyección inicial, el tratamiento sólo fue administrado al observar actividad neovascular en la imagen de OCT. La AV y la presencia de fluido macular mediante OCT se midió al inicio, al sexto mes y al duodécimo mes de seguimiento. Los pacientes fueron clasificados como buenos respondedores o malos respondedores en función del cambio en la AV y el fluido macular. El DNA extraído de la sangre fue genotipado para veintinueve SNPs en seis genes candidatos (PLA2G12A, IL23R, STAT3, VEGFA, KDR y HIF1A). Del total de los pacientes incluidos en el estudio 77 fueron clasificados como buenos respondedores y 29 como malos respondedores. Para rs2285714 (PLA2G12A)

la frecuencia del alelo menor T fue del 40.1% para los buenos respondedores y del 51.7% para los pobres respondedores. Los pacientes portadores de al menos un alelo T de rs2285714 tuvieron 2.79 veces más probabilidades de ser pobres respondedores (79.3% de los respondedores pobres) que buenos respondedores (57.3% de los buenos respondedores). Sin embargo, después de la corrección de Bonferroni la observación hecha inicialmente ya no fue estadísticamente significativa. Este estudio mostró una posible asociación débil entre rs2285714 (PLA2G12A) y la respuesta a la terapia anti-VEGF [99].

1.8.1.7.2. IL-8

IL-8 es una potente quimiocina inflamatoria y proangiogénica que se expresa en las células endoteliales vasculares y en las células del EPR. IL-8 induce la angiogénesis e incrementa la permeabilidad endotelial en un mecanismo dependiente de VEGF [357,358]. Es un gen candidato por su posible influencia en la respuesta a la terapia anti-VEGF en la DMAE.

En el trabajo de Lazzeri y cols. [342] ranibizumab fue significativamente más efectivo en la ganancia visual de los pacientes que albergaban el genotipo TT de IL-8 rs4073 en comparación con el genotipo AA. Además, tras la “fase de carga” los resultados anatómicos fueron significativamente peores en los pacientes portadores del genotipo IL-8 rs4073 AA. Esta tendencia se mantuvo durante los doce meses de seguimiento del estudio. En conclusión, en este estudio rs4073 en IL-8 fue un importante determinante molecular en los resultados finales en los pacientes con DMAEnv.

1.8.1.7.3. Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos, trombospondina 1 y factor de crecimiento del tejido conectivo

El receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2), trombospondina 1 (THBS1) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), son genes implicados en la angiogénesis en la DMAE. En los resultados de la investigación realizada por Francis y cols. [325], CTGF tuvo asociación estadísticamente significativa con el cambio en la AV. Tener el alelo menor (A) en rs9399005 (CTGF) confirió un resultado visual peor comparado con el alelo ancestral. Polimorfismos en THBS1 (rs1478604) y FGFR2 (rs1047100) se

asociaron con una mejor respuesta a ranibizumab. Otro polimorfismo en FGFR2 (rs2912762) estuvo asociado con la fuga persistente de colorante en la AGF en el duodécimo mes de seguimiento, subrayando el papel potencial de este gen en la respuesta al tratamiento.

1.8.1.7.4. SERPINF1

En la cohorte española de Cobos y cols. [85] la variante genética rs12603486 (SERPINF1) genotipos GA/GG estuvo asociada con una respuesta funcional pobre a ranibizumab, mientras que SERPINF1 rs1136287 (alelo C) estuvo asociada a una buena respuesta. En términos de resultados anatómicos la variante genética rs1136287 (alelo G) también estuvo asociada a una buena respuesta.

1.8.2. Metabólica

Estudios sobre metabólica han demostrado que los pacientes con DMAEnv tienen perfiles metabólicos diferentes de aquellas personas de similar edad sin esta enfermedad [97,359-361]. Además, existe evidencia de que las diferentes características metabólicas basales de los pacientes con DMAEnv tratados con terapia anti-VEGF pueden predecir la respuesta a esta.

Gao y cols. [362] llevaron a cabo un estudio prospectivo en el que incluyeron a 100 pacientes con DMAEnv tratados con terapia anti-VEGF (bevacizumab, ranibizumab o aflibercept). En este estudio se examinó el perfil metabólico sérico basal del grupo de pacientes y se relacionó con la respuesta anatómica a la terapia antiangiogénica durante la fase de tratamiento inicial de tres meses. Los pacientes fueron clasificados como respondedores y no respondedores. Se observó que la expresión de los niveles de glicerofosfolina, lisofosfatidilcolina y fosfatidilserina, fueron superiores en el grupo de los no respondedores, lo que implica que las reducciones en estos tres metabolitos pueden usarse como predictores de la respuesta a la terapia anti-VEGF durante la fase inicial para pacientes con DMAEnv.

1.8.3. MicroRNA

En la revisión de la literatura realizada no se ha encontrado ningún estudio en el que se haya empleado miRNA como biomarcador de respuesta a la terapia con fármacos anti-VEGF en DMAEnv.

2. Justificación

La DMAEnv es una enfermedad de prevalencia creciente que supone un reto en la medicina actual por las consecuencias derivadas de la ceguera de la que es responsable, y aunque no tiene cura, un apropiado tratamiento puede retrasar la progresión de la enfermedad evitando el impacto negativo que tiene la pérdida de visión en la calidad de vida de estos pacientes.

Los agentes anti-VEGF, como ranibizumab, son actualmente el tratamiento de elección para la DMAEnv. Desafortunadamente, no todos los pacientes pueden beneficiarse completamente de la terapia intravítrea y la actividad neovascular puede no responder a este tratamiento.

Existen diferencias significativas entre los diferentes individuos en la respuesta a la farmacoterapia anti-VEGF, por lo que no todos los pacientes se benefician de igual manera.

En la actualidad, no existe consenso sobre lo que constituye la capacidad de respuesta al tratamiento o si las características preexistentes de los pacientes tienen algún papel en la determinación del resultado. Aunque diferentes biomarcadores de respuesta a la terapia anti-VEGF han sido descritos hasta la fecha, nuevos biomarcadores podrían proporcionar una visión novedosa de la actividad de la enfermedad y ofrecer un valor pronóstico superior y una mejor orientación para el manejo terapéutico personalizado.

Las limitaciones a este tratamiento ya conocidas implican que deberíamos definir el perfil de los pacientes a los que aplicarlo con el objetivo de facilitar el cumplimiento de las pautas de inyección recomendadas por la evidencia científica.

Los modelos predictivos de respuesta al tratamiento son una de las herramientas más poderosas para la medicina personalizada. La aplicación de estos modelos podría ser muy útil en la predicción del tratamiento óptimo para una aplicación temprana en cada paciente.

Estamos a las puertas de la llegada de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad y se hará necesario un manejo individualizado de los mismos. En este sentido, el conocimiento de los factores predictivos de respuesta a uno u otro fármaco podría orientar en la elección y efectividad de los tratamientos.

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

La identificación de biomarcadores de respuesta a ranibizumab en el tratamiento de la DMAEnv permitiría crear modelos predictivos de respuesta al mismo y aplicar clasificadores de aprendizaje automático basados en RNA para establecer planes de tratamiento específicos para el paciente.

3.2. Objetivos

- Clasificar a los pacientes en buenos respondedores y pobres respondedores al tratamiento con ranibizumab tras tres inyecciones intravítreas mensuales y analizar la respuesta funcional (AV) y anatómica (marcadores tomográficos y fundoscópicos) al mes de la primera y tercera inyección.
- Analizar el poder discriminatorio de los marcadores clínicos con la respuesta al tratamiento.
- Identificar las diferencias en la expresión del RNA mensajero y microRNA en las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes en función de la respuesta al tratamiento.
- Identificar genes/vías relevantes asociadas a la respuesta a ranibizumab.
- Crear modelos de predicción de respuesta a ranibizumab basados en técnicas computacionales que empleen las mediciones moleculares investigadas.

4. Material y métodos

4.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio para la caracterización de los patrones de expresión génica de células blancas de sangre periférica de pacientes con DMAEnv que respondan bien, y de aquellos que lo hagan pobremente, a la terapia con ranibizumab (Lucentis®, Novartis, Basilea, Suiza) mediante transcriptómica global. Se evalúa la viabilidad del uso de patrones de expresión como biomarcador(es) de la NV coroidea y/o retiniana en la DMAEnv y se desarrolla un conjunto de genes cuya expresión se puede utilizar como una prueba predictiva para anticipar el resultado del tratamiento anti-VEGF.

4.2. Población de estudio

En el estudio se incluyeron 59 pacientes diagnosticados de DMAEnv en el servicio de oftalmología del Hospital San Pedro de Logroño (La Rioja). Todos los pacientes recibieron tres inyecciones mensuales de ranibizumab intravítreo (Lucentis®, Novartis, Basilea, Suiza), lo que se conoce como dosis de “fase de carga”, para posteriormente ser examinados y clasificados clínicamente en función de su respuesta según parámetros funcionales (AV) y anatómicos (hallazgos fundoscópicos y tomográficos). El periodo de estudio estuvo comprendido entre febrero de 2016 y mayo de 2017. Debido a que el estudio implica la utilización de tejido humano, el uso de datos personales e información genética, requirió una autorización previa por el Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja (CEICLAR). La investigación cumplió los principios éticos de respeto a la dignidad humana, confidencialidad y proporcionalidad entre los riesgos y los beneficios esperados. Se dispuso del consentimiento informado (CI) verbal y escrito de las personas implicadas o sus representantes legales en este estudio según las normas deontológicas reconocidas por la declaración de Helsinki (revisión de Hong-Kong, septiembre 1989).

4.3. Criterios de inclusión y exclusión

La participación en el estudio fue voluntaria. Previamente a la inclusión en el mismo los pacientes firmaron y autorizaron, mediante la firma del documento de CI, la autorización para su inclusión. En este documento el paciente fue informado del objetivo del estudio, así como de la libre aceptación de su participación.

4.3.1. Criterios de inclusión

Hombres o mujeres con edad igual o superior a cincuenta años.

Pacientes con deterioro visual debido exclusivamente a la DMAEnv activa de reciente diagnóstico y no tratados previamente o tras haber transcurrido un periodo mínimo de seis meses tras la última inyección intravítrea de farmacoterapia anti-VEGF.

Pacientes con cualquier subtipo de DMAEnv independientemente de la medida de la lesión.

Pacientes con una puntuación en su AVMC basal entre 23 y 78 letras, ambas inclusive, medido mediante el optotipo ETDRS a cuatro metros (equivalente al optotipo Snellen 20/25 y 20/30).

Pacientes que otorguen su CI antes de proceder a cualquier evaluación y consientan expresamente la inclusión de los datos de su historia clínica, así como los resultantes de la participación en el estudio, en un fichero de datos personales bajo la responsabilidad del centro.

En el caso de que los dos ojos fueran elegibles en la visita basal, se incluyó en el estudio el ojo que tuviera la mejor capacidad de recuperación funcional a criterio del investigador.

4.3.2. Criterios de exclusión

Pacientes con accidente cerebrovascular o infarto agudo de miocardio en los seis meses previos a la selección del estudio.

Pacientes con presión arterial (PA) no controlada (PA sistólica >160 mmHg, PA diastólica >100 mmHg).

Pacientes que presentasen fibrosis central en el área macular que impidiera la recuperación de la AV.

Pacientes con sensibilidad conocida a ranibizumab o a cualquier otro componente de la formulación de ranibizumab.

Pacientes con cualquier inflamación periocular activa o inflamación ocular al inicio del estudio.

Pacientes con infecciones oculares y/o periorbitales activas.

Pacientes que presentasen cataratas (opacidades) de intensidad suficiente como para interferir con el seguimiento o que requirieran cirugía durante el estudio.

Pacientes con glaucoma no controlado (>30 mmHg) a pesar del máximo tratamiento con dos fármacos hipotensores oculares.

Pacientes con NV del iris o glaucoma neovascular al inicio del estudio.

Pacientes con afaquia, pseudoexfoliación, hemorragia vítrea severa, desprendimiento de retina regmatógeno, retinopatía diabética proliferativa o NV coroidea de cualquier otra causa que no fuera secundaria a la DMAEnv al inicio del estudio.

Pacientes con daños estructurales dentro de 0.5 diámetros de disco (DD) del centro de la mácula (por ejemplo, tracción vitreomacular, membrana epirretiniana, cicatrices, quemaduras con láser, atrofia foveal, rotura retiniana) al inicio del estudio que, en opinión del investigador, pudieran impedir la mejoría de la función visual con el tratamiento.

Pacientes sometidos a cualquier procedimiento intraocular (incluyendo la capsulotomía itrio-aluminio-granate) en los dos meses previos al inicio del estudio o que lo tuvieran previsto en los seis meses posteriores al inicio de este.

Pacientes con tratamiento ocular tópico o sistémico con corticoesteroides administrados durante al menos treinta días consecutivos en los tres meses anteriores a la selección.

Pacientes en tratamiento con cualquier fármaco que pudiera resultar tóxico para la retina y/o nervio óptico.

Pacientes en tratamiento con cualquier fármaco sistémico anti-VEGF en los tres meses previos al inicio del estudio.

Pacientes con incapacidad de cumplir con el estudio y los procedimientos de seguimiento.

4.4. Recogida de datos clínicos

Los datos clínicos recogidos de los pacientes incluidos en el presente estudio fueron los siguientes:

- Raza
- Fecha de diagnóstico de la enfermedad
- Historia previa de tratamiento de la DMAEnv
- Afectación unilateral o bilateral
- Ojo (lateralidad)
- Edad
- Sexo
- Factores de riesgo asociados a la DMAE:
 - DM
 - HTA
 - Dislipemia
 - Enfermedad coronaria
 - Hábito tabáquico⁽¹⁾
 - Hábito alcohólico⁽²⁾
 - Exposición a la luz ultravioleta⁽³⁾
 - Dieta saludable⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Tabaquismo activo.

⁽²⁾ Consumo de bebidas alcohólicas diario, independientemente de la cantidad.

⁽³⁾ Actividad laboral con exposición a luz ultravioleta y/o hábito de tomar el sol.

⁽⁴⁾ Control en la ingesta de grasas y/o adherencia a una dieta mediterránea, según criterio del paciente.

- AVMC (ETDRS)
- Presión intraocular (PIO) (medida en mmHg)

- Biomarcadores tomográficos:
 - ECR (μm)
 - Volumen macular (mm^3)
 - DEP
 - FIR
 - FSR
 - FQI
- Signos en la retina mediante exploración fundoscópica:
 - Hemorragia
 - Exudación
 - Atrofia
 - Fibrosis
- Características angiográficas de la MNV:
 - Localización de la lesión; subfoveal, yuxtafoveal o extrafoveal.
 - Tamaño de la lesión (DD)
 - Tipo o patrón de la lesión; PC, MC u O.

4.5. Visitas de estudio

Todos los pacientes desde su aceptación voluntaria para la participación en el estudio acudieron a las siguientes visitas en las que se realizaron los procedimientos indicados a continuación.

4.5.1. Visita número 1

Visita de selección.

Para confirmar el diagnóstico de DMAEnv y valorar si el paciente cumplía los criterios de inclusión se midió la AVMC (ETDRS) y la PIO, se realizó una exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura del polo anterior y posterior del ojo bajo midriasis farmacológica, se obtuvo una imagen mediante un dispositivo SD-OCT y se realizó una AGF previa firma del CI.

Para la inclusión en el estudio el paciente firmó dos copias del CI del estudio y se le hizo entrega de una de ellas.

La extracción de sangre y la visita número 2 se programaron un máximo de siete después de la visita número 1.

4.5.2. Visita número 2

Se programó un máximo de siete días después de la visita número 1 y una vez realizada la extracción de sangre.

Se midió la AVMC (ETDRS) y la PIO, se realizó una exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura del polo anterior y posterior del ojo bajo midriasis farmacológica, se obtuvo una imagen mediante un dispositivo SD-OCT y se administró la primera inyección de ranibizumab intravítreo (Lucentis®, Novartis, Basilea, Suiza).

4.5.3. Visita número 3

Se llevó a cabo con un intervalo de 28 ± 3 días de la visita número 2.

Se midió la AVMC (ETDRS) y la PIO, se realizó una exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura del polo anterior y posterior del ojo bajo midriasis farmacológica, se obtuvo una imagen mediante un dispositivo SD-OCT y se administró la segunda inyección de ranibizumab intravítreo (Lucentis®, Novartis, Basilea, Suiza).

4.5.4. Visita número 4

Se realizó con un intervalo de 28 ± 3 días de la visita número 3.

Se administró la tercera inyección de ranibizumab intravítreo (Lucentis®, Novartis, Basilea, Suiza).

4.5.5. Visita número 5

Se llevó a cabo con un intervalo de 28 ± 3 días de la visita número 4.

Se midió la AVMC (ETDRS) y la PIO, se realizó una exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura del polo anterior y posterior del ojo bajo midriasis farmacológica y se obtuvo una imagen mediante un dispositivo SD-OCT.

Fuera del estudio se programó el siguiente tratamiento anti-VEGF que requiriese el paciente.

4.6. Exploración

4.6.1. Agudeza visual

La toma de AV se realizó mediante un gráfico ETDRS que es considerado actualmente el test de referencia para la toma de AV y monitorización de la DMAE [138].

Para la inclusión en el estudio se precisó una AVMC entre 23 y 78 letras ETDRS, ambas inclusive.

Para la toma de AV se empleó la mejor corrección óptica para cada paciente y se realizó a una distancia de cuatro metros, siempre empleando el mismo optotipo y bajo las mismas condiciones lumínicas. De acuerdo con las recomendaciones se realizó siempre utilizando un procedimiento idéntico [135].

La puntuación ETDRS se normaliza a una distancia de prueba ETDRS teórica de un metro, lo que permite comparar directamente las puntuaciones ETDRS obtenidas a diferentes distancias de prueba. Por lo tanto, la puntuación ETDRS se determina contando el número de letras leídas en la tabla a una distancia determinada y luego sumando según la distancia a la que se realiza la prueba lo siguiente: +0, para la prueba a un metro; +15, para pruebas a dos metros; o +30, para pruebas a cuatro metros. Dado que la tabla ETDRS tiene un total de 70 letras el rango de AV comprobable a una distancia determinada varía [363]. En el presente estudio la AV se evaluó a cuatro metros por lo que la puntuación de la AV varió entre 31 y 100 letras.

La toma de AV se llevó a cabo en las visitas de estudio número 1, 2, 3 y 5.

4.6.2. Biomicroscopía con lámpara de hendidura

En este estudio todos los pacientes fueron examinados mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura en las visitas de estudio número 1, 2, 3 y 5.

Mediante el empleo de este instrumento se exploraron las estructuras de la parte anterior del ojo, se tomó la PIO y se exploró la parte posterior del ojo con el uso de lentes accesorias.

En la parte anterior del ojo se valoró la presencia de inflamación o infección activa, opacidades del cristalino (catarata), NV del iris, presencia de pseudoexfoliación, así como cualquier otra condición que fuera motivo de exclusión para la participación en el estudio.

Se midió la PIO utilizando el tonómetro de Goldmann integrado en la lámpara de hendidura. Se consideraron valores normales aquellos comprendidos entre 10 mmHg y 21 mmHg. Los pacientes con glaucoma no controlado (PIO \geq 30 mmHg) a pesar del máximo tratamiento con dos fármacos hipotensores oculares, así como los pacientes con glaucoma neovascular, fueron excluidos del estudio.

La exploración de la parte posterior del ojo (vítreo, nervio óptico y retina) se realizó bajo midriasis farmacológica instilando colirio de tropicamida 0.5% (Alcon Laboratories Inc, Forth Worth EE. UU.) y se emplearon lentes accesorias de 78 dioptrías o de 90 dioptrías (Volk Optical Inc, Mentor, EE. UU.). Se valoró la presencia de inflamación o infección activa, hemorragia vítrea, desprendimiento de retina, retinopatía diabética proliferativa o NV secundaria a otra patología diferente a la DMAEnv, daños estructurales dentro de 0.5 DD del centro de la mácula y cualquier otra condición que fuera motivo de exclusión. En cada visita de estudio se tomó como dato la presencia o ausencia de cada uno de los siguientes signos fundoscópicos en la retina:

- Hemorragia
 - Extravasación de sangre del complejo neovascular localizado sub-EPR, subretiniano, intrarretiniano, u ocasionalmente, en compartimentos prerretinianos [5].
- Lípidos (exudados duros)
 - Lipoproteínas precipitadas relacionadas con la fuga vascular crónica, característica exudativa de la MNV [5].
- Áreas de atrofia
 - Ausencia de una monocapa de EPR clínicamente normal frecuentemente acompañada de la pérdida concomitante de la retina

externa [5]. Las áreas de atrofia se identificaron clínicamente como zonas bien demarcadas de disminución del grosor de la retina en comparación con la retina circundante, con un cambio relativo en el color que permite una mayor visualización de los vasos coroideos subyacentes [123].

- Fibrosis
 - Acumulación en cualquier capa de la retina, en el espacio subretiniano, en la monocapa del EPR o en el espacio sub-EPR, de tejido con una importante deposición de colágeno [5].

En algunos de los pacientes incluidos en el estudio se obtuvieron imágenes mediante el uso de FFC para el registro de estos hallazgos, aunque no se realizó de forma rutinaria ni protocolizada.

4.6.3. Angiografía con fluoresceína

La AGF se llevó a cabo para detectar la presencia y determinar la localización, tamaño y tipo o patrón de MNV. Si no estuvo contraindicada por la existencia de riesgos sistémicos, fue rutinariamente obligatoria. Se realizó en la visita número 1 de estudio.

Previamente a su realización el paciente fue informado verbalmente y por escrito, mediante un documento de CI, del riesgo potencial asociado a la prueba. El lugar dónde se realizó la prueba contó con un plan de atención en situación de emergencia y un protocolo claro para minimizar los riesgos y manejar las complicaciones.

Para la realización de esta prueba se empleó el angiógrafo Spectralis HRA (Heidelberg Engineering, Vista, California, EE. UU.). Previamente a la inyección del contraste de fluoresceína se instiló colirio de tropicamida 0.5% (Alcon Laboratories Inc, Forth Worth EE. UU) para obtener una buena dilatación de la pupila. Posteriormente se procedió a canalizar una vena periférica, antecubital o del dorso de la mano, con un catéter de 23 G tipo palomita. Se realizó la inyección de fluoresceína (5 mL de solución al 10%) durante unos cuatro segundos y tras seis-ocho segundos se comenzó con la toma de fotografías.

Las MNVs se clasificaron según su comportamiento angiográfico en tipo o patrón:

- PC, membrana con patrón en rueda de carro y cuya extensión es mayor del 50% del tamaño de la lesión.
- MC, membrana con patrón en rueda de carro y cuya extensión es menor del 50% del tamaño de la lesión.
- O, no se evidencia patrón típico en rueda de carro y puede apreciarse como hiperfluorescencia tardía de origen indeterminado o como desprendimiento fibrovascular del EPR.

Todos los angiogramas fueron evaluados por dos especialistas en retina. El tamaño total de la lesión incluyó la MNV, la sangre, la fluorescencia bloqueada y el desprendimiento seroso del EPR, y fue medido en DD. La localización se consideró subfoveal para las lesiones ubicadas directamente debajo del centro geométrico de la zona avascular foveal (ZAF), yuxtafoveal para aquellas lesiones situadas entre 1 μm y 199 μm del centro geométrico de la ZAF y extrafoveal para aquellas lesiones situadas mínimo a 200 μm del centro geométrico de la ZAF.

4.6.4. Tomografía de coherencia óptica

En este estudio la exploración de los pacientes mediante OCT se realizó con OCT modelo Cirrus™ HD-OCT, Carl Zeiss, Meditec, Dublin, CA, EE. UU., en las visitas de estudio número 1, 2, 3 y 5. Esta prueba se realizó tras la toma de la AVMC y la exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura, así como tras la medición de la PIO. Las imágenes se obtuvieron bajo dilatación con colirio de tropicamida 0.5% (Alcon Laboratories Inc, Forth Worth EE. UU.).

El protocolo de exploración empleado fue el *macular cube* 512x128. Este programa realiza 512 cortes *B-scans* (axiales) con 128 *A-scans* (verticales) por cada corte sobre un área macular central de 6 mm x 6 mm. Posteriormente, el programa ofrece un mapa de espesores con sectores concéntricos que conforman las nueve regiones del mapa macular ETDRS [364] (Figura 19).

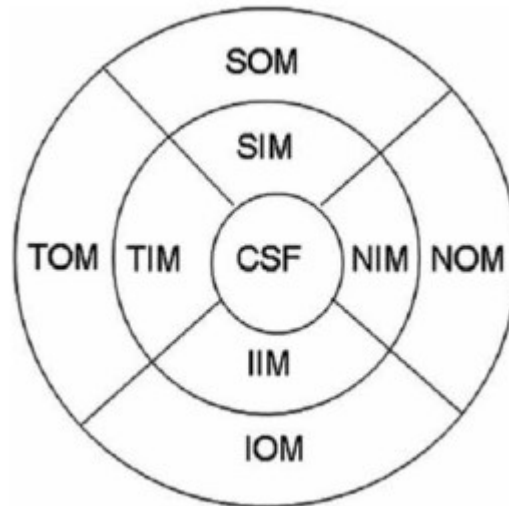


Figura 19. Diagrama con las 9 regiones del mapa macular ETDRS. Los círculos concéntricos son de 1 mm, 3 mm y 6 mm de diámetro. 1= CST: *Central Subfield Thickness* (grosor del subcampo central). 2= SIM: *Superior Inner Macula* (mácula interna superior). 3 = TIM: *Temporal Inner Macula* (mácula interna temporal). 4= IIM: *Inferior Inner Macula* (mácula interna inferior). 5= NIM: *Nasal Inner Macula* (mácula interna nasal). 6 = SOM: *Superior Outer Macula* (mácula externa superior). 7= TOM: *Temporal Outer Macula* (mácula externa temporal). 8= IOM: *Inferior Outer Macula* (mácula externa inferior). 9= NOM: *Nasal Outer Macula* (mácula externa nasal) [364].

El volumen del cubo y el espesor medio del cubo son generados por algoritmos internos de Cirrus que comparan el estudio realizado al paciente con el estudio macular normal.

La evaluación de la actividad neovascular mediante los datos que se extrajeron del análisis de las imágenes obtenidas mediante SD-OCT fueron de dos tipos, mediciones cuantitativas y observaciones cualitativas. Estos biomarcadores tomográficos se analizaron en todas las visitas en las que se obtuvieron imágenes (visitas número 1, 2, 3 y 5) y fueron los siguientes:

- ECR; medición en μm del espacio entre la MLI y el EPR, o membrana de Bruch.
- Volumen macular; multiplicación del grosor medio por un área. Se mide en mm^3 .
- DEP; separación del EPR de la membrana de Bruch.
- FIR; definido como engrosamiento difuso de la retina.

- FSR; espacio hiporreflectivo localizado entre la retina neurosensorial y el EPR.
- FQI; fluido intrarretiniano organizado en espacios quísticos hiporreflectivos.

4.7. Inyección de ranibizumab intravítreo

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados con ranibizumab intravítreo (Lucentis®, Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza) a una concentración de 0.5 mg en 0.05 ml mediante el uso de jeringa precargada. Al contener esta jeringa 0,165 ml, el exceso de volumen se expulsó antes de cada inyección para administrar la dosis recomendada de 0.5 mg.

Previamente al inicio del tratamiento con ranibizumab todos los pacientes fueron informados de los posibles beneficios y riesgos del fármaco, así como leyeron y firmaron el documento de CI.

El número de inyecciones administradas en el estudio fue de tres separadas por un intervalo de tiempo de 28 ± 3 días, lo que se conoce como dosis de “fase de carga”. Las inyecciones posteriores se programaron fuera del estudio.

Las inyecciones fueron administradas en las visitas de estudio número 2, 3 y 4. En la visita número 2 y 3 la inyección se administró tras la toma de AV, toma de PIO, exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura y toma de imagen mediante un dispositivo de OCT. La visita número 4 consistió exclusivamente en la administración del fármaco.

El procedimiento se realizó en quirófano en condiciones estériles estándar. La anestesia utilizada fue colirio de lidocaína al 5% administrado tópicamente. Para la reducción de la flora bacteriana de la superficie ocular y de los párpados se empleó povidona iodada al 10% en piel y 5% en saco conjuntival. El personal médico encargado de la realización de la inyección usó mascarilla quirúrgica y guantes estériles, los ojos a tratar fueron aislados con paño quirúrgico fenestrado y se empleó blefarostato. La inyección se realizó vía pars plana en el cuadrante temporal inferior y el calibre de las agujas empleadas fue de 30 G. La distancia al limbo a la que se inyectó fue de 3.5 mm o 4 mm según si el paciente era pseudofáquico o fáquico, respectivamente. Tras la

administración del fármaco se comprobó la percepción luminosa y/o visión de objetos.

4.8. Evaluación de la respuesta

Se evaluó la respuesta morfológica mediante los cambios observados en las imágenes de SD-OCT y la presencia o ausencia de hemorragia retiniana en la exploración del fondo de ojo, como indicador de actividad de la enfermedad, y la respuesta funcional según el cambio en la AVMC (ETDRS). Se asignó a cada paciente el tipo de respuesta en función de la combinación de parámetros morfológicos y/o funcionales. Los resultados observados a los 28 ± 3 días de la tercera inyección de ranibizumab (Lucentis®, Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza) fueron los que se correlacionaron con el perfil de expresión génica para establecer su capacidad predictiva de respuesta a la terapia.

La clasificación de la respuesta de los pacientes se basó en el sistema de clasificación propuesto por Amoaku y cols. el cual tiene en cuenta criterios morfológicos y funcionales [365] (Tabla 10).

Tabla 10. Respuesta a la terapia anti-VEGF en DMAEnv [365]. FSR= Fluido Subretiniano. FIR= Fluido Intrarretiniano. FQI= Fluido Quístico Intrarretiniano. ECR= Espesor Central de la Retina. AV= Agudeza Visual.

RESPUESTA	MORFOLÓGICA	FUNCIONAL
BUENA (Morfológica o funcional)	Ausencia de FSR, FIR, y FQI o reducción del ECR >75% y ausencia de hemorragia	Mejoría AV > 5 letras
PARCIAL (Morfológica y funcional)	Reducción del ECR del 25-75% y presencia de FSR o FIR o FQI y ausencia de hemorragia	Mejoría AV 0-5 letras
POBRE (Morfológica y funcional)	Reducción del ECR del 0-25% y presencia de FSR o FIR o FQI y ausencia de hemorragia	Pérdida AV 0-4 letras
NO RESPUESTA (Morfológica o funcional)	No cambio o aumento del ECR y presencia de FSR o FIR o FQI o presencia de hemorragia	Pérdida AV \geq 5 letras

Los pacientes fueron clasificados como buenos respondedores si presentaron una respuesta buena o parcial, es decir, cuando en la exploración mostraron resolución del FIR, FSR, reducción del ECR y/o mejora en la AVMC de al menos 5 letras ETDRS y ausencia de hemorragia. Y como pobres respondedores si la respuesta fue pobre o no hubo respuesta, es decir, fueron pacientes que mostraron una reducción inferior al 25% del ECR respecto al basal, con persistencia o aparición de nuevo FIR, FSR o ausencia o mínimo cambio en la AVMC (menos de 5 letras ETDRS) tras la terapia anti-VEGF.

4.9. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se extrajeron muestras de sangre y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) utilizando un protocolo estándar para la extracción y purificación de RNA. La sangre se colocó en tubos BD Vacutainer CPT que contenían citrato de sodio y solución Ficoll™ Hypaque™ (BD-Bioscience, Madrid, España). Las PBMCs se recogieron mediante centrifugación a 1.800 xg durante diez minutos a temperatura ambiente. Luego, las PBMCs se lavaron en una solución salina con tampón fosfato (PBS - / -), se centrifugaron a 300 xg durante diez minutos y se cuantificaron. Finalmente, las PBMCs se almacenaron a -80 °C tras su resuspensión en reactivo TRIzol (Invitrogen, Madrid, España).

4.10. Purificación de RNA

El RNA total se extrajo y purificó de acuerdo con los protocolos publicados [366]. Se aisló RNA y miRNA usando TRIzol (Invitrogen, Madrid, España) y el mini-kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). Las muestras se trataron con DNasa I (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de ácido nucleico se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU) y se sometió a secuenciación de próxima generación.

4.11. Secuenciación de próxima generación

La secuenciación completa del transcriptoma se realizó de acuerdo con los protocolos del fabricante y utilizando sus reactivos (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) como se describió anteriormente [366]. Se utilizó un sistema de electroforesis automatizado (Experion; Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) para comprobar la integridad y la calidad del total. Se fragmentó un µg de RNA en piezas de aproximadamente 200 pares de bases (pb) utilizando cationes divalentes a temperatura elevada. Los fragmentos de RNA escindidos se trataron con transcriptasa inversa y primers aleatorios para generar la primera hebra de DNA complementario (cDNA). La segunda hebra se obtuvo usando DNA polimerasa I y RNasa H. Los fragmentos de cDNA se repararon en los extremos

mediante DNA polimerasa de Klenow y DNA polimerasa T4. Luego, el cDNA fue fosforilado por polinucleótido quinasa T4 y adaptadores de indexación ligados (Illumina, Madrid, España). Las bibliotecas de genes etiquetadas con adaptador se amplificaron mediante PCR con DNA polimerasa (Phusion; Finnzymes Reagents, Vantaa, Finlandia) y se validaron y cuantificaron mediante electroforesis y qPCR. Se mezclaron conjuntos de 4-6 bibliotecas indexadas en proporciones equimolares para producir una concentración de mezcla de oligonucleótidos total de 10 nM. Las bibliotecas finales se secuenciaron en una plataforma HiSeq 1500 (Illumina, Madrid, España) para generar lecturas de extremos emparejados de 2x125 pb.

4.12. Análisis transcriptómico y bioinformática

Para los análisis transcriptómicos se utilizaron datos de lecturas crudas obtenidos de los flujos de trabajo de secuenciación de Illumina. En primer lugar, se limpiaron los datos de adaptadores y secuencias de baja calidad en función de las puntuaciones de calidad informadas. El mapeo se realizó utilizando el alineador STAR (<https://github.com/alexdobin/STAR> fecha de acceso 1 de abril de 2021) [367]. Las lecturas mapeadas se contaron utilizando FeatureCounts (<http://subread.sourceforge.net/> fecha de acceso 1 de abril de 2021) descartando las lecturas de mapeo múltiple [368]. Los análisis estadísticos se realizaron en R utilizando dos paquetes de análisis de expresión diferencial (ED) diferentes: edgeR y DESeq2. Los resultados se verificaron de forma cruzada entre ambos métodos para obtener un conjunto de genes expresados diferencialmente.

Todas las muestras secuenciadas se clasificaron en los dos grupos de pacientes definidos (buenos respondedores y pobres respondedores) para realizar contrastes de modelos. La clasificación de género se incluyó en el modelo estadístico como una variable de confusión que no se utilizó para el contraste. Las lecturas se normalizaron utilizando la metodología predeterminada de cada paquete. Los resultados estadísticos del contraste del modelo se enumeraron y filtraron por valor de p (<0.01) para estudiar las alteraciones más relevantes entre los grupos. Además, se aplicó un filtro más amplio para analizar el enriquecimiento de la vía por la mayoría de los genes

alterados (valor de $p < 0,05$) utilizando la base de datos de la vía de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) [369] [370] [371].

Las lecturas de miRNA se obtuvieron siguiendo los protocolos de secuenciación de Illumina de manera similar a la secuenciación de RNA. En primer lugar, se limpiaron los datos de adaptadores y secuencias de baja calidad en función de las puntuaciones de calidad informadas. Después de eso, se utilizó la herramienta miRDeep2 (<https://github.com/rajewskylab/mirdeep2> fecha de acceso 1 de abril de 2021) para mapear, cuantificar y analizar el enriquecimiento de miRNA descritos en humanos en miRBase (<https://www.mirbase.org> fecha de acceso 1 de abril de 2021) [372]. Se realizaron análisis de expresión diferencial de miRNAs sobre recuentos normalizados de miRDeep utilizando el paquete estadístico edgeR. La configuración del análisis se basó en los mismos grupos y criterios que el análisis de ED de RNA. Los resultados también se filtraron por valor de p para identificar los miRNA más relevantes alterados entre los grupos.

4.13. Procesamiento de datos y selección de características

Todo el procesamiento de datos y experimentos de aprendizaje automático se realizaron utilizando herramientas de procesamiento de datos de código abierto (disponibles en Weka Machine Learning 3, <https://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka> fecha de acceso 1 de abril de 2021). En primer lugar, se utilizó un algoritmo de evaluación de atributos para reducir los conjuntos de genes utilizados para el modelado de clasificación. Ese proceso se aplicó para ambos conjuntos de datos (RNA y miRNA) utilizando dos enfoques diferentes: modelo de puntuación de minimización de entropía para cada atributo y algoritmo de selección de características basado en correlación. El conjunto resultante del algoritmo de selección de características basado en correlación cumple la condición de ser el conjunto de atributos mínimos que no comprometen el rendimiento de clasificación del modelo. Para este estudio, se eligió el área bajo la curva (AUC) de la característica operativa del receptor (ROC) para medir el rendimiento de clasificación del modelo. El AUC también se utilizó como parámetro de rendimiento en el paso de procesamiento de datos. Las firmas y

sus modelos se probaron de forma independiente utilizando técnicas de validación cruzada de 10 veces.

5. Resultados

5.1. Descripción de la cohorte

Cincuenta y nueve pacientes fueron clasificados como “buenos respondedores” o “pobres respondedores” según los criterios morfológicos y funcionales descritos en el apartado "Material y Métodos". Previamente al tratamiento no hubo diferencias entre estos grupos en cuanto a la edad, sexo, DM, HTA, dislipidemia, enfermedad coronaria, dieta, consumo de tabaco o alcohol, exposición solar, ojo afectado, PIO, ECR, volumen del cubo macular, DEP, LIR, LSR, FQI, hemorragia, exudación o fibrosis. Sin embargo, los "pobres respondedores" mostraron una proporción más alta de atrofia del EPR que los “buenos respondedores” ($p=0.011$) (Tabla 11), es decir, sólo el 23% de los pacientes con atrofia del EPR tuvieron una buena respuesta al tratamiento con ranibizumab mientras que el 64% de los pacientes sin atrofia del EPR mostraron una buena respuesta. Los datos cuantitativos se expresarán a lo largo de este trabajo como media \pm error estándar de la media.

Tabla 11. Características demográficas y anatómicas basales. Los valores de p se calcularon mediante la prueba exacta de Fisher. UV= Ultravioleta. AV= Agudeza Visual. PIO= Presión Intraocular. EPR= Epitelio Pigmentario de la Retina. DD= Diámetro de Disco. MNV= Membrana Neovascular. PC= Predominantemente Clásico. MC= Mínimamente Clásico. O= Oculto.

	Todos	Pobres respondedores	Buenos respondedores	Valor p
<i>Naïve</i>	47/59	21/26	26/33	1,000
Ambos ojos afectados (si/no)	5/54	0/26	5/33	0,061
Edad (años)	78,03+/- 1,055	80,04+/-1,379	76,45+/-1,504	0,092
Sexo (masculino/femenino)	24/35	8/18	16/17	0,193

	Diabetes mellitus (si/no)	6/53	2/24	4/29	0,685	
	Hipertensión arterial (si/no)	43/16	19/7	24/9	1,000	
	Dislipemia (si/no)	25/34	11/15	14/19	1,000	
	Enfermedad coronaria (si/no)	13/46	5/21	8/25	0,757	
	Tabaco (si/no)	23/36	8/18	15/18	0,292	
	Alcohol (si/no)	14/45	5/21	9/24	0,548	
	Exposición luz UV (si/no)	19/40	8/18	11/22	1,000	
	Dieta grasa (si/no)	5/54	1/25	4/29	0,372	
	Ojo afectado (derecho/izquierdo)	34/25	17/9	17/16	0,305	
OCT	Pre-tratamiento	AV (ETDRS)	63,61+/-1,131	62,73+/-1,791	64,30+/-1,464	0,495
		PIO (mmHg)	17,26+/-0,386	17,12+/-0,6687	17,39+/-0,4653	0,734
		Espesor central de la retina (µm)	329,18+/-15,495	325,2+/-28,09	332,4+/-17,7	0,820
		Volumen macular (mm ³)	10,333+/-0,176	10,37+/-0,3137	10,30+/-0,2004	0,839
		Desprendimiento del EPR (si/no)	43/16	20/6	23/10	0,571
		Fluido intrarretiniano (si/no)	48/11	22/4	26/7	0,740
		Fluido subretiniano (si/no)	43/16	17/9	26/7	0,377
		Fluido quístico intrarretiniano (si/no)	35/24	16/10	19/14	0,795

Fundoscopia	Hemorragia (si/no)	28/31	15/11	13/20	0,196
	Exudación (si/no)	8/51	2/24	6/27	0,446
	Atrofia (si/no)	13/46	10/16	3/30	0,011
	Fibrosis (si/no)	4/55	2/24	2/31	1,000
AGF	Localización (Sub/Yuxta/Extra-foveal)	16/35/5	9/16/0	7/19/5	0,085
	Tamaño (DD)	1,03+/- 0,130	1,193+/-0,2181	0,9150+/-0,1585	0,297
	Tipo o patrón de la MNV (PC/MC/O)	22/8/26	9/3/14	13/5/12	0,577

La AVMC basal de todo el grupo previamente al inicio del tratamiento fue de $63,61 \pm 1,131$ letras ETDRS. En el grupo de pacientes pobres respondedores la AVMC pretratamiento fue de $62,73 \pm 1,791$ letras ETDRS y en el grupo de pacientes buenos respondedores fue de $64,30 \pm 1,464$ letras ETDRS, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,495$) (Figura 20).

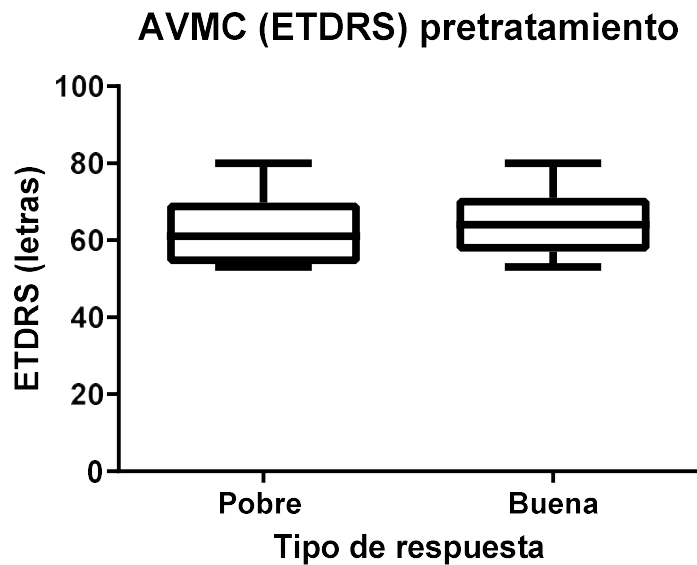


Figura 20. Medida de la agudeza visual mejor corregida (AVMC) mediante la escala ETDRS en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando la AVMC en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

La AVMC al primer mes tras el inicio del tratamiento fue de 62,88 letras ETDRS en el grupo de pacientes pobres respondedores y de 67,36 letras ETDRS en el grupo de pacientes buenos respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,1237$) (Figura 21).

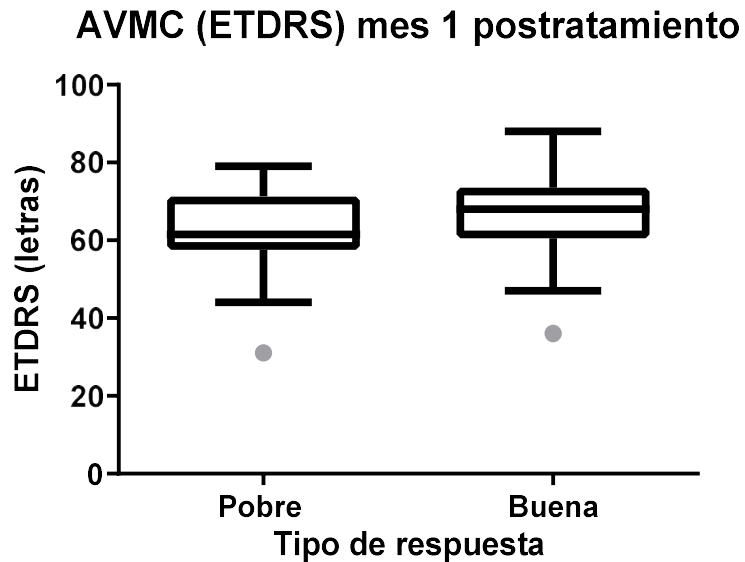


Figura 21. Medida de la agudeza visual mejor corregida (AVMC) mediante la escala ETDRS en el grupo de pacientes pobres respondedores y buenos respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando la AVMC en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al primer mes tras inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

La AVMC al tercer mes tras el inicio del tratamiento fue de 62,12 letras ETDRS en el grupo de pacientes pobres respondedores y de 70,18 letras ETDRS en el grupo de pacientes buenos respondedores, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,0104$) (Figura 22).

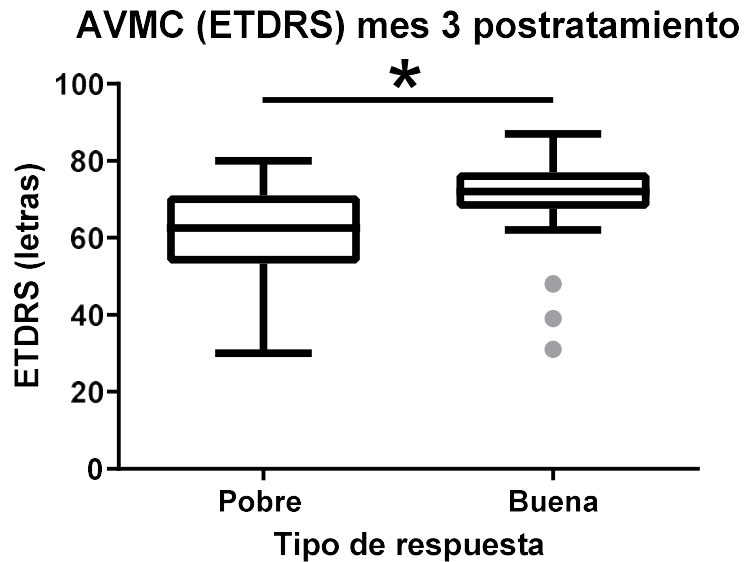


Figura 22. Medida de la agudeza visual mejor corregida (AVMC) mediante la escala ETDRS en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando la AVMC en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. *: $p<0.05$.

En este estudio previamente, al primer mes y tercer mes del inicio del tratamiento, se analizaron los siguientes biomarcadores tomográficos: ECR (μm), volumen macular (mm^3) y presencia o ausencia de DEP, FIR, FSR y FQI.

El ECR medio previo al inicio del tratamiento de los 59 pacientes incluidos fue de $329,18 \pm 15,495 \mu\text{m}$. El ECR en el grupo de pacientes pobres respondedores fue de $325,2 \pm 28,09 \mu\text{m}$ y en el de pacientes buenos respondedores de $332,4 \pm 17,7 \mu\text{m}$, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,820$) (Figura 23).

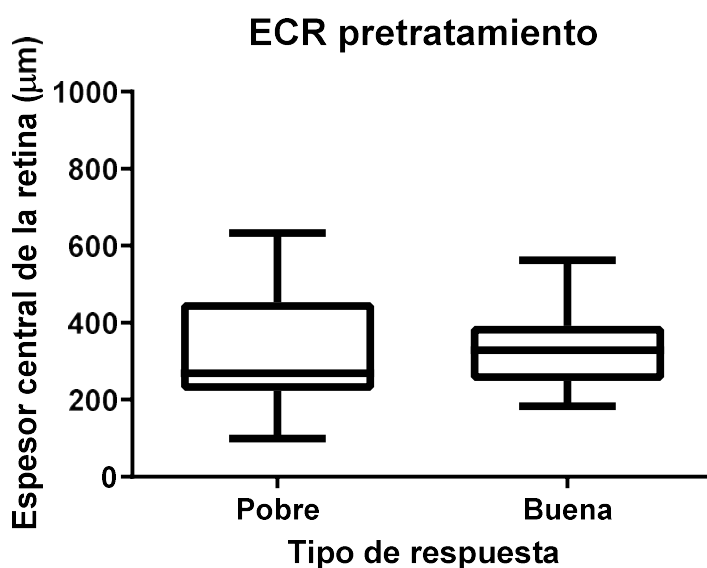


Figura 23. Medida del espesor central de la retina (ECR) en μm en el grupo de pacientes con pobre y buena respuesta previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando el ECR en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al primer mes tras el inicio del tratamiento el ECR medio fue de 257,6 μm en el grupo de pacientes pobres respondedores y de 253,3 μm en el grupo de pacientes buenos respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,0854$) (Figura 24).

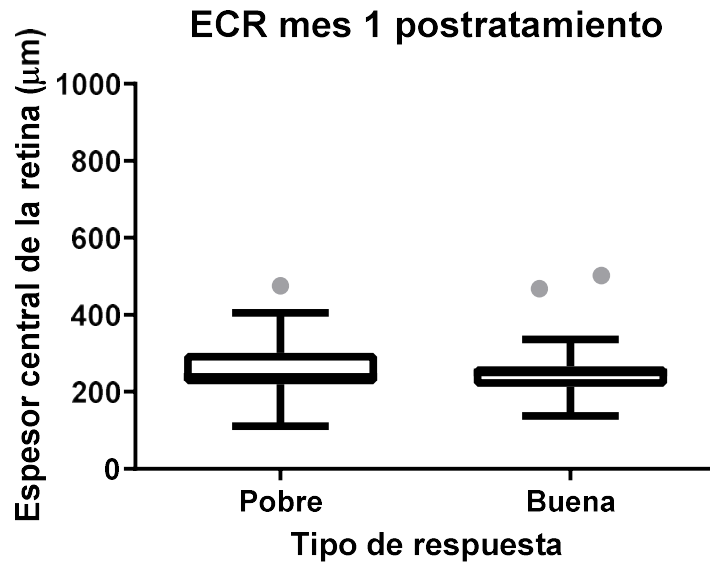


Figura 24. Medida del espesor central de la retina (ECR) en μm en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando el ECR en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al tercer mes tras el inicio del tratamiento el ECR medio fue de 250,5 μ m en el grupo de pacientes pobres respondedores y de 246,4 μ m en el grupo de pacientes buenos respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,8011$) (Figura 25).

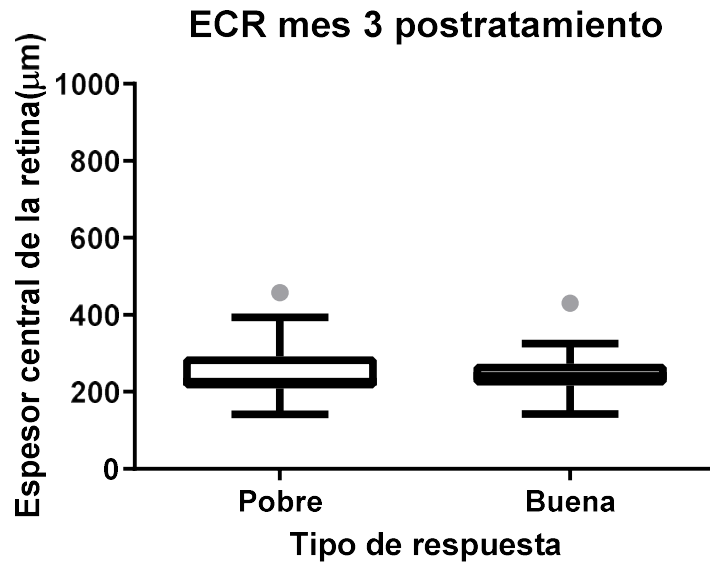


Figura 25. Medida del espesor central de la retina (ECR) en μ m en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando el ECR en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Previamente al inicio del tratamiento el volumen macular medio de todo el grupo fue de $10,333 \pm 0,176 \text{ mm}^3$. El grupo de pacientes pobres respondedores presentó un volumen macular medio de $10,37 \pm 0,3137 \text{ mm}^3$ y el grupo de pacientes buenos respondedores de $10,30 \pm 0,2004 \text{ mm}^3$, sin encontrar diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,839$) (Figura 26).

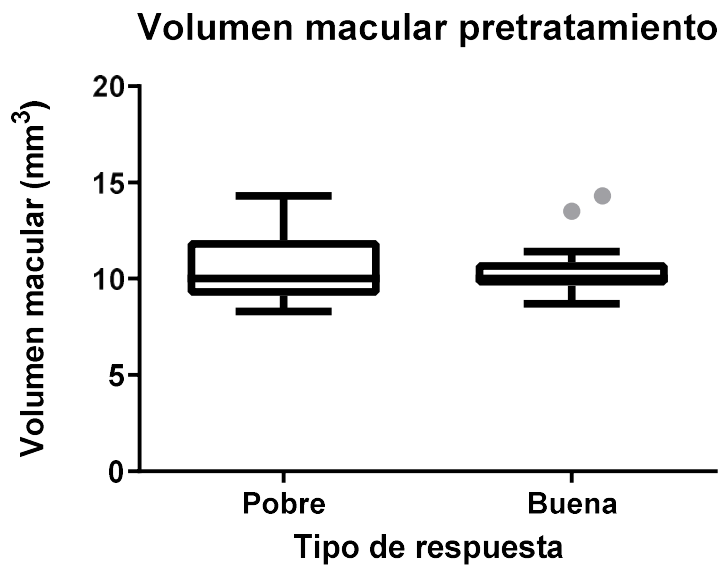


Figura 26. Medida del volumen macular en mm^3 en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando el volumen macular en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al primer mes tras el inicio del tratamiento el volumen macular medio fue de 9,58 mm³ en el grupo de pacientes pobres respondedores y de 9,476 mm³ en el grupo de pacientes buenos respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (p=0,7166) (Figura 27).

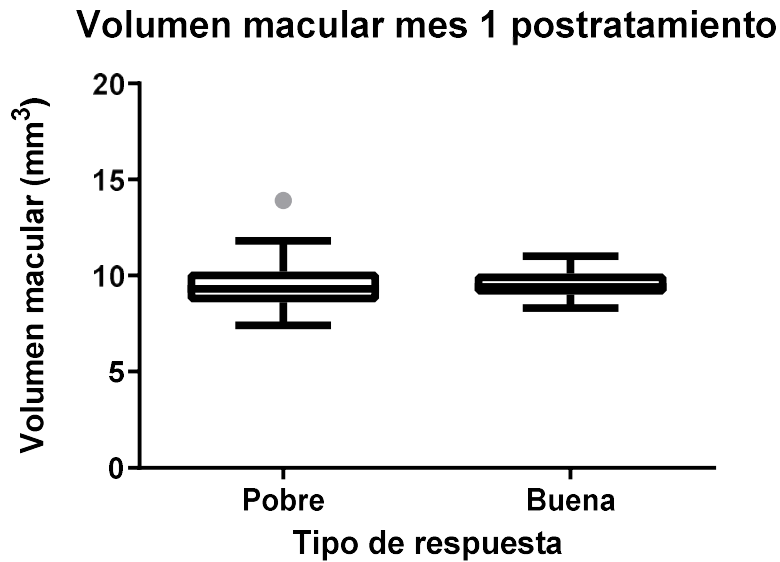


Figura 27. Medida del volumen macular en mm³ en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al primer mes del inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando el volumen macular en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al primer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al tercer mes tras el inicio del tratamiento el volumen macular medio fue de 9,269 mm³ en el grupo de pacientes pobres respondedores y de 9,400 mm³ en el grupo de pacientes buenos respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (p=0,5943) (Figura 28).

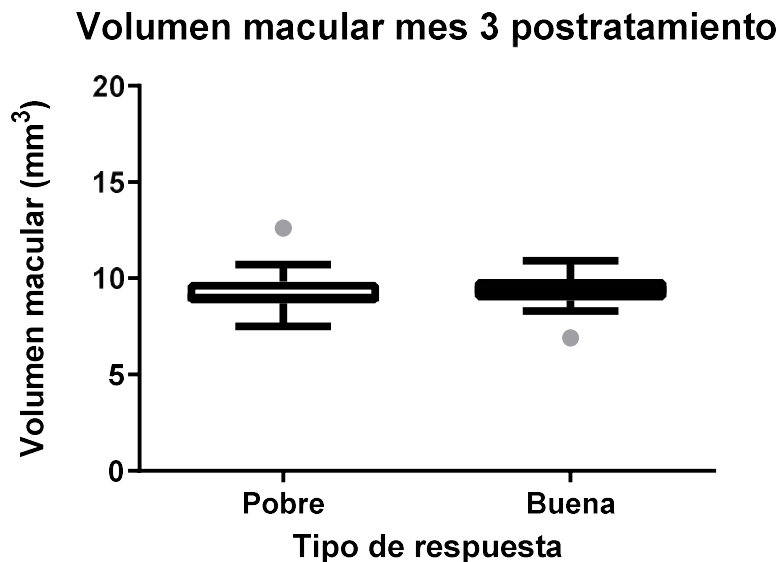


Figura 28. Medida del volumen macular en mm³ en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de Caja-Bigotes de la tabla de contingencia representando el volumen macular en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Previamente al inicio del tratamiento el DEP estuvo presente en 43 del total de los 59 ojos incluidos en el estudio. Se identificó la presencia de DEP en 20 pacientes del grupo de pobres respondedores y en 23 pacientes del grupo de buenos respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,571$) (Figura 29).

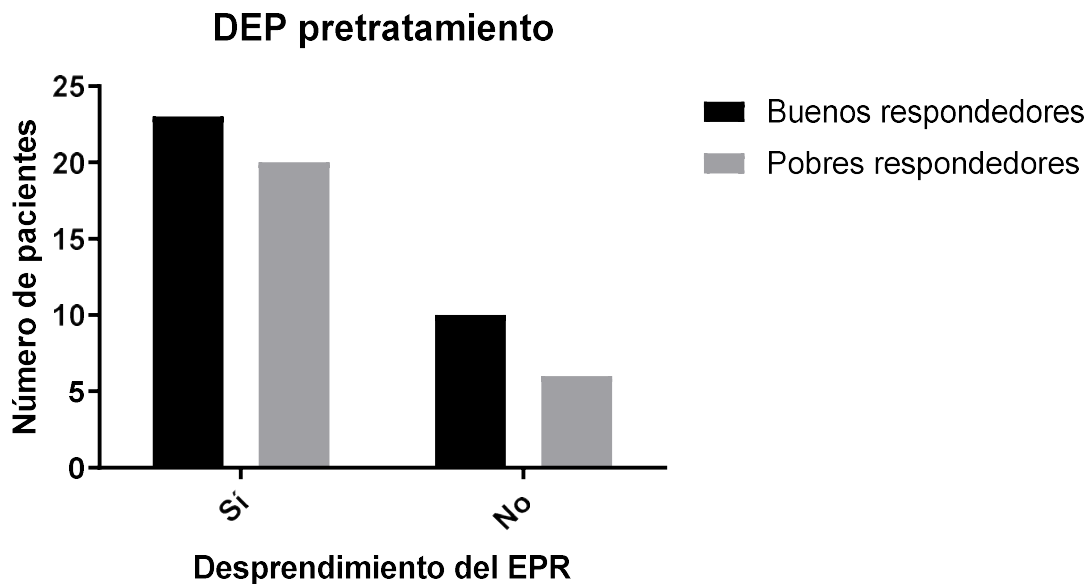


Figura 29. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (DEP) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el DEP en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al primer mes tras el inicio del tratamiento el DEP estuvo presente en 22 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 21 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó DEP en 11 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 5 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,5943$) (Figura 30).

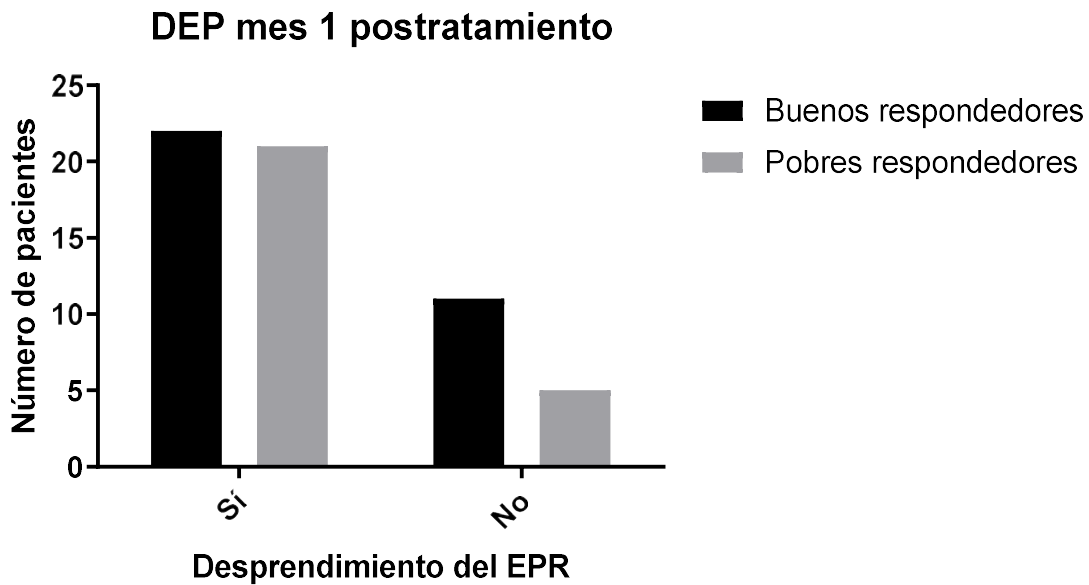


Figura 30. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (DEP) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el DEP en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al tercer mes tras el inicio del tratamiento el DEP estuvo presente en 19 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 18 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó DEP en 14 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 8 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,4232$) (Figura 31).

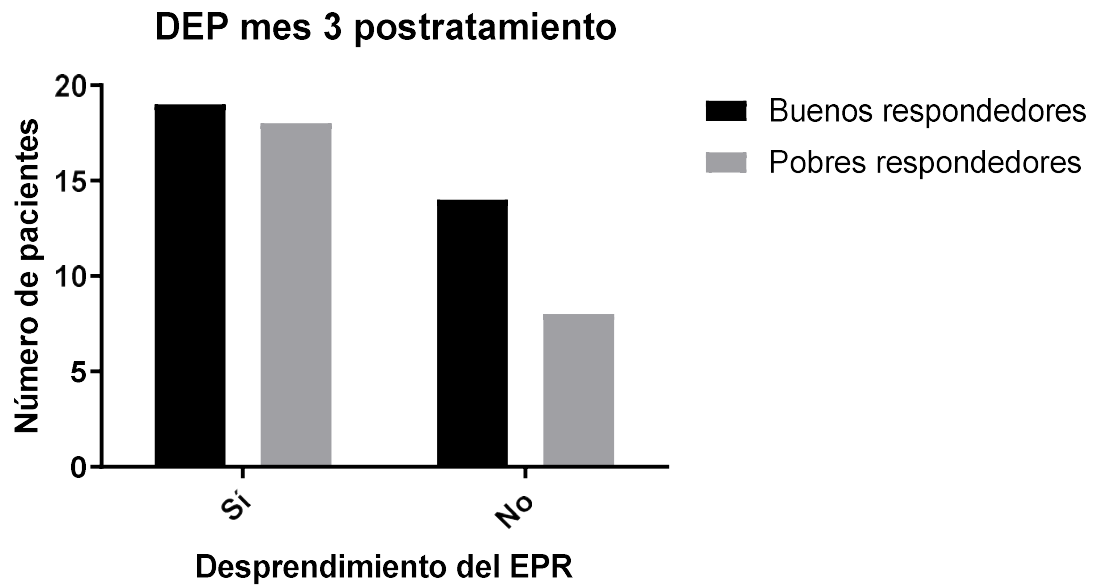


Figura 31. Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (DEP) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el DEP en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Previamente al inicio del tratamiento la presencia de FIR se detectó en 48 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en el estudio. El FIR se identificó en 22 pacientes del grupo de pobres respondedores y en 26 pacientes del grupo de buenos respondedores. No se detectó FIR en 7 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 4 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,740$) (Figura 32).

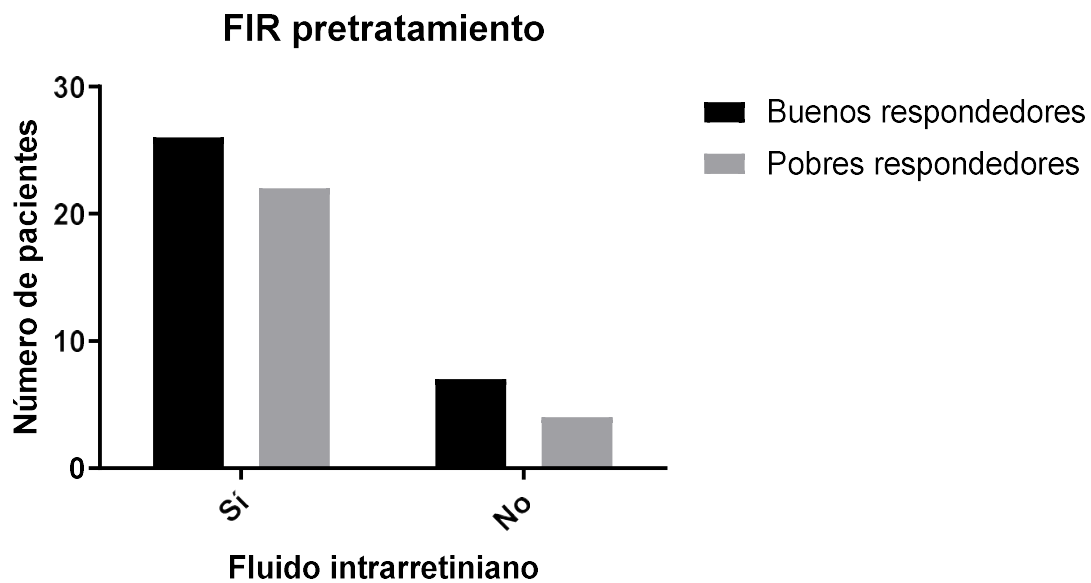


Figura 32. Fluido intrarretiniano (FIR) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FIR en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al primer mes tras el inicio del tratamiento la presencia de FIR se detectó en 22 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 16 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FIR en 11 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 10 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (0,7864) (Figura 33).

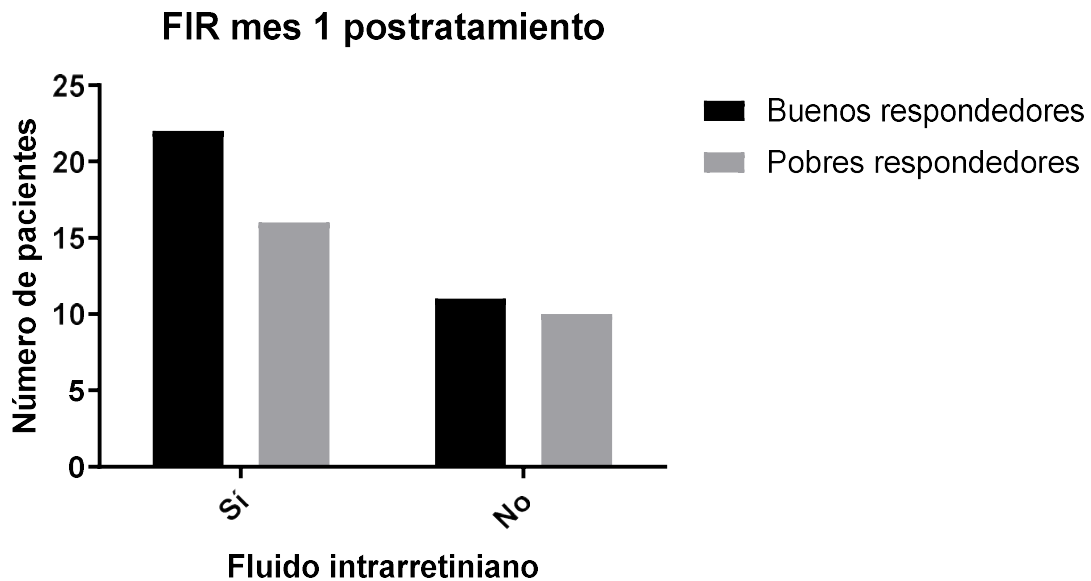


Figura 33. Fluido intrarretiniano (FIR) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FIR en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al tercer mes tras el inicio del tratamiento la presencia de FIR se detectó en 12 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 15 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FIR en 21 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 11 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (0,1215) (Figura 34).

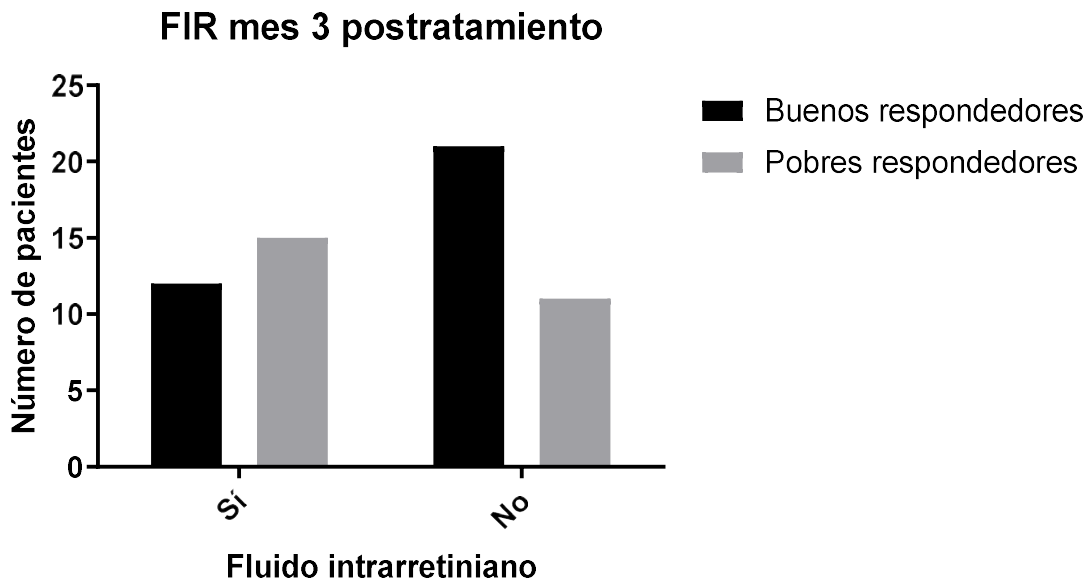


Figura 34. Fluido intrarretiniano (FIR) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FIR en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Previamente al inicio del tratamiento el FSR estuvo presente en 43 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en este estudio. Se detectó FSR en 26 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 17 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FSR en 7 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 9 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,377$) (Figura 35).

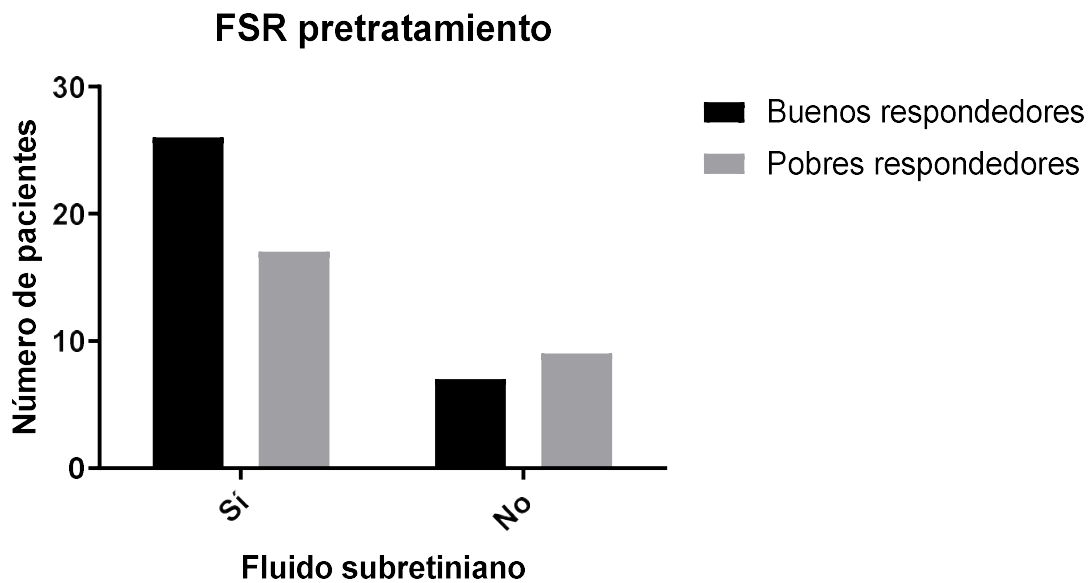


Figura 35. Fluido subretiniano (FSR) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FSR en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al primer mes tras el inicio del tratamiento se detectó FSR en 12 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 15 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FSR en 21 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 11 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (0,0622) (Figura 36).

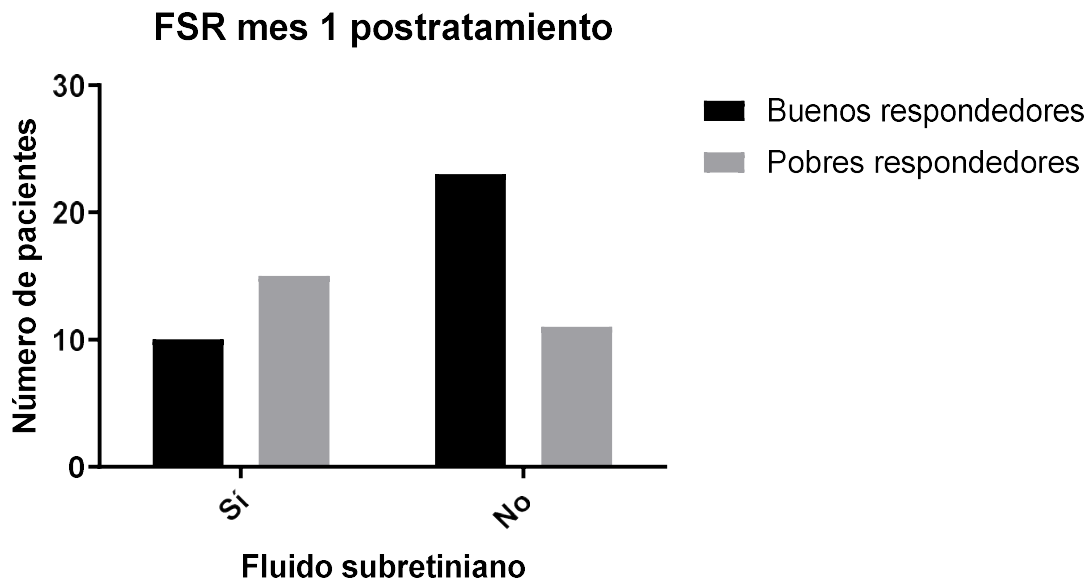


Figura 36. Fluido subretiniano (FSR) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FSR en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al tercer mes tras el inicio del tratamiento la presencia de FSR se detectó en 8 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 10 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FSR en 25 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 16 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (0,2678) (Figura 37).

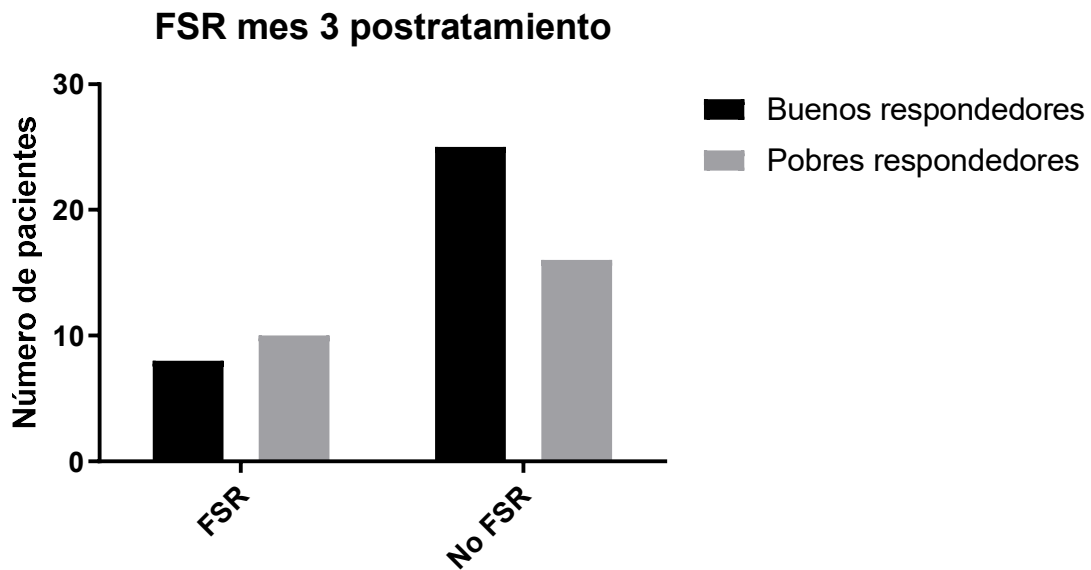


Figura 37. Fluido subretiniano (FSR) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FSR en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Previamente al inicio del tratamiento la presencia de FQI se detectó en 35 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en este estudio. El FQI se identificó en 19 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 16 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FQI en 14 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 10 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,795$) (Figura 38).

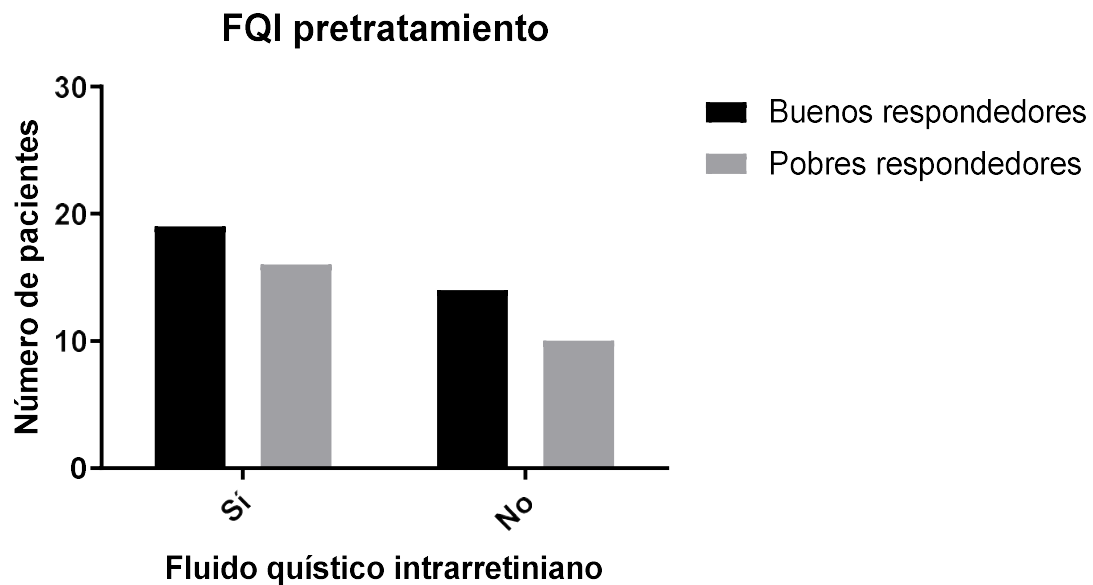


Figura 38. Fluido quístico intrarretiniano (FQI) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FQI en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al primer mes tras el inicio del tratamiento la presencia de FQI se detectó en 5 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 10 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FQI en 28 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 16 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (0,0693) (Figura 39).

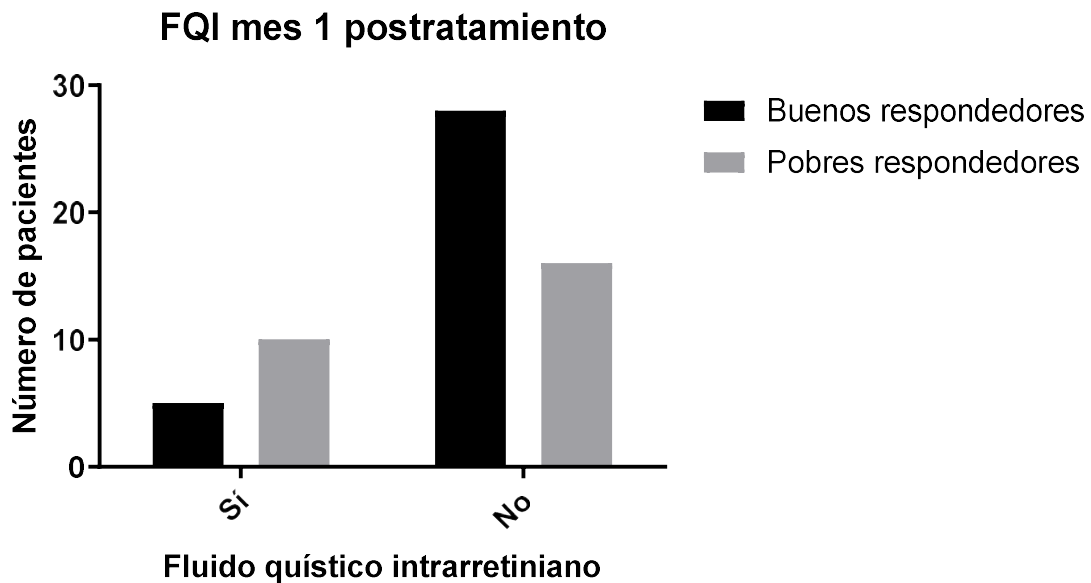


Figura 39. Fluido vítreo intrarretiniano (FQI) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FQI en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al tercer mes tras el inicio del tratamiento se detectó FQI en 3 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 13 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó FQI en 30 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 13 pacientes del grupo de pobres respondedores, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,0008$) (Figura 40).

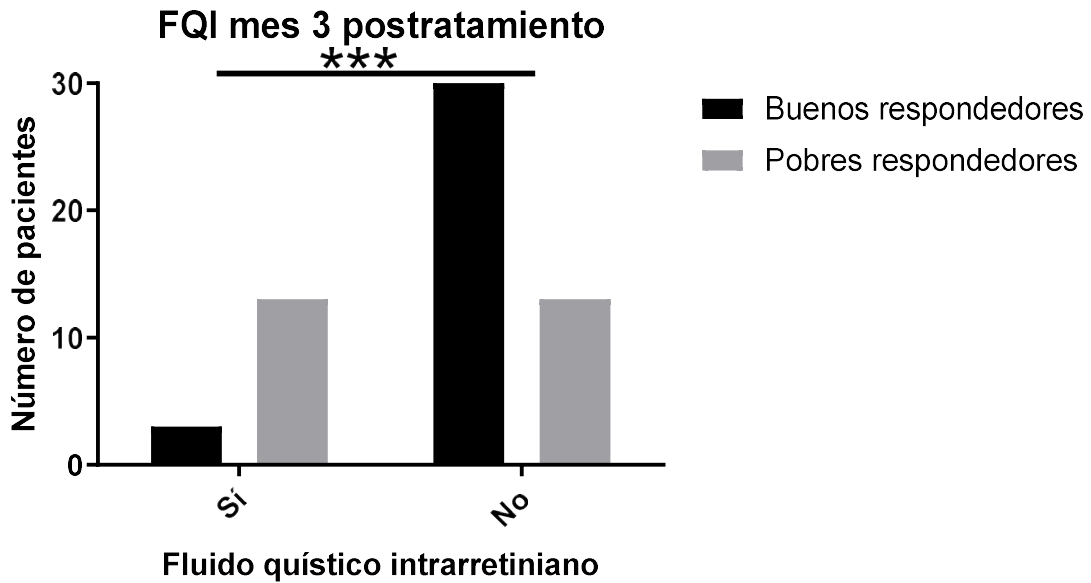


Figura 40. Fluido quístico intrarretiniano (FQI) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el FQI en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. ***: $p<0,001$.

En la exploración fundoscópica de los pacientes se detectó la presencia o ausencia en la retina de hemorragia, exudación, atrofia y/o fibrosis.

Previamente al inicio del tratamiento la hemorragia estuvo presente en 28 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en este estudio, se detectó en 15 pacientes del grupo de pobres respondedores y en 13 pacientes del grupo de buenos respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,196$) (Figura 41).

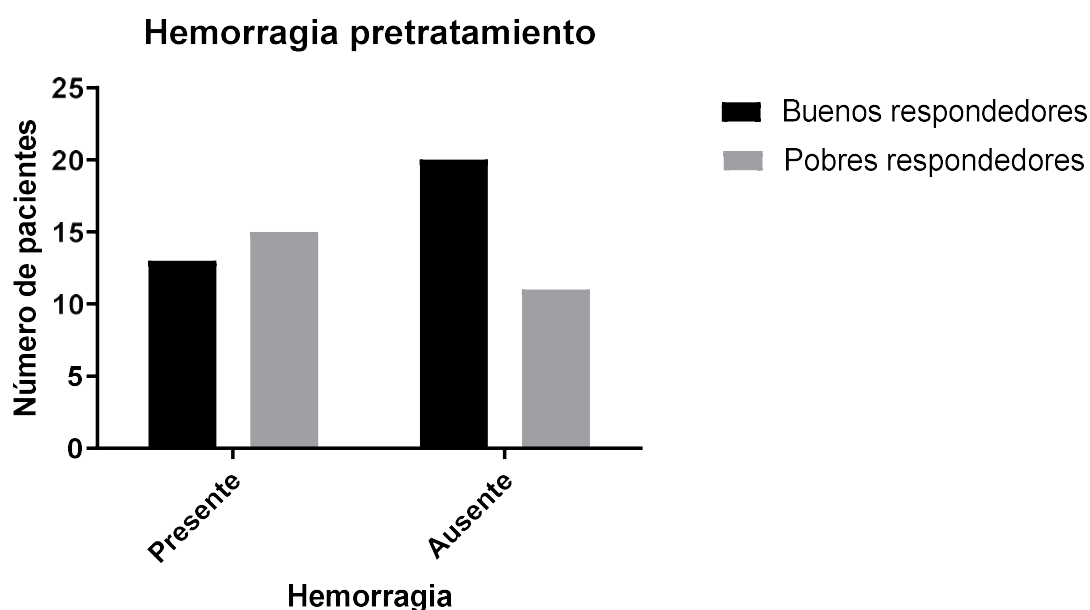


Figura 41. Hemorragia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de hemorragia en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

La presencia de hemorragia al primer mes tras el inicio del tratamiento se identificó en 10 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 15 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se identificó hemorragia en 23 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 11 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,0622$) (Figura 42).

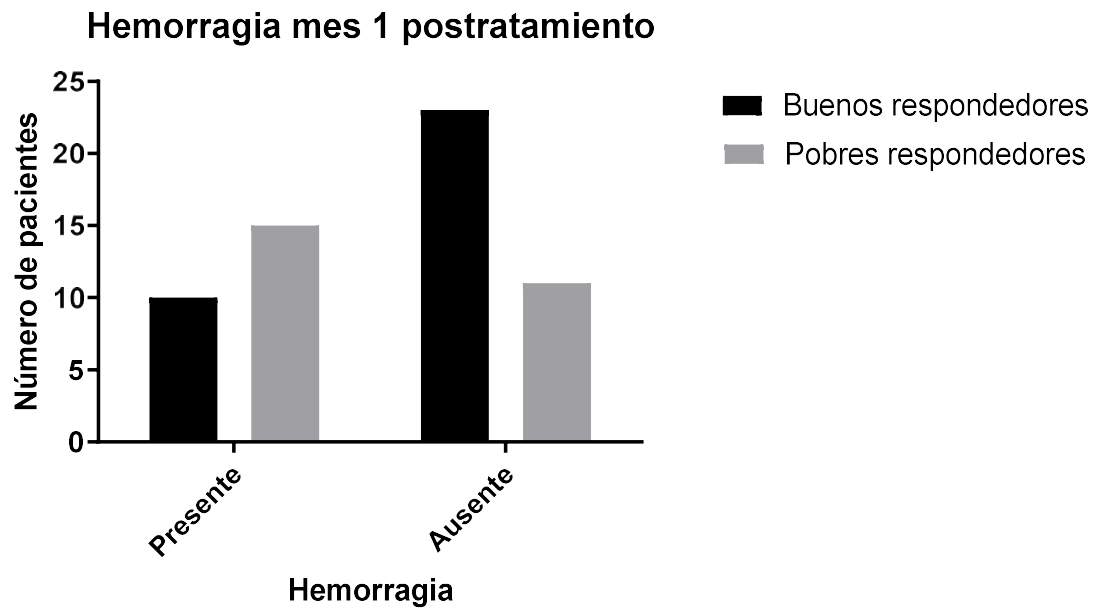


Figura 42. Hemorragia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de hemorragia en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

La hemorragia al tercer mes tras el inicio del tratamiento estuvo presente en 1 paciente del grupo de buenos respondedores y en 12 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó hemorragia en 32 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 14 pacientes del grupo de pobres respondedores, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0,0001$) (Figura 43).

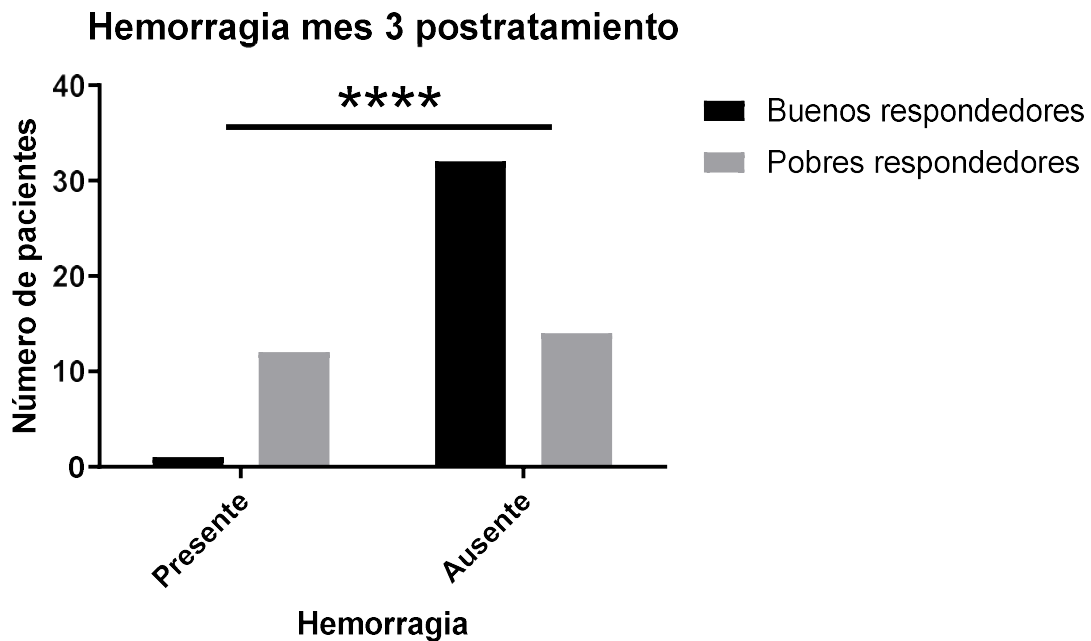


Figura 43. Hemorragia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de hemorragia en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. ****: $p < 0.0001$.

Previamente al inicio del tratamiento la exudación estuvo presente en 8 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en el presente estudio. En el grupo de pacientes pobres respondedores se detectó exudación en 2 pacientes y en el grupo de pacientes buenos respondedores en 6 pacientes, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,446$) (Figura 44).

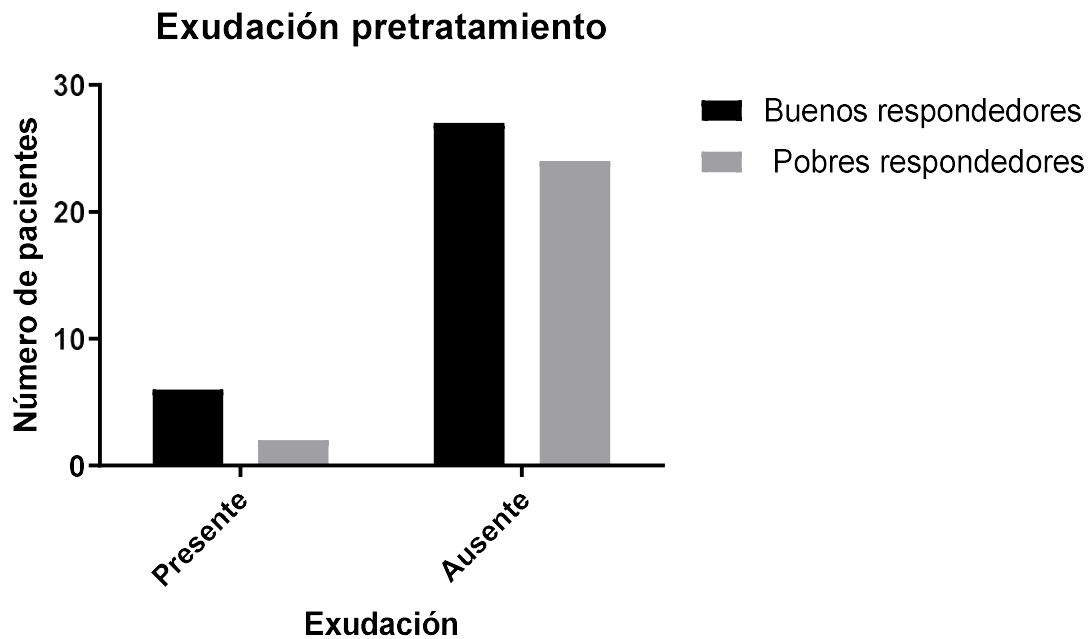


Figura 44. Exudación en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de exudación en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

La exudación al primer mes tras el inicio del tratamiento se detectó en 4 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 1 paciente del grupo de pobres respondedores. No se detectó exudación en 29 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 25 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,3716$) (Figura 45).

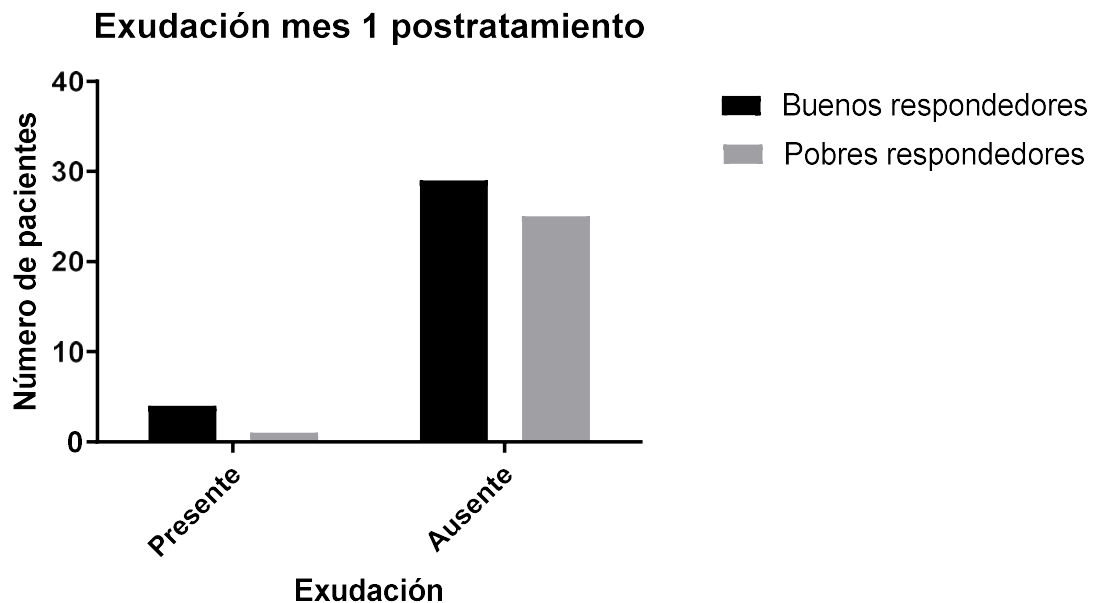


Figura 45. Exudación en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes del inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de exudación en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

La exudación al tercer mes tras el inicio del tratamiento estuvo presente en 3 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 2 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó exudación en 30 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 24 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.9999$) (Figura 46).

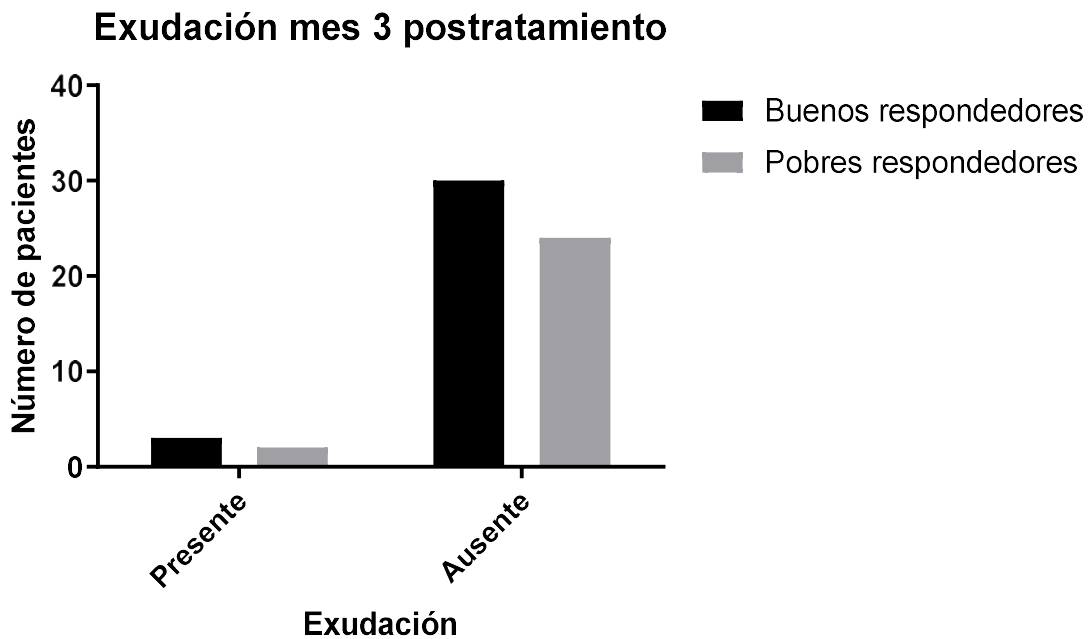


Figura 46. Exudación en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de exudación en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Previamente al inicio del tratamiento la presencia de atrofia se identificó en 13 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en este estudio. En el grupo de pacientes buenos respondedores la atrofia estuvo presente en 3 pacientes y en el grupo de pobres respondedores en 10 pacientes, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,011$) (Figura 47).

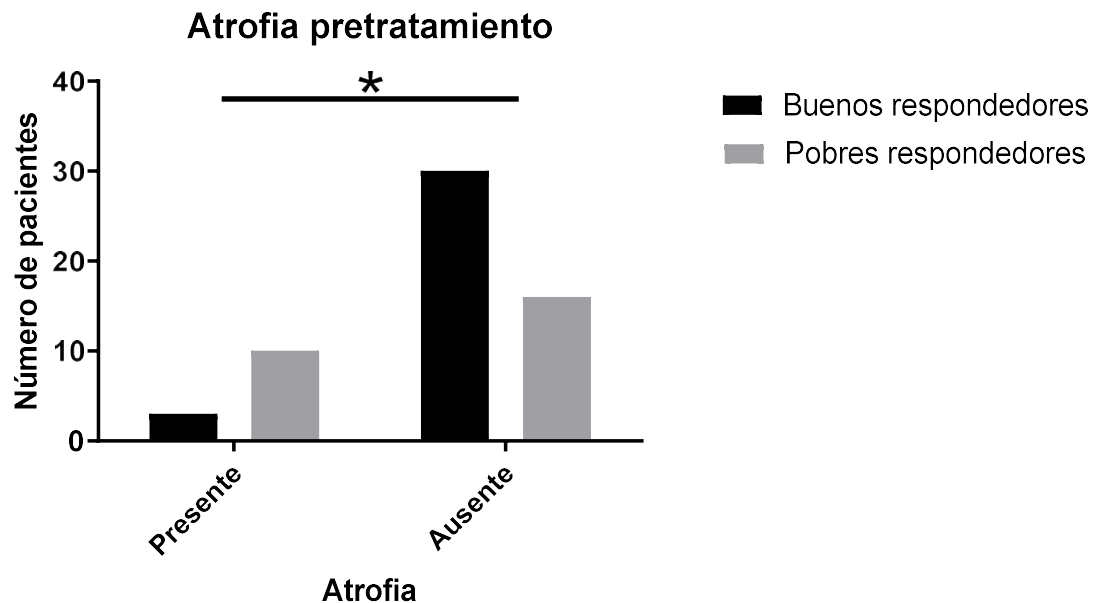


Figura 47. Atrofia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de atrofia en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. *: $p<0.05$.

Al primer mes tras inicio del tratamiento se detectó atrofia en 5 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 12 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se identificó atrofia en 28 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 14 pacientes del grupo de pobres respondedores, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,019$) (Figura 48).

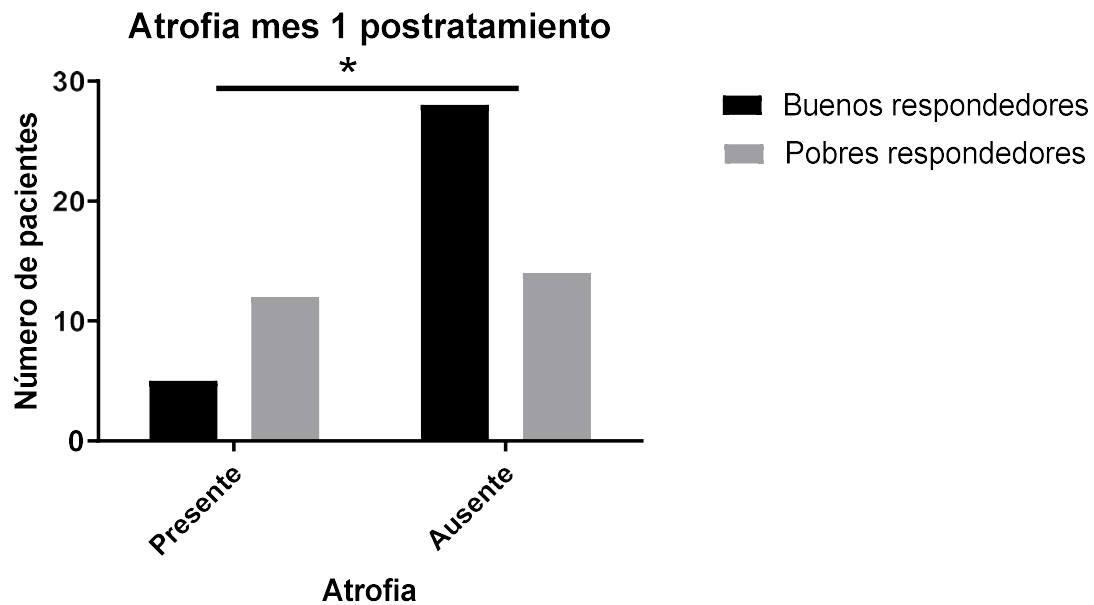


Figura 48. Atrofia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de atrofia en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. *: $p<0.05$.

La presencia de atrofia al tercer mes tras el inicio del tratamiento se detectó en 7 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 13 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se identificó atrofia en 26 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 13 pacientes del grupo de pobres respondedores, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,0279$) (Figura 49).

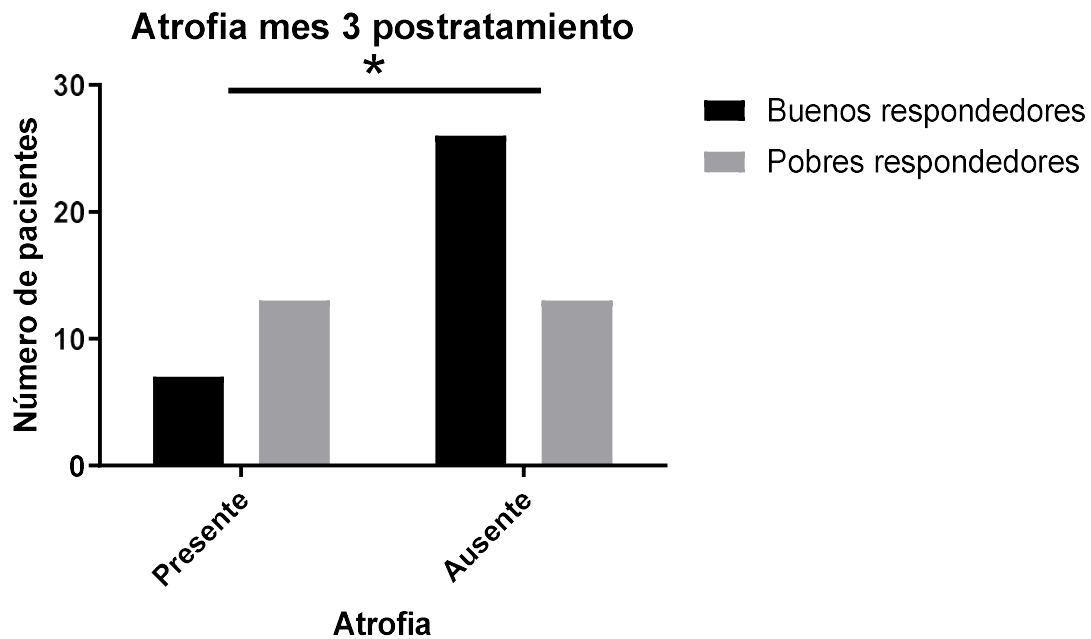


Figura 49. Atrofia en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de atrofia en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. *: $p<0.05$.

Previamente al inicio del tratamiento la fibrosis estuvo presente en 4 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en este estudio. Se identificó fibrosis en 2 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 2 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=1,000$) (Figura 50).

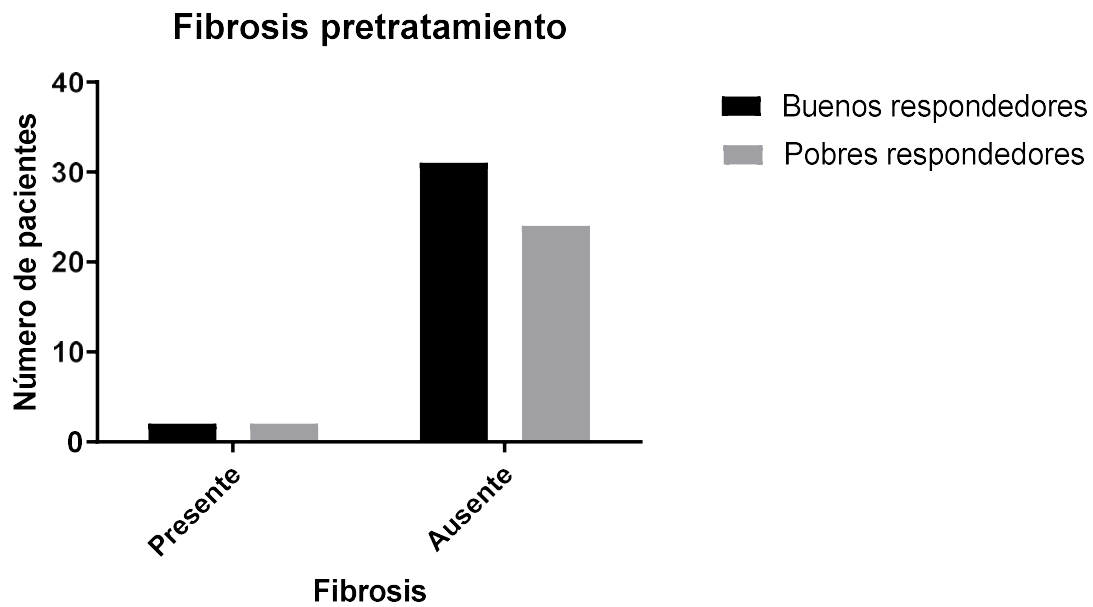


Figura 50. Fibrosis en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de fibrosis en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al primer mes tras el inicio del tratamiento se identificó fibrosis en 3 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 4 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó fibrosis en 30 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 22 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,6881$) (Figura 51).

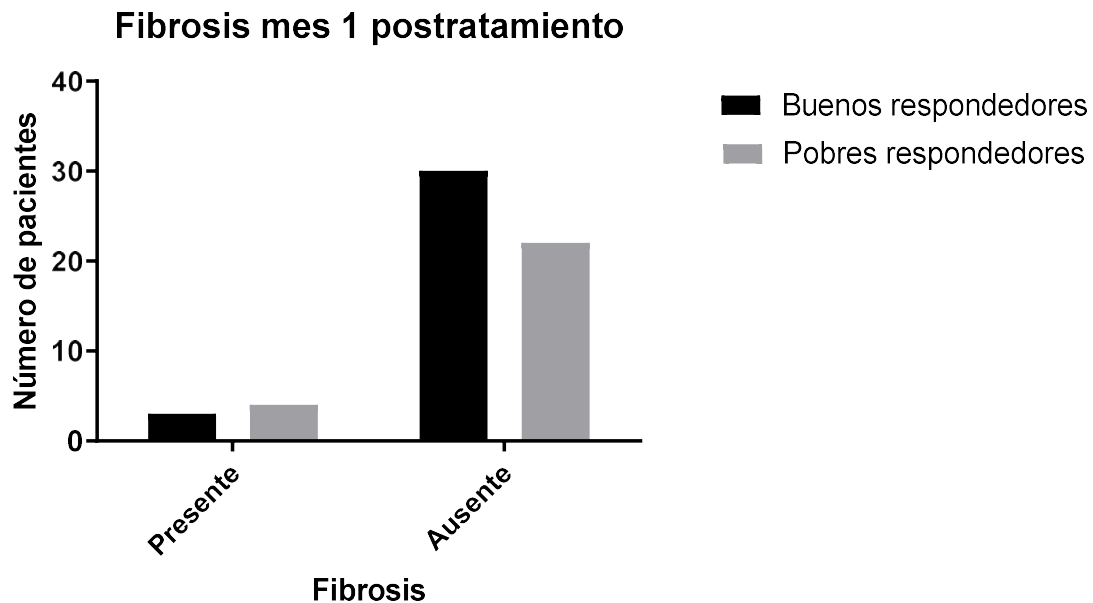


Figura 51. Fibrosis en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de fibrosis en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al primer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Al tercer mes tras el inicio del tratamiento la fibrosis estuvo presente 3 pacientes del grupo de buenos respondedores y en 6 pacientes del grupo de pobres respondedores. No se detectó fibrosis en 30 pacientes del grupo de buenos respondedores ni en 20 pacientes del grupo de pobres respondedores, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,1638$) (Figura 52).

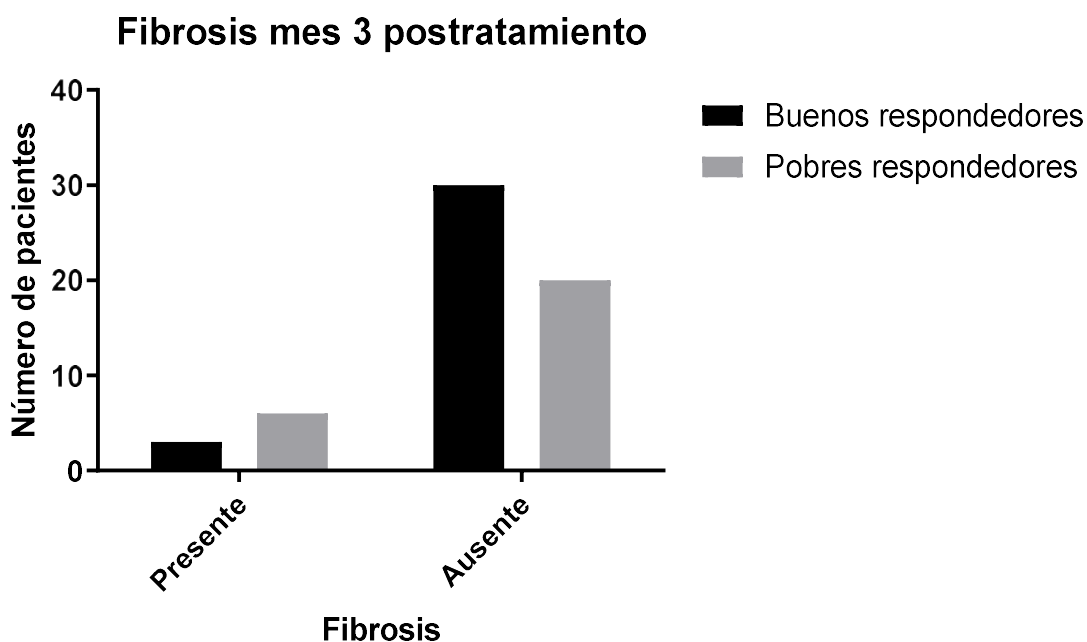


Figura 52. Fibrosis en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes tras el inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la presencia o ausencia de fibrosis en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores al tercer mes del inicio del tratamiento. Se utilizó el test exacto de Fisher para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

El estudio mediante AGF se realizó en 56 pacientes del total de los 59 pacientes incluidos en este estudio. La existencia de contraindicaciones para la realización de esta prueba fue el motivo por el que no se realizó en tres del total de los pacientes incluidos. Mediante esta prueba se evaluó la localización, el tamaño y el tipo o patrón de MNV.

En cuanto a la localización de las lesiones, del total de los 56 pacientes estudiados mediante AGF se identificaron 16 MNVs subfoveales, 35 MNVs yuxtafoveales y 5 MNVs extrafoveales. En el grupo de pacientes buenos respondedores hubo 7 MNVs subfoveales, 19 MNVs yuxtafoveales y 5 MNVs extrafoveales. En el grupo de pacientes pobres respondedores hubo 9 MNVs subfoveales, 16 MNVs yuxtafoveales y ninguna extrafoveal. Sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,085$) (Figura 53).

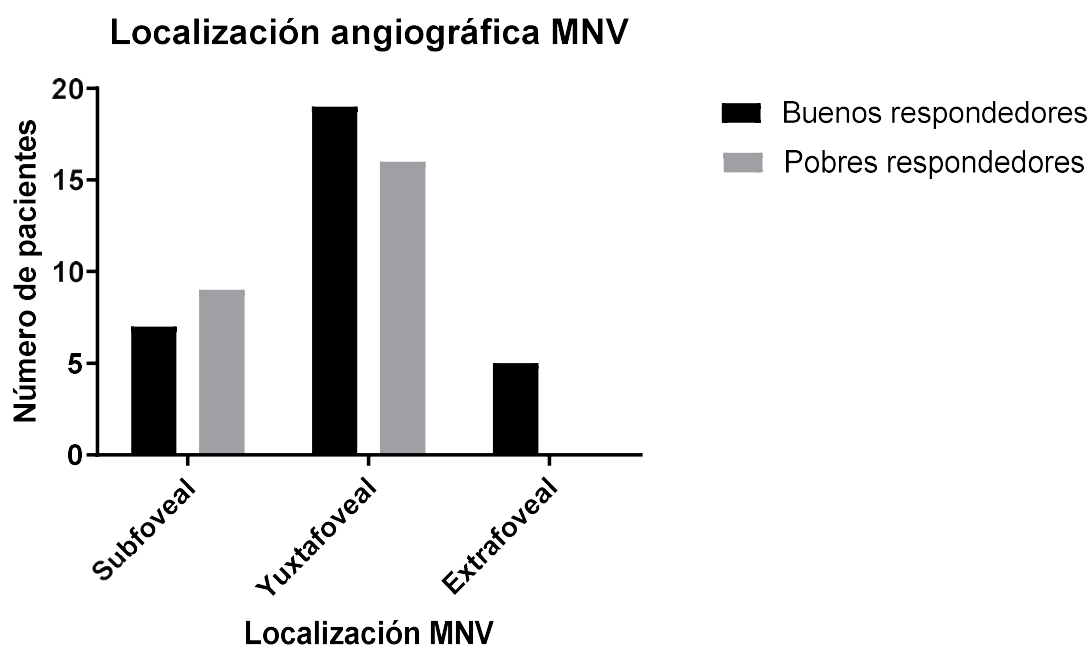


Figura 53. Localización angiográfica de las membranas neovasculares (MNVs) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando la localización de las MNVs (subfoveal, yuxtafoveal o extrafoveal) en el grupo de pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test Chi-cuadrado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

Previamente al inicio del tratamiento el tamaño de las MNVs se midió en DD. El tamaño medio de estas lesiones fue de $1,03 \pm 0,130$ DD. En el grupo de pacientes pobres respondedores el tamaño fue de $1,193 \pm 0,2181$ DD y en el grupo de pacientes buenos respondedores fue de $0,9150 \pm 0,1585$ DD, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,297$) (Figura 54).

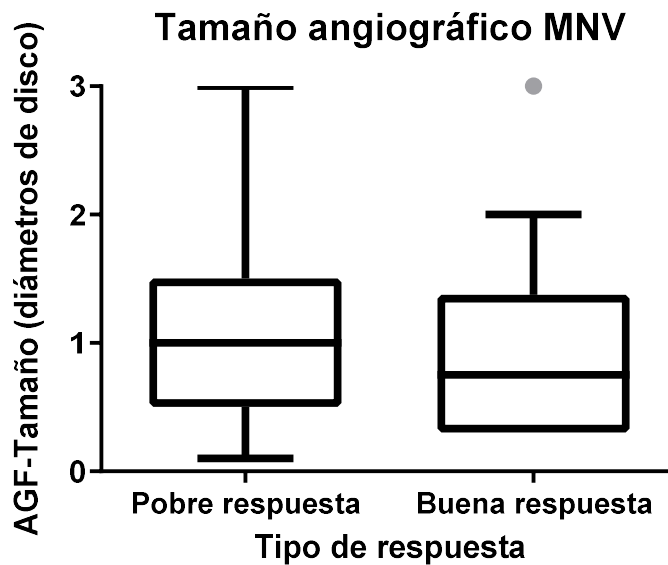


Figura 54. Tamaño angiográfico en diámetros de disco de las membranas neovasculares (MNVs) en pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el tamaño de las MNVs en el grupo de pacientes pobres respondedores y pacientes buenos respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó un t-test no pareado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

En cuanto al tipo o patrón angiográfico que presentaron las MNVs de los pacientes incluidos en este estudio 22 MNVs fueron de tipo PC, 8 MNVs de tipo MC y 26 MNVs de tipo O sin componente clásico. En el grupo de pacientes buenos respondedores las MNVs identificadas fueron 13 de tipo PC, 5 de tipo MC y 12 de tipo O. En el grupo de pacientes pobres respondedores se identificaron 9 MNVs, 3 MNVs y 14 MNVs de tipo PC, MC y O, respectivamente, sin existir diferencia estadísticamente significativamente entre los grupos ($p=0,577$) (Figura 55).

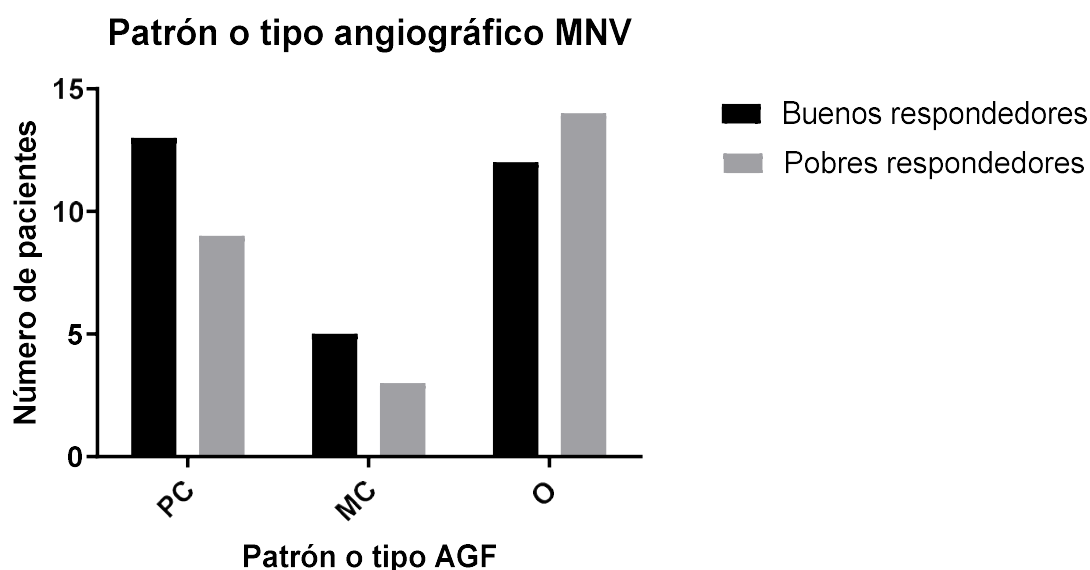


Figura 55. Patrón o tipo angiográfico de las membranas neovasculares (MNVs) en pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Diagrama de barras de la tabla de contingencia representando el patrón angiográfico de las MNVs (PC= Predominantemente Clásico. MC=Mínimamente Clásico. O=Oculto) en el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores previamente al inicio del tratamiento. Se utilizó el test de Chi-cuadrado para estudiar la significación. Sin diferencia estadísticamente significativa.

5.2. Diferencias en la expresión del RNA mensajero entre pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores

Se realizó un análisis de ED de la secuenciación de RNA (RNA-Seq) en RNA extraído de PBMCs de pacientes con buena o pobre respuesta a ranibizumab antes del inicio del tratamiento.

Los resultados de la comparación entre estos grupos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. RNAs expresados diferencialmente en PBMCs de buenos y pobres respondedores. Log2FC= Logaritmo en base 2 del cambio de expresión.

Número de identificación (Ensembl)	Nivel de expresión (lecturas normalizadas)	Log2FC	Valor de P	Símbolo	Nombre
ENSG00000273727	3,8	-1,65	4,10E-05	U1	U1 spliceosomal RNA
ENSG00000235621	9,8	0,82	1,16E-04	LINC00494	long intergenic non-protein coding RNA 494
ENSG00000158106	25	0,54	1,67E-04	RHPN1	rhophilin Rho GTPase binding protein 1
ENSG00000215012	75,3	0,25	2,13E-04	RTL10	retrotransposon Gag like 10
ENSG00000249572	1,8	-1,31	2,41E-04	N/A	novel transcript
ENSG00000233913	23,6	-1,95	3,18E-04	RPL10P9	ribosomal protein L10 pseudogene 9
ENSG00000260766	12,5	0,49	3,98E-04	N/A	N/A
ENSG00000160307	18,5	-1,57	4,40E-04	S100B	S100 calcium binding protein B
ENSG00000226581	1,1	1,62	5,17E-04	LINC02848	long intergenic non-protein coding RNA 2848
ENSG00000204345	1,3	-1,4	5,83E-04	CD300LD	CD300 molecule like family member d
ENSG00000174473	1,7	1,56	7,12E-04	GALNTL6	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase like 6
ENSG00000211789	14,2	0,77	7,23E-04	TRAV12-2	T cell receptor alpha variable 12-2
ENSG00000205710	11,6	-0,8	7,28E-04	C17orf107	chromosome 17 open reading frame 107
ENSG00000227309	3,3	-0,95	7,79E-04	RPL31P19	ribosomal protein L31 (RPL31) pseudogene
ENSG00000154723	43,8	-0,26	7,79E-04	ATP5PF	ATP synthase peripheral stalk subunit F6
ENSG00000107968	221,6	-0,29	7,81E-04	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8

ENSG00000211880	6,4	0,7	7,90E-04	TRAJ9	T cell receptor alpha joining 9
ENSG00000258511	2,1	1,13	7,95E-04	LINC02295	long intergenic non-protein coding RNA 2295
ENSG00000235361	0,8	-1,67	9,34E-04	N/A	novel transcript, antisense to ABR
ENSG00000226430	1,7	1,29	1,03E-03	USP17L7	ubiquitin specific peptidase 17 like family member 7
ENSG00000197353	6,9	-0,94	1,04E-03	LYPD2	LY6/PLAUR domain containing 2
ENSG00000180758	18,7	0,39	1,06E-03	GPR157	G protein-coupled receptor 157
ENSG00000211575	0,9	-1,6	1,19E-03	MIR760	microRNA 760
ENSG00000272666	12,3	-0,75	1,26E-03	KLHDC7B-DT	KLHDC7B divergent transcript
ENSG00000156510	15,3	0,55	1,29E-03	HKDC1	hexokinase domain containing 1
ENSG00000007038	5,5	0,88	1,32E-03	PRSS21	serine protease 21
ENSG00000254088	5,4	0,61	1,33E-03	SLC2A3P4	solute carrier family 2 member 3 pseudogene 4
ENSG00000281106	23,3	0,71	1,58E-03	TMEM272	transmembrane protein 272
ENSG00000180822	67,2	0,28	1,58E-03	PSMG4	proteasome assembly chaperone 4
ENSG00000236709	7,6	-1,1	1,61E-03	DAPK1-IT1	DAPK1 intronic transcript 1

A pesar de no alcanzar significación estadística cuando se corrigieron por comparaciones múltiples, se analizaron los 25 genes más significativos (TOP25) para construir un modelo de clasificación predictiva usando una colección de algoritmos de aprendizaje automático (WEKA). Usando un clasificador Random Forest optimizado por el meta clasificador Random Committee, el clasificador consiguió una curva ROC con una AUC = 0.886. Además, se realizó un análisis de enriquecimiento de las vías de señalización, utilizando la base de datos KEGG con fines exploratorios, con secuencias que muestran $p < 0,05$ sin ajustar. En el análisis realizado, se encontraron vías relacionadas con las citoquinas inflamatorias y la señalización de NF- κ B (Figura 56 y Tabla 13), lo que respalda la participación del sistema inmunológico no sólo con la patogenia sino también con la respuesta al tratamiento.

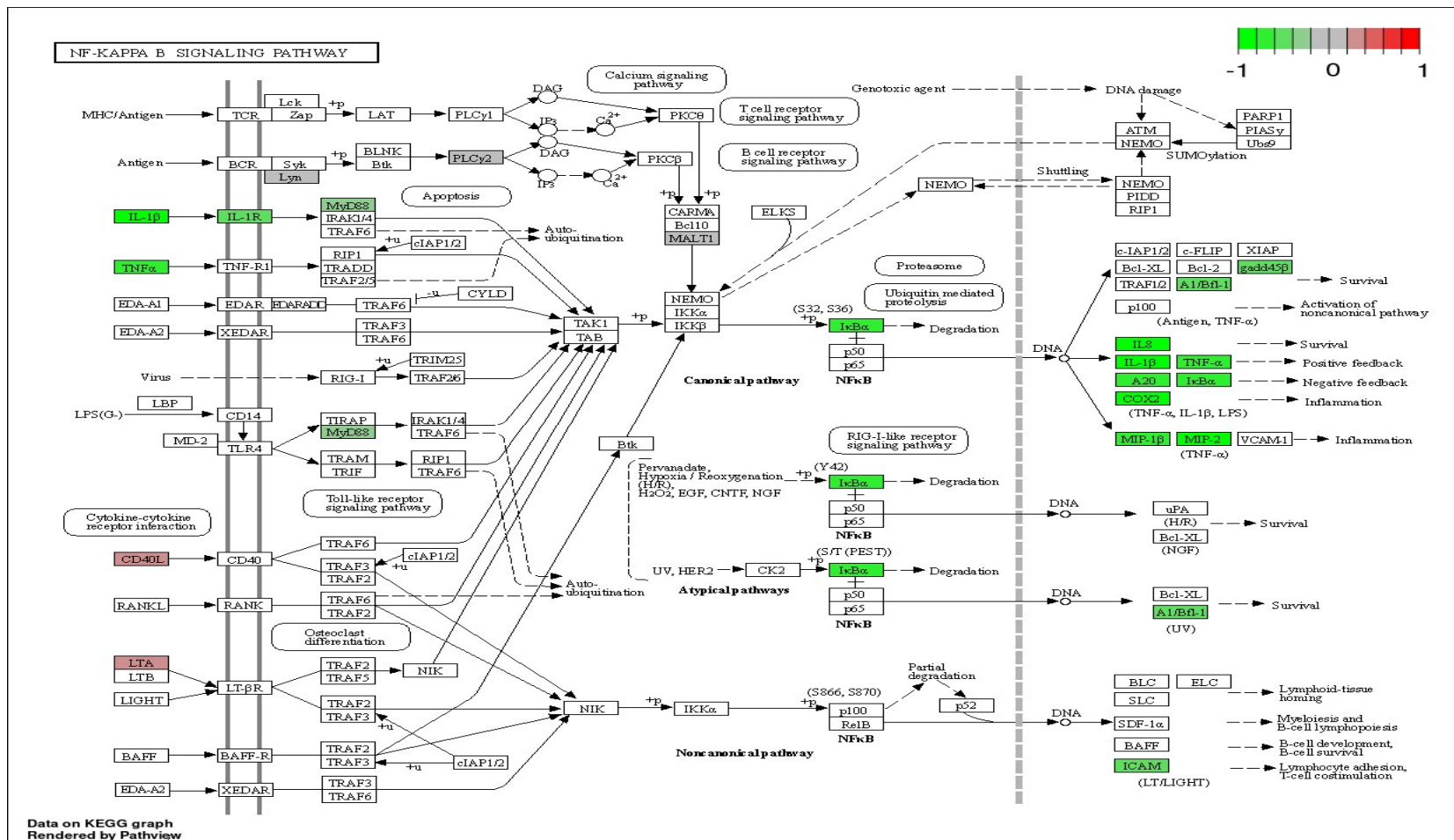


Figura 56. Miembros de la ruta de señalización de NF-Kb regulados por RNAs expresados diferencialmente (TOP25). Se analizaron los RNAs TOP25 (de la Tabla 13) con KEGG. Verde: genes regulados a la baja en los que responden bien frente a los que responden pobremente. Rojo: genes regulados al alza en los que responden bien frente a los que responden pobremente.

Tabla 13. Vías de KEGG alteradas por los RNAs TOP25. Los RNAs TOP25 se sometieron a análisis exploratorio. Las vías celulares expresadas diferencialmente se analizaron con mirPathv3.0 y la base de datos de vías KEGG. FDR= *False Discovery Rate* (tasa de descubrimiento falso).

Vía KEGG alterada por RNAs TOP25	Valor de p (FDR)	Tamaño del set
hsa04657 IL-17 signaling pathway	9,71E-03	16
hsa04621 NOD-like receptor signaling pathway	1,00E-02	20
hsa05142 Chagas disease	1,46E-02	12
hsa04668 TNF signaling pathway	1,46E-02	19
hsa04933 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	1,99E-02	10
hsa05133 Pertussis	2,10E-02	11
hsa05171 Coronavirus disease - COVID-19	2,10E-02	16
hsa04620 Toll-like receptor signaling pathway	2,10E-02	14
hsa04064 NF-kappa B signaling pathway	2,10E-02	20
hsa05134 Legionellosis	2,10E-02	12
hsa04625 C-type lectin receptor signaling pathway	2,10E-02	17
hsa05323 Rheumatoid arthritis	2,10E-02	13
hsa04061 Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	3,13E-02	13
hsa04010 MAPK signaling pathway	3,14E-02	22
hsa05164 Influenza A	3,68E-02	14
hsa04060 Cytokine-cytokine receptor interaction	3,68E-02	21
hsa05161 Hepatitis B	3,68E-02	15
hsa05020 Prion disease	3,68E-02	18
hsa04380 Osteoclast differentiation	3,68E-02	17
hsa05166 Human T-cell leukemia virus 1 infection	3,68E-02	17
hsa04659 Th17 cell differentiation	3,68E-02	10
hsa05132 Salmonella infection	3,68E-02	19
hsa05169 Epstein-Barr virus infection	3,93E-02	17
hsa05135 Yersinia infection	4,23E-02	14

hsa05152 Tuberculosis	4,28E-02	16
hsa05120 Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	4,80E-02	11
hsa04932 Non-alcoholic fatty liver disease	4,80E-02	14
hsa05162 Measles	4,80E-02	14
hsa04217 Necroptosis	4,80E-02	11
hsa05167 Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	4,97E-02	25

5.3. Diferencias en la expresión de microRNAs entre pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores

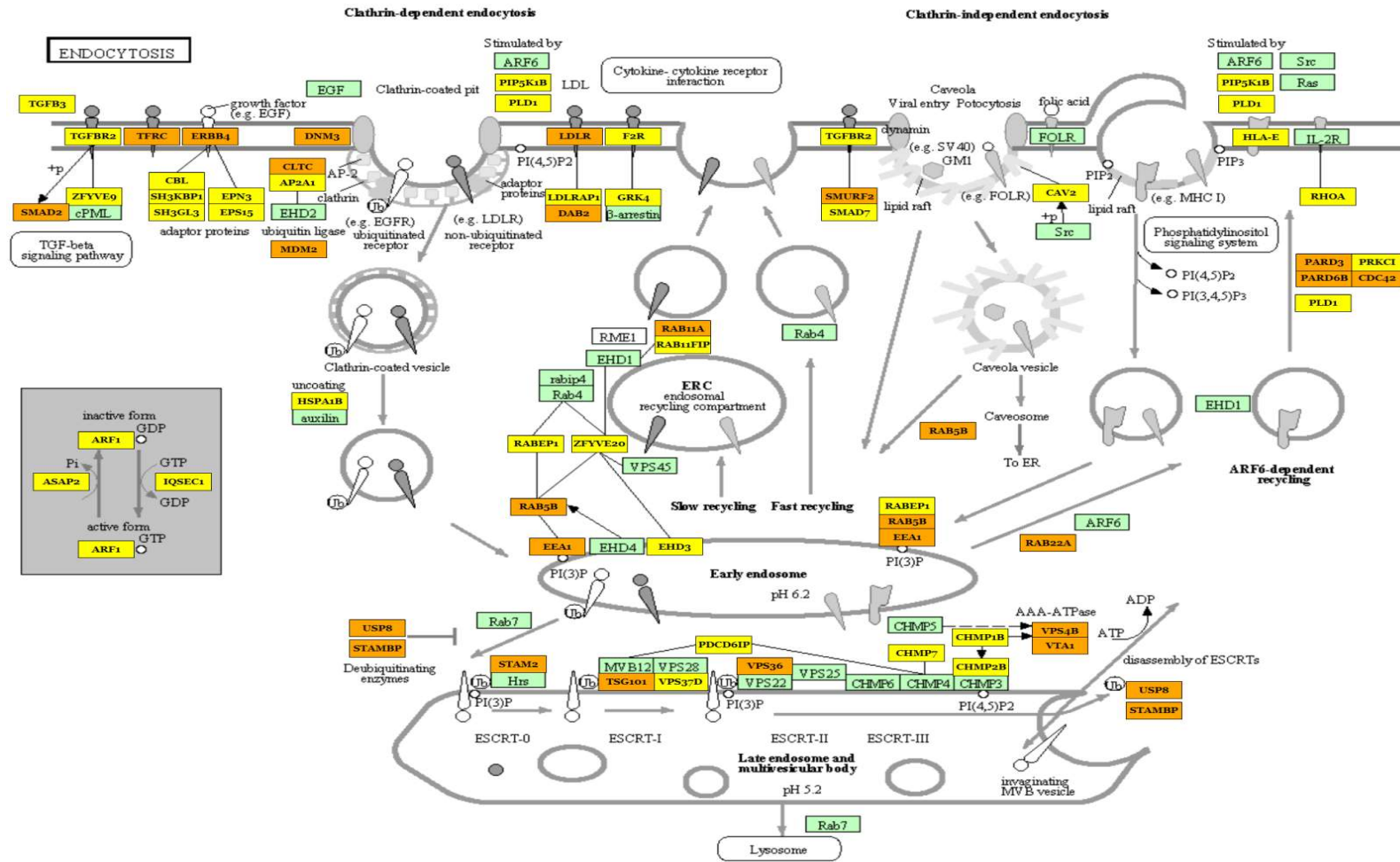
Se realizó un análisis de ED de RNA-Seq adicional en miRNAs extraídos de PBMCs de los mismos pacientes. Los resultados de la comparación entre pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. miRNAs expresados diferencialmente en PBMCs de pacientes buenos y pobres respondedores. Log2F= Logaritmo en base 2 del cambio de expresión.

miRNA	Nivel de expresión en cuentas	Log2FC	Valor de P
hsa-miR-3614-5p	11,3	3,49	1,42E-03
hsa-miR-423-5p	1779,1	10,8	2,37E-03
hsa-miR-20a-5p	865,9	9,76	3,16E-03
hsa-miR-30c-1-3p	24,6	4,62	5,19E-03
hsa-miR-1249-5p	3	1,58	5,32E-03
hsa-miR-3605-3p	7,5	2,91	6,96E-03
hsa-miR-320b	22,2	4,48	7,55E-03
hsa-miR-320b-2	22,7	4,51	8,09E-03
hsa-miR-25-5p	11,8	3,56	9,93E-03
hsa-miR-34c-5p	4,7	2,22	1,36E-02
hsa-miR-6813-5p	2,8	1,48	1,67E-02
hsa-miR-30a-5p	225,9	7,82	1,73E-02

hsa-miR-132-3p	25	4,64	1,76E-02
hsa-miR-642a-5p	4,3	2,1	1,77E-02
hsa-miR-212-3p	6,9	2,78	1,97E-02
hsa-miR-181b-5p	1721,2	10,75	1,98E-02
hsa-miR-3127-5p	2,8	1,47	2,00E-02
hsa-miR-1273h-5p	6,4	2,68	2,11E-02
hsa-miR-181b-5p-2	1795,9	10,81	2,19E-02
hsa-miR-652-5p	24,7	4,63	2,51E-02
hsa-let-7i-5p	5009	12,29	2,51E-02
hsa-miR-369-3p	20	4,32	2,59E-02
hsa-miR-6511a-3p	4,7	2,24	2,62E-02
hsa-miR-6511a-3p-2	4,7	2,24	2,62E-02
hsa-miR-6511a-3p-3	4,7	2,24	2,62E-02
hsa-miR-6511a-3p-4	4,7	2,24	2,62E-02
hsa-miR-223-5p	93,8	6,55	2,69E-02
hsa-miR-2110	14,5	3,85	2,84E-02
hsa-miR-190a-5p	32,2	5,01	2,91E-02
hsa-miR-487a-3p	9,7	3,28	3,27E-02

Utilizando el análisis de datos asistido por mirPathv3.0 [373] con los miRNAs TOP25 se identificaron numerosas vías reguladas por este conjunto de miRNAs, incluida la señalización de la hormona tiroidea, la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la señalización de Hippo y proteínas de adhesión, la endocitosis y otras. Es de destacar que este conjunto de miRNAs también regula importantes genes relacionados con la DMAE como son VEGFA, el factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A y su receptor, involucrados en la vía de señalización de VEGF, la interacción MEC-receptor, la interacción citoquina-receptor y el ciclo celular (Figuras 57-61 y Tabla 15).



04144 2/13/15
 © Kanehisa Laboratories

Figura 57. Regulación de la endocitosis por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente. Los miRNAs TOP25 (de la Tabla 14) se analizaron con DIANA-miRPath v3.0 con KEGG. Amarillo: Genes regulados por 1 miRNA. Naranja: Genes regulados por 2 o más miRNAs.

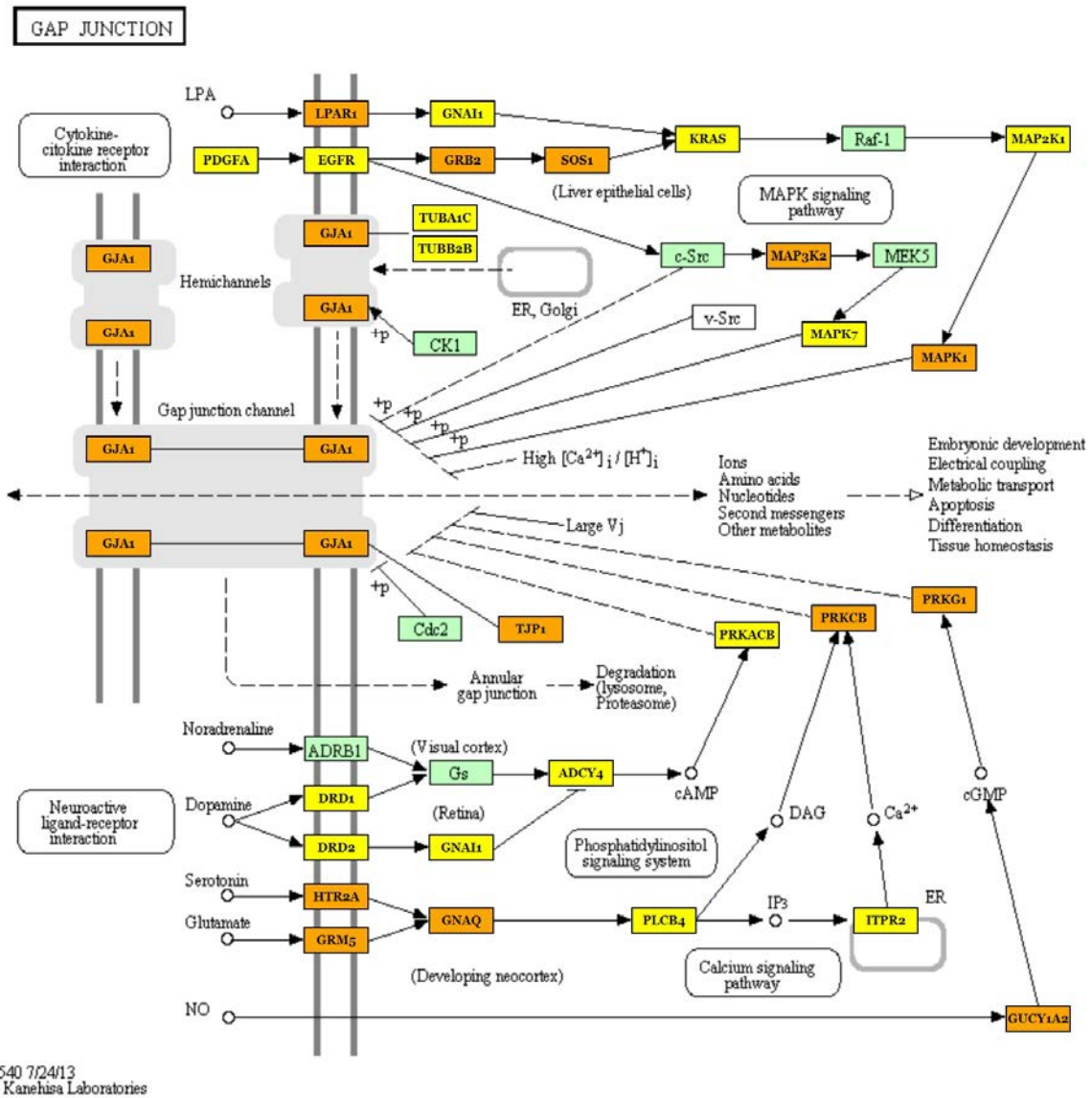
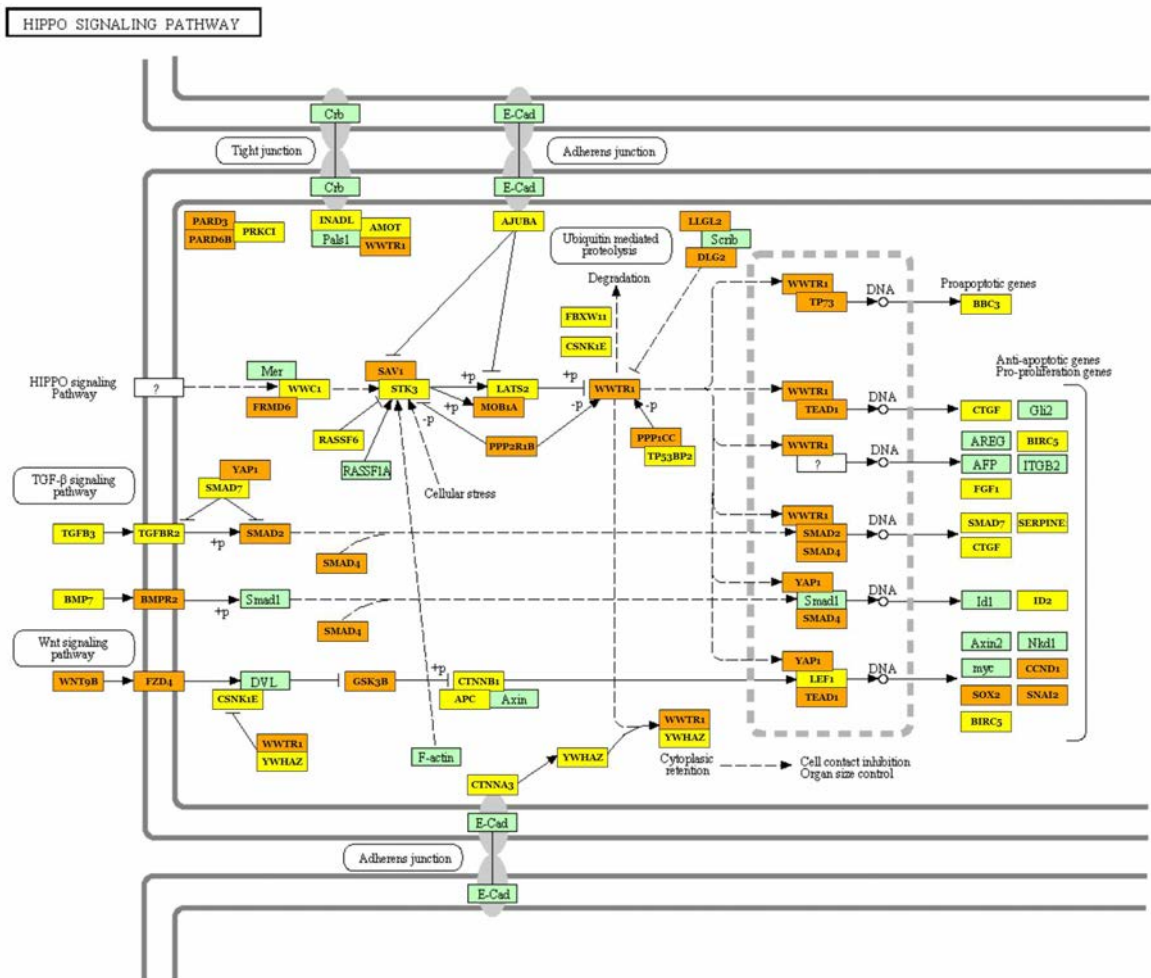
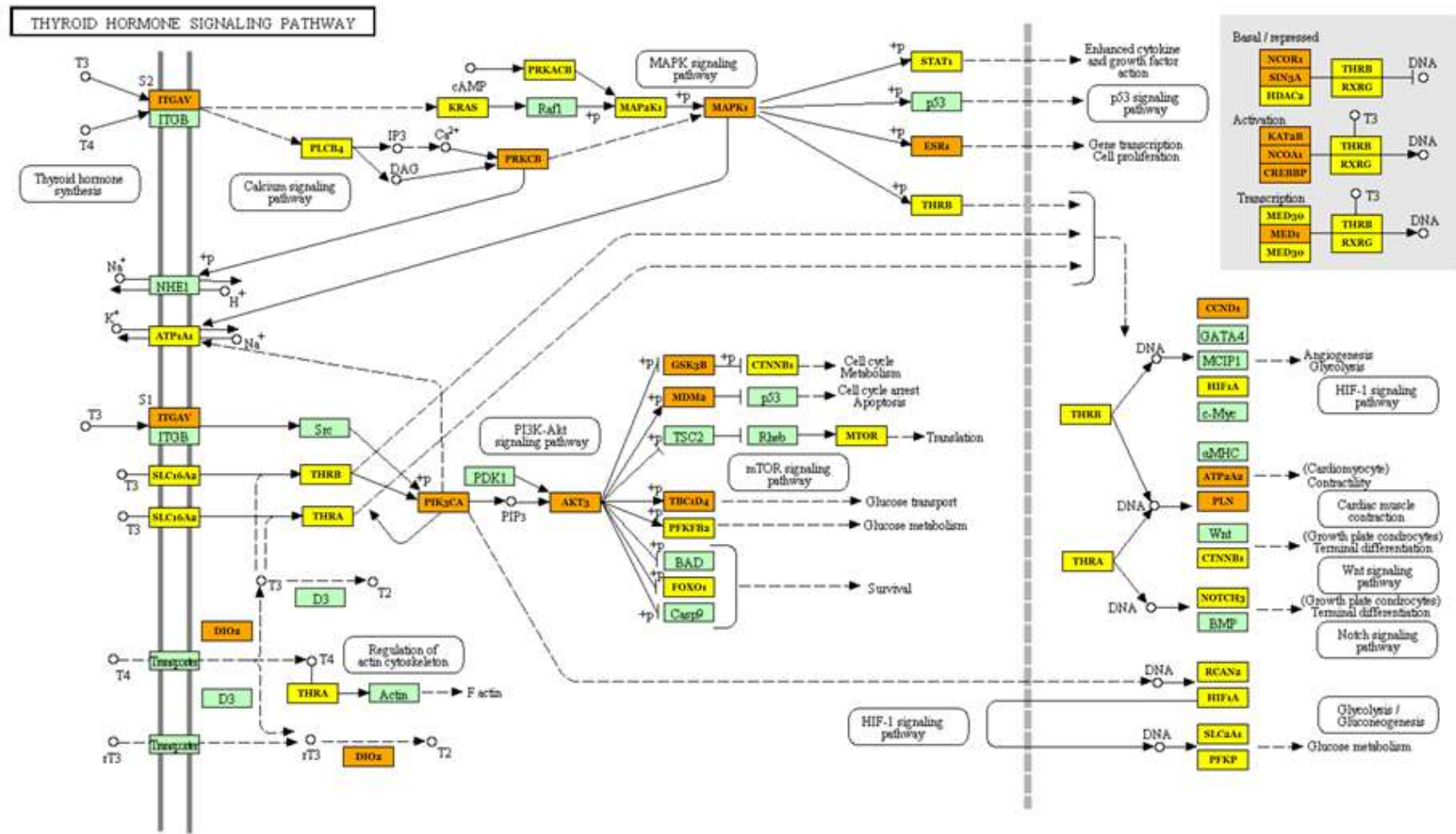


Figura 58. Miembros de la unión gap regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente. Los miRNAs TOP25 (de la Tabla 14) se analizaron con DIANA-miRPath v3.0 con KEGG. Amarillo: Genes regulados por 1 miRNA. Naranja: Genes regulados por 2 o más miRNAs.



04390 2/13/15
 (c) Kazehusa Laboratories

Figura 59. Miembros de la vía de señalización de Hippo regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente. Los miRNAs TOP25 (de la Tabla 14) se analizaron con DIANA-miRPath v3.0 con KEGG. Amarillo: Genes regulados por 1 miRNA. Naranja: Genes regulados por 2 o más miRNAs.



04919 1/23/14
 (c) Kanehisa Laboratories

Figura 60. Miembros de la vía de señalización de la hormona tiroidea regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente. Los miRNAs TOP25 (de la Tabla 14) se analizaron con DIANA-miRPath v3.0 con KEGG. Amarillo: Genes regulados por 1 miRNA. Naranja: Genes regulados por 2 o más miRNAs.

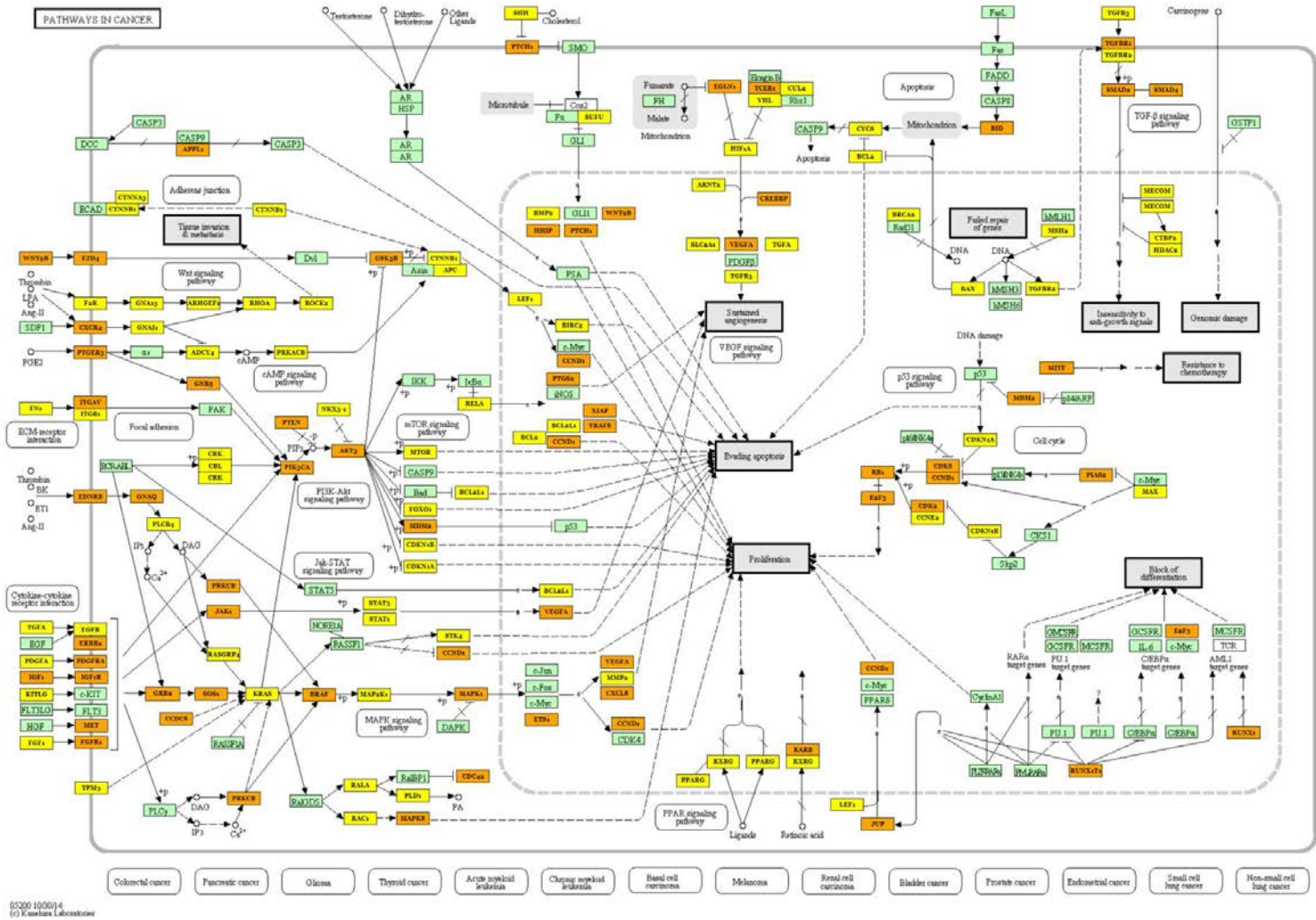


Figura 61. Miembros KEGG de *Pathways-in-Cancer* regulados por miRNAs TOP25 expresados diferencialmente. Los miRNAs TOP25 (de la Tabla 14) se analizaron con DIANA-miRPath v3.0 con KEGG. Amarillo: Genes regulados por 1 miRNA. Naranja: Genes regulados por 2 o más miRNAs.

Tabla 15. Lista de genes putativos regulados por hsa-miR-20a-5p según la base de datos TargetScan v7.2. PTC= *Preferentially Conserved Targeting* (Diana preferencialmente conservada).

Gen diana	Nombre del gen	PCT Agregado
BRMS1L	breast cancer metastasis-suppressor 1-like	> 0.99
MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	> 0.99
PLEKHA3	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 3	> 0.99
ANKRD52	ankyrin repeat domain 52	> 0.99
KCNB1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	> 0.99
PTPN4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4 (megakaryocyte)	> 0.99
USP46	ubiquitin specific peptidase 46	> 0.99
ENPP5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)	> 0.99
GPR137C	G protein-coupled receptor 137C	> 0.99
FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	> 0.99
TBC1D20	TBC1 domain family, member 20	> 0.99
TRPM3	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3	> 0.99
EZH1	enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)	> 0.99

ZNFX1	zinc finger, NFX1-type containing 1	> 0.99
PKD2	polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant)	> 0.99
ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20	> 0.99
ZFYVE26	zinc finger, FYVE domain containing 26	> 0.99
MYT1L	myelin transcription factor 1-like	> 0.99
AAK1	AP2 associated kinase 1	> 0.99
ELK4	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)	> 0.99
BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	> 0.99
FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	> 0.99
MED12L	mediator complex subunit 12-like	> 0.99
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit	> 0.99
WDR37	WD repeat domain 37	> 0.99
C2CD2	C2 calcium-dependent domain containing 2	> 0.99
ZNF827	zinc finger protein 827	> 0.99
ATG7	autophagy related 7	> 0.99
ZFP91	ZFP91 zinc finger protein	> 0.99
DLGAP2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	> 0.99
C11orf30	chromosome 11 open reading frame 30	> 0.99

ZNF512B	zinc finger protein 512B	> 0,99
CSRNP3	cysteine-serine-rich nuclear protein 3	> 0,99
NCOA3	nuclear receptor coactivator 3	0,99
NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase	0,99
FAM102A	family with sequence similarity 102, member A	0,99
ABHD2	abhydrolase domain containing 2	0,99
ITPR1PL2	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 2	0,99
CLOCK	clock circadian regulator	0,99
RAB5B	RAB5B, member RAS oncogene family	0,99
ATXN1L	ataxin 1-like	0,99
ZBTB7A	zinc finger and BTB domain containing 7A	0,99
HOOK3	hook microtubule-tethering protein 3	0,99
RPS6KA5	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	0,98
PURB	purine-rich element binding protein B	0,98
KCNK10	potassium channel, subfamily K, member 10	0,98
DYNC1LI2	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 2	0,98
KIF5A	kinesin family member 5A	0,98

FYCO1	FYVE and coiled-coil domain containing 1	0,98
ITGB8	integrin, beta 8	0,98
EPHA4	EPH receptor A4	0,98
ANKRD33B	ankyrin repeat domain 33B	0,98
PPP6C	protein phosphatase 6, catalytic subunit	0,98
ZNF704	zinc finger protein 704	0,98
WNK3	WNK lysine deficient protein kinase 3	0,98
VANGL1	VANGL planar cell polarity protein 1	0,97
PANK3	pantothenate kinase 3	0,97
ZBTB4	zinc finger and BTB domain containing 4	0,97
ZNF652	zinc finger protein 652	0,97
PRRG1	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 1	0,97
TXNIP	thioredoxin interacting protein	0,97
PPP1R3B	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B	0,97
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	0,97
GPR63	G protein-coupled receptor 63	0,97
TMEM200C	transmembrane protein 200C	0,97
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1	0,97

SLAIN2	SLAIN motif family, member 2	0,97
GPR6	G protein-coupled receptor 6	0,97
ZFYVE9	zinc finger, FYVE domain containing 9	0,97
GINM1	glycoprotein integral membrane 1	0,97

Estos resultados también apoyan la participación de vías relevantes comunes al sistema inmunológico y la retina con la respuesta al tratamiento. Siguiendo la misma estrategia que con los datos de RNA se seleccionaron los miRNAs TOP25 para construir un modelo de clasificación predictiva basado en clasificadores basados en ED. Utilizando un clasificador basado en optimización mínima secuencial (SMO) se obtuvo una curva ROC con una AUC = 0,826.

5.4. Modelo de clasificación a partir de los datos de RNA

El método de análisis de RNA-Seq permite medir los niveles de expresión de todos los transcritos presentes, simultáneamente. Con esa información es posible desarrollar diferentes algoritmos de clasificación. Hay varios tipos de clasificadores descritos en la literatura. Los clasificadores basados en ED tienen en cuenta la diferencia en el nivel de expresión de los genes y, a menudo, son útiles para descubrir biomarcadores de enfermedades. Para los datos de RNA-Seq esto generalmente se hace ajustando la distribución de los genes a modelos lineales binomiales negativos y aplicando una prueba estadística de razón de verosimilitud.

En general, el primer paso para un proceso de clasificación es un paso de selección de características mediante el procesamiento previo de los datos. Esto se hace para reducir la complejidad computacional asociada con la cantidad de datos obtenidos por RNA-Seq. Además, no todos los genes expresados pueden ser relevantes para una tarea de clasificación específica. De hecho, el uso de características no informativas puede incluso disminuir la precisión del clasificador debido al sobreajuste del modelo.

Sin embargo, dado que no se observó ningún gen expresado diferencialmente entre los pacientes buenos respondedores y pacientes pobres respondedores después de las correcciones de comparaciones múltiples, se decidió investigar otros clasificadores basados en la reducción de la entropía.

Para reducir el número de características a utilizar se realizó un procedimiento de selección de características (ver Métodos) utilizando la suite Weka [374] en datos de secuenciación de RNA de PBMCs obtenidos de la cohorte estudiada. Este proceso resultó en una reducción significativa de características (> 1000 veces). A continuación, fueron seleccionados los 10 RNAs más

informativos (ENSG00000249572, ENSG00000176531, ENSG00000240350, ENSG00000161298, ENSG00000049239, ENSG00000226479, ENSG00000198056, ENSG00000104450, ENSG000001566510 y ENSG00000158106) para obtener un modelo de clasificación predictiva para la respuesta al tratamiento utilizando un clasificador Random Forest optimizado por el meta clasificador Random Committee. El rendimiento del clasificador se representa con una curva ROC (AUC = 0,950) en la Figura 62.

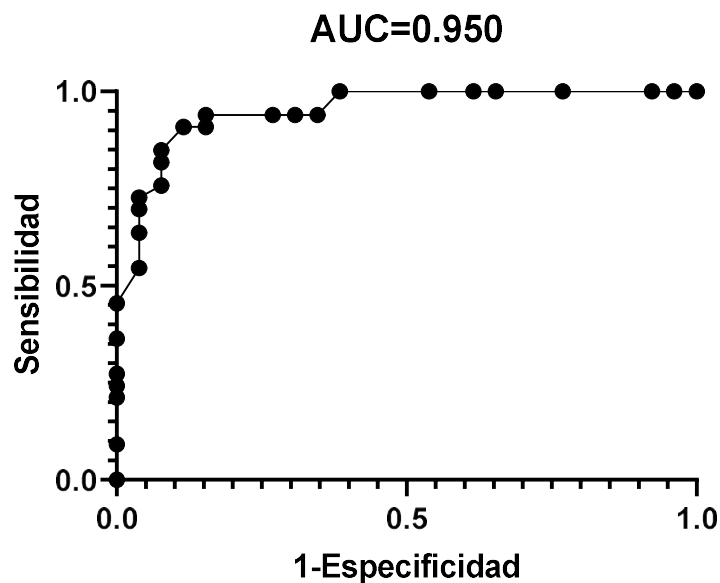


Figura 62. Rendimiento del modelo de clasificación a partir de datos informativos de RNA. Se construyó una curva ROC con datos de expresión de 10 RNAs (ENSG00000249572, ENSG00000176531, ENSG00000240350, ENSG00000161298, ENSG00000049239, ENSG00000226479, ENSG00000198056, ENSG00000104450, ENSG000001566510 y ENSG00000158106) de los 59 pacientes. El modelo de clasificación se construyó utilizando un clasificador Random Forest optimizado por el meta clasificador Random Committee, incluido en la suite WEKA. AUC = Área bajo la curva.

5.5. Modelo de clasificación a partir de los datos de miRNA

De manera similar al apartado anterior, se realizó la selección de características (ver Métodos) en datos de secuenciación de miRNA de PBMCs obtenidos de la cohorte estudiada. Se seleccionaron los 18 miRNAs más

informativos (hsa-miR-1284, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR-3127-5p, hsa-miR-3149, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-548ah-3p, hsa-miR-551b-5p, hsa-miR-579-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-6786-3p, hsa-miR-6798-3p, hsa-miR-6813-5p, hsa-miR-6850-3p, hsa-miR-6875-5p y hsa-miR-6889-5p) para obtener un modelo de clasificación predictiva para la respuesta al tratamiento utilizando un clasificador basado en SMO. El rendimiento del clasificador se representa con una curva ROC (AUC = 0,914) en la Figura 63.

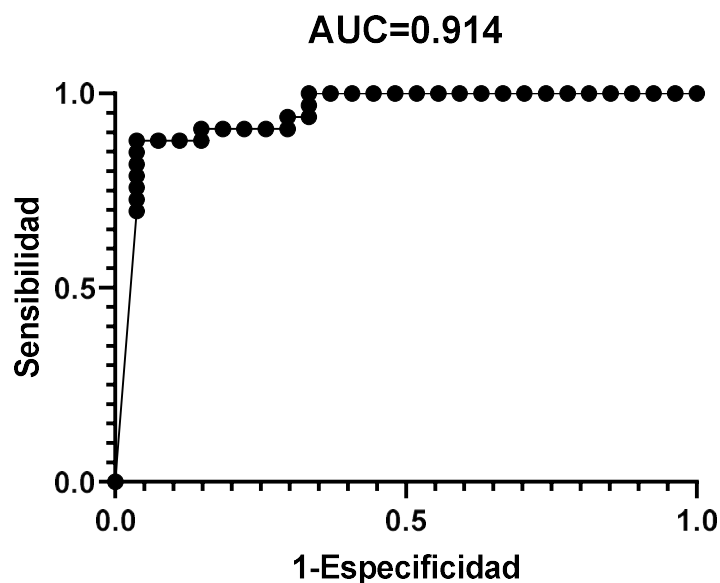


Figura 63. Rendimiento del modelo de clasificación a partir de datos informativos de miRNA. Se construyó una curva ROC con datos de expresión de 18 miRNAs (hsa-miR-1284, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR-3127-5p, hsa -miR-3149, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-548ah-3p, hsa-miR-551b-5p, hsa-miR-579-3p, hsa-miR-615 -5p, hsa-miR-6786-3p, hsa-miR-6798-3p, hsa-miR-6813-5p, hsa-miR-6850-3p, hsa-miR-6875-5p y hsa-miR-6889-5p) de los 59 pacientes. El modelo de clasificación se construyó utilizando un clasificador basado en SMO, incluido en la suite WEKA. AUC = Área bajo la curva.

5.6. Modelo de clasificación a partir de los datos combinados de RNA y miRNA

Para obtener un modelo de clasificación óptimo se combinaron los RNAs más discriminativos (ENSG00000249572, ENSG00000161298,

ENSG00000226479 y ENSG00000198056) con el miRNA más discriminativo (hsa-miR-20a-5p) utilizando un clasificador de Bayes ingenuo y ajustado. El rendimiento del clasificador para la respuesta al tratamiento se representa con una curva ROC (AUC = 0,968) en la Figura 64 el cual mejoró el modelo de RNA (AUC = 0,950, Figura 62) y el modelo de miRNA (AUC = 0,914, Figura 63).

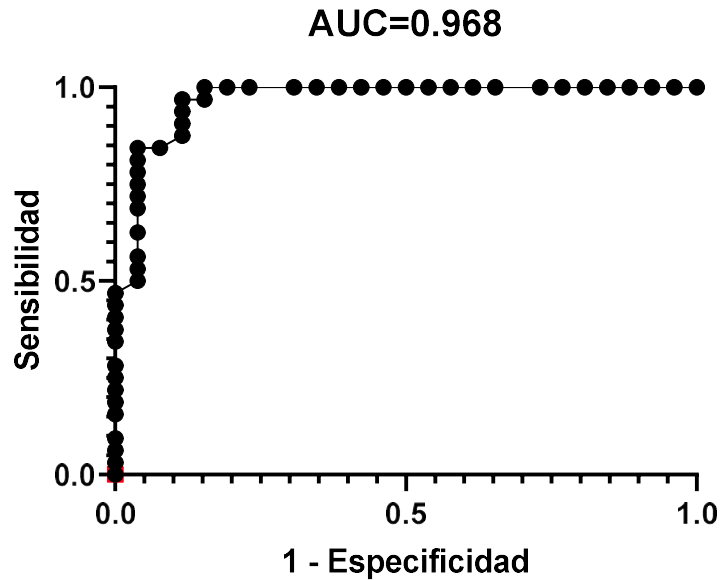


Figura 64. Rendimiento del modelo de clasificación a partir de datos informativos de RNA y miRNA. Se construyó una curva ROC con los datos de expresión de 4 RNAs (ENSG00000249572, ENSG00000161298, ENSG00000226479 y ENSG00000198056) y 1 miRNA (hsa-miR-20a-5p) de los 59 pacientes. El modelo de clasificación se construyó utilizando un clasificador Naïve Bayes, incluido en la suite WEKA. AUC = Área bajo la curva.

6. Discusión

La DMAE es una enfermedad multifactorial. Los principales factores de riesgo comúnmente asociados a esta enfermedad son la edad, los antecedentes familiares y el consumo de tabaco [375]. Otros factores de riesgo incluyen el IMC, la etnia, el sexo, las enfermedades cardiovasculares o los hábitos alimentarios [376].

Los fármacos anti-VEGF son inhibidores eficaces de la NV inducida por láser en modelos animales y son la primera línea de tratamiento para la DMAEnv en humanos [135]. Sin embargo, existe un porcentaje de pacientes en los que la respuesta no es satisfactoria y no existe una definición universal de fracaso del tratamiento. Algunos profesionales consideran que el tratamiento ha fracasado cuando persiste líquido en la retina mientras que otros se centran más en la pérdida de visión. Además, el protocolo de tratamiento que los médicos pueden modificar por diversas razones también puede afectar a la respuesta.

La introducción de la terapia anti-VEGF ha tenido un impacto significativo en la reducción de la pérdida visual secundaria a la DMAEnv que, aunque representa aproximadamente al 10% de todos los pacientes con DMAE, es la responsable de la mayoría de la pérdida visual severa secundaria a esta enfermedad [377].

La NV no tratada resulta en una pérdida de visión de entre una y tres líneas ETDRS (5-15 letras) en tres meses, y de entre tres y cuatro líneas en un año [378]. Aunque los agentes anti-VEGF han mejorado considerablemente el pronóstico de la enfermedad, en torno al 10% de ellos no responden a esta terapia y todavía experimentan una pérdida sustancial de visión, es decir, una pérdida de quince o más letras, lo que es comparable con el curso natural de la enfermedad [257]. Esta proporción de ojos con DMAEnv muestra una declinación en la AV o morfología de la retina a pesar de la terapia o requieren retratamientos muy frecuentes.

Existen diferencias interindividuales significativas en la respuesta al tratamiento antiangiogénico, hecho que se torna más complejo por la disponibilidad de varios agentes anti-VEGF con diferente configuración molecular. Se ha descrito que la respuesta a la terapia anti-VEGF depende de una variedad de factores entre los que se incluyen la edad del paciente, las

características de la lesión, la duración de la lesión, la AV basal y la presencia de alelos de riesgo de genotipos particulares. Actualmente no hay consenso sobre cómo clasificar la respuesta óptima o falta de respuesta con estas terapias [365].

Aunque la AV basal está consistentemente asociada con los resultados visuales, la respuesta temprana al tratamiento puede ser mejor predictor de la trayectoria visual [379]. Algunos estudios, claramente, han demostrado que el cambio máximo en la AV ocurre tras las tres primeras inyecciones de la conocida como “fase de carga” [380] y que se puede esperar prácticamente toda la ganancia visual en este periodo [232].

En el estudio CATT se observó que la ganancia visual de un individuo a la semana doce del inicio del tratamiento era un predictor más fuerte para su ganancia visual a largo plazo que la combinación de todos los predictores significativos basales combinados, incluida la AV [381]. Esta misma observación también ha sido publicada en otros trabajos [382]. En el registro *Fight Retinal Blindness* [383] los pacientes que lograron una buena AV (≥ 70 letras) en la cuarta inyección era más probable que mantuvieran una buena visión tras tres años de tratamiento que aquellos que no lo lograron. Sin embargo, esta respuesta inicial medida al mes de la tercera inyección de la “fase de carga” no siempre ha sido predictiva de la ganancia visual a largo plazo, pues una proporción de ojos continúan acumulando ganancia en la visión incluso después de ese momento, como se informó en los estudios ANCHOR y MARINA [232,257], HARBOR [384] y posteriores series de casos [385]. Además, los estudios PIER [258], SUSTAIN [183] y EXCITE [260], sugirieron que la respuesta al tratamiento puede que no siempre refleje el resultado visual tras la fase de iniciación o “fase de carga”. Según algunos autores, en un ojo en particular la respuesta en cualquier momento tras el cuarto mes no refleja y no se puede predecir de aquella obtenida tras la “fase de carga” [365].

Los cambios morfológicos en la retina preceden a la pérdida de la función visual y la respuesta morfológica y funcional a la terapia anti-VEGF no se correlacionan necesariamente y pueden estar disociadas en un ojo individual. Por eso, la respuesta a la terapia anti-VEGF puede ser clasificada en gran medida en respuesta funcional y morfológica. Como la función y la morfología no

se correlacionan estas respuestas a veces pueden ser mutuamente excluyentes. Por lo tanto, es importante usar una combinación de ambos parámetros en la determinación de la respuesta en un paciente individual. Como resultado de esta “desconexión” entre las medidas de respuesta funcional y morfológica es necesaria la evaluación conjunta para guiar las decisiones clínicas [365]. Además, existe un “efecto techo” que puede negar las métricas funcionales utilizadas actualmente como es una mejora mayor a cinco letras cuando la AV basal es buena (ETDRS > 70 letras).

En el presente estudio, según los criterios establecidos, el 44% de los pacientes no mostró una respuesta satisfactoria al tratamiento con ranibizumab al mes de la tercera inyección. Este resultado, aunque elevado, es comparable con otros datos de estudios en el mundo real [386] [387] [99]. Al comparar las características basales de la cohorte, basadas en la respuesta a ranibizumab, no se encontró ninguna diferencia en factores de riesgo como la edad, el sexo, consumo de tabaco, HTA, etc., o mediciones oculares basales como la PIO, el ECR, el volumen del cubo macular, el DEP, la presencia de fluido o fibrosis. Estos resultados están de acuerdo con los resultados de otros estudios previos en los que no se encontró asociación de estos parámetros con la respuesta al tratamiento con ranibizumab [388] [320], aunque algunos trabajos han encontrado asociación de antecedentes de tabaquismo e HTA con la respuesta a ranibizumab en DMAEnv [389].

Curiosamente, aunque la atrofia del EPR fue mayor en el grupo con peor respuesta, como se ve regularmente en la clínica [390], no mostró poder discriminatorio entre los grupos (AUC = 0,64, $p = 0,0544$).

La existencia de historia previa de tratamiento en los pacientes con DMAEnv ha sido relacionada con los resultados visuales obtenidos tras la administración de farmacoterapia anti-VEGF. En la literatura encontramos que los pacientes *naïve*, pacientes que no han sido tratados previamente, obtienen una mayor mejora en la visión que los pacientes no *naïve* o pacientes que han recibido tratamiento previo [391]. Los resultados del ensayo clínico CATT indicaron que el tratamiento anti-VEGF podría acelerar el desarrollo de AG [392]. Los pacientes no *naïve* podrían tener una probabilidad mayor de desarrollar AG y pérdida de fotorreceptores que aquellos pacientes del grupo *naïve*, lo que

podría resultar en una ganancia visual inferior tras el tratamiento. Sin embargo, en el presente estudio, en el que el 20,34% (12/59) de los pacientes habían recibido tratamiento anti-VEGF previo con un intervalo mínimo de seis meses desde la última inyección a su inclusión en el estudio, no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=1,000$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

La eficacia de ranibizumab dependiente de la edad ha sido descrita en la literatura. Los cambios en la AVMC han sido mayores en los grupos de pacientes de menor edad comparados con los grupos de mayor edad [391] [393]. Aunque esta asociación se ha identificado en múltiples trabajos, la razón subyacente todavía no ha sido explicada. Puede ser que los fotorreceptores y las células del EPR en los pacientes más jóvenes tengan mayor capacidad de reparación que en los pacientes de mayor edad, de manera similar a lo que ocurre en otros tejidos del cuerpo humano [394]. La asociación entre la mayor edad y los peores resultados visuales es generalmente consistente con los resultados de los estudios pivotales y ensayos clínicos randomizados [393] [381]. En el ensayo clínico MARINA [395] una diferencia de 13.6 años al diagnóstico de la enfermedad estuvo asociada con una reducción de cinco letras en la ganancia visual en los pacientes mayores. Mientras tanto, en el ensayo clínico ANCHOR [396] una diferencia de edad de 18.8 años estuvo asociada con una reducción de cinco letras en la ganancia visual. En el estudio HARBOR [397] los pacientes con una edad ≤ 73 años al inicio ganaron 4.5 letras más que aquellos mayores de 73 años tras el tratamiento con ranibizumab. Durante los dos primeros años del estudio CATT [381] [393] la mayor edad estuvo asociada con menores ganancias visuales, peores niveles de AV final y una probabilidad disminuida de ganar ≥ 15 letras, sin embargo, esto no fue significativo durante el seguimiento a cinco años [398], lo que podría indicar que la edad no influye en los resultados visuales a largo plazo. En los estudios de práctica clínica real la relación entre la edad y los resultados visuales no es consistente. Las asociaciones se encuentran en las cohortes de pacientes más grandes [399] [400]. Ya que la edad es un factor de riesgo importante para la DMAE, su relación con los resultados visuales, probablemente, representa parte de la historia natural de la enfermedad [401]. En los resultados de este estudio la edad media de los pacientes previamente al

inicio del tratamiento fue de $78,03 \pm 1,055$ años, sin existir diferencia estadísticamente significativa ($p=0,092$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

La respuesta a ranibizumab dependiente del sexo también ha sido estudiada en la literatura. Existen algunas asociaciones entre la prevalencia de la DMAE y el género que pueden sugerir que el curso del tratamiento pueda diferir entre hombres y mujeres [402]. Sin embargo, a pesar de que el género es regularmente incluido en el análisis de los factores de riesgo de los ensayos clínicos y estudios retrospectivos, no se ha encontrado asociación significativa entre el género y la respuesta visual al tratamiento anti-VEGF en la DMAEnv. Suzuki y cols. no encontraron diferencias en el sexo entre pacientes respondedores y no respondedores [403]. Por el contrario, en los resultados del estudio CATT a cinco años [398] las mujeres fueron más propensas a mostrar una ganancia visual ≥ 15 letras que los hombres. En el presente estudio, el 40,68% (24/59) de los pacientes incluidos fueron hombres y el 59,32% (35/59) mujeres, sin haberse detectado diferencia estadísticamente significativa ($p=0,193$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

Existen múltiples enfermedades sistémicas bien conocidas y factores de riesgo conductuales para el desarrollo de la DMAE, como son las enfermedades cardiovasculares, el consumo de tabaco y la nutrición [404]. Sin embargo, su papel en la determinación de la respuesta al tratamiento no está claro, permaneciendo como fuertes factores de riesgo modificables para la prevención de la enfermedad y la mejora de la salud general [401]. van Asten y cols. [405] comunicaron que los pacientes con historia previa de DM tenían un riesgo 2.1 veces superior de no responder al tratamiento, por el contrario, no encontraron asociación con la enfermedad cardiovascular, el consumo de tabaco o el IMC. Piermarocchi y cols. [389] informaron que aquellos pacientes con HTA, así como aquellos fumadores o exfumadores, obtuvieron una ganancia visual menor (-3.86 letras y -4 letras, respectivamente) durante un año de tratamiento con ranibizumab. En un trabajo llevado a cabo por investigadores españoles la HTA fue el factor ambiental con la asociación más fuerte a la mala respuesta anatómica a ranibizumab tras la “fase de carga” y tras doce meses de tratamiento

[85]. Lee y cols. [406] hallaron que los pacientes fumadores tenían más probabilidad de obtener peores resultados visuales tras el tratamiento con ranibizumab. Además, los resultados del estudio CATT a cinco años de seguimiento concluyeron que aquellos pacientes que eran fumadores al inicio del tratamiento eran más propensos a obtener una peor AV final, por lo que fumar podría ejercer un efecto perjudicial a largo plazo [398]. En contraste con estos resultados, una gran cantidad de estudios han fallado en detectar estas asociaciones [337,397,407-412]. En el presente trabajo se ha estudiado la asociación entre la existencia previa al inicio del tratamiento de DM, HTA, dislipemia, enfermedad coronaria, consumo de tabaco y alcohol, exposición a la luz ultravioleta y consumo de una dieta rica en grasas, con el tipo de respuesta a la administración de tres inyecciones mensuales de ranibizumab, sin haberse encontrado diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores para ninguna de las características basales estudiadas.

La AV basal ha sido la variable más minuciosamente investigada y su relación con la respuesta visual tras el tratamiento ha sido bien establecida como el predictor del resultado visual más significativo tanto en los ensayos clínicos como en los estudios de práctica clínica real [401]. Los cambios visuales tras el tratamiento están fuertemente influenciados por el “efecto techo”, en el que los pacientes con mejor AV a su presentación tienen una capacidad reducida o “techo” para ganar AV en comparación con aquellos que presentan valores de AV basal más bajos. Un análisis post hoc del ensayo clínico MARINA detectó una reducción de 1.2-1.6 letras en la ganancia visual por cada incremento de cinco letras en la AV basal [395]. Mientras parece que el tratamiento con fármacos anti-VEGF es más efectivo en los ojos con pobre AV, los pacientes que se presentan con mejor AV inicial tienen más probabilidades de tener una mejor AV final. Un gran análisis retrospectivo del *Moorfields Eye Hospital* informó de un 43% de aumento de la probabilidad de conseguir y mantener una AV de 20/40 por cada aumento en cinco letras en la AV basal [399]. Los datos del *Swedish Macular Register* revelaron que los ojos con una AV inicial >60 letras (20/63) tenían sólo un riesgo del 20% de tener una AV más baja (≤ 60 letras) tras uno o dos años de tratamiento, comparado con el 60% de los ojos con baja AV inicial

[400]. Esta relación también se ha observado en varios estudios a largo plazo [413] [414] [415], lo que sugiere que las grandes ganancias visuales en aquellos pacientes con peor AV basal no son suficientes para superar a aquellos que se presentan con una buena AV basal, a pesar del tratamiento continuado. Como aquellos pacientes con peor AV basal es también más probable que respondan negativamente al tratamiento, la AV basal baja puede ser un indicador de mayor gravedad de la enfermedad ya que puede subyacer una patología no tratable con fármacos anti-VEGF como es la atrofia, la cicatrización u otros cambios anatómicos no controlados [401]. van Asten y cols. [405] observaron que aquellos pacientes con peor AV basal era más probable que fueran no respondedores (definidos por la pérdida de más del 30% de las letras iniciales) tras las tres inyecciones mensuales iniciales de tratamiento. De manera similar, el análisis de los datos del registro *Fight Retinal Blindness* detectó que los ojos con una AV mejor a 20/40 tenían un 39% menos de posibilidades de experimentar una pérdida ≥ 30 letras que aquellos ojos con peor AV basal tras cinco años de tratamiento [416]. En el presente estudio, la AVMC media previa al inicio del tratamiento fue de 63,61 +/- 1,131 letras ETDRS. El grupo de pacientes buenos respondedores presentó una AVMC media de 64,30 +/- 1,464 letras ETDRS y el de pobres respondedores de 62,73 +/- 1,791 letras ETDRS, sin haberse detectado diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,495$).

El ECR medido por OCT es comúnmente evaluado como resultado en los ensayos clínicos y ha sido utilizado como criterio de tratamiento en algunos [417]. Además, es importante determinar en cada caso qué se entiende por el mismo [401]. El ECR debe ser medido en los pacientes con DMAEnv porque parece correlacionarse con la AV, tanto basalmente como después del tratamiento [418], y es considerado el parámetro morfológico más disponible e intuitivo que puede evaluarse mediante el examen de OCT. Sin embargo, los estudios han revelado diferentes resultados sobre esta correlación y el ECR parece no ser tan valioso como predictor de la función visual [419]. De hecho, los estudios que han considerado otros parámetros como la localización del fluido, la fibrosis o la integridad de las capas retinianas de manera individual, pueden ser más precisos [420]. Esto es debido a que el ECR considera diferentes capas retinianas que por

sí solas podrían influir en los resultados funcionales [421]. En el estudio CATT un ECR más delgado ($<120 \mu\text{m}$, 57.7 letras) o más grueso ($>212 \mu\text{m}$, 64.0 letras) tuvo un peor resultado visual que aquellos pacientes con un ECR entre esos rangos ($120\text{-}212 \mu\text{m}$, 72.0 letras), tras dos años de terapia [422]. De manera similar, en el estudio PrONTO también se halló una correlación entre el cambio en el ECR y la AV a los tres y doce meses de seguimiento [182], sugiriendo que una mejora en el ECR es un predictor de una ganancia visual mayor. En este estudio el ECR medio previo al inicio del tratamiento fue de $329,18 \pm 15,495 \mu\text{m}$. El grupo de pacientes buenos respondedores tuvo un ECR medio de $332,4 \pm 17,7 \mu\text{m}$ y el de pobres respondedores de $325,2 \pm 28,09 \mu\text{m}$, sin haberse detectado diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,820$).

La presencia de DEP en las imágenes de OCT parece ser menos importante para el pronóstico visual en los pacientes con DMAEnv que la presencia de otros parámetros tomográficos, como son los quistes intrarretinianos o el FSR [419], y parece afectar a la recuperación visual sólo cuando está combinado con estos [208]. Estudios previos han informado de resultados inconsistentes con respecto a la relación entre el DEP y la AV. Mientras algunos estudios han asociado la presencia de DEP con un resultado visual menos favorable otros no han informado de tal relación [423]. En un análisis post hoc del estudio HARBOR los pacientes con DEP tenían una mejor AV basal y en el vigésimo cuarto mes de seguimiento que los pacientes sin él. En realidad, los pacientes que iniciaron tratamiento con mejor AV mantuvieron esos valores hasta el final del estudio. Sin embargo, a dos años de seguimiento no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el incremento de la AVMC en los pacientes con DEP frente aquellos que no lo tenían [424]. Tampoco la respuesta del DEP a la terapia se ha asociado con los resultados visuales en análisis retrospectivos del ensayo VIEW [425], aunque se observó que los pacientes con DEP al inicio que desarrollaron FIR durante el seguimiento obtuvieron una ganancia visual inferior que cualquier combinación de parámetros anatómicos [196]. La presencia de un DEP ($>250 \mu\text{m}$) muy sobresaliente se ha correlacionado de manera significativa y negativa con el número de letras ganadas en la escala ETDRS tras tres inyecciones de ranibizumab [426]. Suzuki y cols. describieron la

existencia de un DEP fibrovascular como un factor de riesgo para la no respuesta a juzgar por los hallazgos visuales [403]. Esto puede ser explicado por la fisiología, el tejido fibroso debajo del EPR puede conducir a la reducción de la difusión de oxígeno desde la CC [427] resultando en la interrupción del transporte activo de fluido exudativo a través del EPR [428]. La habilidad del EPR para mantener el microambiente puede ser reducida y la función de los fotorreceptores dañada. En el presente estudio el 72,88% (43/59) de los pacientes presentó DEP basalmente, sin haberse encontrado diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores ($p=0,571$).

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de FIR ha sido asociada con una mala visión, tanto basalmente en el estudio EXCITE [192], como durante el tratamiento en grandes ensayos clínicos como son los ensayos CATT y VIEW [196] [422]. Análisis más recientes han sugerido que el volumen de FIR es importante, con un incremento de este asociado a un cambio progresivamente peor de la AVMC, tanto en un análisis post hoc del estudio HARBOR [429], como en un análisis post hoc del estudio FLUID [430]. En un estudio de práctica clínica real de pacientes con DMAEnv tratados con terapia anti-VEGF en diferentes hospitales españoles, se observó que la presencia de FIR producía peores resultados visuales y un riesgo mayor de atrofia y fibrosis[431], siendo estos dos hallazgos en gran parte los responsables de la mala AV. Sin embargo, los resultados de este trabajo no muestran diferencia estadísticamente significativa ($p=0,740$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores en función de la presencia de FIR basal, el cual fue detectado en el 81,36% (48/59) de los pacientes.

El papel del FSR está menos claro que el del FIR, pero su presencia está frecuentemente asociada con resultados visuales más altos y con bajas tasas de atrofia, independientemente de la frecuencia del tratamiento intravítreo, en comparación con la presencia de FQI [208]. En el estudio CATT los ojos con FSR basal obtuvieron una AVMC más alta a cinco años de seguimiento y este efecto fue todavía más evidente en el seguimiento a dos años. La hipótesis aquí mencionada propuso que el FSR puede proteger a los fotorreceptores de la potencial toxicidad relacionada con el contacto directo con un EPR enfermo. El

FSR pudiera contener factores neuroprotectores que proporcionen soporte trófico a la retina suprayacente [390]. En un análisis post hoc del estudio prospectivo y aleatorizado, HARBOR, la ausencia de FSR estuvo asociada a una baja AV [214]. Sadaa y cols. en desacuerdo con el papel de protección que pudiera ofrecer el FSR, enfatizaron en que los pacientes con FSR persistente en el estudio HARBOR habían conseguido un buen resultado visual porque habían sido tratados de manera continuada durante el mismo [432]. El estudio FLUID informó de los resultados visuales de pacientes con DMAEnv tratados con ranibizumab intravítreo durante veinticuatro meses con dos protocolos diferentes de inyecciones, los cuales exclusivamente diferían en la tolerancia del nivel de FSR. Los pacientes que fueron tratados con un protocolo que toleraba una pequeña cantidad de FSR ($\leq 200 \mu\text{m}$ debajo del centro de la fovea) consiguieron una AVMC media no inferior al grupo en el que todo el FSR fue resuelto [433] [210]. De este modo, los análisis de los estudios CATT, VIEW y HARBOR, han indicado que el FSR basal puede predecir resultados visuales mejores [397] [422] [429] [264] [214] y que el FSR residual puede estar asociado con ganancias visuales mayores a veinticuatro meses de seguimiento en el estudio HARBOR. En los estudios EXCITE y FLUID se observó que los individuos con FSR podían tolerar intervalos de tratamiento extendidos sin afectar negativamente a los resultados visuales [210] [434]. Sin embargo, un análisis post hoc del estudio FLUID mostró que el incremento del FSR dentro de los 1-6 mm centrales (pero no 1 mm central) de la retina estaba asociado con una AV cada vez más reducida [430]. Análisis post hoc de los estudios HAWK y HARRIER han propuesto que el efecto del FSR como un factor pronóstico puede ser en parte dependiente del volumen de FSR presente [417]. Otros estudios previos, han fallado en detectar una correlación significativa entre la presencia de FSR y los resultados visuales [426] [408]. Sin embargo, Segal y cols. hallaron una asociación significativa positiva entre el FSR y el resultado visual [435]. Más recientemente, en un estudio de práctica clínica real realizado en hospitales españoles, la presencia de FSR estuvo asociada con buenos resultados visuales y menores tasas de atrofia y fibrosis [431]. En el presente estudio no se ha detectado diferencia estadísticamente significativa ($p=0,377$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores en función de la presencia de FSR

basal, el cual estuvo presente en el 72,88% (43/59) del total de los 59 pacientes incluidos en este estudio.

La presencia de FQI basal está frecuentemente asociada tanto con una AV basal pobre como con una baja mejora visual tras el tratamiento anti-VEGF [436]. La presencia de quistes intrarretinianos ha mostrado resultados contradictorios en la literatura como biomarcador tomográfico en la predicción de la respuesta a la terapia anti-VEGF, específicamente a ranibizumab. Gamulescu y cols. informaron que la presencia de estos quistes estaba asociada a un peor pronóstico visual que la presencia de FSR [437]. El efecto negativo de la presencia de FQI en la AV fue confirmado en el estudio CATT en todos los puntos de tiempo examinados en un periodo de dos años. Esta correlación fue más fuerte en el segundo año y los autores postularon que los quistes pequeños hiporreflectivos persistentes tras la terapia anti-VEGF al finalizar el primer año podían haber sido debidos a mecanismos independientes de VEGF, como es la muerte celular [422]. En un análisis post hoc de un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y multicéntrico, en el que se incluyeron 1.240 pacientes con DMAEnv tratados con ranibizumab o aflibercept intravítreo, Schmidt-Erfurth y cols. comunicaron que la presencia de FQI fue la única característica que se correlacionó de manera estadísticamente significativa con la función visual basal, con valores bajos basales de AVMC y durante el tratamiento. Cuando el FQI persistió tras tres dosis mensuales iniciales de farmacoterapia anti-VEGF hubo una mayor disminución de la AVMC y estos quistes degenerativos mostraron el peor pronóstico en los resultados visuales [438]. Es más, los pacientes con FQI persistente a pesar de doce inyecciones mensuales de fármacos anti-VEGF mostraron un alto riesgo de fibrosis y atrofia del EPR [208]. Sin embargo, este biomarcador no ha afectado significativamente al resultado visual en otras series [426]. Se puede concluir que la presencia de FQI siempre es un biomarcador pronóstico negativo, y tanto si aparece basalmente como a lo largo de la terapia anti-VEGF, la AV puede estar significativamente comprometida [438]. En este estudio se detectó FQI basalmente en el 59,32% (35/59) de los pacientes, sin haberse detectado diferencia estadísticamente significativa ($p=0,795$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

La presencia de una hemorragia clínica por sí misma no ha sido asociada a unos peores resultados visuales. En el estudio CATT las lesiones compuestas en >50% por hemorragia obtuvieron ganancias visuales a dos años de seguimiento similares a aquellas que no la presentaron [439]. La hemorragia, sin embargo, necesita ser claramente definida ya que su presencia puede dañar significativamente la visión, particularmente aquellas de mayor tamaño (>1 DD) y aquellas localizadas directamente debajo de la fovea, habiendo sido asociadas las hemorragias subfoveales grandes con resultados visuales pobres, particularmente si no han sido tratadas [440]. De manera interesante, las grandes hemorragias (>1 DD) fueron un factor de riesgo para el desarrollo de una cicatriz en análisis post hoc del estudio CATT, sugiriendo que parte del pobre pronóstico visual de estas grandes hemorragias podía estar relacionado con el riesgo de cicatrización [441]. En el estudio de Suzuki y cols. [403] la presencia de HSR mediante la exploración fundoscópica se correlacionó con la no respuesta al tratamiento. En el presente estudio, el 47,46% (28/59) de los pacientes presentaron hemorragia en la retina en la exploración fundoscópica basal previa al inicio del tratamiento con ranibizumab, sin haberse detectado diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,196$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

La exudación es una característica común de la MNV y puede manifestarse en forma de lípidos (exudados duros) en la exploración fundoscópica. La concentración de estas moléculas puede exceder su solubilidad resultando en la deposición en el tejido [5]. Suzuki y cols. [403] hallaron entre los pacientes no respondedores, a juzgar por los hallazgos en el fondo de ojo, menos casos con edema macular que en los pacientes respondedores. Sin embargo, en el presente estudio no se ha detectado diferencia estadísticamente significativa ($p=0,446$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores en función de la presencia de exudación basal previa al inicio del tratamiento, la cual se detectó en el 13,56% (8/51) de los pacientes.

La presencia de AG en la presentación de la enfermedad está asociada con peores resultados visuales tras el tratamiento con ranibizumab [393] [381]. El seguimiento a largo plazo en los ensayos clínicos ha demostrado que el desarrollo de la atrofia es una causa principal del declive visual. En los resultados

a cinco años del estudio CATT el desarrollo de atrofia fue una razón significativa para el declive visual en esta cohorte [390] y la atrofia foveal en el segundo año estuvo asociada a un peor pronóstico visual en el quinto año. También este estudio informó de que la presencia de atrofia fuera del área foveal al inicio era un factor de riesgo para la pérdida de AV a dos años de seguimiento, indicando que la progresión de la AG es una razón importante para la pérdida de AV incluso durante los primeros años de terapia anti-VEGF. De manera similar, un análisis post hoc del estudio AREDS2 identificó a la atrofia como responsable del 60% de los casos de pobre visión (<20/200) [442]. En análisis agrupados de los estudios ANCHOR, MARINA y HORIZON, también se observó que la progresión de la atrofia macular era la causa principal del declive visual tras siete años de comenzar el tratamiento [443], lo que implica que el aumento de la atrofia central es un factor de pobre pronóstico. En el presente estudio se identificó atrofia basalmente en el 22,03% (13/56) de los pacientes, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($p=0,011$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores. Pero, aunque la atrofia del EPR fue mayor en el grupo con peor respuesta, como se ve regularmente en la clínica [393] [444] [390], no mostró poder discriminatorio entre los grupos ($AUC = 0,64$, $p = 0,0544$).

La fibrosis se refiere a la acumulación aparente de tejido en cualquier capa de la retina y es parte de la respuesta de cicatrización [5]. La presencia de una cicatriz se ha asociado a malos resultados visuales en los ensayos clínicos, notablemente en el estudio CATT [390] [422]. En análisis post hoc del estudio AREDS2 la fibrosis fue identificada como responsable del 40% de los casos de pobre visión (<20/200) [445], lo que implica que la prevención de la formación de cicatrices sigue siendo un objetivo importante en la preservación de la visión. En este estudio el 6,78% (4/59) de los pacientes presentaron fibrosis previamente al inicio del tratamiento, sin haberse detectado diferencia estadísticamente significativa ($p=1,000$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

El estudio MPS se basó en la única modalidad de imagen disponible en aquel momento, la AGF [446] [447]. Los límites claramente demarcados fueron el criterio esencial para determinar si la MNV era extrafoveal, yuxtafoveal o

subfoveal, tres ubicaciones consideradas importantes para predecir el resultado visual. Este resultado se correlaciona con la proximidad de la lesión al centro de la fovea [133], siendo peor conforme más próxima a este se encuentre la MNV. Basalmente mediante el estudio con AGF los pacientes en este trabajo incluidos mostraron MNVs de diferente localización en la siguiente proporción; 28,57% (16/56) subfoveales, 62,5% (35/56) yuxtafoveales y 8,93% (5/56) extrafoveales, sin haberse detectado diferencia estadísticamente significativa ($p=0,085$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

La AGF también es útil para documentar el tamaño de la MNV y se sabe que las lesiones de menor tamaño se correlacionan con un pronóstico visual mejor [386]. Un gran tamaño de la lesión se ha asociado de manera constante a un peor resultado visual en múltiples ensayos clínicos aleatorizados entre los que se incluyen los ensayos MARINA [395], ANCHOR [261], CATT [393] [390] y VIEW [448]. Al final del ensayo clínico MARINA el grupo de pacientes con MNVs de 3.6 DD más grandes tuvo una AV inferior en cinco letras respecto del grupo de pacientes con MNVs más pequeñas. En el estudio ANCHOR, con un seguimiento a doce meses, las lesiones con un incremento de 1 DD obtuvieron una AV 3.54 letras inferior [396]. En el estudio CATT, los pacientes con lesiones $>10.2 \text{ mm}^2$ comparados con aquellos pacientes con un tamaño de la lesión $\leq 2.54 \text{ mm}^2$ experimentaron una menor ganancia visual, hubo una menor proporción de pacientes que ganaron ≥ 15 letras y consiguieron una peor AV final tras un año de tratamiento [393]. En el presente estudio no se ha detectado diferencia estadísticamente significativa ($p=0,297$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores a juzgar por el tamaño de la MNV.

En origen, la clasificación del tipo o patrón de MNV se aplicó con el propósito de conocer qué pacientes se podían beneficiar del tratamiento mediante fotocoagulación láser, destinado a erradicar toda la lesión neovascular [446] [447]. Aunque en términos de ganancia visual no se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta de las lesiones de tipo C u O a los agentes anti-VEGF en los grandes ensayos clínicos aleatorizados, múltiples estudios han relacionado el tipo de MNV con el pronóstico visual. Los estudios ANCHOR [233] y MARINA [232] examinaron la eficacia de las inyecciones intravítreas de ranibizumab en ojos con membranas descritas como ocultas o

pobrementemente definidas y clásicas o bien definidas. De acuerdo a su diseño, estos ensayos clínicos no encontraron diferencias en la respuesta al tratamiento entre los diferentes tipos de lesiones [449]. En el ensayo clínico CATT [393] [381], las MNVs de tipo PC o MC obtuvieron un peor resultado visual a un año en comparación con las lesiones de tipo O (64.2 vs. 70.4 letras), por el contrario, los pacientes con este tipo de lesiones fueron más propensos a ganar ≥ 15 letras en el análisis univariado [393]. Las lesiones de tipo RAP se han asociado con mejores ganancias visuales tras la terapia intravítrea en comparación con otro tipo de lesiones, tanto en el ensayo clínico CATT como VIEW [315]. Estos beneficios parecen más pronunciados en la terapia de inicio (durante el primer año) con diferencias significativas en los resultados visuales entre las lesiones de este tipo y otros tipos de lesiones angiográficas. Sin embargo, tras dos años de tratamiento estas diferencias pasan a ser no significativas [450]. En los resultados del trabajo de Chae y cols. los ojos con MNVs localizadas por debajo del EPR al inicio fueron más propensos a mantener una buena AV tras la terapia anti-VEGF [451]. Sin embargo, al evaluar el efecto del tipo de MNV mediante AGF, Azar y cols. [426] no encontraron ninguna correlación significativa entre los diferentes tipos de MNV y los resultados visuales tras la administración de ranibizumab intravítreo. Por el contrario, Woo y cols. en el análisis univariable hallaron una mayor ganancia visual en los pacientes con MNVs de tipo PC o MC frente a las MNVs de tipo O [391]. En los ensayos clínicos VIEW1 y VIEW2 los pacientes con lesiones clásicas tuvieron mayor probabilidad de obtener una AV final $< 20/200$ a un año de tratamiento que aquellos pacientes con otro tipo de lesiones [452]. Esta discrepancia en los resultados puede ser debida a la diferencia en la población de estudio y en el diseño del estudio. El hecho de que los pacientes con lesiones clásicas se presenten frecuentemente con peor AV basal en los estudios se traduce en mejores ganancias visuales finales, debido al efecto de la AV basal sobre la final. En general, aparte de un pequeño grupo de buenos respondedores, los pacientes con lesiones clásicas responden relativamente peor que aquellos con otros tipos de lesiones [401]. Kang y Roh informaron de que el tamaño de la MNV, y no el tipo, se correlacionaba con el resultado visual de los pacientes [407]. En el presente estudio, el tipo de MNV según los hallazgos angiográficos no mostró diferencia estadísticamente

significativa ($p=0,577$) entre el grupo de pacientes buenos respondedores y pobres respondedores.

En el pasado se ha utilizado con éxito la tecnología RNA-Seq para dilucidar la implicación de vías relevantes para la respuesta al tratamiento farmacológico en una enfermedad ocular compleja a través del enriquecimiento de vías integradoras [366] [453]. Otros grupos han analizado los monocitos utilizando transcriptómica basada en microarrays para revelar las diferencias de genes relacionados con la inmunidad alterada entre los pacientes con DMAE y los controles de la misma edad [454].

En esta cohorte debido al número de muestras incluidas, así como a la variabilidad intrínseca asociada con las muestras humanas, la corrección de comparaciones múltiples no logró identificar diferencias significativas en la expresión de RNA o miRNA entre pacientes buenos y pobres respondedores. Sin embargo, el análisis exploratorio identificó genes/vías relevantes que pueden estar asociados con la respuesta a ranibizumab y justifican una mayor investigación. Es de destacar que los pacientes pobres respondedores mostraron un aumento en las citoquinas angiogénicas y proinflamatorias mediadas por la activación de la señalización del factor nuclear-kappa beta (NF- κ B), que puede ser de relevancia porque los factores inflamatorios sistémicos se han asociado con la patogénesis de la DMAE [455] [456]. Sin embargo, el papel en la aparición de la DMAE o respuesta a ranibizumab de los 4 RNAs y 1 miRNA que componen el mejor modelo de clasificación sigue sin estar claro porque la información en la literatura es escasa. ENSG00000249572 (lnc-ADAMTS12-6) es un nuevo transcrito afiliado con la clase de RNA no codificante largo (lncRNA) ubicado en el cromosoma 5 del genoma humano. Aunque todavía falta la caracterización funcional para la mayoría de los lncRNA, estos se han implicado en varias enfermedades humanas a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, los lncRNA pueden unirse al DNA genómico regulando la estructura de la cromatina local en el núcleo. Además, pueden regular la expresión génica post-transcripcionalmente interactuando con proteínas de traducción de RNA y miRNA [457]. Esta transcripción se ha asociado con la desregulación de lncRNA que se produce en PBMCs de pacientes con leucemia mielomonocítica juvenil portadores de una mutación en el gen NF1 [458], lo que sugiere un papel en la

regulación inmunitaria. ENSG00000161298 (ZNF382) pertenece a la familia del factor de transcripción de dedos de zinc del dominio KRAB que se ha demostrado que regula los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis, al interactuar con la proteína activadora 1, el protooncogén Fos, protooncogén Jun y señalización NF- κ B [459]. Estas interacciones dan como resultado la inhibición de estas vías inflamatorias lo que está de acuerdo con la noción de que los pobres respondedores, mostrando niveles reducidos de este factor de transcripción antiinflamatorio, pueden mostrar un perfil proinflamatorio en la expresión génica de las PBMCs. Además, la regulación positiva de ZNF382 reduce la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) como MMP1 [459], las cuales están desreguladas en la DMAE [460]. ENSG00000226479 (TMEM185B) es un gen codificador de proteínas ampliamente expresado que pertenece a la familia TMEM que reúne proteínas de funciones en su mayoría desconocidas. Para esta familia se han descrito funciones relacionadas con la proliferación y algunos de ellos han sido propuestos como posibles biomarcadores de pronóstico del cáncer de pulmón [461]. Curiosamente, este miembro se ha asociado con el síndrome de linfocitos desnudos tipo II, una enfermedad del sistema inmunológico categorizada como una forma de inmunodeficiencia combinada. Por último, ENSG00000198056 codifica una pequeña subunidad de la proteína Primasa (PRIM1) involucrada en la replicación del DNA y la proliferación celular. Esta primasa regula los procesos críticos en la retina ya que las mutaciones en esta promueven la apoptosis de las neuronas retinianas a través de la activación de p53 y puntos de control de daño del DNA [462] y su función se ha asociado con el desarrollo de degeneraciones retinianas hereditarias como la retinitis pigmentosa recesiva [463]. El quinto miembro del mejor modelo de clasificación es un miRNA (hsa-miR-20a-5p) expresado en la retina [464] capaz de regular un gran número de genes entre los que se incluyen genes relacionados con la regulación de la proliferación celular [465], sistema inmunológico [466] y apoptosis [467] [468]. Curiosamente, hsa-miR-20a-5p reprime la migración de células endoteliales en respuesta a VEGF regulando la activación de la quinasa MKK3 y p38 [469] [470]

Recientemente, se ha presentado un método de aprendizaje automático para la clasificación en la primera visita de pacientes con DMAEnv que requieren alta o baja demanda de tratamiento, mostrando resultados prometedores (AUCs que van de 0,76 a 0,79, con validación cruzada de 10 veces) mediante el uso de características morfológicas de OCT [471]. También, se ha desarrollado un método para predecir retrospectivamente la respuesta al tratamiento durante dos años con ranibizumab en pacientes con DMAEnv [472]. Este método derivó en un metamarcador basado en un modelo definido por una puntuación compuesta de siete características iniciales para categorizar la respuesta a ranibizumab. Estas siete características comprendieron la edad, el grosor de la lesión retiniana central, la AV, la presencia de quistes, el tipo de NV, la presencia de DEP y el tamaño de la fuga. En la presente cohorte, la respuesta fue medida después de tres inyecciones mensuales de ranibizumab sin haberse podido predecir la misma con precisión en función de ninguna de las siete características informadas. La única característica estadísticamente significativa entre los pacientes buenos y pobres respondedores fue la presencia de atrofia del EPR que no resultó discriminatoria entre los grupos.

La naturaleza multifactorial de la enfermedad, los avances recientes en las mediciones moleculares (RNA-Seq) y las técnicas computacionales (basadas en el aprendizaje automático), conducen a hipotetizar que el análisis transcriptómico global de PBMCs pudiera proporcionar más información sobre la respuesta a ranibizumab en pacientes con DMAEnv. En los últimos años la transcriptómica de células mononucleares de sangre periférica también se ha utilizado para capturar la variabilidad del sistema inmunológico en enfermedades autoinmunes o hepáticas, entre otras [473-475]. En este estudio se obtuvieron resultados moderados utilizando métodos basados en ED (AUC = 0,886 con una firma de 25 miembros para los datos de RNA, y AUC = 0,826 con una firma de 25 miembros para los datos de miRNA). Estos resultados eran hasta cierto punto esperables debido a la alta variabilidad que se suele obtener cuando se trabaja con muestras humanas [476], y especialmente en pacientes con DMAE. Por esa razón, se decidió realizar una selección de características con base en la reducción de la entropía lo que resultó en mejores modelos (AUC > 0.9 para datos

de RNA y miRNA) usando menos características, especialmente cuando se combinaron datos de RNA y miRNA.

Sin embargo, este estudio posee algunas limitaciones. Es un estudio unicéntrico por lo que las conclusiones extraídas pueden no ser trasladables a otros escenarios. La respuesta de los pacientes fue analizada después de únicamente tres meses de tratamiento. El razonamiento fue que, aunque ranibizumab puede ser eficaz después de periodos más prolongados a menudo es después de estos tres meses cuando los oftalmólogos deciden si continuar o modificar el tratamiento o el régimen. La clasificación del tipo de respuesta a ranibizumab se basó en la clasificación propuesta por Amoaku y cols. [365], aunque se reconoce que actualmente no hay consenso sobre cómo clasificar la respuesta óptima, o falta de ella, con esta terapia. No todos los biomarcadores de OCT descritos en la literatura como de valor pronóstico y orientación para el manejo terapéutico individualizado han sido incluidos en el análisis del presente trabajo. Un estudio similar con una cohorte más grande en términos de número de pacientes sería beneficioso para validar los resultados. Para reducir la posibilidad de sobreajuste se realizó una validación cruzada de 10 veces para la selección de características y construcción del modelo. Además, aunque el tamaño de la cohorte es lo suficientemente grande como para llegar a conclusiones significativas con las técnicas de aprendizaje automático que se han utilizado, estos resultados deberían replicarse en otras cohortes en el futuro. Dada la disparidad de regímenes de tratamiento que se encuentran en la bibliografía [477] [478] es difícil encontrar estudios comparables con datos de secuenciación disponibles.

Por estas razones, entre las perspectivas futuras se planea validar estos resultados en nuevas cohortes de pacientes que están siendo reclutadas para validar en ellas el transcriptoma y otros mecanismos de regulación genética estudiando su metiloma.

7. Conclusiones

Las cifras de pacientes pobres respondedores al tratamiento anti-VEGF en nuestro entorno son semejantes a las reportadas en estudios previos de práctica clínica real, así como las características clínicas sistémicas y retinianas.

Ninguna de las características clínicas basales analizadas de forma independiente tuvo poder discriminatorio de respuesta, haciendo necesario el empleo de otros biomarcadores con valor pronóstico superior.

El análisis transcriptómico realizado no encontró diferencias de expresión significativas de RNA o miRNA en función de la respuesta a ranibizumab, pero sugieren la implicación de genes/vías relevantes en algunas citoquinas angiogénicas y proinflamatorias poco descritas hasta la fecha.

Una firma compuesta por 4 RNAs y 1 miRNA en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con DMAEnv, permite predecir retrospectivamente una respuesta exitosa a ranibizumab antes del inicio del tratamiento, con buena precisión.

Los clasificadores de aprendizaje automático basados en RNA y miRNA de células mononucleares de sangre periférica, especialmente en combinación con otros métodos, como las características basales específicas, pueden mejorar la predicción de pacientes con respuesta insuficiente a ranibizumab y ayudar a establecer planes de tratamiento específicos para cada paciente en la primera visita.

Divulgación científica

Este trabajo ha dado lugar a la siguiente publicación que se puede encontrar como Anexo:

Oca AI, Pérez-Sala Á, Pariente A, Ochoa R, Velilla S, Peláez R, Larráyoiz IM. Predictive Biomarkers of Age-Related Macular Degeneration Response to Anti-VEGF Treatment. *J Pers Med*. 2021 Dec 8;11(12):1329. doi: 10.3390/jpm11121329. PMID: 34945801; PMCID: PMC8706948.

Bibliografía

1. Lambert, N.G.; ElShelmani, H.; Singh, M.K.; Mansergh, F.C.; Wride, M.A.; Padilla, M.; Keegan, D.; Hogg, R.E.; Ambati, B.K. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **2016**, *54*, 64-102, doi:10.1016/j.preteyeres.2016.04.003S1350-9462(16)30012-X [pii].
2. de Jong, P.T. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **2006**, *355*, 1474-1485, doi:355/14/1474 [pii]10.1056/NEJMra062326.
3. Bird, A. Age-related macular disease. *Br J Ophthalmol* **1996**, *80*, 2-3, doi:10.1136/bjo.80.1.2.
4. Ratnayaka, J.A.; Serpell, L.C.; Lotery, A.J. Dementia of the eye: the role of amyloid beta in retinal degeneration. *Eye (Lond)* **2015**, *29*, 1013-1026, doi:10.1038/eye.2015.100eye2015100 [pii].
5. Spaide, R.F.; Jaffe, G.J.; Sarraf, D.; Freund, K.B.; Sadda, S.R.; Staurengi, G.; Waheed, N.K.; Chakravarthy, U.; Rosenfeld, P.J.; Holz, F.G., et al. Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data: Consensus on Neovascular Age-Related Macular Degeneration Nomenclature Study Group. *Ophthalmology* **2020**, *127*, 616-636, doi:10.1016/j.ophtha.2019.11.004.
6. Mitchell, P.; Liew, G.; Gopinath, B.; Wong, T.Y. Age-related macular degeneration. *Lancet* **2018**, *392*, 1147-1159, doi:S0140-6736(18)31550-2 [pii]10.1016/S0140-6736(18)31550-2.
7. Nussenblatt, R.B.; Lee, R.W.; Chew, E.; Wei, L.; Liu, B.; Sen, H.N.; Dick, A.D.; Ferris, F.L. Immune responses in age-related macular degeneration and a possible long-term therapeutic strategy for prevention. *Am J Ophthalmol* **2014**, *158*, 5-11 e12, doi:10.1016/j.ajo.2014.03.014S0002-9394(14)00168-8 [pii].
8. Subhi, Y.; Forshaw, T.; Sorensen, T.L. Macular thickness and volume in the elderly: A systematic review. *Ageing Res Rev* **2016**, *29*, 42-49, doi:10.1016/j.arr.2016.05.013S1568-1637(16)30098-8 [pii].
9. Kokotas, H.; Grigoriadou, M.; Petersen, M.B. Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings. *Clin Chem Lab Med* **2011**, *49*, 601-616, doi:10.1515/CCLM.2011.091.
10. Holekamp, N.M. Review of neovascular age-related macular degeneration treatment options. *The American journal of managed care* **2019**, *25*, S172-S181.
11. Erke, M.G.; Bertelsen, G.; Peto, T.; Sjolie, A.K.; Lindekleiv, H.; Njolstad, I. Prevalence of age-related macular degeneration in elderly Caucasians: the Tromso Eye Study. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 1737-1743, doi:10.1016/j.ophtha.2012.03.016.
12. Pugazhendhi, A.; Hubbell, M.; Jairam, P.; Ambati, B. Neovascular Macular Degeneration: A Review of Etiology, Risk Factors, and Recent Advances in Research and Therapy. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:1170 [pii]10.3390/ijms22031170ijms22031170 [pii].
13. Kim, J.B.; Lad, E.M. Therapeutic Options Under Development for Nonneovascular Age-Related Macular Degeneration and Geographic Atrophy. *Drugs & aging* **2021**, *38*, 17-27, doi:10.1007/s40266-020-00822-6.
14. Ho, A.C.; Albin, T.A.; Brown, D.M.; Boyer, D.S.; Regillo, C.D.; Heier, J.S. The Potential Importance of Detection of Neovascular Age-Related Macular Degeneration When Visual Acuity Is Relatively Good. *JAMA ophthalmology* **2017**, *135*, 268-273, doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.5314.
15. Esteban, O.; Ascaso, F.J.; Mateo, J.; Calvo, T.; Montoya, J.; Ruiz-Pesini, E. Effect of mitochondrial haplogroups on ranibizumab response in neovascular age-related macular degeneration patients: a pilot study. *Acta ophthalmologica* **2019**, *97*, e133-e134, doi:10.1111/aos.13865.

16. Holz, F.G.; Strauss, E.C.; Schmitz-Valckenberg, S.; van Lookeren Campagne, M. Geographic atrophy: clinical features and potential therapeutic approaches. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 1079-1091, doi:10.1016/j.ophtha.2013.11.023.
17. Chiu, C.J.; Chang, M.L.; Zhang, F.F.; Li, T.; Gensler, G.; Schleicher, M.; Taylor, A. The relationship of major American dietary patterns to age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **2014**, *158*, 118-127 e111, doi:10.1016/j.ajo.2014.04.016.
18. Flaxel, C.J.; Adelman, R.A.; Bailey, S.T.; Fawzi, A.; Lim, J.I.; Vemulakonda, G.A.; Ying, G.S. Age-Related Macular Degeneration Preferred Practice Pattern(R). *Ophthalmology* **2020**, *127*, P1-P65, doi:10.1016/j.ophtha.2019.09.024.
19. Klein, R.; Klein, B.E.; Knudtson, M.D.; Wong, T.Y.; Cotch, M.F.; Liu, K.; Burke, G.; Saad, M.F.; Jacobs, D.R., Jr. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology* **2006**, *113*, 373-380, doi:10.1016/j.ophtha.2005.12.013.
20. Klein, B.E.; Klein, R. Cataracts and macular degeneration in older Americans. *Arch Ophthalmol* **1982**, *100*, 571-573, doi:10.1001/archopht.1982.01030030573002.
21. Vinding, T. Age-related macular degeneration. Macular changes, prevalence and sex ratio. An epidemiological study of 1000 aged individuals. *Acta Ophthalmol (Copenh)* **1989**, *67*, 609-616, doi:10.1111/j.1755-3768.1989.tb04392.x.
22. Klein, R.; Klein, B.E.; Linton, K.L. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **1992**, *99*, 933-943, doi:10.1016/s0161-6420(92)31871-8.
23. Vingerling, J.R.; Dielemans, I.; Hofman, A.; Grobbee, D.E.; Hijmering, M.; Kramer, C.F.; de Jong, P.T. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology* **1995**, *102*, 205-210, doi:S0161-6420(95)31034-2 [pii]10.1016/s0161-6420(95)31034-2.
24. Mitchell, P.; Smith, W.; Attebo, K.; Wang, J.J. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **1995**, *102*, 1450-1460, doi:S0161-6420(95)30846-9 [pii]10.1016/s0161-6420(95)30846-9.
25. Klein, R.; Klein, B.E.; Tomany, S.C.; Meuer, S.M.; Huang, G.H. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* **2002**, *109*, 1767-1779, doi:10.1016/s0161-6420(02)01146-6.
26. Varma, R.; Fraser-Bell, S.; Tan, S.; Klein, R.; Azen, S.P. Prevalence of age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology* **2004**, *111*, 1288-1297, doi:10.1016/j.ophtha.2004.01.023.
27. Munoz, B.; Klein, R.; Rodriguez, J.; Snyder, R.; West, S.K. Prevalence of age-related macular degeneration in a population-based sample of Hispanic people in Arizona: Proyecto VER. *Archives of ophthalmology* **2005**, *123*, 1575-1580, doi:10.1001/archopht.123.11.1575.
28. Schachat, A.P.; Hyman, L.; Leske, M.C.; Connell, A.M.; Wu, S.Y. Features of age-related macular degeneration in a black population. The Barbados Eye Study Group. *Archives of ophthalmology* **1995**, *113*, 728-735, doi:10.1001/archopht.1995.01100060054032.
29. Friedman, D.S.; Katz, J.; Bressler, N.M.; Rahmani, B.; Tielsch, J.M. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* **1999**, *106*, 1049-1055, doi:10.1016/S0161-6420(99)90267-1.
30. Jampol, L.M.; Tielsch, J. Race, macular degeneration, and the Macular Photocoagulation Study. *Archives of ophthalmology* **1992**, *110*, 1699-1700, doi:10.1001/archopht.1992.01080240039024.
31. Wong, W.L.; Su, X.; Li, X.; Cheung, C.M.; Klein, R.; Cheng, C.Y.; Wong, T.Y. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020

- and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health* **2014**, *2*, e106-116, doi:10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
32. Wong, W.L.; Su, X.; Li, X.; Cheung, C.M.; Klein, R.; Cheng, C.Y.; Wong, T.Y. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* **2014**, *2*, e106-116, doi:10.1016/S2214-109X(13)70145-1S2214-109X(13)70145-1 [pii].
 33. Li, J.Q.; Welchowski, T.; Schmid, M.; Mauschitz, M.M.; Holz, F.G.; Finger, R.P. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* **2020**, *104*, 1077-1084, doi:10.1136/bjophthalmol-2019-314422bjophthalmol-2019-314422 [pii].
 34. Prevalence of age-related macular degeneration in Spain. *The British journal of ophthalmology* **2011**, *95*, 931-936, doi:10.1136/bjo.2010.187773.
 35. Zapata, M.A.; Bures, A.; Gallego-Pinazo, R.; Gutierrez-Sanchez, E.; Olenik, A.; Pastor, S.; Ruiz-Medrano, J.; Salinas, C.; Otero-Romero, S.; Abraldes, M. Prevalence of age-related macular degeneration among optometric telemedicine users in Spain: a retrospective nationwide population-based study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **2021**, doi:10.1007/s00417-021-05093-4.
 36. Colijn, J.M.; Buitendijk, G.H.S.; Prokofyeva, E.; Alves, D.; Cachulo, M.L.; Khawaja, A.P.; Cougnard-Gregoire, A.; Merle, B.M.J.; Korb, C.; Erke, M.G., et al. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology* **2017**, *124*, 1753-1763, doi:S0161-6420(16)32475-7 [pii]10.1016/j.ophtha.2017.05.035.
 37. Rosing, M.P.; Durhuus, J.A.; Krogh Nielsen, M.; Subhi, Y.; Kirkwood, T.B.; Westendorp, R.G.; Sorensen, T.L. Age-related macular degeneration: A two-level model hypothesis. *Prog Retin Eye Res* **2020**, *76*, 100825, doi:S1350-9462(19)30112-0 [pii]10.1016/j.preteyeres.2019.100825.
 38. Plessz, M.; Gueguen, A.; Goldberg, M.; Czernichow, S.; Zins, M. Ageing, retirement and changes in vegetable consumption in France: findings from the prospective GAZEL cohort. *Br J Nutr* **2015**, *114*, 979-987, doi:10.1017/S0007114515002615S0007114515002615 [pii].
 39. Pot, G.K.; Prynne, C.J.; Almoosawi, S.; Kuh, D.; Stephen, A.M. Trends in food consumption over 30 years: evidence from a British birth cohort. *Eur J Clin Nutr* **2015**, *69*, 817-823, doi:10.1038/ejcn.2014.223ejcn2014223 [pii].
 40. Cruickshanks, K.J.; Nondahl, D.M.; Johnson, L.J.; Dalton, D.S.; Fisher, M.E.; Huang, G.H.; Klein, B.E.; Klein, R.; Schubert, C.R. Generational Differences in the 5-Year Incidence of Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol* **2017**, *135*, 1417-1423, doi:10.1001/jamaophthalmol.2017.50012663390 [pii].
 41. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **2001**, *69*, 89-95, doi:S0009-9236(01)63448-9 [pii]10.1067/mcp.2001.113989.
 42. Mayeux, R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx* **2004**, *1*, 182-188, doi:10.1602/neuroRx.1.2.182S1545-5343(06)70033-5 [pii].
 43. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* **2000**, *107*, 2224-2232, doi:10.1016/s0161-6420(00)00409-7.
 44. Blumenkranz, M.S.; Russell, S.R.; Robey, M.G.; Kott-Blumenkranz, R.; Penneys, N. Risk factors in age-related maculopathy complicated by choroidal neovascularization. *Ophthalmology* **1986**, *93*, 552-558, doi:10.1016/s0161-6420(86)33702-3.
 45. Buch, H.; Vinding, T.; la Cour, M.; Jensen, G.B.; Prause, J.U.; Nielsen, N.V. Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study: the Copenhagen City Eye Study.

- Acta ophthalmologica Scandinavica* **2005**, *83*, 409-418, doi:10.1111/j.1600-0420.2005.00492.x.
46. Choudhury, F.; Varma, R.; McKean-Cowdin, R.; Klein, R.; Azen, S.P. Risk factors for four-year incidence and progression of age-related macular degeneration: the los angeles latino eye study. *American journal of ophthalmology* **2011**, *152*, 385-395, doi:10.1016/j.ajo.2011.02.025.
 47. Klein, R.; Klein, B.E.; Jensen, S.C.; Meuer, S.M. The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **1997**, *104*, 7-21, doi:10.1016/s0161-6420(97)30368-6.
 48. Klein, R.; Klein, B.E.; Knudtson, M.D.; Meuer, S.M.; Swift, M.; Gangnon, R.E. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **2007**, *114*, 253-262, doi:10.1016/j.ophtha.2006.10.040.
 49. Miyazaki, M.; Kiyohara, Y.; Yoshida, A.; Iida, M.; Nose, Y.; Ishibashi, T. The 5-year incidence and risk factors for age-related maculopathy in a general Japanese population: the Hisayama study. *Investigative ophthalmology & visual science* **2005**, *46*, 1907-1910, doi:10.1167/iovs.04-0923.
 50. Owen, C.G.; Jarrar, Z.; Wormald, R.; Cook, D.G.; Fletcher, A.E.; Rudnicka, A.R. The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *The British journal of ophthalmology* **2012**, *96*, 752-756, doi:10.1136/bjophthalmol-2011-301109.
 51. Rein, D.B.; Wittenborn, J.S.; Zhang, X.; Honeycutt, A.A.; Lesesne, S.B.; Saaddine, J. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments. *Archives of ophthalmology* **2009**, *127*, 533-540, doi:10.1001/archophthalmol.2009.58.
 52. Tomany, S.C.; Klein, R.; Klein, B.E. The relationship between iris color, hair color, and skin sun sensitivity and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **2003**, *110*, 1526-1533, doi:10.1016/s0161-6420(03)00539-6.
 53. Wang, J.J.; Rochtchina, E.; Lee, A.J.; Chia, E.M.; Smith, W.; Cumming, R.G.; Mitchell, P. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **2007**, *114*, 92-98, doi:10.1016/j.ophtha.2006.07.017.
 54. Woo, S.J.; Ahn, J.; Morrison, M.A.; Ahn, S.Y.; Lee, J.; Kim, K.W.; DeAngelis, M.M.; Park, K.H. Analysis of Genetic and Environmental Risk Factors and Their Interactions in Korean Patients with Age-Related Macular Degeneration. *PLoS one* **2015**, *10*, e0132771, doi:10.1371/journal.pone.0132771.
 55. Lambert, N.G.; ElShelmani, H.; Singh, M.K.; Mansergh, F.C.; Wride, M.A.; Padilla, M.; Keegan, D.; Hogg, R.E.; Ambati, B.K. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **2016**, *54*, 64-102, doi:10.1016/j.preteyeres.2016.04.003.
 56. Frank, R.N.; Puklin, J.E.; Stock, C.; Canter, L.A. Race, iris color, and age-related macular degeneration. *Transactions of the American Ophthalmological Society* **2000**, *98*, 109-115; discussion 115-107.
 57. Churchill, A.J.; Carter, J.G.; Lovell, H.C.; Ramsden, C.; Turner, S.J.; Yeung, A.; Escardo, J.; Atan, D. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Human molecular genetics* **2006**, *15*, 2955-2961, doi:10.1093/hmg/ddl238.
 58. Klein, R.; Klein, B.E.; Tomany, S.C.; Cruickshanks, K.J. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **2003**, *110*, 1273-1280, doi:10.1016/S0161-6420(03)00599-2.
 59. Delcourt, C.; Michel, F.; Colvez, A.; Lacroux, A.; Delage, M.; Vernet, M.H. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the

- POLA study. *Ophthalmic epidemiology* **2001**, *8*, 237-249, doi:10.1076/opep.8.4.237.1613.
60. Clemons, T.E.; Milton, R.C.; Klein, R.; Seddon, J.M.; Ferris, F.L., 3rd. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* **2005**, *112*, 533-539, doi:10.1016/j.ophtha.2004.10.047.
 61. Wang, I.K.; Lin, H.J.; Wan, L.; Lin, C.L.; Yen, T.H.; Sung, F.C. Risk of Age-Related Macular Degeneration in End-Stage Renal Disease Patients Receiving Long-Term Dialysis. *Retina* **2016**, *36*, 1866-1873, doi:10.1097/IAE.0000000000001011.
 62. Tomany, S.C.; Wang, J.J.; Van Leeuwen, R.; Klein, R.; Mitchell, P.; Vingerling, J.R.; Klein, B.E.; Smith, W.; De Jong, P.T. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* **2004**, *111*, 1280-1287, doi:10.1016/j.ophtha.2003.11.010S0161-6420(04)00306-9 [pii].
 63. Jonasson, F.; Fisher, D.E.; Eiriksdottir, G.; Sigurdsson, S.; Klein, R.; Launer, L.J.; Harris, T.; Gudnason, V.; Cotch, M.F. Five-year incidence, progression, and risk factors for age-related macular degeneration: the age, gene/environment susceptibility study. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 1766-1772, doi:10.1016/j.ophtha.2014.03.013S0161-6420(14)00237-1 [pii].
 64. Saunier, V.; Merle, B.M.J.; Delyfer, M.N.; Cougnard-Gregoire, A.; Rougier, M.B.; Amouyel, P.; Lambert, J.C.; Dartigues, J.F.; Korobelnik, J.F.; Delcourt, C. Incidence of and Risk Factors Associated With Age-Related Macular Degeneration: Four-Year Follow-up From the ALIENOR Study. *JAMA Ophthalmol* **2018**, *136*, 473-481, doi:10.1001/jamaophthalmol.2018.05042676792 [pii].
 65. Seddon, J.M.; Cote, J.; Davis, N.; Rosner, B. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Arch Ophthalmol* **2003**, *121*, 785-792, doi:10.1001/archophth.121.6.785121/6/785 [pii].
 66. Tan, J.S.; Mitchell, P.; Smith, W.; Wang, J.J. Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **2007**, *114*, 1143-1150, doi:S0161-6420(06)01451-5 [pii]10.1016/j.ophtha.2006.09.033.
 67. Klein, R.; Klein, B.E.; Knudtson, M.D.; Cotch, M.F.; Wong, T.Y.; Liu, K.; Burke, G.L.; Saad, M.F.; Jacobs, D.R., Jr.; Sharrett, A.R. Subclinical atherosclerotic cardiovascular disease and early age-related macular degeneration in a multiracial cohort: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Arch Ophthalmol* **2007**, *125*, 534-543, doi:125/4/534 [pii]10.1001/archophth.125.4.534.
 68. Fritsche, L.G.; Igl, W.; Bailey, J.N.; Grassmann, F.; Sengupta, S.; Bragg-Gresham, J.L.; Burdon, K.P.; Hebbring, S.J.; Wen, C.; Gorski, M., et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet* **2016**, *48*, 134-143, doi:10.1038/ng.3448ng.3448 [pii].
 69. Fritsche, L.G.; Igl, W.; Bailey, J.N.; Grassmann, F.; Sengupta, S.; Bragg-Gresham, J.L.; Burdon, K.P.; Hebbring, S.J.; Wen, C.; Gorski, M., et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature genetics* **2016**, *48*, 134-143, doi:10.1038/ng.3448.
 70. Gu, J.; Pauer, G.J.; Yue, X.; Narendra, U.; Sturgill, G.M.; Bena, J.; Gu, X.; Peachey, N.S.; Salomon, R.G.; Hagstrom, S.A., et al. Proteomic and genomic biomarkers for age-related macular degeneration. *Advances in experimental medicine and biology* **2010**, *664*, 411-417, doi:10.1007/978-1-4419-1399-9_47.
 71. Hollyfield, J.G.; Perez, V.L.; Salomon, R.G. A hapten generated from an oxidation fragment of docosahexaenoic acid is sufficient to initiate age-related macular

- degeneration. *Molecular neurobiology* **2010**, *41*, 290-298, doi:10.1007/s12035-010-8110-z.
72. Ni, J.; Yuan, X.; Gu, J.; Yue, X.; Gu, X.; Nagaraj, R.H.; Crabb, J.W. Plasma protein pentosidine and carboxymethyllysine, biomarkers for age-related macular degeneration. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2009**, *8*, 1921-1933, doi:10.1074/mcp.M900127-MCP200.
 73. Kamburoglu, G.; Gumus, K.; Kadayifcilar, S.; Eldem, B. Plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels in age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **2006**, *244*, 565-569, doi:10.1007/s00417-005-0108-2.
 74. Rochtchina, E.; Wang, J.J.; Flood, V.M.; Mitchell, P. Elevated serum homocysteine, low serum vitamin B12, folate, and age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *American journal of ophthalmology* **2007**, *143*, 344-346, doi:10.1016/j.ajo.2006.08.032.
 75. Vine, A.K.; Stader, J.; Branham, K.; Musch, D.C.; Swaroop, A. Biomarkers of cardiovascular disease as risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2005**, *112*, 2076-2080, doi:10.1016/j.ophtha.2005.07.004.
 76. Coral, K.; Raman, R.; Rathi, S.; Rajesh, M.; Sulochana, K.N.; Angayarkanni, N.; Paul, P.G.; Ramakrishnan, S. Plasma homocysteine and total thiol content in patients with exudative age-related macular degeneration. *Eye* **2006**, *20*, 203-207, doi:10.1038/sj.eye.6701853.
 77. Ghosh, S.; Saha, M.; Das, D. A study on plasma homocysteine level in age-related macular degeneration. *Nepalese journal of ophthalmology : a biannual peer-reviewed academic journal of the Nepal Ophthalmic Society : NEPJOPH* **2013**, *5*, 195-200, doi:10.3126/nepjoph.v5i2.8728.
 78. Nowak, M.; Swietochowska, E.; Wielkoszynski, T.; Marek, B.; Kos-Kudla, B.; Szapska, B.; Kajdaniuk, D.; Glogowska-Szelag, J.; Sieminska, I.; Ostrowska, Z., et al. Homocysteine, vitamin B12, and folic acid in age-related macular degeneration. *European journal of ophthalmology* **2005**, *15*, 764-767, doi:10.5301/EJO.2008.3287.
 79. Seddon, J.M.; George, S.; Rosner, B.; Rifai, N. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. *Archives of ophthalmology* **2005**, *123*, 774-782, doi:10.1001/archophth.123.6.774.
 80. Colak, E.; Kosanovic-Jakovic, N.; Zoric, L.; Radosavljevic, A.; Stankovic, S.; Majkic-Singh, N. The association of lipoprotein parameters and C-reactive protein in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmic research* **2011**, *46*, 125-132, doi:10.1159/000323815.
 81. Hong, T.; Tan, A.G.; Mitchell, P.; Wang, J.J. A review and meta-analysis of the association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* **2011**, *56*, 184-194, doi:10.1016/j.survophthal.2010.08.007.
 82. Robman, L.; Baird, P.N.; Dimitrov, P.N.; Richardson, A.J.; Guymer, R.H. C-reactive protein levels and complement factor H polymorphism interaction in age-related macular degeneration and its progression. *Ophthalmology* **2010**, *117*, 1982-1988, doi:10.1016/j.ophtha.2010.02.003.
 83. Seddon, J.M.; Gensler, G.; Milton, R.C.; Klein, M.L.; Rifai, N. Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *JAMA* **2004**, *291*, 704-710, doi:10.1001/jama.291.6.704.
 84. Yasuma, T.R.; Nakamura, M.; Nishiguchi, K.M.; Kikuchi, M.; Kaneko, H.; Niwa, T.; Hamajima, N.; Terasaki, H. Elevated C-reactive protein levels and ARMS2/HTRA1 gene variants in subjects without age-related macular degeneration. *Molecular vision* **2010**, *16*, 2923-2930.

85. Cobos, E.; Recalde, S.; Anter, J.; Hernandez-Sanchez, M.; Barreales, C.; Olavarrieta, L.; Valverde, A.; Suarez-Figueroa, M.; Cruz, F.; Abrales, M., et al. Association between CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1 and VEGF polymorphisms and anatomical and functional response to ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica* **2018**, *96*, e201-e212, doi:10.1111/aos.13519.
86. Adamus, G.; Chew, E.Y.; Ferris, F.L.; Klein, M.L. Prevalence of anti-retinal autoantibodies in different stages of Age-related macular degeneration. *BMC ophthalmology* **2014**, *14*, 154, doi:10.1186/1471-2415-14-154.
87. Donoso, L.A.; Kim, D.; Frost, A.; Callahan, A.; Hageman, G. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* **2006**, *51*, 137-152, doi:10.1016/j.survophthal.2005.12.001.
88. Iannaccone, A.; Neeli, I.; Krishnamurthy, P.; Lenchik, N.I.; Wan, H.; Gerling, I.C.; Desiderio, D.M.; Radic, M.Z. Autoimmune biomarkers in age-related macular degeneration: a possible role player in disease development and progression. *Advances in experimental medicine and biology* **2012**, *723*, 11-16, doi:10.1007/978-1-4614-0631-0_2.
89. Nussenblatt, R.B.; Ferris, F., 3rd. Age-related macular degeneration and the immune response: implications for therapy. *American journal of ophthalmology* **2007**, *144*, 618-626, doi:10.1016/j.ajo.2007.06.025.
90. Penfold, P.L.; Madigan, M.C.; Gillies, M.C.; Provis, J.M. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **2001**, *20*, 385-414, doi:10.1016/s1350-9462(00)00025-2.
91. Reynolds, R.; Rosner, B.; Seddon, J.M. Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2010**, *117*, 1989-1995, doi:10.1016/j.ophtha.2010.07.009.
92. Mo, F.M.; Proia, A.D.; Johnson, W.H.; Cyr, D.; Lashkari, K. Interferon gamma-inducible protein-10 (IP-10) and eotaxin as biomarkers in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2010**, *51*, 4226-4236, doi:10.1167/iovs.09-3910.
93. Lip, P.L.; Blann, A.D.; Hope-Ross, M.; Gibson, J.M.; Lip, G.Y. Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* **2001**, *108*, 705-710, doi:10.1016/s0161-6420(00)00663-1.
94. Ambati, B.K.; Nozaki, M.; Singh, N.; Takeda, A.; Jani, P.D.; Suthar, T.; Albuquerque, R.J.; Richter, E.; Sakurai, E.; Newcomb, M.T., et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* **2006**, *443*, 993-997, doi:10.1038/nature05249.
95. Uehara, H.; Mamalis, C.; McFadden, M.; Taggart, M.; Stagg, B.; Passi, S.; Earle, P.; Chakravarthy, U.; Hogg, R.E.; Ambati, B.K. The reduction of serum soluble Flt-1 in patients with neovascular age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **2015**, *159*, 92-100 e101-102, doi:10.1016/j.ajo.2014.09.036.
96. Bazan, N.G.; Molina, M.F.; Gordon, W.C. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annual review of nutrition* **2011**, *31*, 321-351, doi:10.1146/annurev.nutr.012809.104635.
97. Osborn, M.P.; Park, Y.; Parks, M.B.; Burgess, L.G.; Uppal, K.; Lee, K.; Jones, D.P.; Brantley, M.A., Jr. Metabolome-wide association study of neovascular age-related macular degeneration. *PLoS one* **2013**, *8*, e72737, doi:10.1371/journal.pone.0072737.
98. Arora, A.; McKay, G.J.; Simpson, D.A. Prediction and verification of miRNA expression in human and rat retinas. *Investigative ophthalmology & visual science* **2007**, *48*, 3962-3967, doi:10.1167/iovs.06-1221.

99. Wang, V.M.; Rosen, R.B.; Meyerle, C.B.; Kurup, S.K.; Ardeljan, D.; Agron, E.; Tai, K.; Pomykala, M.; Chew, E.Y.; Chan, C.C., et al. Suggestive association between PLA2G12A single nucleotide polymorphism rs2285714 and response to anti-vascular endothelial growth factor therapy in patients with exudative age-related macular degeneration. *Molecular vision* **2012**, *18*, 2578-2585.
100. Lin, H.; Qian, J.; Castillo, A.C.; Long, B.; Keyes, K.T.; Chen, G.; Ye, Y. Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **2011**, *52*, 6308-6314, doi:10.1167/iovs.10-6632.
101. Shen, J.; Yang, X.; Xie, B.; Chen, Y.; Swaim, M.; Hackett, S.F.; Campochiaro, P.A. MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2008**, *16*, 1208-1216, doi:10.1038/mt.2008.104.
102. Klein, B.E.; Howard, K.P.; Iyengar, S.K.; Sivakumaran, T.A.; Meyers, K.J.; Cruickshanks, K.J.; Klein, R. Sunlight exposure, pigmentation, and incident age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2014**, *55*, 5855-5861, doi:10.1167/iovs.14-14602iovs.14-14602 [pii].
103. Velilla, S.; Garcia-Medina, J.J.; Garcia-Layana, A.; Dolz-Marco, R.; Pons-Vazquez, S.; Pinazo-Duran, M.D.; Gomez-Ulla, F.; Arevalo, J.F.; Diaz-Llopis, M.; Gallego-Pinazo, R. Smoking and age-related macular degeneration: review and update. *Journal of ophthalmology* **2013**, *2013*, 895147, doi:10.1155/2013/895147.
104. Evans, J.R.; Fletcher, A.E.; Wormald, R.P. 28,000 Cases of age related macular degeneration causing visual loss in people aged 75 years and above in the United Kingdom may be attributable to smoking. *The British journal of ophthalmology* **2005**, *89*, 550-553, doi:10.1136/bjo.2004.049726.
105. Thornton, J.; Edwards, R.; Mitchell, P.; Harrison, R.A.; Buchan, I.; Kelly, S.P. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye* **2005**, *19*, 935-944, doi:10.1038/sj.eye.6701978.
106. Mitchell, P.; Smith, W.; Wang, J.J. Iris color, skin sun sensitivity, and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **1998**, *105*, 1359-1363, doi:10.1016/S0161-6420(98)98013-7.
107. Schick, T.; Ersoy, L.; Lechanteur, Y.T.; Saksens, N.T.; Hoyng, C.B.; den Hollander, A.I.; Kirchhof, B.; Fauser, S. History of Sunlight Exposure Is a Risk Factor for Age-Related Macular Degeneration. *Retina* **2016**, *36*, 787-790, doi:10.1097/IAE.0000000000000756.
108. Taylor, H.R.; West, S.; Munoz, B.; Rosenthal, F.S.; Bressler, S.B.; Bressler, N.M. The long-term effects of visible light on the eye. *Archives of ophthalmology* **1992**, *110*, 99-104, doi:10.1001/archopht.1992.01080130101035.
109. Fletcher, A.E.; Bentham, G.C.; Agnew, M.; Young, I.S.; Augood, C.; Chakravarthy, U.; de Jong, P.T.; Rahu, M.; Seland, J.; Soubrane, G., et al. Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* **2008**, *126*, 1396-1403, doi:10.1001/archopht.126.10.1396126/10/1396 [pii].
110. Cho, E.; Hankinson, S.E.; Willett, W.C.; Stampfer, M.J.; Spiegelman, D.; Speizer, F.E.; Rimm, E.B.; Seddon, J.M. Prospective study of alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology* **2000**, *118*, 681-688, doi:10.1001/archopht.118.5.681.
111. Moss, S.E.; Klein, R.; Klein, B.E.; Jensen, S.C.; Meuer, S.M. Alcohol consumption and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* **1998**, *105*, 789-794, doi:10.1016/S0161-6420(98)95016-3.
112. Chong, E.W.; Kreis, A.J.; Wong, T.Y.; Simpson, J.A.; Guymer, R.H. Alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *American journal of ophthalmology* **2008**, *145*, 707-715, doi:10.1016/j.ajo.2007.12.005.

113. Blasiak, J. Senescence in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci* **2020**, *77*, 789-805, doi:10.1007/s00018-019-03420-x10.1007/s00018-019-03420-x [pii].
114. Bhutto, I.; Luty, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* **2012**, *33*, 295-317, doi:10.1016/j.mam.2012.04.005S0098-2997(12)00045-3 [pii].
115. Kauppinen, A.; Paterno, J.J.; Blasiak, J.; Salminen, A.; Kaarniranta, K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci* **2016**, *73*, 1765-1786, doi:10.1007/s00018-016-2147-810.1007/s00018-016-2147-8 [pii].
116. Al-Zamil, W.M.; Yassin, S.A. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging* **2017**, *12*, 1313-1330, doi:10.2147/CIA.S143508cia-12-1313 [pii].
117. Rosing, M.P.; Durhuus, J.A.; Krogh Nielsen, M.; Subhi, Y.; Kirkwood, T.B.; Westendorp, R.G.; Sorensen, T.L. Age-related macular degeneration: A two-level model hypothesis. *Progress in retinal and eye research* **2020**, *76*, 100825, doi:10.1016/j.preteyeres.2019.100825.
118. Bird, A.C.; Bressler, N.M.; Bressler, S.B.; Chisholm, I.H.; Coscas, G.; Davis, M.D.; de Jong, P.T.; Klaver, C.C.; Klein, B.E.; Klein, R., et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* **1995**, *39*, 367-374, doi:S0039-6257(05)80092-X [pii]10.1016/s0039-6257(05)80092-x.
119. Ferris, F.L., 3rd; Wilkinson, C.P.; Bird, A.; Chakravarthy, U.; Chew, E.; Csaky, K.; Sadda, S.R. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 844-851, doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.036S0161-6420(12)01055-X [pii].
120. Klein, R.; Meuer, S.M.; Myers, C.E.; Buitendijk, G.H.; Rochtchina, E.; Choudhury, F.; de Jong, P.T.; McKean-Cowdin, R.; Iyengar, S.K.; Gao, X., et al. Harmonizing the classification of age-related macular degeneration in the three-continent AMD consortium. *Ophthalmic Epidemiol* **2014**, *21*, 14-23, doi:10.3109/09286586.2013.867512.
121. Davis, M.D.; Gangnon, R.E.; Lee, L.Y.; Hubbard, L.D.; Klein, B.E.; Klein, R.; Ferris, F.L.; Bressler, S.B.; Milton, R.C. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Arch Ophthalmol* **2005**, *123*, 1484-1498, doi:123/11/1484 [pii]10.1001/archophth.123.11.1484.
122. Ferris, F.L.; Davis, M.D.; Clemons, T.E.; Lee, L.Y.; Chew, E.Y.; Lindblad, A.S.; Milton, R.C.; Bressler, S.B.; Klein, R. A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch Ophthalmol* **2005**, *123*, 1570-1574, doi:123/11/1570 [pii]10.1001/archophth.123.11.1570.
123. Klein, R.; Davis, M.D.; Magli, Y.L.; Segal, P.; Klein, B.E.; Hubbard, L. The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology* **1991**, *98*, 1128-1134, doi:10.1016/s0161-6420(91)32186-9.
124. Klaver, C.C.; Assink, J.J.; van Leeuwen, R.; Wolfs, R.C.; Vingerling, J.R.; Stijnen, T.; Hofman, A.; de Jong, P.T. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2001**, *42*, 2237-2241.
125. Subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Guidelines for evaluation and treatment in the macular photocoagulation study. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* **1991**, *109*, 1242-1257.
126. Laser photocoagulation of subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* **1991**, *109*, 1220-1231, doi:10.1001/archophth.1991.01080090044025.

127. Occult choroidal neovascularization. Influence on visual outcome in patients with age-related macular degeneration. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* **1996**, *114*, 400-412.
128. Yannuzzi, L.A.; Sorenson, J.; Spaide, R.F.; Lipson, B. Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy (IPCV). *Retina* **1990**, *10*, 1-8.
129. Dansingani, K.K.; Gal-Or, O.; Sadda, S.R.; Yannuzzi, L.A.; Freund, K.B. Understanding aneurysmal type 1 neovascularization (polypoidal choroidal vasculopathy): a lesson in the taxonomy of 'expanded spectra' - a review. *Clinical & experimental ophthalmology* **2018**, *46*, 189-200, doi:10.1111/ceo.13114.
130. Gass, J.D. Biomicroscopic and histopathologic considerations regarding the feasibility of surgical excision of subfoveal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* **1994**, *118*, 285-298, doi:S0002-9394(14)72951-4 [pii].
131. Yannuzzi, L.A.; Negrao, S.; Iida, T.; Carvalho, C.; Rodriguez-Coleman, H.; Slakter, J.; Freund, K.B.; Sorenson, J.; Orlock, D.; Borodoker, N. Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* **2001**, *21*, 416-434, doi:10.1097/00006982-200110000-00003.
132. Hartnett, M.E.; Weiter, J.J.; Staurengi, G.; Elsner, A.E. Deep retinal vascular anomalous complexes in advanced age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **1996**, *103*, 2042-2053, doi:S0161-6420(96)30389-8 [pii]10.1016/s0161-6420(96)30389-8.
133. Freund, K.B.; Zweifel, S.A.; Engelbert, M. Do we need a new classification for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration? *Retina* **2010**, *30*, 1333-1349, doi:10.1097/IAE.0b013e3181e7976b00006982-201010000-00001 [pii].
134. Spaide, R.F. IMPROVING THE AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION CONSTRUCT: A New Classification System. *Retina* **2018**, *38*, 891-899, doi:10.1097/IAE.0000000000001732.
135. Schmidt-Erfurth, U.; Chong, V.; Loewenstein, A.; Larsen, M.; Souied, E.; Schlingemann, R.; Eldem, B.; Mones, J.; Richard, G.; Bandello, F. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *The British journal of ophthalmology* **2014**, *98*, 1144-1167, doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305702.
136. Garcia-Layana, A.; Cabrera-Lopez, F.; Garcia-Arumi, J.; Arias-Barquet, L.; Ruiz-Moreno, J.M. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. *Clinical interventions in aging* **2017**, *12*, 1579-1587, doi:10.2147/CIA.S142685.
137. Nowomiejska, K.; Oleszczuk, A.; Brzozowska, A.; Grzybowski, A.; Ksiazek, K.; Maciejewski, R.; Ksiazek, P.; Juenemann, A.; Rejdak, R. M-charts as a tool for quantifying metamorphopsia in age-related macular degeneration treated with the bevacizumab injections. *BMC ophthalmology* **2013**, *13*, 13, doi:10.1186/1471-2415-13-13.
138. Shah, N.; Dakin, S.C.; Dobinson, S.; Tufail, A.; Egan, C.A.; Anderson, R.S. Visual acuity loss in patients with age-related macular degeneration measured using a novel high-pass letter chart. *The British journal of ophthalmology* **2016**, *100*, 1346-1352, doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307375.
139. Laidlaw, D.A.; Abbott, A.; Rosser, D.A. Development of a clinically feasible logMAR alternative to the Snellen chart: performance of the "compact reduced logMAR" visual acuity chart in amblyopic children. *The British journal of ophthalmology* **2003**, *87*, 1232-1234, doi:10.1136/bjo.87.10.1232.
140. Bressler, S.B.; Bressler, N.M.; Fine, S.L.; Hillis, A.; Murphy, R.P.; Olk, R.J.; Patz, A. Natural course of choroidal neovascular membranes within the foveal avascular zone in senile macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **1982**, *93*, 157-163, doi:10.1016/0002-9394(82)90410-x.
141. Doris, N.; Hart, P.M.; Chakravarthy, U.; McClelland, J.; Stevenson, M.; Hudson, C.; Jackson, J. Relation between macular morphology and visual function in patients with

- choroidal neovascularisation of age related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology* **2001**, *85*, 184-188, doi:10.1136/bjo.85.2.184.
142. Sunness, J.S.; Gonzalez-Baron, J.; Applegate, C.A.; Bressler, N.M.; Tian, Y.; Hawkins, B.; Barron, Y.; Bergman, A. Enlargement of atrophy and visual acuity loss in the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **1999**, *106*, 1768-1779, doi:10.1016/S0161-6420(99)90340-8.
 143. Hogg, R.; Curry, E.; Muldrew, A.; Winder, J.; Stevenson, M.; McClure, M.; Chakravarthy, U. Identification of lesion components that influence visual function in age related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology* **2003**, *87*, 609-614, doi:10.1136/bjo.87.5.609.
 144. Amsler, M. Earliest symptoms of diseases of the macula. *The British journal of ophthalmology* **1953**, *37*, 521-537, doi:10.1136/bjo.37.9.521.
 145. Wiecek, E.; Lashkari, K.; Dakin, S.C.; Bex, P. Novel quantitative assessment of metamorphopsia in maculopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* **2014**, *56*, 494-504, doi:10.1167/iovs.14-15394.
 146. Bressler, N.M. Early detection and treatment of neovascular age-related macular degeneration. *The Journal of the American Board of Family Practice* **2002**, *15*, 142-152.
 147. Schmidt-Erfurth, U.; Waldstein, S.M. A paradigm shift in imaging biomarkers in neovascular age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **2016**, *50*, 1-24, doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.007.
 148. Davis, M.D.; Gangnon, R.E.; Lee, L.Y.; Hubbard, L.D.; Klein, B.E.; Klein, R.; Ferris, F.L.; Bressler, S.B.; Milton, R.C. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Archives of ophthalmology* **2005**, *123*, 1484-1498, doi:10.1001/archophth.123.11.1484.
 149. Sarraf, D.; Gin, T.; Yu, F.; Brannon, A.; Owens, S.L.; Bird, A.C. Long-term drusen study. *Retina* **1999**, *19*, 513-519, doi:10.1097/00006982-199911000-00006.
 150. Klein, M.L.; Ferris, F.L., 3rd; Armstrong, J.; Hwang, T.S.; Chew, E.Y.; Bressler, S.B.; Chandra, S.R. Retinal precursors and the development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2008**, *115*, 1026-1031, doi:10.1016/j.ophtha.2007.08.030.
 151. Lei, J.; Balasubramanian, S.; Abdelfattah, N.S.; Nittala, M.G.; Sadda, S.R. Proposal of a simple optical coherence tomography-based scoring system for progression of age-related macular degeneration. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **2017**, *255*, 1551-1558, doi:10.1007/s00417-017-3693-y.
 152. Keane, P.A.; Patel, P.J.; Liakopoulos, S.; Heussen, F.M.; Sadda, S.R.; Tufail, A. Evaluation of age-related macular degeneration with optical coherence tomography. *Survey of ophthalmology* **2012**, *57*, 389-414, doi:10.1016/j.survophthal.2012.01.006.
 153. Ho, J.; Witkin, A.J.; Liu, J.; Chen, Y.; Fujimoto, J.G.; Schuman, J.S.; Duker, J.S. Documentation of intraretinal retinal pigment epithelium migration via high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 687-693, doi:10.1016/j.ophtha.2010.08.010.
 154. Ouyang, Y.; Heussen, F.M.; Hariri, A.; Keane, P.A.; Sadda, S.R. Optical coherence tomography-based observation of the natural history of drusenoid lesion in eyes with dry age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 2656-2665, doi:10.1016/j.ophtha.2013.05.029.
 155. Mrejen, S.; Sarraf, D.; Mukkamala, S.K.; Freund, K.B. Multimodal imaging of pigment epithelial detachment: a guide to evaluation. *Retina* **2013**, *33*, 1735-1762, doi:10.1097/IAE.0b013e3182993f66.

156. Tan, A.C.S.; Simhaee, D.; Balaratnasingam, C.; Dansingani, K.K.; Yannuzzi, L.A. A Perspective on the Nature and Frequency of Pigment Epithelial Detachments. *American journal of ophthalmology* **2016**, *172*, 13-27, doi:10.1016/j.ajo.2016.09.004.
157. Garrity, S.T.; Sarraf, D.; Freund, K.B.; Sadda, S.R. Multimodal Imaging of Nonneovascular Age-Related Macular Degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2018**, *59*, AMD48-AMD64, doi:10.1167/iovs.18-24158.
158. Krause, L.; Yousif, T.; Pohl, K. An epidemiological study of neovascular age-related macular degeneration in Germany. *Current medical research and opinion* **2013**, *29*, 1391-1397, doi:10.1185/03007995.2013.832184.
159. Holz, F.G.; Sadda, S.R.; Staurengi, G.; Lindner, M.; Bird, A.C.; Blodi, B.A.; Bottoni, F.; Chakravarthy, U.; Chew, E.Y.; Csaky, K., et al. Imaging Protocols in Clinical Studies in Advanced Age-Related Macular Degeneration: Recommendations from Classification of Atrophy Consensus Meetings. *Ophthalmology* **2017**, *124*, 464-478, doi:10.1016/j.ophtha.2016.12.002.
160. Subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Guidelines for evaluation and treatment in the macular photocoagulation study. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **1991**, *109*, 1242-1257.
161. Novotny, H.R.; Alvis, D.L. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation* **1961**, *24*, 82-86, doi:10.1161/01.cir.24.1.82.
162. Executive Committee and study ophthalmologists of the Macular Photocoagulation Study at the semi-annual meeting held in Columbia, M.J., 1984). Age-related macular degeneration. The Macular Photocoagulation Study. *American journal of ophthalmology* **1984**, *98*, 376-377, doi:10.1016/0002-9394(84)90332-5.
163. Bressler, N.M. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials--tap report 2. *Archives of ophthalmology* **2001**, *119*, 198-207.
164. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization--verteporfin in photodynamic therapy report 2. *American journal of ophthalmology* **2001**, *131*, 541-560, doi:10.1016/s0002-9394(01)00967-9.
165. Castillo, M.M.; Mowatt, G.; Elders, A.; Lois, N.; Fraser, C.; Hernandez, R.; Amoaku, W.; Burr, J.M.; Lotery, A.; Ramsay, C.R., et al. Optical coherence tomography for the monitoring of neovascular age-related macular degeneration: a systematic review. *Ophthalmology* **2015**, *122*, 399-406, doi:10.1016/j.ophtha.2014.07.055.
166. Schachat, A.P.; Thompson, J.T. Optical coherence tomography, fluorescein angiography, and the management of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2015**, *122*, 222-223, doi:10.1016/j.ophtha.2014.09.015.
167. Huang, D.; Swanson, E.A.; Lin, C.P.; Schuman, J.S.; Stinson, W.G.; Chang, W.; Hee, M.R.; Flotte, T.; Gregory, K.; Puliafito, C.A., et al. Optical coherence tomography. *Science* **1991**, *254*, 1178-1181, doi:10.1126/science.1957169.
168. Fercher, A.F.; Hitzenberger, C.K.; Drexler, W.; Kamp, G.; Sattmann, H. In vivo optical coherence tomography. *American journal of ophthalmology* **1993**, *116*, 113-114, doi:10.1016/s0002-9394(14)71762-3.
169. Ting, D.S.W.; Peng, L.; Varadarajan, A.V.; Keane, P.A.; Burlina, P.M.; Chiang, M.F.; Schmetterer, L.; Pasquale, L.R.; Bressler, N.M.; Webster, D.R., et al. Deep learning in ophthalmology: The technical and clinical considerations. *Progress in retinal and eye research* **2019**, *72*, 100759, doi:10.1016/j.preteyeres.2019.04.003.
170. Keane, P.A.; Sadda, S.R. Retinal imaging in the twenty-first century: state of the art and future directions. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 2489-2500, doi:10.1016/j.ophtha.2014.07.054.

171. Giani, A.; Pellegrini, M.; Invernizzi, A.; Cigada, M.; Staurenghi, G. Aligning scan locations from consecutive spectral-domain optical coherence tomography examinations: a comparison among different strategies. *Investigative ophthalmology & visual science* **2012**, *53*, 7637-7643, doi:10.1167/iovs.12-10047.
172. Choma, M.; Sarunic, M.; Yang, C.; Izatt, J. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography. *Optics express* **2003**, *11*, 2183-2189, doi:10.1364/oe.11.002183.
173. Drexler, W.; Morgner, U.; Ghanta, R.K.; Kartner, F.X.; Schuman, J.S.; Fujimoto, J.G. Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography. *Nature medicine* **2001**, *7*, 502-507, doi:10.1038/86589.
174. Spaide, R.F.; Koizumi, H.; Pozzoni, M.C. Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. *American journal of ophthalmology* **2008**, *146*, 496-500, doi:10.1016/j.ajo.2008.05.032.
175. Staurenghi, G.; Sadda, S.; Chakravarthy, U.; Spaide, R.F. Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography: the IN*OCT consensus. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 1572-1578, doi:10.1016/j.ophtha.2014.02.023.
176. Yehoshua, Z.; Rosenfeld, P.J.; Gregori, G.; Feuer, W.J.; Falcao, M.; Lujan, B.J.; Puliafito, C. Progression of geographic atrophy in age-related macular degeneration imaged with spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 679-686, doi:10.1016/j.ophtha.2010.08.018.
177. Khurana, R.N.; Dupas, B.; Bressler, N.M. Agreement of time-domain and spectral-domain optical coherence tomography with fluorescein leakage from choroidal neovascularization. *Ophthalmology* **2010**, *117*, 1376-1380, doi:10.1016/j.ophtha.2009.11.039.
178. Jung, J.J.; Chen, C.Y.; Mrejen, S.; Gallego-Pinazo, R.; Xu, L.; Marsiglia, M.; Boddu, S.; Freund, K.B. The incidence of neovascular subtypes in newly diagnosed neovascular age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **2014**, *158*, 769-779 e762, doi:10.1016/j.ajo.2014.07.006.
179. Yehoshua, Z.; de Amorim Garcia Filho, C.A.; Nunes, R.P.; Gregori, G.; Penha, F.M.; Moshfeghi, A.A.; Zhang, K.; Sadda, S.; Feuer, W.; Rosenfeld, P.J. Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: the COMPLETE study. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 693-701, doi:10.1016/j.ophtha.2013.09.044.
180. Keane, P.A.; Liakopoulos, S.; Ongchin, S.C.; Heussen, F.M.; Msutta, S.; Chang, K.T.; Walsh, A.C.; Sadda, S.R. Quantitative subanalysis of optical coherence tomography after treatment with ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2008**, *49*, 3115-3120, doi:10.1167/iovs.08-1689.
181. Hee, M.R.; Puliafito, C.A.; Wong, C.; Duker, J.S.; Reichel, E.; Rutledge, B.; Schuman, J.S.; Swanson, E.A.; Fujimoto, J.G. Quantitative assessment of macular edema with optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology* **1995**, *113*, 1019-1029, doi:10.1001/archophth.1995.01100080071031.
182. Fung, A.E.; Lalwani, G.A.; Rosenfeld, P.J.; Dubovy, S.R.; Michels, S.; Feuer, W.J.; Puliafito, C.A.; Davis, J.L.; Flynn, H.W., Jr.; Esquiabro, M. An optical coherence tomography-guided, variable dosing regimen with intravitreal ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **2007**, *143*, 566-583, doi:10.1016/j.ajo.2007.01.028.
183. Holz, F.G.; Amoaku, W.; Donate, J.; Guymer, R.H.; Kellner, U.; Schlingemann, R.O.; Weichselberger, A.; Staurenghi, G. Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of

- ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN study. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 663-671, doi:10.1016/j.ophtha.2010.12.019.
184. Krebs, I.; Falkner-Radler, C.; Hagen, S.; Haas, P.; Brannath, W.; Lie, S.; Ansari-Shahrezaei, S.; Binder, S. Quality of the threshold algorithm in age-related macular degeneration: Stratus versus Cirrus OCT. *Investigative ophthalmology & visual science* **2009**, *50*, 995-1000, doi:10.1167/iovs.08-2617.
 185. Sadda, S.R.; Wu, Z.; Walsh, A.C.; Richine, L.; Dougall, J.; Cortez, R.; LaBree, L.D. Errors in retinal thickness measurements obtained by optical coherence tomography. *Ophthalmology* **2006**, *113*, 285-293, doi:10.1016/j.ophtha.2005.10.005.
 186. Ho, J.; Sull, A.C.; Vuong, L.N.; Chen, Y.; Liu, J.; Fujimoto, J.G.; Schuman, J.S.; Duker, J.S. Assessment of artifacts and reproducibility across spectral- and time-domain optical coherence tomography devices. *Ophthalmology* **2009**, *116*, 1960-1970, doi:10.1016/j.ophtha.2009.03.034.
 187. Jaffe, G.J.; Martin, D.F.; Toth, C.A.; Daniel, E.; Maguire, M.G.; Ying, G.S.; Grunwald, J.E.; Huang, J. Macular morphology and visual acuity in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 1860-1870, doi:10.1016/j.ophtha.2013.01.073.
 188. Keane, P.A.; Liakopoulos, S.; Chang, K.T.; Wang, M.; Dustin, L.; Walsh, A.C.; Sadda, S.R. Relationship between optical coherence tomography retinal parameters and visual acuity in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2008**, *115*, 2206-2214, doi:10.1016/j.ophtha.2008.08.016.
 189. Keane, P.A.; Patel, P.J.; Ouyang, Y.; Chen, F.K.; Ikeji, F.; Walsh, A.C.; Tufail, A.; Sadda, S.R. Effects of retinal morphology on contrast sensitivity and reading ability in neovascular age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2010**, *51*, 5431-5437, doi:10.1167/iovs.09-4846.
 190. Moutray, T.; Alarbi, M.; Mahon, G.; Stevenson, M.; Chakravarthy, U. Relationships between clinical measures of visual function, fluorescein angiographic and optical coherence tomography features in patients with subfoveal choroidal neovascularisation. *The British journal of ophthalmology* **2008**, *92*, 361-364, doi:10.1136/bjo.2007.123976.
 191. Spaide, R.F.; Laud, K.; Fine, H.F.; Klancnik, J.M., Jr.; Meyerle, C.B.; Yannuzzi, L.A.; Sorenson, J.; Slakter, J.; Fisher, Y.L.; Cooney, M.J. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina* **2006**, *26*, 383-390, doi:10.1097/O1.iae.0000238561.99283.0e.
 192. Simader, C.; Ritter, M.; Bolz, M.; Deak, G.G.; Mayr-Sponer, U.; Golbaz, I.; Kundi, M.; Schmidt-Erfurth, U.M. Morphologic parameters relevant for visual outcome during anti-angiogenic therapy of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 1237-1245, doi:10.1016/j.ophtha.2013.12.029.
 193. Waldstein, S.M.; Philip, A.M.; Leitner, R.; Simader, C.; Langs, G.; Gerendas, B.S.; Schmidt-Erfurth, U. Correlation of 3-Dimensionally Quantified Intraretinal and Subretinal Fluid With Visual Acuity in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *JAMA ophthalmology* **2016**, *134*, 182-190, doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.4948.
 194. Nagiel, A.; Sarraf, D.; Sadda, S.R.; Spaide, R.F.; Jung, J.J.; Bhavsar, K.V.; Ameri, H.; Querques, G.; Freund, K.B. Type 3 neovascularization: evolution, association with pigment epithelial detachment, and treatment response as revealed by spectral domain optical coherence tomography. *Retina* **2015**, *35*, 638-647, doi:10.1097/IAE.0000000000000488.
 195. Ritter, M.; Simader, C.; Bolz, M.; Deak, G.G.; Mayr-Sponer, U.; Sayegh, R.; Kundi, M.; Schmidt-Erfurth, U.M. Intraretinal cysts are the most relevant prognostic biomarker in neovascular age-related macular degeneration independent of the therapeutic strategy.

- The British journal of ophthalmology* **2014**, *98*, 1629-1635, doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305186.
196. Schmidt-Erfurth, U.; Waldstein, S.M.; Deak, G.G.; Kundi, M.; Simader, C. Pigment epithelial detachment followed by retinal cystoid degeneration leads to vision loss in treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2015**, *122*, 822-832, doi:10.1016/j.ophtha.2014.11.017.
 197. Sulzbacher, F.; Kiss, C.; Kaider, A.; Eisenkoelbl, S.; Munk, M.; Roberts, P.; Sacu, S.; Schmidt-Erfurth, U. Correlation of SD-OCT features and retinal sensitivity in neovascular age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2012**, *53*, 6448-6455, doi:10.1167/iovs.11-9162.
 198. Sulzbacher, F.; Kiss, C.; Kaider, A.; Roberts, P.; Munk, M.; Kroh, M.E.; Sayegh, R.; Schmidt-Erfurth, U. Correlation of OCT characteristics and retinal sensitivity in neovascular age-related macular degeneration in the course of monthly ranibizumab treatment. *Investigative ophthalmology & visual science* **2013**, *54*, 1310-1315, doi:10.1167/iovs.12-11046.
 199. Bolz, M.; Simader, C.; Ritter, M.; Ahlers, C.; Benesch, T.; Prunte, C.; Schmidt-Erfurth, U. Morphological and functional analysis of the loading regimen with intravitreal ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology* **2010**, *94*, 185-189, doi:10.1136/bjo.2008.143974.
 200. Gianniou, C.; Dirani, A.; Jang, L.; Mantel, I. REFRACTORY INTRARETINAL OR SUBRETINAL FLUID IN NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION TREATED WITH INTRAVITREAL RANIZUBIMAB: Functional and Structural Outcome. *Retina* **2015**, *35*, 1195-1201, doi:10.1097/IAE.0000000000000465.
 201. Querques, G.; Coscas, F.; Forte, R.; Massamba, N.; Sterkers, M.; Souied, E.H. Cystoid macular degeneration in exudative age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **2011**, *152*, 100-107 e102, doi:10.1016/j.ajo.2011.01.027.
 202. Cohen, S.Y.; Dubois, L.; Nghiem-Buffet, S.; Ayrault, S.; Fajnkuchen, F.; Guiberteau, B.; Delahaye-Mazza, C.; Quentel, G.; Tadayoni, R. Retinal pseudocysts in age-related geographic atrophy. *American journal of ophthalmology* **2010**, *150*, 211-217 e211, doi:10.1016/j.ajo.2010.02.019.
 203. Steinberg, J.S.; Gobel, A.P.; Thiele, S.; Fleckenstein, M.; Holz, F.G.; Schmitz-Valckenberg, S. Development of Intraretinal Cystoid Lesions in Eyes with Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Retina* **2016**, *36*, 1548-1556, doi:10.1097/IAE.0000000000000951.
 204. Kashani, A.H.; Keane, P.A.; Dustin, L.; Walsh, A.C.; Sadda, S.R. Quantitative subanalysis of cystoid spaces and outer nuclear layer using optical coherence tomography in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2009**, *50*, 3366-3373, doi:10.1167/iovs.08-2691.
 205. Schlegl, T.; Waldstein, S.M.; Vogl, W.D.; Schmidt-Erfurth, U.; Langs, G. Predicting Semantic Descriptions from Medical Images with Convolutional Neural Networks. *Information processing in medical imaging : proceedings of the ... conference* **2015**, *24*, 437-448, doi:10.1007/978-3-319-19992-4_34.
 206. de Massoungnes, S.; Dirani, A.; Mantel, I. GOOD VISUAL OUTCOME AT 1 YEAR IN NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION WITH PIGMENT EPITHELIUM DETACHMENT: Factors Influencing the Treatment Response. *Retina* **2018**, *38*, 717-724, doi:10.1097/IAE.0000000000001613.
 207. Dirani, A.; Ambresin, A.; Marchionno, L.; Decugis, D.; Mantel, I. Factors Influencing the Treatment Response of Pigment Epithelium Detachment in Age-Related Macular Degeneration. *American journal of ophthalmology* **2015**, *160*, 732-738 e732, doi:10.1016/j.ajo.2015.06.025.

208. Sadda, S.R.; Tuomi, L.L.; Ding, B.; Fung, A.E.; Hopkins, J.J. Macular Atrophy in the HARBOR Study for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **2018**, *125*, 878-886, doi:10.1016/j.ophtha.2017.12.026.
209. Sato, T.; Suzuki, M.; Ooto, S.; Spaide, R.F. Multimodal Imaging Findings and Multimodal Vision Testing in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Retina* **2015**, *35*, 1292-1302, doi:10.1097/IAE.0000000000000505.
210. Guymer, R.H.; Markey, C.M.; McAllister, I.L.; Gillies, M.C.; Hunyor, A.P.; Arnold, J.J. Tolerating Subretinal Fluid in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Treated with Ranibizumab Using a Treat-and-Extend Regimen: FLUID Study 24-Month Results. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 723-734, doi:10.1016/j.ophtha.2018.11.025.
211. Ahlers, C.; Golbaz, I.; Einwallner, E.; Dunavolgyi, R.; Malamos, P.; Stock, G.; Prunte, C.; Schmidt-Erfurth, U. Identification of optical density ratios in subretinal fluid as a clinically relevant biomarker in exudative macular disease. *Investigative ophthalmology & visual science* **2009**, *50*, 3417-3424, doi:10.1167/iovs.08-2759.
212. Neudorfer, M.; Weinberg, A.; Loewenstein, A.; Barak, A. Differential optical density of subretinal spaces. *Investigative ophthalmology & visual science* **2012**, *53*, 3104-3110, doi:10.1167/iovs.11-8700.
213. Lek, J.J.; Caruso, E.; Baglin, E.K.; Sharangan, P.; Hodgson, L.A.B.; Harper, C.A.; Rosenfeld, P.J.; Luu, C.D.; Guymer, R.H. Interpretation of Subretinal Fluid Using OCT in Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology. Retina* **2018**, *2*, 792-802, doi:10.1016/j.oret.2018.01.005.
214. Waldstein, S.M.; Simader, C.; Staurengi, G.; Chong, N.V.; Mitchell, P.; Jaffe, G.J.; Lu, C.; Katz, T.A.; Schmidt-Erfurth, U. Morphology and Visual Acuity in Aflibercept and Ranibizumab Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration in the VIEW Trials. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 1521-1529, doi:10.1016/j.ophtha.2016.03.037.
215. Rahimy, E.; Freund, K.B.; Larsen, M.; Spaide, R.F.; Costa, R.A.; Hoang, Q.; Christakopoulos, C.; Munch, I.C.; Sarraf, D. Multilayered pigment epithelial detachment in neovascular age-related macular degeneration. *Retina* **2014**, *34*, 1289-1295, doi:10.1097/IAE.0000000000000130.
216. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* **2013**, *309*, 2005-2015, doi:10.1001/jama.2013.4997.
217. Chew, E.Y.; SanGiovanni, J.P.; Ferris, F.L.; Wong, W.T.; Agron, E.; Clemons, T.E.; Sperduto, R.; Danis, R.; Chandra, S.R.; Blodi, B.A., et al. Lutein/zeaxanthin for the treatment of age-related cataract: AREDS2 randomized trial report no. 4. *JAMA ophthalmology* **2013**, *131*, 843-850, doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.4412.
218. Ricci, F.; Bandello, F.; Navarra, P.; Staurengi, G.; Stumpp, M.; Zarbin, M. Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Therapeutic Management and New-Upcoming Approaches. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21218242.
219. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **1986**, *104*, 694-701.
220. Argon laser photocoagulation for senile macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. *Archives of ophthalmology* **1982**, *100*, 912-918, doi:10.1001/archophth.1982.01030030920003.
221. Glatt, H.; Machemer, R. Experimental subretinal hemorrhage in rabbits. *American journal of ophthalmology* **1982**, *94*, 762-773, doi:10.1016/0002-9394(82)90301-4.
222. Coscas, G.; Soubrane, G. [Argon laser photocoagulation of subretinal neovascularization in senile macular degeneration. Results of a randomized study of 60 cases]. *Bulletins et memoires de la Societe francaise d'ophthalmologie* **1982**, *94*, 149-154.

223. Dugel, P.U.; Bebhuk, J.D.; Nau, J.; Reichel, E.; Singer, M.; Barak, A.; Binder, S.; Jackson, T.L. Epimacular brachytherapy for neovascular age-related macular degeneration: a randomized, controlled trial (CABERNET). *Ophthalmology* **2013**, *120*, 317-327, doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.068.
224. Dugel, P.U.; Petrarca, R.; Bennett, M.; Barak, A.; Weinberger, D.; Nau, J.; Jackson, T.L. Macular epiretinal brachytherapy in treated age-related macular degeneration: MERITAGE study: twelve-month safety and efficacy results. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 1425-1431, doi:10.1016/j.ophtha.2012.01.014.
225. Silva, R.A.; Moshfeghi, A.A.; Kaiser, P.K.; Singh, R.P.; Moshfeghi, D.M. Radiation treatment for age-related macular degeneration. *Seminars in ophthalmology* **2011**, *26*, 121-130, doi:10.3109/08820538.2011.554486.
226. Moshfeghi, A.A.; Morales-Canton, V.; Quiroz-Mercado, H.; Velez-Montoya, R.; Zavala-Ayala, A.; Shusterman, E.M.; Kaiser, P.K.; Sanislo, S.R.; Gertner, M.; Moshfeghi, D.M. 16 Gy low-voltage x-ray irradiation followed by as needed ranibizumab therapy for age-related macular degeneration: 12 month outcomes of a 'radiation-first' strategy. *The British journal of ophthalmology* **2012**, *96*, 1320-1324, doi:10.1136/bjophthalmol-2011-301222.
227. Hochman, M.A.; Seery, C.M.; Zarbin, M.A. Pathophysiology and management of subretinal hemorrhage. *Survey of ophthalmology* **1997**, *42*, 195-213, doi:10.1016/s0039-6257(97)00089-1.
228. Bressler, N.M.; Hawkins, B.S.; Bressler, S.B.; Miskala, P.H.; Marsh, M.J. Clinical trial performance of community- vs university-based practices in the submacular surgery trials (SST): SST report no. 2. *Archives of ophthalmology* **2004**, *122*, 857-863, doi:10.1001/archophth.122.6.857.
229. Treumer, F.; Klatt, C.; Roider, J.; Hillenkamp, J. Subretinal coapplication of recombinant tissue plasminogen activator and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration with submacular haemorrhage. *The British journal of ophthalmology* **2010**, *94*, 48-53, doi:10.1136/bjo.2009.164707.
230. Arias, L.; Mones, J. Transconjunctival sutureless vitrectomy with tissue plasminogen activator, gas and intravitreal bevacizumab in the management of predominantly hemorrhagic age-related macular degeneration. *Clinical ophthalmology* **2010**, *4*, 67-72, doi:10.2147/opth.s8635.
231. Jager, R.D.; Mieler, W.F.; Miller, J.W. Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **2008**, *358*, 2606-2617, doi:10.1056/NEJMra0801537.
232. Rosenfeld, P.J.; Brown, D.M.; Heier, J.S.; Boyer, D.S.; Kaiser, P.K.; Chung, C.Y.; Kim, R.Y. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **2006**, *355*, 1419-1431, doi:10.1056/NEJMoa054481.
233. Brown, D.M.; Kaiser, P.K.; Michels, M.; Soubrane, G.; Heier, J.S.; Kim, R.Y.; Sy, J.P.; Schneider, S. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **2006**, *355*, 1432-1444, doi:10.1056/NEJMoa062655.
234. Kaiser, P.K.; Blodi, B.A.; Shapiro, H.; Acharya, N.R. Angiographic and optical coherence tomographic results of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2007**, *114*, 1868-1875, doi:10.1016/j.ophtha.2007.04.030.
235. Fernandez-Ferreiro, A.; Luaces-Rodriguez, A.; Aguiar, P.; Pardo-Montero, J.; Gonzalez-Barcia, M.; Garcia-Varela, L.; Herranz, M.; Silva-Rodriguez, J.; Gil-Martinez, M.; Bermudez, M.A., et al. Preclinical PET Study of Intravitreal Injections. *Investigative ophthalmology & visual science* **2017**, *58*, 2843-2851, doi:10.1167/iovs.17-21812.
236. Luaces-Rodriguez, A.; Gonzalez-Barcia, M.; Blanco-Teijeiro, M.J.; Gil-Martinez, M.; Gonzalez, F.; Gomez-Ulla, F.; Lamas, M.J.; Otero-Espinar, F.J.; Fernandez-Ferreiro, A.

- Review of Intraocular Pharmacokinetics of Anti-Infectives Commonly Used in the Treatment of Infectious Endophthalmitis. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, doi:10.3390/pharmaceutics10020066.
237. Ramulu, P.Y.; Do, D.V.; Corcoran, K.J.; Corcoran, S.L.; Robin, A.L. Use of retinal procedures in medicare beneficiaries from 1997 to 2007. *Archives of ophthalmology* **2010**, *128*, 1335-1340, doi:10.1001/archophthamol.2010.224.
 238. Schlottmann, P.G.; Alezzandrini, A.A.; Zas, M.; Rodriguez, F.J.; Luna, J.D.; Wu, L. New Treatment Modalities for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Asia-Pacific journal of ophthalmology* **2017**, *6*, 514-519, doi:10.22608/APO.2017258.
 239. Pozarowska, D.; Pozarowski, P. The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy. *Central-European journal of immunology* **2016**, *41*, 311-316, doi:10.5114/ceji.2016.63132.
 240. Moshfeghi, A.A.; Puliafito, C.A. Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert opinion on investigational drugs* **2005**, *14*, 671-682, doi:10.1517/13543784.14.5.671.
 241. Gragoudas, E.S.; Adamis, A.P.; Cunningham, E.T., Jr.; Feinsod, M.; Guyer, D.R. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **2004**, *351*, 2805-2816, doi:10.1056/NEJMoa042760.
 242. Schmidt-Erfurth, U.M.; Richard, G.; Augustin, A.; Aylward, W.G.; Bandello, F.; Corcostegui, B.; Cunha-Vaz, J.; Gaudric, A.; Leys, A.; Schlingemann, R.O. Guidance for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica Scandinavica* **2007**, *85*, 486-494, doi:10.1111/j.1600-0420.2007.00979.x.
 243. Iqbal, S.; Lenz, H.J. Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2004**, *54 Suppl 1*, S32-39, doi:10.1007/s00280-004-0884-0.
 244. Mulcahy, M.F.; Benson, A.B., 3rd. Bevacizumab in the treatment of colorectal cancer. *Expert opinion on biological therapy* **2005**, *5*, 997-1005, doi:10.1517/14712598.5.7.997.
 245. Rosenfeld, P.J.; Moshfeghi, A.A.; Puliafito, C.A. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye* **2005**, *36*, 331-335.
 246. Avery, R.L.; Pieramici, D.J.; Rabena, M.D.; Castellarin, A.A.; Nasir, M.A.; Giust, M.J. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2006**, *113*, 363-372 e365, doi:10.1016/j.ophtha.2005.11.019.
 247. Matsuyama, K.; Ogata, N.; Matsuoka, M.; Wada, M.; Takahashi, K.; Nishimura, T. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *The British journal of ophthalmology* **2010**, *94*, 1215-1218, doi:10.1136/bjo.2008.156810.
 248. Carneiro, A.M.; Costa, R.; Falcao, M.S.; Barthelmes, D.; Mendonca, L.S.; Fonseca, S.L.; Goncalves, R.; Goncalves, C.; Falcao-Reis, F.M.; Soares, R. Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of neovascular age-related macular degeneration with bevacizumab or ranibizumab. *Acta ophthalmologica* **2012**, *90*, e25-30, doi:10.1111/j.1755-3768.2011.02240.x.
 249. Zehetner, C.; Kirchmair, R.; Huber, S.; Kralinger, M.T.; Kieselbach, G.F. Plasma levels of vascular endothelial growth factor before and after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in patients with age-related macular degeneration, and in patients with diabetic macular oedema. *The British journal of ophthalmology* **2013**, *97*, 454-459, doi:10.1136/bjophthamol-2012-302451.
 250. Stein, J.D.; Newman-Casey, P.A.; Mrinalini, T.; Lee, P.P.; Hutton, D.W. Cost-effectiveness of bevacizumab and ranibizumab for newly diagnosed neovascular macular degeneration. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 936-945, doi:10.1016/j.ophtha.2013.10.037.

251. Hsu, J.; Kaiser, R.S.; Sivalingam, A.; Abraham, P.; Fineman, M.S.; Samuel, M.A.; Vander, J.F.; Regillo, C.D.; Ho, A.C. Intravitreal bevacizumab (avastin) in central retinal vein occlusion. *Retina* **2007**, *27*, 1013-1019, doi:10.1097/IAE.0b013e318050ca7c.
252. Ferrara, N.; Damico, L.; Shams, N.; Lowman, H.; Kim, R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* **2006**, *26*, 859-870, doi:10.1097/01.iae.0000242842.14624.e7.
253. Ferrara, N.; Gerber, H.P.; LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* **2003**, *9*, 669-676, doi:10.1038/nm0603-669.
254. Chen, Y.; Wiesmann, C.; Fuh, G.; Li, B.; Christinger, H.W.; McKay, P.; de Vos, A.M.; Lowman, H.B. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *Journal of molecular biology* **1999**, *293*, 865-881, doi:10.1006/jmbi.1999.3192.
255. Gaudreault, J.; Fei, D.; Rusit, J.; Suboc, P.; Shiu, V. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Investigative ophthalmology & visual science* **2005**, *46*, 726-733, doi:10.1167/iovs.04-0601.
256. Zayit-Soudry, S.; Zemel, E.; Loewenstein, A.; Perlman, I. Safety evaluation of repeated intravitreal injections of bevacizumab and ranibizumab in rabbit eyes. *Retina* **2010**, *30*, 671-681, doi:10.1097/IAE.0b013e3181c0858c.
257. Brown, D.M.; Michels, M.; Kaiser, P.K.; Heier, J.S.; Sy, J.P.; Ianchulev, T. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* **2009**, *116*, 57-65 e55, doi:10.1016/j.ophtha.2008.10.018.
258. Regillo, C.D.; Brown, D.M.; Abraham, P.; Yue, H.; Ianchulev, T.; Schneider, S.; Shams, N. Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1. *American journal of ophthalmology* **2008**, *145*, 239-248, doi:10.1016/j.ajo.2007.10.004.
259. Abraham, P.; Yue, H.; Wilson, L. Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 2. *American journal of ophthalmology* **2010**, *150*, 315-324 e311, doi:10.1016/j.ajo.2010.04.011.
260. Schmidt-Erfurth, U.; Eldem, B.; Guymer, R.; Korobelnik, J.F.; Schlingemann, R.O.; Axer-Siegel, R.; Wiedemann, P.; Simader, C.; Gekkieva, M.; Weichselberger, A. Efficacy and safety of monthly versus quarterly ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration: the EXCITE study. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 831-839, doi:10.1016/j.ophtha.2010.09.004.
261. Rosenfeld, P.J.; Shapiro, H.; Tuomi, L.; Webster, M.; Elledge, J.; Blodi, B. Characteristics of patients losing vision after 2 years of monthly dosing in the phase III ranibizumab clinical trials. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 523-530, doi:10.1016/j.ophtha.2010.07.011.
262. Chakravarthy, U.; Harding, S.P.; Rogers, C.A.; Downes, S.M.; Lotery, A.J.; Wordsworth, S.; Reeves, B.C. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 1399-1411, doi:10.1016/j.ophtha.2012.04.015.
263. Silva, R.; Axer-Siegel, R.; Eldem, B.; Guymer, R.; Kirchhof, B.; Papp, A.; Seres, A.; Gekkieva, M.; Nieweg, A.; Pilz, S. The SECURE study: long-term safety of ranibizumab 0.5 mg in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 130-139, doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.026.
264. Busbee, B.G.; Ho, A.C.; Brown, D.M.; Heier, J.S.; Suner, I.J.; Li, Z.; Rubio, R.G.; Lai, P. Twelve-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 1046-1056, doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.014.

265. Singer, M.A.; Awh, C.C.; Sadda, S.; Freeman, W.R.; Antoszyk, A.N.; Wong, P.; Tuomi, L. HORIZON: an open-label extension trial of ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 1175-1183, doi:10.1016/j.ophtha.2011.12.016.
266. Heier, J.S.; Boyer, D.S.; Ciulla, T.A.; Ferrone, P.J.; Jumper, J.M.; Gentile, R.C.; Kotlovker, D.; Chung, C.Y.; Kim, R.Y. Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration: year 1 results of the FOCUS Study. *Archives of ophthalmology* **2006**, *124*, 1532-1542, doi:10.1001/archophth.124.11.1532.
267. Ho, A.C.; Busbee, B.G.; Regillo, C.D.; Wieland, M.R.; Van Everen, S.A.; Li, Z.; Rubio, R.G.; Lai, P. Twenty-four-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 2181-2192, doi:10.1016/j.ophtha.2014.05.009.
268. Abedi, F.; Wickremasinghe, S.; Islam, A.F.; Inglis, K.M.; Guymer, R.H. Anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration: a treat-and-extend protocol over 2 years. *Retina* **2014**, *34*, 1531-1538, doi:10.1097/IAE.0000000000000134.
269. Wyckoff, C.C.; Croft, D.E.; Brown, D.M.; Wang, R.; Payne, J.F.; Clark, L.; Abdelfattah, N.S.; Sadda, S.R. Prospective Trial of Treat-and-Extend versus Monthly Dosing for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: TREX-AMD 1-Year Results. *Ophthalmology* **2015**, *122*, 2514-2522, doi:10.1016/j.ophtha.2015.08.009.
270. Silva, R.; Berta, A.; Larsen, M.; Macfadden, W.; Feller, C.; Mones, J. Treat-and-Extend versus Monthly Regimen in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Results with Ranibizumab from the TREND Study. *Ophthalmology* **2018**, *125*, 57-65, doi:10.1016/j.ophtha.2017.07.014.
271. Kertes, P.J.; Galic, I.J.; Greve, M.; Williams, G.; Baker, J.; Lahaie, M.; Sheidow, T. Efficacy of a Treat-and-Extend Regimen With Ranibizumab in Patients With Neovascular Age-Related Macular Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA ophthalmology* **2020**, *138*, 244-250, doi:10.1001/jamaophthalmol.2019.5540.
272. Avery, R.L.; Castellarin, A.A.; Steinle, N.C.; Dhoot, D.S.; Pieramici, D.J.; See, R.; Couvillion, S.; Nasir, M.A.; Rabena, M.D.; Le, K., et al. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *The British journal of ophthalmology* **2014**, *98*, 1636-1641, doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305252.
273. Economides, A.N.; Carpenter, L.R.; Rudge, J.S.; Wong, V.; Koehler-Stec, E.M.; Hartnett, C.; Pyles, E.A.; Xu, X.; Daly, T.J.; Young, M.R., et al. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nature medicine* **2003**, *9*, 47-52, doi:10.1038/nm811.
274. Papadopoulos, N.; Martin, J.; Ruan, Q.; Rafique, A.; Rosconi, M.P.; Shi, E.; Pyles, E.A.; Yancopoulos, G.D.; Stahl, N.; Wiegand, S.J. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* **2012**, *15*, 171-185, doi:10.1007/s10456-011-9249-6.
275. Stewart, M.W.; Rosenfeld, P.J. Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap. *The British journal of ophthalmology* **2008**, *92*, 667-668, doi:10.1136/bjo.2007.134874.
276. Yu, L.; Liang, X.H.; Ferrara, N. Comparing protein VEGF inhibitors: In vitro biological studies. *Biochemical and biophysical research communications* **2011**, *408*, 276-281, doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.014.
277. Heier, J.S.; Brown, D.M.; Chong, V.; Korobelnik, J.F.; Kaiser, P.K.; Nguyen, Q.D.; Kirchhof, B.; Ho, A.; Ogura, Y.; Yancopoulos, G.D., et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 2537-2548, doi:10.1016/j.ophtha.2012.09.006.

278. Schmidt-Erfurth, U.; Kaiser, P.K.; Korobelnik, J.F.; Brown, D.M.; Chong, V.; Nguyen, Q.D.; Ho, A.C.; Ogura, Y.; Simader, C.; Jaffe, G.J., et al. Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 193-201, doi:10.1016/j.ophtha.2013.08.011.
279. Dugel, P.U.; Koh, A.; Ogura, Y.; Jaffe, G.J.; Schmidt-Erfurth, U.; Brown, D.M.; Gomes, A.V.; Warburton, J.; Weichselberger, A.; Holz, F.G. HAWK and HARRIER: Phase 3, Multicenter, Randomized, Double-Masked Trials of Brolucizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **2020**, *127*, 72-84, doi:10.1016/j.ophtha.2019.04.017.
280. Dugel, P.U.; Jaffe, G.J.; Sallstig, P.; Warburton, J.; Weichselberger, A.; Wieland, M.; Singerman, L. Brolucizumab Versus Aflibercept in Participants with Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Trial. *Ophthalmology* **2017**, *124*, 1296-1304, doi:10.1016/j.ophtha.2017.03.057.
281. Heier, J.S.; Khanani, A.M.; Quezada Ruiz, C.; Basu, K.; Ferrone, P.J.; Brittain, C.; Figueroa, M.S.; Lin, H.; Holz, F.G.; Patel, V., et al. Efficacy, durability, and safety of intravitreal faricimab up to every 16 weeks for neovascular age-related macular degeneration (TENAYA and LUCERNE): two randomised, double-masked, phase 3, non-inferiority trials. *Lancet* **2022**, *399*, 729-740, doi:S0140-6736(22)00010-1 [pii]10.1016/S0140-6736(22)00010-1.
282. Schmidt-Erfurth, U.; Garcia-Arumi, J.; Bandello, F.; Berg, K.; Chakravarthy, U.; Gerendas, B.S.; Jonas, J.; Larsen, M.; Tadayoni, R.; Loewenstein, A. Guidelines for the Management of Diabetic Macular Edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* **2017**, *237*, 185-222, doi:10.1159/000458539.
283. Garcia-Layana, A.; Figueroa, M.S.; Arias, L.; Araiz, J.; Ruiz-Moreno, J.M.; Garcia-Arumi, J.; Gomez-Ulla, F.; Lopez-Galvez, M.I.; Cabrera-Lopez, F.; Garcia-Campos, J.M., et al. Individualized Therapy with Ranibizumab in Wet Age-Related Macular Degeneration. *Journal of ophthalmology* **2015**, *2015*, 412903, doi:10.1155/2015/412903.
284. Gil-Martinez, M.; Santos-Ramos, P.; Fernandez-Rodriguez, M.; Abraldes, M.J.; Rodriguez-Cid, M.J.; Santiago-Varela, M.; Fernandez-Ferreiro, A.; Gomez-Ulla, F. Pharmacological Advances in the Treatment of Age-related Macular Degeneration. *Current medicinal chemistry* **2020**, *27*, 583-598, doi:10.2174/0929867326666190726121711.
285. Okada, M.; Kandasamy, R.; Chong, E.W.; McGuinness, M.; Guymer, R.H. The Treat-and-Extend Injection Regimen Versus Alternate Dosing Strategies in Age-related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-analysis. *American journal of ophthalmology* **2018**, *192*, 184-197, doi:10.1016/j.ajo.2018.05.026.
286. Al-Zamil, W.M.; Yassin, S.A. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clinical interventions in aging* **2017**, *12*, 1313-1330, doi:10.2147/CIA.S143508.
287. Haga, A.; Kawaji, T.; Ideta, R.; Inomata, Y.; Tanihara, H. Treat-and-extend versus every-other-month regimens with aflibercept in age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica* **2018**, *96*, e393-e398, doi:10.1111/aos.13607.
288. Garcia-Layana, A.; Garcia-Arumi, J.; Figueroa, M.S.; Arias Barquet, L.; Ruiz-Moreno, J.M.; Monclus-Arbona, L.; The Spanish Amd Multicenter, G. Management of Wet Age-Related Macular Degeneration in Spain: Challenges for Treat and Extend Implementation in Routine Clinical Practice. *Journal of ophthalmology* **2019**, *2019*, 9821509, doi:10.1155/2019/9821509.
289. Broadhead, G.K.; Hong, T.; Chang, A.A. Treating the untreatable patient: current options for the management of treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica* **2014**, *92*, 713-723, doi:10.1111/aos.12463.

290. Yang, S.; Zhao, J.; Sun, X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug design, development and therapy* **2016**, *10*, 1857-1867, doi:10.2147/DDDT.S97653.
291. Chong, V. Ranibizumab for the treatment of wet AMD: a summary of real-world studies. *Eye* **2016**, *30*, 270-286, doi:10.1038/eye.2015.217.
292. Kim, L.N.; Mehta, H.; Barthelmes, D.; Nguyen, V.; Gillies, M.C. Metaanalysis of Real-World Outcomes of Intravitreal Ranibizumab for the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Retina* **2016**, *36*, 1418-1431, doi:10.1097/IAE.0000000000001142.
293. Ciulla, T.A.; Hussain, R.M.; Pollack, J.S.; Williams, D.F. Visual Acuity Outcomes and Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy Intensity in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Patients: A Real-World Analysis of 49 485 Eyes. *Ophthalmology. Retina* **2020**, *4*, 19-30, doi:10.1016/j.oret.2019.05.017.
294. Carrasco, J.; Pietsch, G.A.; Nicolas, M.P.; Koerber, C.; Bennison, C.; Yoon, J. Real-World Effectiveness and Real-World Cost-Effectiveness of Intravitreal Aflibercept and Intravitreal Ranibizumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Systematic Review and Meta-Analysis of Real-World Studies. *Advances in therapy* **2020**, *37*, 300-315, doi:10.1007/s12325-019-01147-6.
295. Samanta, A.; Aziz, A.A.; Jhingan, M.; Singh, S.R.; Khanani, A.M.; Chhablani, J. Emerging Therapies in Neovascular Age-Related Macular Degeneration in 2020. *Asia-Pacific journal of ophthalmology* **2020**, *9*, 250-259, doi:10.1097/APO.0000000000000291.
296. Wang, J.J.; Buitendijk, G.H.; Rohtchina, E.; Lee, K.E.; Klein, B.E.; van Duijn, C.M.; Flood, V.M.; Meuer, S.M.; Attia, J.; Myers, C., et al. Genetic susceptibility, dietary antioxidants, and long-term incidence of age-related macular degeneration in two populations. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 667-675, doi:10.1016/j.ophtha.2013.10.017.
297. Awh, C.C.; Lane, A.M.; Hawken, S.; Zanke, B.; Kim, I.K. CFH and ARMS2 genetic polymorphisms predict response to antioxidants and zinc in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 2317-2323, doi:10.1016/j.ophtha.2013.07.039.
298. Chew, E.Y.; Klein, M.L.; Clemons, T.E.; Agron, E.; Abecasis, G.R. Genetic testing in persons with age-related macular degeneration and the use of the AREDS supplements: to test or not to test? *Ophthalmology* **2015**, *122*, 212-215, doi:10.1016/j.ophtha.2014.10.012.
299. Merle, B.M.; Richard, F.; Benlian, P.; Puche, N.; Delcourt, C.; Souied, E.H. CFH Y402H and ARMS2 A69S Polymorphisms and Oral Supplementation with Docosahexaenoic Acid in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Patients: The NAT2 Study. *PLoS one* **2015**, *10*, e0130816, doi:10.1371/journal.pone.0130816.
300. Rojas-Fernandez, C.H.; Tyber, K. Benefits, Potential Harms, and Optimal Use of Nutritional Supplementation for Preventing Progression of Age-Related Macular Degeneration. *The Annals of pharmacotherapy* **2017**, *51*, 264-270, doi:10.1177/1060028016680643.
301. Fauser, S.; Lambrou, G.N. Genetic predictive biomarkers of anti-VEGF treatment response in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* **2015**, *60*, 138-152, doi:10.1016/j.survophthal.2014.11.002.
302. Medina, F.M.C.; Motta, A.; Takahashi, W.Y.; Carricondo, P.C.; Motta, M.; Melo, M.B.; Vasconcellos, J.P.C. Association of the CFH Y402H Polymorphism with the 1-Year Response of Exudative AMD to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in the Brazilian Population. *Ophthalmic research* **2019**, *61*, 168-173, doi:10.1159/000475995.
303. Orlin, A.; Hadley, D.; Chang, W.; Ho, A.C.; Brown, G.; Kaiser, R.S.; Regillo, C.D.; Godshalk, A.N.; Lier, A.; Kaderli, B., et al. Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration. *Retina* **2012**, *32*, 4-9, doi:10.1097/IAE.0b013e31822a2c7c.

304. Park, U.C.; Shin, J.Y.; McCarthy, L.C.; Kim, S.J.; Park, J.H.; Chung, H.; Yu, H.G. Pharmacogenetic associations with long-term response to anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular AMD patients. *Molecular vision* **2014**, *20*, 1680-1694.
305. Riaz, M.; Lores-Motta, L.; Richardson, A.J.; Lu, Y.; Montgomery, G.; Omar, A.; Koenekoop, R.K.; Chen, J.; Muether, P.; Altay, L., et al. GWAS study using DNA pooling strategy identifies association of variant rs4910623 in OR52B4 gene with anti-VEGF treatment response in age-related macular degeneration. *Scientific reports* **2016**, *6*, 37924, doi:10.1038/srep37924.
306. Shah, A.R.; Williams, S.; Bauml, C.R.; Rosner, B.; Duker, J.S.; Seddon, J.M. Predictors of Response to Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *American journal of ophthalmology* **2016**, *163*, 154-166 e158, doi:10.1016/j.ajo.2015.11.033.
307. Yaspan, B.L.; Williams, D.F.; Holz, F.G.; Regillo, C.D.; Li, Z.; Dressen, A.; van Lookeren Campagne, M.; Le, K.N.; Graham, R.R.; Beres, T., et al. Targeting factor D of the alternative complement pathway reduces geographic atrophy progression secondary to age-related macular degeneration. *Science translational medicine* **2017**, *9*, doi:10.1126/scitranslmed.aaf1443.
308. Parmeggiani, F.; Gallenga, C.E.; Costagliola, C.; Semeraro, F.; Romano, M.R.; Dell'Omo, R.; Russo, A.; De Nadai, K.; Gemmati, D.; D'Angelo, S., et al. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on the efficacy of photodynamic therapy in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Scientific reports* **2019**, *9*, 2614, doi:10.1038/s41598-019-38919-7.
309. Fan, Q.; Maranville, J.C.; Fritsche, L.; Sim, X.; Cheung, C.M.G.; Chen, L.J.; Gorski, M.; Yamashiro, K.; Ahn, J.; Laude, A., et al. HDL-cholesterol levels and risk of age-related macular degeneration: a multiethnic genetic study using Mendelian randomization. *International journal of epidemiology* **2017**, *46*, 1891-1902, doi:10.1093/ije/dyx189.
310. Wang, Y.F.; Han, Y.; Zhang, R.; Qin, L.; Wang, M.X.; Ma, L. CETP/LPL/LIPC gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration. *Scientific reports* **2015**, *5*, 15711, doi:10.1038/srep15711.
311. Gorin, M.B.; daSilva, M.J. Predictive genetics for AMD: Hype and hopes for genetics-based strategies for treatment and prevention. *Experimental eye research* **2020**, *191*, 107894, doi:10.1016/j.exer.2019.107894.
312. Park, D.H.; Sun, H.J.; Lee, S.J. A comparison of responses to intravitreal bevacizumab, ranibizumab, or aflibercept injections for neovascular age-related macular degeneration. *International ophthalmology* **2017**, *37*, 1205-1214, doi:10.1007/s10792-016-0391-4.
313. Chen, G.; Tzekov, R.; Li, W.; Jiang, F.; Mao, S.; Tong, Y. Pharmacogenetics of Complement Factor H Y402H Polymorphism and Treatment of Neovascular AMD with Anti-VEGF Agents: A Meta-Analysis. *Scientific reports* **2015**, *5*, 14517, doi:10.1038/srep14517.
314. Finger, R.P.; Wickremasinghe, S.S.; Baird, P.N.; Guymer, R.H. Predictors of anti-VEGF treatment response in neovascular age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* **2014**, *59*, 1-18, doi:10.1016/j.survophthal.2013.03.009.
315. Hagstrom, S.A.; Ying, G.S.; Maguire, M.G.; Martin, D.F.; Gibson, J.; Lotery, A.; Chakravarthy, U. VEGFR2 Gene Polymorphisms and Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **2015**, *122*, 1563-1568, doi:10.1016/j.ophtha.2015.04.024.
316. Hong, N.; Shen, Y.; Yu, C.Y.; Wang, S.Q.; Tong, J.P. Association of the polymorphism Y402H in the CFH gene with response to anti-VEGF treatment in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Acta ophthalmologica* **2016**, *94*, 334-345, doi:10.1111/aos.13049.

317. Kubicka-Trzaska, A.; Karska-Basta, I.; Kobylarz, J.; Dziedzina, S.; Sanak, M.; Romanowska-Dixon, B. Association between Y402H, E318D and R102G polymorphisms of complement proteins genes and the response to intravitreal anti-VEGF treatment in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Klinika oczna* **2016**, *118*, 114-121.
318. Lores-Motta, L.; Riaz, M.; Grunin, M.; Corominas, J.; van Asten, F.; Pauper, M.; Leenders, M.; Richardson, A.J.; Muether, P.; Cree, A.J., et al. Association of Genetic Variants With Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Age-Related Macular Degeneration. *JAMA ophthalmology* **2018**, *136*, 875-884, doi:10.1001/jamaophthalmol.2018.2019.
319. Wu, M.; Xiong, H.; Xu, Y.; Xiong, X.; Zou, H.; Zheng, M.; Wang, X.; Zhou, X. Association between VEGF-A and VEGFR-2 polymorphisms and response to treatment of neovascular AMD with anti-VEGF agents: a meta-analysis. *The British journal of ophthalmology* **2017**, *101*, 976-984, doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309418.
320. Zhao, L.; Grob, S.; Avery, R.; Kimura, A.; Pieramici, D.; Lee, J.; Rabena, M.; Ortiz, S.; Quach, J.; Cao, G., et al. Common variant in VEGFA and response to anti-VEGF therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Current molecular medicine* **2013**, *13*, 929-934, doi:10.2174/15665240113139990048.
321. Zhou, Y.L.; Chen, C.L.; Wang, Y.X.; Tong, Y.; Fang, X.L.; Li, L.; Wang, Z.Y. Association between polymorphism rs11200638 in the HTRA1 gene and the response to anti-VEGF treatment of exudative AMD: a meta-analysis. *BMC ophthalmology* **2017**, *17*, 97, doi:10.1186/s12886-017-0487-2.
322. Lee, A.Y.; Raya, A.K.; Kymes, S.M.; Shiels, A.; Brantley, M.A., Jr. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *The British journal of ophthalmology* **2009**, *93*, 610-613, doi:10.1136/bjo.2008.150995.
323. Teper, S.J.; Nowinska, A.; Pilat, J.; Palucha, A.; Wylegala, E. Involvement of genetic factors in the response to a variable-dosing ranibizumab treatment regimen for age-related macular degeneration. *Molecular vision* **2010**, *16*, 2598-2604.
324. Kloeckener-Gruissem, B.; Barthelmes, D.; Labs, S.; Schindler, C.; Kurz-Levin, M.; Michels, S.; Fleischhauer, J.; Berger, W.; Sutter, F.; Menghini, M. Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Investigative ophthalmology & visual science* **2011**, *52*, 4694-4702, doi:10.1167/iovs.10-6080.
325. Francis, P.J. The influence of genetics on response to treatment with ranibizumab (Lucentis) for age-related macular degeneration: the Lucentis Genotype Study (an American Ophthalmological Society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society* **2011**, *109*, 115-156.
326. Wickremasinghe, S.S.; Xie, J.; Lim, J.; Chauhan, D.S.; Robman, L.; Richardson, A.J.; Hageman, G.; Baird, P.N.; Guymer, R. Variants in the APOE gene are associated with improved outcome after anti-VEGF treatment for neovascular AMD. *Investigative ophthalmology & visual science* **2011**, *52*, 4072-4079, doi:10.1167/iovs.10-6550.
327. Smailhodzic, D.; Muether, P.S.; Chen, J.; Kwestro, A.; Zhang, A.Y.; Omar, A.; Van de Ven, J.P.; Keunen, J.E.; Kirchhof, B.; Hoyng, C.B., et al. Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 2304-2311, doi:10.1016/j.ophtha.2012.05.040.
328. McKibbin, M.; Ali, M.; Bansal, S.; Baxter, P.D.; West, K.; Williams, G.; Cassidy, F.; Inglehearn, C.F. CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology* **2012**, *96*, 208-212, doi:10.1136/bjo.2010.193680.
329. Agosta, E.; Lazzeri, S.; Orlandi, P.; Figus, M.; Fioravanti, A.; Di Desidero, T.; Sartini, M.S.; Nardi, M.; Danesi, R.; Bocci, G. Pharmacogenetics of antiangiogenic and antineovascular

- therapies of age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* **2012**, *13*, 1037-1053, doi:10.2217/pgs.12.77.
330. Chen, H.; Yu, K.D.; Xu, G.Z. Association between variant Y402H in age-related macular degeneration (AMD) susceptibility gene CFH and treatment response of AMD: a meta-analysis. *PloS one* **2012**, *7*, e42464, doi:10.1371/journal.pone.0042464.
331. Hagstrom, S.A.; Ying, G.S.; Pauer, G.J.T.; Sturgill-Short, G.M.; Huang, J.; Callanan, D.G.; Kim, I.K.; Klein, M.L.; Maguire, M.G.; Martin, D.F. Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology* **2013**, *120*, 593-599, doi:10.1016/j.ophtha.2012.11.037.
332. Lazzeri, S.; Figus, M.; Orlandi, P.; Fioravanti, A.; Di Desidero, T.; Agosta, E.; Sartini, M.S.; Posarelli, C.; Nardi, M.; Danesi, R., et al. VEGF-A polymorphisms predict short-term functional response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* **2013**, *14*, 623-630, doi:10.2217/pgs.13.43.
333. Matsumiya, W.; Honda, S.; Yanagisawa, S.; Miki, A.; Nagai, T.; Tsukahara, Y. Evaluation of clinical and genetic indicators for the early response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* **2014**, *15*, 833-843, doi:10.2217/pgs.14.51.
334. Park, U.C.; Shin, J.Y.; Kim, S.J.; Shin, E.S.; Lee, J.E.; McCarthy, L.C.; Newcombe, P.J.; Xu, C.F.; Chung, H.; Yu, H.G. Genetic factors associated with response to intravitreal ranibizumab in Korean patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina* **2014**, *34*, 288-297, doi:10.1097/IAE.0b013e3182979e1e.
335. Veloso, C.E.; de Almeida, L.N.; Recchia, F.M.; Pelayes, D.; Nehemy, M.B. VEGF gene polymorphism and response to intravitreal ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic research* **2014**, *51*, 1-8, doi:10.1159/000354328.
336. Cruz-Gonzalez, F.; Cabrillo-Estevez, L.; Lopez-Valverde, G.; Cieza-Borrella, C.; Hernandez-Galilea, E.; Gonzalez-Sarmiento, R. Predictive value of VEGF A and VEGFR2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet AMD. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **2014**, *252*, 469-475, doi:10.1007/s00417-014-2585-7.
337. Hermann, M.M.; van Asten, F.; Muether, P.S.; Smailhodzic, D.; Lichtner, P.; Hoyng, C.B.; Kirchhof, B.; Grefkes, C.; den Hollander, A.I.; Fauser, S. Polymorphisms in vascular endothelial growth factor receptor 2 are associated with better response rates to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 905-910, doi:10.1016/j.ophtha.2013.10.047.
338. Kawashima, Y.; Oishi, A.; Tsujikawa, A.; Yamashiro, K.; Miyake, M.; Ueda-Arakawa, N.; Yoshikawa, M.; Takahashi, A.; Yoshimura, N. Effects of aflibercept for ranibizumab-resistant neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **2015**, *253*, 1471-1477, doi:10.1007/s00417-014-2838-5.
339. Dedania, V.S.; Grob, S.; Zhang, K.; Bakri, S.J. Pharmacogenomics of response to anti-VEGF therapy in exudative age-related macular degeneration. *Retina* **2015**, *35*, 381-391, doi:10.1097/IAE.0000000000000466.
340. Chaudhary, V.; Brent, M.; Lam, W.C.; Devenyi, R.; Teichman, J.; Mak, M.; Barbosa, J.; Kaur, H.; Carter, R.; Farrokhyar, F. Genetic Risk Evaluation in Wet Age-Related Macular Degeneration Treatment Response. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* **2016**, *236*, 88-94, doi:10.1159/000446819.
341. Bardak, H.; Bardak, Y.; Ercalik, Y.; Turkseven Kumral, E.; Imamoglu, S.; Gunay, M.; Ozbas, H.; Bagci, O. Effect of ARMS2 gene polymorphism on intravitreal ranibizumab treatment

- for neovascular age-related macular degeneration. *Genetics and molecular research : GMR* **2016**, *15*, doi:10.4238/gmr15049164.
342. Lazzeri, S.; Orlandi, P.; Piaggi, P.; Sartini, M.S.; Casini, G.; Guidi, G.; Figus, M.; Fioravanti, A.; Di Desidero, T.; Ripandelli, G., et al. IL-8 and VEGFR-2 polymorphisms modulate long-term functional response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* **2016**, *17*, 35-39, doi:10.2217/pgs.15.153.
 343. Bakbak, B.; Ozturk, B.T.; Zamani, A.G.; Gonul, S.; Iyit, N.; Gedik, S.; Yildirim, M.S. Association of Apolipoprotein E Polymorphism with Intravitreal Ranibizumab Treatment Outcomes in Age-Related Macular Degeneration. *Current eye research* **2016**, *41*, 862-866, doi:10.3109/02713683.2015.1067325.
 344. Yamashiro, K.; Mori, K.; Honda, S.; Kano, M.; Yanagi, Y.; Obana, A.; Sakurada, Y.; Sato, T.; Nagai, Y.; Hikichi, T., et al. A prospective multicenter study on genome wide associations to ranibizumab treatment outcome for age-related macular degeneration. *Scientific reports* **2017**, *7*, 9196, doi:10.1038/s41598-017-09632-0.
 345. Valverde-Megias, A.; Veganzones-de-Castro, S.; Donate-Lopez, J.; Maestro-de-Las-Casas, M.L.; Megias-Fresno, A.; Garcia-Feijoo, J. ARMS2 A69S polymorphism is associated with the number of ranibizumab injections needed for exudative age-related macular degeneration in a pro re nata regimen during 4 years of follow-up. *Graefes' archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **2017**, *255*, 2091-2098, doi:10.1007/s00417-017-3748-0.
 346. Kikushima, W.; Sakurada, Y.; Sugiyama, A.; Yoneyama, S.; Tanabe, N.; Matsubara, M.; Mabuchi, F.; Iijima, H. Comparison of two-year outcomes after photodynamic therapy with ranibizumab or aflibercept for polypoidal choroidal vasculopathy. *Scientific reports* **2017**, *7*, 16461, doi:10.1038/s41598-017-16476-1.
 347. Sengul, E.A.; Artunay, O.; Rasier, R.; Kockar, A.; Afacan, C.; Hancer, V.S.; Yuzbasioglu, E. Pharmacogenetic Aspect of Intravitreal Ranibizumab Treatment in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Five-Year Follow-Up. *Ocular immunology and inflammation* **2018**, *26*, 971-977, doi:10.1080/09273948.2017.1311925.
 348. Akiyama, M.; Takahashi, A.; Momozawa, Y.; Arakawa, S.; Miya, F.; Tsunoda, T.; Ashikawa, K.; Oshima, Y.; Yasuda, M.; Yoshida, S., et al. Genome-wide association study suggests four variants influencing outcomes with ranibizumab therapy in exudative age-related macular degeneration. *Journal of human genetics* **2018**, *63*, 1083-1091, doi:10.1038/s10038-018-0493-0.
 349. Balikova, I.; Postelmans, L.; Pasteels, B.; Coquelet, P.; Catherine, J.; Efendic, A.; Hosoda, Y.; Miyake, M.; Yamashiro, K.; Thienpont, B., et al. Genetic biomarkers in the VEGF pathway predicting response to anti-VEGF therapy in age-related macular degeneration. *BMJ open ophthalmology* **2019**, *4*, e000273, doi:10.1136/bmjophth-2019-000273.
 350. Gourgouli, K.; Gourgouli, I.; Tsaousis, G.; Spai, S.; Niskopoulou, M.; Efthimiopoulos, S.; Lamnissou, K. Investigation of genetic base in the treatment of age-related macular degeneration. *International ophthalmology* **2020**, *40*, 985-997, doi:10.1007/s10792-019-01274-7.
 351. Zhang, J.; Liu, Z.; Hu, S.; Qi, J. Meta-Analysis of the Pharmacogenetics of ARMS2 A69S Polymorphism and the Response to Advanced Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic research* **2021**, *64*, 192-204, doi:10.1159/000508738.
 352. Deangelis, M.M.; Silveira, A.C.; Carr, E.A.; Kim, I.K. Genetics of age-related macular degeneration: current concepts, future directions. *Seminars in ophthalmology* **2011**, *26*, 77-93, doi:10.3109/08820538.2011.577129.
 353. Gold, B.; Merriam, J.E.; Zernant, J.; Hancox, L.S.; Taiber, A.J.; Gehrs, K.; Cramer, K.; Neel, J.; Bergeron, J.; Barile, G.R., et al. Variation in factor B (BF) and complement component

- 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics* **2006**, *38*, 458-462, doi:10.1038/ng1750.
354. Jakobsdottir, J.; Conley, Y.P.; Weeks, D.E.; Ferrell, R.E.; Gorin, M.B. C2 and CFB genes in age-related maculopathy and joint action with CFH and LOC387715 genes. *PloS one* **2008**, *3*, e2199, doi:10.1371/journal.pone.0002199.
355. Murakami, M.; Taketomi, Y.; Sato, H.; Yamamoto, K. Secreted phospholipase A2 revisited. *Journal of biochemistry* **2011**, *150*, 233-255, doi:10.1093/jb/mvr088.
356. Chen, W.; Stambolian, D.; Edwards, A.O.; Branham, K.E.; Othman, M.; Jakobsdottir, J.; Tosakulwong, N.; Pericak-Vance, M.A.; Campochiaro, P.A.; Klein, M.L., et al. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 7401-7406, doi:10.1073/pnas.0912702107.
357. Mizukami, Y.; Jo, W.S.; Duerr, E.M.; Gala, M.; Li, J.; Zhang, X.; Zimmer, M.A.; Iliopoulos, O.; Zukerberg, L.R.; Kohgo, Y., et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nature medicine* **2005**, *11*, 992-997, doi:10.1038/nm1294.
358. Martin, D.; Galisteo, R.; Gutkind, J.S. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284*, 6038-6042, doi:10.1074/jbc.C800207200.
359. Lains, I.; Kelly, R.S.; Miller, J.B.; Silva, R.; Vavvas, D.G.; Kim, I.K.; Murta, J.N.; Lasky-Su, J.; Miller, J.W.; Husain, D. Human Plasma Metabolomics Study across All Stages of Age-Related Macular Degeneration Identifies Potential Lipid Biomarkers. *Ophthalmology* **2018**, *125*, 245-254, doi:10.1016/j.ophtha.2017.08.008.
360. Chen, G.; Walmsley, S.; Cheung, G.C.M.; Chen, L.; Cheng, C.Y.; Beuerman, R.W.; Wong, T.Y.; Zhou, L.; Choi, H. Customized Consensus Spectral Library Building for Untargeted Quantitative Metabolomics Analysis with Data Independent Acquisition Mass Spectrometry and MetaboDIA Workflow. *Analytical chemistry* **2017**, *89*, 4897-4906, doi:10.1021/acs.analchem.6b05006.
361. Hou, X.W.; Wang, Y.; Pan, C.W. Metabolomics in Age-Related Macular Degeneration: A Systematic Review. *Investigative ophthalmology & visual science* **2020**, *61*, 13, doi:10.1167/iovs.61.14.13.
362. Gao, Y.; Teo, Y.C.K.; Beuerman, R.W.; Wong, T.Y.; Zhou, L.; Cheung, C.M.G. A serum metabolomics study of patients with nAMD in response to anti-VEGF therapy. *Scientific reports* **2020**, *10*, 1341, doi:10.1038/s41598-020-58346-3.
363. Ferris, F.L., 3rd; Sperduto, R.D. Standardized illumination for visual acuity testing in clinical research. *Am J Ophthalmol* **1982**, *94*, 97-98, doi:0002-9394(82)90198-2 [pii]10.1016/0002-9394(82)90198-2.
364. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* **1991**, *98*, 786-806.
365. Amoaku, W.M.; Chakravarthy, U.; Gale, R.; Gavin, M.; Ghanchi, F.; Gibson, J.; Harding, S.; Johnston, R.L.; Kelly, S.P.; Lotery, A., et al. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. *Eye* **2015**, *29*, 1397-1398, doi:10.1038/eye.2015.159.
366. Larrayoz, I.M.; de Luis, A.; Rua, O.; Velilla, S.; Cabello, J.; Martinez, A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *PloS one* **2012**, *7*, e39359, doi:10.1371/journal.pone.0039359.
367. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15-21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635 [pii].

368. Pariente, A.; Perez-Sala, A.; Ochoa, R.; Pelaez, R.; Larrayoz, I.M. Genome-Wide Transcriptomic Analysis Identifies Pathways Regulated by Sterculic Acid in Retinal Pigmented Epithelium Cells. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9051187.
369. Larrayoz, I.M.; Rua, O.; Velilla, S.; Martinez, A. Transcriptomic profiling explains racial disparities in pterygium patients treated with doxycycline. *Investigative ophthalmology & visual science* **2014**, *55*, 7553-7561, doi:10.1167/iovs.14-14951.
370. Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research* **2014**, *42*, D199-205, doi:10.1093/nar/gkt1076.
371. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **2000**, *28*, 27-30, doi:10.1093/nar/28.1.27.
372. Friedlander, M.R.; Mackowiak, S.D.; Li, N.; Chen, W.; Rajewsky, N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 37-52, doi:10.1093/nar/gkr688gkr688 [pii].
373. Vlachos, I.S.; Zagganas, K.; Paraskevopoulou, M.D.; Georgakilas, G.; Karagkouni, D.; Vergoulis, T.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A.G. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research* **2015**, *43*, W460-466, doi:10.1093/nar/gkv403.
374. Frank, E.; Hall, M.; Trigg, L.; Holmes, G.; Witten, I.H. Data mining in bioinformatics using Weka. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 2479-2481, doi:10.1093/bioinformatics/bth261.
375. Pariente, A.; Pelaez, R.; Perez-Sala, A.; Larrayoz, I.M. Inflammatory and cell death mechanisms induced by 7-ketocholesterol in the retina. Implications for age-related macular degeneration. *Experimental eye research* **2019**, *187*, 107746, doi:10.1016/j.exer.2019.107746.
376. Bowes Rickman, C.; Farsiu, S.; Toth, C.A.; Klingeborn, M. Dry age-related macular degeneration: mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Investigative ophthalmology & visual science* **2013**, *54*, ORSF68-80, doi:10.1167/iovs.13-12757.
377. Smith, W.; Assink, J.; Klein, R.; Mitchell, P.; Klaver, C.C.; Klein, B.E.; Hofman, A.; Jensen, S.; Wang, J.J.; de Jong, P.T. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* **2001**, *108*, 697-704, doi:10.1016/s0161-6420(00)00580-7.
378. Wong, T.Y.; Chakravarthy, U.; Klein, R.; Mitchell, P.; Zlateva, G.; Buggage, R.; Fahrbach, K.; Probst, C.; Sledge, I. The natural history and prognosis of neovascular age-related macular degeneration: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Ophthalmology* **2008**, *115*, 116-126, doi:10.1016/j.ophtha.2007.03.008.
379. Fulcher, C.; Hazel, C.A.; Pacey, I.; Ali, H.; Ghanchi, F.D. Predicting visual outcomes in patients treated with aflibercept for neovascular age-related macular degeneration: Data from a real-world clinical setting. *European journal of ophthalmology* **2020**, *30*, 543-549, doi:10.1177/1120672119839299.
380. Martin, D.F.; Maguire, M.G.; Ying, G.S.; Grunwald, J.E.; Fine, S.L.; Jaffe, G.J. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **2011**, *364*, 1897-1908, doi:10.1056/NEJMoa1102673.
381. Ying, G.S.; Maguire, M.G.; Daniel, E.; Ferris, F.L.; Jaffe, G.J.; Grunwald, J.E.; Toth, C.A.; Huang, J.; Martin, D.F. Association of Baseline Characteristics and Early Vision Response with 2-Year Vision Outcomes in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology* **2015**, *122*, 2523-2531 e2521, doi:10.1016/j.ophtha.2015.08.015.
382. Menghini, M.; Kurz-Levin, M.M.; Amstutz, C.; Michels, S.; Windisch, R.; Barthelmes, D.; Sutter, F.K. Response to ranibizumab therapy in neovascular AMD - an evaluation of good and bad responders. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* **2010**, *227*, 244-248, doi:10.1055/s-0029-1245203.

383. Nguyen, V.; Daien, V.; Guymer, R.; Young, S.; Hunyor, A.; Fraser-Bell, S.; Hunt, A.; Gillies, M.C.; Barthelmes, D. Projection of Long-Term Visual Acuity Outcomes Based on Initial Treatment Response in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 64-74, doi:10.1016/j.ophtha.2018.08.023.
384. Stoller, G.L.; Kokame, G.T.; Dreyer, R.F.; Shapiro, H.; Tuomi, L.L. Patterns of Early and Delayed Visual Response to Ranibizumab Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *JAMA ophthalmology* **2016**, *134*, 545-553, doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0379.
385. Krebs, I.; Glittenberg, C.; Ansari-Shahrezaei, S.; Hagen, S.; Steiner, I.; Binder, S. Non-responders to treatment with antagonists of vascular endothelial growth factor in age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology* **2013**, *97*, 1443-1446, doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303513.
386. Zhang, X.; Lai, T.Y.Y. Baseline Predictors of Visual Acuity Outcome in Patients with Wet Age-Related Macular Degeneration. *BioMed research international* **2018**, *2018*, 9640131, doi:10.1155/2018/9640131.
387. Lux, A.; Llacer, H.; Heussen, F.M.; Jousseaume, A.M. Non-responders to bevacizumab (Avastin) therapy of choroidal neovascular lesions. *The British journal of ophthalmology* **2007**, *91*, 1318-1322, doi:10.1136/bjo.2006.113902.
388. Singh, R.P.; Habbu, K.; Ehlers, J.P.; Lansang, M.C.; Hill, L.; Stoilov, I. The Impact of Systemic Factors on Clinical Response to Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 1581-1587, doi:10.1016/j.ophtha.2016.03.038.
389. Piermarocchi, S.; Miotto, S.; Colavito, D.; Leon, A.; Segato, T. Combined effects of genetic and non-genetic risk factors affect response to ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica* **2015**, *93*, e451-457, doi:10.1111/aos.12587.
390. Jaffe, G.J.; Ying, G.S.; Toth, C.A.; Daniel, E.; Grunwald, J.E.; Martin, D.F.; Maguire, M.G. Macular Morphology and Visual Acuity in Year Five of the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 252-260, doi:10.1016/j.ophtha.2018.08.035.
391. Woo, S.J.; Cho, G.E.; Cho, J.H. Short-term Efficacy and Safety of Ranibizumab for Neovascular Age-related Macular Degeneration in the Real World: A Post-marketing Surveillance Study. *Korean journal of ophthalmology : KJO* **2019**, *33*, 150-166, doi:10.3341/kjo.2018.0081.
392. Grunwald, J.E.; Daniel, E.; Huang, J.; Ying, G.S.; Maguire, M.G.; Toth, C.A.; Jaffe, G.J.; Fine, S.L.; Blodi, B.; Klein, M.L., et al. Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 150-161, doi:10.1016/j.ophtha.2013.08.015.
393. Ying, G.S.; Huang, J.; Maguire, M.G.; Jaffe, G.J.; Grunwald, J.E.; Toth, C.; Daniel, E.; Klein, M.; Pieramici, D.; Wells, J., et al. Baseline predictors for one-year visual outcomes with ranibizumab or bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 122-129, doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.042.
394. Chen, M.; Rajapakse, D.; Fraczek, M.; Luo, C.; Forrester, J.V.; Xu, H. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye - a mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging cell* **2016**, *15*, 436-445, doi:10.1111/acel.12447.
395. Boyer, D.S.; Antoszyk, A.N.; Awh, C.C.; Bhisitkul, R.B.; Shapiro, H.; Acharya, N.R. Subgroup analysis of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2007**, *114*, 246-252, doi:10.1016/j.ophtha.2006.10.045.
396. Kaiser, P.K.; Brown, D.M.; Zhang, K.; Hudson, H.L.; Holz, F.G.; Shapiro, H.; Schneider, S.; Acharya, N.R. Ranibizumab for predominantly classic neovascular age-related macular

- degeneration: subgroup analysis of first-year ANCHOR results. *American journal of ophthalmology* **2007**, *144*, 850-857, doi:10.1016/j.ajo.2007.08.012.
397. Regillo, C.D.; Busbee, B.G.; Ho, A.C.; Ding, B.; Haskova, Z. Baseline Predictors of 12-Month Treatment Response to Ranibizumab in Patients With Wet Age-Related Macular Degeneration. *American journal of ophthalmology* **2015**, *160*, 1014-1023 e1012, doi:10.1016/j.ajo.2015.07.034.
398. Ying, G.S.; Maguire, M.G.; Pan, W.; Grunwald, J.E.; Daniel, E.; Jaffe, G.J.; Toth, C.A.; Hagstrom, S.A.; Martin, D.F. Baseline Predictors for Five-Year Visual Acuity Outcomes in the Comparison of AMD Treatment Trials. *Ophthalmology. Retina* **2018**, *2*, 525-530, doi:10.1016/j.oret.2017.10.003.
399. Fu, D.J.; Keenan, T.D.; Faes, L.; Lim, E.; Wagner, S.K.; Moraes, G.; Huemer, J.; Kern, C.; Patel, P.J.; Balaskas, K., et al. Insights From Survival Analyses During 12 Years of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *JAMA ophthalmology* **2021**, *139*, 57-67, doi:10.1001/jamaophthalmol.2020.5044.
400. Westborg, I.; Albrecht, S.; Rosso, A. Risk for Low Visual Acuity after 1 and 2 Years of Treatment with Ranibizumab or Bevacizumab for Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Retina* **2017**, *37*, 2035-2046, doi:10.1097/IAE.0000000000001431.
401. Phan, L.T.; Broadhead, G.K.; Hong, T.H.; Chang, A.A. Predictors of Visual Acuity After Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration - Current Perspectives. *Clinical ophthalmology* **2021**, *15*, 3351-3367, doi:10.2147/OPHT.S205147.
402. Kawasaki, R.; Yasuda, M.; Song, S.J.; Chen, S.J.; Jonas, J.B.; Wang, J.J.; Mitchell, P.; Wong, T.Y. The prevalence of age-related macular degeneration in Asians: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* **2010**, *117*, 921-927, doi:10.1016/j.ophtha.2009.10.007.
403. Suzuki, M.; Nagai, N.; Izumi-Nagai, K.; Shinoda, H.; Koto, T.; Uchida, A.; Mochimaru, H.; Yuki, K.; Sasaki, M.; Tsubota, K., et al. Predictive factors for non-response to intravitreal ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology* **2014**, *98*, 1186-1191, doi:10.1136/bjophthalmol-2013-304670.
404. Lim, L.S.; Mitchell, P.; Seddon, J.M.; Holz, F.G.; Wong, T.Y. Age-related macular degeneration. *Lancet* **2012**, *379*, 1728-1738, doi:10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
405. van Asten, F.; Rovers, M.M.; Lechanteur, Y.T.; Smailhodzic, D.; Muether, P.S.; Chen, J.; den Hollander, A.I.; Fauser, S.; Hoyng, C.B.; van der Wilt, G.J., et al. Predicting non-response to ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic epidemiology* **2014**, *21*, 347-355, doi:10.3109/09286586.2014.949010.
406. Lee, S.; Song, S.J.; Yu, H.G. Current smoking is associated with a poor visual acuity improvement after intravitreal ranibizumab therapy in patients with exudative age-related macular degeneration. *Journal of Korean medical science* **2013**, *28*, 769-774, doi:10.3346/jkms.2013.28.5.769.
407. Kang, S.; Roh, Y.J. One-year results of intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration and clinical responses of various subgroups. *Japanese journal of ophthalmology* **2009**, *53*, 389-395, doi:10.1007/s10384-009-0670-y.
408. Singh, R.P.; Fu, E.X.; Smith, S.D.; Williams, D.R.; Kaiser, P.K. Predictive factors of visual and anatomical outcome after intravitreal bevacizumab treatment of neovascular age-related macular degeneration: an optical coherence tomography study. *The British journal of ophthalmology* **2009**, *93*, 1353-1358, doi:10.1136/bjo.2008.141879.
409. Abedi, F.; Wickremasinghe, S.; Richardson, A.J.; Makalic, E.; Schmidt, D.F.; Sandhu, S.S.; Baird, P.N.; Guymer, R.H. Variants in the VEGFA gene and treatment outcome after anti-

- VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 115-121, doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.006.
410. Byun, Y.J.; Lee, S.J.; Koh, H.J. Predictors of response after intravitreal bevacizumab injection for neovascular age-related macular degeneration. *Japanese journal of ophthalmology* **2010**, *54*, 571-577, doi:10.1007/s10384-010-0866-1.
411. Jakobsen, D.B.; Torp, T.L.; Stefansson, E.; Peto, T.; Grauslund, J. Retinal metabolic and structural alterations in response to aflibercept treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica* **2019**, *97*, 525-531, doi:10.1111/aos.13996.
412. Lee, H.; Ji, B.; Chung, H.; Kim, H.C. Correlation between Optical Coherence Tomographic Hyperreflective Foci and Visual Outcomes after Anti-Vegf Treatment in Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Retina* **2016**, *36*, 465-475, doi:10.1097/IAE.0000000000000645.
413. Gillies, M.; Arnold, J.; Bhandari, S.; Essex, R.W.; Young, S.; Squirrell, D.; Nguyen, V.; Barthelmes, D. Ten-Year Treatment Outcomes of Neovascular Age-Related Macular Degeneration from Two Regions. *American journal of ophthalmology* **2020**, *210*, 116-124, doi:10.1016/j.ajo.2019.10.007.
414. Ho, A.C.; Kleinman, D.M.; Lum, F.C.; Heier, J.S.; Lindstrom, R.L.; Orr, S.C.; Chang, G.C.; Smith, E.L.; Pollack, J.S. Baseline Visual Acuity at Wet AMD Diagnosis Predicts Long-Term Vision Outcomes: An Analysis of the IRIS Registry. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging retina* **2020**, *51*, 633-639, doi:10.3928/23258160-20201104-05.
415. Spooner, K.; Fraser-Bell, S.; Hong, T.; Phan, L.; Wong, J.G.; Chang, A. Long-term Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: The LATAR Study: Report 1: Ten-Year, Real-World Outcomes. *Ophthalmology. Retina* **2021**, *5*, 511-518, doi:10.1016/j.oret.2020.09.019.
416. Nguyen, C.L.; Gillies, M.C.; Nguyen, V.; Daien, V.; Cohn, A.; Banerjee, G.; Arnold, J. Characterization of Poor Visual Outcomes of Neovascular Age-related Macular Degeneration Treated with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 735-742, doi:10.1016/j.ophtha.2018.11.036.
417. Dugel, P.U.; Singh, R.P.; Koh, A.; Ogura, Y.; Weissgerber, G.; Gedif, K.; Jaffe, G.J.; Tadayoni, R.; Schmidt-Erfurth, U.; Holz, F.G. HAWK and HARRIER: Ninety-Six-Week Outcomes from the Phase 3 Trials of Brolucizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **2021**, *128*, 89-99, doi:10.1016/j.ophtha.2020.06.028.
418. Ho, A.C.; Saroj, N.; Baker, K.; Vitti, R.; Berliner, A.J.; Thompson, D.; Roth, D.B. Impact of Baseline Characteristics on Treatment Response to Intravitreal Aflibercept Injection for Wet Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology. Retina* **2018**, *2*, 676-683, doi:10.1016/j.oret.2017.10.017.
419. Metrangolo, C.; Donati, S.; Mazzola, M.; Fontanel, L.; Messina, W.; D'Alterio, G.; Rubino, M.; Radice, P.; Premi, E.; Azzolini, C. OCT Biomarkers in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Narrative Review. *Journal of ophthalmology* **2021**, *2021*, 9994098, doi:10.1155/2021/9994098.
420. Ou, W.C.; Brown, D.M.; Payne, J.F.; Wykoff, C.C. Relationship Between Visual Acuity and Retinal Thickness During Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Retinal Diseases. *American journal of ophthalmology* **2017**, *180*, 8-17, doi:10.1016/j.ajo.2017.05.014.
421. Moraes, G.; Fu, D.J.; Wilson, M.; Khalid, H.; Wagner, S.K.; Korot, E.; Ferraz, D.; Faes, L.; Kelly, C.J.; Spitz, T., et al. Quantitative Analysis of OCT for Neovascular Age-Related Macular Degeneration Using Deep Learning. *Ophthalmology* **2021**, *128*, 693-705, doi:10.1016/j.ophtha.2020.09.025.
422. Sharma, S.; Toth, C.A.; Daniel, E.; Grunwald, J.E.; Maguire, M.G.; Ying, G.S.; Huang, J.; Martin, D.F.; Jaffe, G.J. Macular Morphology and Visual Acuity in the Second Year of the

- Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 865-875, doi:10.1016/j.ophtha.2015.12.002.
423. Cheong, K.X.; Grewal, D.S.; Teo, K.Y.C.; Gan, A.T.L.; Jaffe, G.J.; Cheung, G.C.M. The relationship between pigment epithelial detachment and visual outcome in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Eye* **2020**, *34*, 2257-2263, doi:10.1038/s41433-020-0803-6.
424. Sarraf, D.; London, N.J.; Khurana, R.N.; Dugel, P.U.; Gune, S.; Hill, L.; Tuomi, L. Ranibizumab Treatment for Pigment Epithelial Detachment Secondary to Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Post Hoc Analysis of the HARBOR Study. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 2213-2224, doi:10.1016/j.ophtha.2016.07.007.
425. Javaheri, M.; Hill, L.; Ghanekar, A.; Stoilov, I. Changes in Treatment-Naive Pigment Epithelial Detachments Associated With the Initial Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Injection: A Post Hoc Analysis From the HARBOR Trial. *JAMA ophthalmology* **2021**, *139*, 219-223, doi:10.1001/jamaophthalmol.2020.5130.
426. Azar, G.; Wolff, B.; De Bats, F.; Halfon, J.; Strehlo, M.; Tick, S.; Castelnovo, L.; Michel, G.; Masse, H.; Vasseur, V., et al. Morphological Predictive Features on Spectral-Domain Optical Coherence Tomography for Visual Outcomes in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Treated with Ranibizumab. *BioMed research international* **2018**, *2018*, 7438083, doi:10.1155/2018/7438083.
427. Friedlander, M. Fibrosis and diseases of the eye. *The Journal of clinical investigation* **2007**, *117*, 576-586, doi:10.1172/JCI31030.
428. Marmor, M.F. Control of subretinal fluid: experimental and clinical studies. *Eye* **1990**, *4* (Pt 2), 340-344, doi:10.1038/eye.1990.46.
429. Schmidt-Erfurth, U.; Vogl, W.D.; Jampol, L.M.; Bogunovic, H. Application of Automated Quantification of Fluid Volumes to Anti-VEGF Therapy of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **2020**, *127*, 1211-1219, doi:10.1016/j.ophtha.2020.03.010.
430. Reiter, G.S.; Grechenig, C.; Vogl, W.D.; Guymer, R.H.; Arnold, J.J.; Bogunovic, H.; Schmidt-Erfurth, U. Analysis of Fluid Volume and Its Impact on Visual Acuity in the Fluid Study as Quantified with Deep Learning. *Retina* **2021**, *41*, 1318-1328, doi:10.1097/IAE.0000000000003023.
431. Llorente-Gonzalez, S.; Hernandez, M.; Gonzalez-Zamora, J.; Bilbao-Malave, V.; Fernandez-Robredo, P.; Saenz-de-Viteri, M.; Barrio-Barrio, J.; Rodriguez-Cid, M.J.; Donate, J.; Ascaso, F.J., et al. The role of retinal fluid location in atrophy and fibrosis evolution of patients with neovascular age-related macular degeneration long-term treated in real world. *Acta Ophthalmol* **2022**, *100*, e521-e531, doi:10.1111/aos.14905.
432. Sadda, S.R.; Guymer, R.; Mones, J.M.; Tufail, A.; Jaffe, G.J. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Use and Atrophy in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Systematic Literature Review and Expert Opinion. *Ophthalmology* **2020**, *127*, 648-659, doi:10.1016/j.ophtha.2019.11.010.
433. Arnold, J.J.; Markey, C.M.; Kurstjens, N.P.; Guymer, R.H. The role of sub-retinal fluid in determining treatment outcomes in patients with neovascular age-related macular degeneration--a phase IV randomised clinical trial with ranibizumab: the FLUID study. *BMC ophthalmology* **2016**, *16*, 31, doi:10.1186/s12886-016-0207-3.
434. Waldstein, S.M.; Wright, J.; Warburton, J.; Margaron, P.; Simader, C.; Schmidt-Erfurth, U. Predictive Value of Retinal Morphology for Visual Acuity Outcomes of Different Ranibizumab Treatment Regimens for Neovascular AMD. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 60-69, doi:10.1016/j.ophtha.2015.09.013.
435. Segal, O.; Barayev, E.; Nemet, A.Y.; Mimouni, M. Predicting Response of Exudative Age-Related Macular Degeneration to Bevacizumab Based on Spectralis Optical Coherence Tomography. *Retina* **2016**, *36*, 259-263, doi:10.1097/IAE.0000000000000690.

436. Lai, T.T.; Hsieh, Y.T.; Yang, C.M.; Ho, T.C.; Yang, C.H. Biomarkers of optical coherence tomography in evaluating the treatment outcomes of neovascular age-related macular degeneration: a real-world study. *Scientific reports* **2019**, *9*, 529, doi:10.1038/s41598-018-36704-6.
437. Gamulescu, M.A.; Panagakis, G.; Theek, C.; Helbig, H. Predictive Factors in OCT Analysis for Visual Outcome in Exudative AMD. *Journal of ophthalmology* **2012**, *2012*, 851648, doi:10.1155/2012/851648.
438. Schmidt-Erfurth, U.; Klimescha, S.; Waldstein, S.M.; Bogunovic, H. A view of the current and future role of optical coherence tomography in the management of age-related macular degeneration. *Eye* **2017**, *31*, 26-44, doi:10.1038/eye.2016.227.
439. Altaweel, M.M.; Daniel, E.; Martin, D.F.; Mittra, R.A.; Grunwald, J.E.; Lai, M.M.; Melamud, A.; Morse, L.S.; Huang, J.; Ferris, F.L., 3rd, et al. Outcomes of eyes with lesions composed of >50% blood in the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology* **2015**, *122*, 391-398 e395, doi:10.1016/j.ophtha.2014.08.020.
440. Stanescu-Segall, D.; Balta, F.; Jackson, T.L. Submacular hemorrhage in neovascular age-related macular degeneration: A synthesis of the literature. *Survey of ophthalmology* **2016**, *61*, 18-32, doi:10.1016/j.survophthal.2015.04.004.
441. Daniel, E.; Pan, W.; Ying, G.S.; Kim, B.J.; Grunwald, J.E.; Ferris, F.L., 3rd; Jaffe, G.J.; Toth, C.A.; Martin, D.F.; Fine, S.L., et al. Development and Course of Scars in the Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* **2018**, *125*, 1037-1046, doi:10.1016/j.ophtha.2018.01.004.
442. Ying, G.S.; Kim, B.J.; Maguire, M.G.; Huang, J.; Daniel, E.; Jaffe, G.J.; Grunwald, J.E.; Blinder, K.J.; Flaxel, C.J.; Rahhal, F., et al. Sustained visual acuity loss in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *JAMA ophthalmology* **2014**, *132*, 915-921, doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.1019.
443. Bhisitkul, R.B.; Mendes, T.S.; Rofagha, S.; Enanoria, W.; Boyer, D.S.; Sadda, S.R.; Zhang, K. Macular atrophy progression and 7-year vision outcomes in subjects from the ANCHOR, MARINA, and HORIZON studies: the SEVEN-UP study. *American journal of ophthalmology* **2015**, *159*, 915-924 e912, doi:10.1016/j.ajo.2015.01.032.
444. Ying, G.S.; Maguire, M.G. Analyses Comparing Visual Acuity Between Ranibizumab and Bevacizumab in the Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *JAMA ophthalmology* **2015**, *133*, 726, doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.0502.
445. Okeagu, C.U.; Agron, E.; Vitale, S.; Domalpally, A.; Chew, E.Y.; Keenan, T.D.L. Principal Cause of Poor Visual Acuity after Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Age-Related Eye Disease Study 2 Report Number 23. *Ophthalmology. Retina* **2021**, *5*, 23-31, doi:10.1016/j.oret.2020.09.025.
446. Laser photocoagulation of subfoveal recurrent neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **1991**, *109*, 1232-1241, doi:10.1001/archophth.1991.01080090056026.
447. Occult choroidal neovascularization. Influence on visual outcome in patients with age-related macular degeneration. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology* **1996**, *114*, 400-412.
448. Steinle, N.C.; Du, W.; Gibson, A.; Saroj, N. Outcomes by Baseline Choroidal Neovascularization Features in Age-Related Macular Degeneration: A Post Hoc Analysis of the VIEW Studies. *Ophthalmology. Retina* **2021**, *5*, 141-150, doi:10.1016/j.oret.2020.07.003.
449. Fernandes, L.H.; Freund, K.B.; Yannuzzi, L.A.; Spaide, R.F.; Huang, S.J.; Slakter, J.S.; Sorenson, J.A. The nature of focal areas of hyperfluorescence or hot spots imaged with

- indocyanine green angiography. *Retina* **2002**, *22*, 557-568, doi:10.1097/00006982-200210000-00005.
450. Daniel, E.; Shaffer, J.; Ying, G.S.; Grunwald, J.E.; Martin, D.F.; Jaffe, G.J.; Maguire, M.G. Outcomes in Eyes with Retinal Angiomatous Proliferation in the Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology* **2016**, *123*, 609-616, doi:10.1016/j.ophtha.2015.10.034.
451. Chae, B.; Jung, J.J.; Mrejen, S.; Gallego-Pinazo, R.; Yannuzzi, N.A.; Patel, S.N.; Chen, C.Y.; Marsiglia, M.; Boddu, S.; Freund, K.B. Baseline Predictors for Good Versus Poor Visual Outcomes in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration With Intravitreal Anti-VEGF Therapy. *Investigative ophthalmology & visual science* **2015**, *56*, 5040-5047, doi:10.1167/iovs.15-16494.
452. Lanzetta, P.; Cruess, A.F.; Cohen, S.Y.; Slakter, J.S.; Katz, T.; Sowade, O.; Zeitz, O.; Ahlers, C.; Mitchell, P. Predictors of visual outcomes in patients with neovascular age-related macular degeneration treated with anti-vascular endothelial growth factor therapy: post hoc analysis of the VIEW studies. *Acta ophthalmologica* **2018**, *96*, e911-e918, doi:10.1111/aos.13751.
453. Rua, O.; Larrayoz, I.M.; Barajas, M.T.; Velilla, S.; Martinez, A. Oral doxycycline reduces pterygium lesions; results from a double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. *PLoS one* **2012**, *7*, e52696, doi:10.1371/journal.pone.0052696.
454. Grunin, M.; Hagbi-Levi, S.; Rinsky, B.; Smith, Y.; Chowers, I. Transcriptome Analysis on Monocytes from Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Scientific reports* **2016**, *6*, 29046, doi:10.1038/srep29046.
455. Litwinska, Z.; Sobus, A.; Luczkowska, K.; Grabowicz, A.; Mozolewska-Piotrowska, K.; Safranow, K.; Kawa, M.P.; Machalinski, B.; Machalinska, A. The Interplay Between Systemic Inflammatory Factors and MicroRNAs in Age-Related Macular Degeneration. *Frontiers in aging neuroscience* **2019**, *11*, 286, doi:10.3389/fnagi.2019.00286.
456. Ulanczyk, Z.; Sobus, A.; Luczkowska, K.; Grabowicz, A.; Mozolewska-Piotrowska, K.; Safranow, K.; Kawa, M.P.; Palucha, A.; Krawczyk, M.; Sikora, P., et al. Associations of microRNAs, Angiogenesis-Regulating Factors and CFH Y402H Polymorphism-An Attempt to Search for Systemic Biomarkers in Age-Related Macular Degeneration. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20225750.
457. McDonel, P.; Guttman, M. Approaches for Understanding the Mechanisms of Long Noncoding RNA Regulation of Gene Expression. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2019**, *11*, doi:10.1101/cshperspect.a032151.
458. Hofmans, M.; Lammens, T.; Depreter, B.; Wu, Y.; Erlacher, M.; Caye, A.; Cave, H.; Flotho, C.; de Haas, V.; Niemeyer, C.M., et al. Long non-coding RNAs as novel therapeutic targets in juvenile myelomonocytic leukemia. *Scientific reports* **2021**, *11*, 2801, doi:10.1038/s41598-021-82509-5.
459. Chen, S.; Xiao, Z.; Zhou, J.; Yang, M.; Feng, S.; Huang, Q.; Zou, J.; Zeng, T.; Li, Y.; Peng, L., et al. ZNF382: A transcription inhibitor down-regulated in multiple tumors due to promoter methylation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2020**, *500*, 220-225, doi:10.1016/j.cca.2019.10.021.
460. Mansoor, N.; Wahid, F.; Azam, M.; Shah, K.; den Hollander, A.I.; Qamar, R.; Ayub, H. Molecular Mechanisms of Complement System Proteins and Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Current molecular medicine* **2019**, *19*, 705-718, doi:10.2174/1566524019666190828150625.
461. Schmit, K.; Michiels, C. TMEM Proteins in Cancer: A Review. *Frontiers in pharmacology* **2018**, *9*, 1345, doi:10.3389/fphar.2018.01345.
462. Yamaguchi, M.; Fujimori-Tonou, N.; Yoshimura, Y.; Kishi, T.; Okamoto, H.; Masai, I. Mutation of DNA primase causes extensive apoptosis of retinal neurons through the


- activation of DNA damage checkpoint and tumor suppressor p53. *Development* **2008**, *135*, 1247-1257, doi:10.1242/dev.011015.
463. Farrar, G.J.; Carrigan, M.; Dockery, A.; Millington-Ward, S.; Palfi, A.; Chadderton, N.; Humphries, M.; Kiang, A.S.; Kenna, P.F.; Humphries, P. Toward an elucidation of the molecular genetics of inherited retinal degenerations. *Human molecular genetics* **2017**, *26*, R2-R11, doi:10.1093/hmg/ddx185.
464. Wang, Y.; Wang, X.; Jiang, Y.; Liu, R.; Cao, D.; Pan, J.; Luo, Y. Identification of key miRNAs and genes for mouse retinal development using a linear model. *Molecular medicine reports* **2020**, *22*, 494-506, doi:10.3892/mmr.2020.11082.
465. Greenberg, E.; Hajdu, S.; Nemlich, Y.; Cohen, R.; Itzhaki, O.; Jacob-Hirsch, J.; Besser, M.J.; Schachter, J.; Markel, G. Differential regulation of aggressive features in melanoma cells by members of the miR-17-92 complex. *Open biology* **2014**, *4*, 140030, doi:10.1098/rsob.140030.
466. Skalsky, R.L.; Corcoran, D.L.; Gottwein, E.; Frank, C.L.; Kang, D.; Hafner, M.; Nusbaum, J.D.; Feederle, R.; Delecluse, H.J.; Luftig, M.A., et al. The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS pathogens* **2012**, *8*, e1002484, doi:10.1371/journal.ppat.1002484.
467. Wang, M.; Gu, H.; Qian, H.; Zhu, W.; Zhao, C.; Zhang, X.; Tao, Y.; Zhang, L.; Xu, W. miR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation. *European journal of cancer* **2013**, *49*, 2010-2021, doi:10.1016/j.ejca.2012.12.017.
468. Yang, Y.; Mei, Q. miRNA signature identification of retinoblastoma and the correlations between differentially expressed miRNAs during retinoblastoma progression. *Molecular vision* **2015**, *21*, 1307-1317.
469. Pin, A.L.; Houle, F.; Guillonnet, M.; Paquet, E.R.; Simard, M.J.; Huot, J. miR-20a represses endothelial cell migration by targeting MKK3 and inhibiting p38 MAP kinase activation in response to VEGF. *Angiogenesis* **2012**, *15*, 593-608, doi:10.1007/s10456-012-9283-z.
470. Guo, Y.; Du, F.; Tan, Y.L.; Luo, J.; Xiong, D.; Song, W.T. VEGF-mediated angiogenesis in retinopathy of prematurity is co-regulated by miR-17-5p and miR-20a-5p. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **2021**, *99*, 414-423, doi:10.1139/bcb-2020-0357.
471. Gallardo, M.; Munk, M.R.; Kurmann, T.; De Zanet, S.; Mosinska, A.; Karagoz, I.K.; Zinkernagel, M.S.; Wolf, S.; Sznitman, R. Machine Learning Can Predict Anti-VEGF Treatment Demand in a Treat-and-Extend Regimen for Patients with Neovascular AMD, DME, and RVO Associated Macular Edema. *Ophthalmology. Retina* **2021**, *5*, 604-624, doi:10.1016/j.oret.2021.05.002.
472. Diack, C.; Schwab, D.; Cosson, V.; Buchheit, V.; Mazer, N.; Frey, N. A Baseline Score to Predict Response to Ranibizumab Treatment in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Translational vision science & technology* **2021**, *10*, 11, doi:10.1167/tvst.10.6.11.
473. Sharma, S.; Baweja, S.; Maras, J.S.; Shasthry, S.M.; Moreau, R.; Sarin, S.K. Differential blood transcriptome modules predict response to corticosteroid therapy in alcoholic hepatitis. *JHEP reports : innovation in hepatology* **2021**, *3*, 100283, doi:10.1016/j.jhepr.2021.100283.
474. Gadd, V.L.; Patel, P.J.; Jose, S.; Horsfall, L.; Powell, E.E.; Irvine, K.M. Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease: Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation. *PloS one* **2016**, *11*, e0157771, doi:10.1371/journal.pone.0157771.
475. Li, S.; Roupahel, N.; Duraisingham, S.; Romero-Steiner, S.; Presnell, S.; Davis, C.; Schmidt, D.S.; Johnson, S.E.; Milton, A.; Rajam, G., et al. Molecular signatures of antibody

- responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nature immunology* **2014**, *15*, 195-204, doi:10.1038/ni.2789.
476. Li, Y.; Oosting, M.; Deelen, P.; Ricano-Ponce, I.; Smeekens, S.; Jaeger, M.; Matzaraki, V.; Swertz, M.A.; Xavier, R.J.; Franke, L., et al. Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses to bacteria and fungi. *Nature medicine* **2016**, *22*, 952-960, doi:10.1038/nm.4139.
477. Amoaku, W.; Balaskas, K.; Cudrnak, T.; Downey, L.; Groppe, M.; Mahmood, S.; Mehta, H.; Mohamed, Q.; Mushtaq, B.; Severn, P., et al. Initiation and maintenance of a Treat-and-Extend regimen for ranibizumab therapy in wet age-related macular degeneration: recommendations from the UK Retinal Outcomes Group. *Clinical ophthalmology* **2018**, *12*, 1731-1740, doi:10.2147/OPTH.S174560.
478. Khanna, S.; Komati, R.; Eichenbaum, D.A.; Hariprasad, I.; Ciulla, T.A.; Hariprasad, S.M. Current and upcoming anti-VEGF therapies and dosing strategies for the treatment of neovascular AMD: a comparative review. *BMJ open ophthalmology* **2019**, *4*, e000398, doi:10.1136/bmjophth-2019-000398.

Anexo

Article

Predictive Biomarkers of Age-Related Macular Degeneration Response to Anti-VEGF Treatment

Ana I. Oca ^{1,†}, Álvaro Pérez-Sala ^{1,†}, Ana Pariente ¹, Rodrigo Ochoa ¹, Sara Velilla ¹, Rafael Peláez ¹ 
and Ignacio M. Larrayoz ^{1,2,*}

¹ Biomarkers and Molecular Signaling Group, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Foundation Rioja Salud, 26006 Logroño, La Rioja, Spain; aioca@riojasalud.es (A.I.O.); aperez@riojasalud.es (Á.P.-S.); apariente@riojasalud.es (A.P.); rochoaf@riojasalud.es (R.O.); svelillaoses@gmail.com (S.V.); rpelaez@riojasalud.es (R.P.)

² Unidad Predepartamental de Enfermería, Universidad de La Rioja (UR), 26006 Logroño, La Rioja, Spain

* Correspondence: ilarrayoz@riojasalud.es; Tel.: +34-941278770

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Age-related macular degeneration (AMD) is an incurable disease associated with aging that destroys sharp and central vision. Increasing evidence implicates both systemic and local inflammation in the pathogenesis of AMD. Intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) agents is currently the first-line therapy for choroidal neovascularization in AMD patients. However, a high number of patients do not show satisfactory responses to anti-VEGF treatment after three injections. Predictive treatment response models are one of the most powerful tools for personalized medicine. Therefore, the application of these models is very helpful to predict the optimal treatment for an early application on each patient. We analyzed the transcriptome of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from AMD patients before treatment to identify biomarkers of response to ranibizumab. A classification model comprised of four mRNAs and one miRNA isolated from PBMCs was able to predict the response to ranibizumab with high accuracy (Area Under the Curve of the Receiver Operating Characteristic curve = 0.968), before treatment. We consider that our classification model, based on mRNA and miRNA from PBMCs allows a robust prediction of patients with insufficient response to anti-VEGF treatment. In addition, it could be used in combination with other methods, such as specific baseline characteristics, to identify patients with poor response to anti-VEGF treatment to establish patient-specific treatment plans at the first visit.

Keywords: RNA-Seq; PBMC; retina; ranibizumab; machine learning



Citation: Oca, A.I.; Pérez-Sala, Á.; Pariente, A.; Ochoa, R.; Velilla, S.; Peláez, R.; Larrayoz, I.M. Predictive Biomarkers of Age-Related Macular Degeneration Response to Anti-VEGF Treatment. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 1329. <https://doi.org/10.3390/jpm11121329>

Academic Editor: Chiara Villa

Received: 22 October 2021

Accepted: 6 December 2021

Published: 8 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is an incurable disease associated with aging that destroys sharp and central vision, and therefore, it is a highly disabling disease. AMD affects the macula, a light-sensitive region at the back center of the retina, responsible for seeing objects in fine detail. There are two main types of AMD: dry and wet AMD. Both forms can occur in one or both eyes, neither of them produces pain, so they can go undetected until they produce marked changes in vision. Dry AMD, the more common form of macular degeneration (90% of total cases), is proposed to be a vascular-metabolic-inflammatory disease characterized by the accumulation of drusen (small yellowish deposits) [1,2]. Dry AMD does not usually cause total loss of central vision due to its slow progress. Wet AMD, however, is the more serious form of the disease and it represents 90% of the cases that progress to legal blindness. It is characterized by choroidal neovascularization (CNV) as a result of abnormally choroidal blood vessels growth through Bruch's membrane into the macula, pushing aside the retinal pigment epithelium (RPE) and distorting its structure [1]. Moreover, 10 to 15 percent of adults with dry AMD will go on to develop wet AMD as a consequence of CNV [1]. This process eventually leads to

blood and fluid leakage that can scar the macula and retina, which leads to a rapid and permanent loss of central vision [1].

CNV is stimulated by the induction of angiogenic growth factors, including VEGF and several interleukins (IL-6, IL-8, IL-18 . . .). Clinical trials and laser-induced CNV in animal models have shown that antiangiogenic therapy targeting VEGF, such as bevacizumab, aflibercept or ranibizumab, can decrease disease progression [3]. However, there are a number of problems with current therapy options. The high rate of retreatment, for one, places a remarkable burden on both patients and retinal specialists, while the high cost of therapy is creating economic challenges for national healthcare systems that are already under strain. In addition, the optimal treatment regimen for specific subsets of patients has yet to be defined in clinical trials. Finally, gains in visual acuity do have a limit, and an important subset of patients with wet AMD does not appear to respond, whether functionally or anatomically, to current anti-VEGF therapy [4].

Increasing evidence implicates both systemic and local inflammation in the pathogenesis of AMD. For instance, the presence of inflammatory mediators of the complement cascade in drusen, macrophages in the choroid of eyes with AMD [5], or anti-retinal autoantibodies and inflammatory markers detected in the sera of patients with AMD [6]. Involvement of systemic inflammation in the disease is reflected by the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in complement components [7–10], chemokine receptors [11,12], VEGF isoforms [13,14] and Toll-like receptor-3 [15]. Furthermore, perturbed macrophage function is thought to lead to the development of features resembling AMD in mice strains deficient in chemokine receptors or their ligands [16]. Thus, plasmatic solutes and PBMCs seem to have an important role in AMD physiopathology [17–20] and have been widely used to study biomarkers related to AMD [21–25].

Although knowledge of the genetic history and DNA sequences of an individual patient may be helpful for the studies of ancestry or a diagnosis of pre-existing adversities to certain drugs, it has relatively little effectiveness for molecular medicine in AMD [26–30] when compared to analyzing transcriptomes. To our knowledge, no direct transcriptome-wide analysis of white blood cells in relation to AMD response to ranibizumab treatment has been reported.

Predictive treatment response models are one of the most powerful tools for personalized medicine as they can predict which treatment would fit better on each patient, probability of success, etc. Therefore, the application of these models is very helpful to predict the optimal treatment for an early application on each patient [23].

In the present work, we have analyzed the transcriptome of PBMCs from 59 wet AMD patients, before undergoing ranibizumab treatment. Using correlation-based feature selection algorithms, we have identified a set of mRNAs and miRNAs to build classification models for the prediction of ranibizumab response, with high accuracy. This set of RNAs could help clinicians to identify patients with poor response to anti-VEGF treatment, at the first visit, and to establish improved patient-specific treatment plans.

2. Materials and Methods

2.1. Population and Group Characteristics

Patients were recruited, evaluated and the progression was followed by Ophthalmologists from the Service of the Hospital San Pedro, La Rioja, Spain. Signed informed consent forms were obtained from 59 untreated wet AMD patients older than 60 years. They were evaluated based on ophthalmoscopy, fluorescein angiography and optical coherence tomography (OCT) in the Department of Ophthalmology of Hospital San Pedro. Patients with severe systemic diseases, such as malignancies, active ischemic heart disease, uncontrolled diabetes or pulmonary disease, or autoimmune diseases were excluded from the study. Classification of patient response was based on Amoaku and collaborators [31]. Briefly, patients were considered good responders (good or partial morphological and/functional response) when the examination showed resolution of intraretinal fluid (IRF), subretinal fluid (SRF), retinal thickening and/or improvement of at least five ETDRS letters. Poor

responders (poor or no response) were defined as patients showing less than 25% reduction in OCT CRT from the baseline, with persistent or new IRF, SRF, or minimal or no change in visual acuity (less than five letters) after VEGF therapy [31,32].

2.2. PBMCs Isolation

Blood samples were drawn and PBMCs were isolated using a standard protocol for RNA extraction and purification. Briefly, blood was placed in BD Vacutainer CPT tubes containing Sodium Citrate and Ficoll™ Hypaque™ Solution (BD-Bioscience, Madrid, Spain). PBMCs were collected by centrifugation at $1800 \times g$ for 10 min at room temperature. Then, PBMCs were washed in a PBS -/- solution, centrifuged at $300 \times g$ for 10 min and quantified. Finally, PBMCs were stored at -80°C after their resuspension in TRIzol reagent (Invitrogen, Madrid, Spain).

2.3. RNA Purification

Total RNA was extracted and purified according to published protocols [33]. Briefly, we isolated mRNA and miRNA using TRIzol (Invitrogen, Madrid, Spain) and the RNeasy mini-kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Samples were treated DNase I (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Nucleic acid content was quantified with a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and subjected to next-generation sequencing.

2.4. Next Generation Sequencing

Whole transcriptome sequencing was performed according to the manufacturer's protocols and using their reagents (Illumina, San Diego, CA, USA) as described previously [33]. Briefly, an automated electrophoresis system (Experion; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to check the integrity and quality of the total. One μg mRNA was fragmented into approximately 200 base pair (bp) pieces by using divalent cations under elevated temperature. Cleaved RNA fragments were treated with reverse transcriptase and random primers to generate first strand cDNA. The second strand was obtained using DNA polymerase I and RNase H. cDNA fragments were end-repaired by Klenow DNA polymerase and T4 DNA polymerase. Then, cDNA was phosphorylated by T4 polynucleotide kinase and ligated indexing adapters (Illumina, Madrid, Spain). Adapter-tagged libraries were amplified by using PCR with DNA polymerase (Phusion; Finnzymes Reagents, Vantaa, Finland) and validated and quantified by electrophoresis and qPCR. Pools of 4–6 indexed libraries were mixed at equimolar ratios to yield a total oligonucleotide mixture concentration of 10 nM. Final libraries were sequenced in a HiSeq 1500 platform (Illumina, Madrid, Spain) to generate $2 \times 125\text{-bp}$ paired-end reads.

2.5. Transcriptomic Analysis and Bioinformatics

For transcriptomic analyses, we used paired end raw reads data obtained from Illumina sequencing workflows. Firstly, data were cleaned of adapters and low-quality sequences based on reported quality scores. Mapping was performed using the Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) aligner (<https://github.com/alexdobin/STAR> accessed date 1 April 2021) [34]. Mapped reads were counted using FeatureCounts (<http://subread.sourceforge.net/> accessed date 1 April 2021) over gene feature discarding multimapping reads [35]. The statistical analyses were performed on R using two different differential expression analysis packages: edgeR and DESeq2. Results were cross-checked between both methods to obtain a differential expressed gene set.

All sequenced samples were classified in the two defined patient groups (Good responders and Poor responders) to perform model contrasts. Gender classification was included in the statistical model as a confounding variable, not being used for contrast. RAW counts were normalized using the default methodology for each package, and zeros were excluded were less than 25% of samples had at least one count. Statistical results from model contrast were listed and filtered by p -value (<0.01) to study the most relevant

alterations between groups. In addition, a wider filter was applied to analyze pathway enrichment by most altered genes (p -value < 0.05) using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database [36–38].

Micro RNA reads were obtained following Illumina sequencing protocols similarly to mRNA sequencing. Firstly, data were cleaned of adapters and low-quality sequences based on reported quality scores. After that, the miRDeep2 tool (<https://github.com/rajewsky-lab/mirdeep2> accessed date 1 April 2021) was used for mapping, quantification and enrichment analysis over human described miRNAs in miRBase (<https://www.mirbase.org> accessed date 1 April 2021) and their precursors [39]. Differential miRNA expression analyses were performed over miRDeep2 normalized counts using the edgeR statistical package. The analysis setup was based on the same groups and criteria as mRNA differential expression analysis. Results were also filtered by p -value to identify the most relevant miRNAs altered between groups.

2.6. Data Mining and Feature Selection

All data mining and deep learning experiments were performed using open-source data mining tools (available from Weka Machine Learning 3, <https://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka> accessed date 1 April 2021). Firstly, an attribute evaluation algorithm was used to reduce gene sets used for classification modeling. That process was applied for both datasets (miRNA and mRNA) using two different approaches: model entropy minimization score for each attribute, and correlation-based feature selection algorithm. The resulting set reported by the correlation-based feature selection algorithm fulfills the condition of being the minimal attribute set without compromising model classification performance. For this study, we chose the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC) to measure model classification performance. AUC was also used as a performance parameter in the data mining step. Signatures and their models were independently tested using 10-fold cross-validation techniques ensuring that no patient was present in both the training set and the test set.

3. Results

3.1. Cohort Description

Baseline characteristics of the AMD patients included in this study are presented in Table 1 and Supplementary Table S1. Fifty-nine patients were classified as “good responders”, or “poor responders” based on the morphological and functional criteria described in the “Methods” section. Prior to treatment, there were no differences between those groups in relation to age, sex, diabetes, hypertension, dyslipidemia, coronary disease, diet, tobacco or alcohol consumption, exposure to the sun, affected eye, intraocular pressure (IOP), central retinal thickness, macular cube volume, retinal pigment epithelial detachment, intra-retinal fluid, sub-retinal fluid, intra-retinal cysts, hemorrhage, exudation or fibrosis (Table 1). However, “poor responders” showed a higher proportion of RPE atrophy than “good responders” ($p = 0.011$) (Table 1), i.e., only 23% of the patients with RPE atrophy responded to treatment, while 64% of patients without atrophy showed improvements with ranibizumab.

Table 1. Demographics and baseline characteristics.

	All	Poor Responders	Good Responders	p -Value
Age (years, mean \pm SD)	78.03 \pm 1.055	80.04 \pm 1.379	76.45 \pm 1.504	0.092
Sex (Male/Female)	24/35	8/18	16/17	0.193
Tobacco (yes/no)	23/36	8/18	15/18	0.292
ETDRS (letters)	63.61 \pm 1.131	62.73 \pm 1.791	64.30 \pm 1.464	0.495

Table 1. Cont.

		All	Poor Responders	Good Responders	p-Value
OCT	Central Retinal Thickness, mean ± SD (µm)	329.18 ± 15.495	325.2 ± 28.09	332.4 ± 17.7	0.820
	Macular cube volume (µm ³)	10.333 ± 0.176	10.37 ± 0.3137	10.30 ± 0.2004	0.839
	Retinal pigment epithelial detachment (yes/no)	43/16	20/6	23/10	0.571
	Intra-retinal fluid (yes/no)	48/11	22/4	26/7	0.740
	Sub-retinal fluid (yes/no)	43/16	17/9	26/7	0.377
	Intra-retinal cysts (yes/no)	35/24	16/10	19/14	0.795
Fundoscopy	Hemorrhage (yes/no)	28/31	15/11	13/20	0.196
	Exudation (yes/no)	8/51	2/24	6/27	0.446
	Atrophy (yes/no)	13/46	10/16	3/30	0.011
	Fibrosis (yes/no)	4/55	2/24	2/31	1.000
AGF	Location (Sub-/Yuxta-/Extra-Foveal)	16/35/5	9/16/0	7/19/5	0.085
	Size (mm)	1.03 ± 0.130	1.193 ± 0.2181	0.9150 ± 0.1585	0.297
	Pattern (O/PC/MC)	26/22/8	14/9/3	12/13/5	0.577

p values were calculated using Fisher’s exact test. AGF pattern: O = Occult; PC = predominantly classic; MC: Minimally classic.

3.2. Messenger RNA Expression Differences between Good Responders and Poor Responders

We performed RNA-Seq differential expression analysis on mRNA extracted from PBMCs of a patient with good or poor response to ranibizumab before treatment initiation.

The results of the comparison between those groups are shown in Table 2. Despite not reaching statistical significance when corrected for multiple testing, TOP25 genes were analyzed to construct a predictive classification model. Using a Random Forest classifier optimized by the meta classifier Random Committee the classifier shows a ROC curve with an AUC = 0.886. In addition, we performed pathway enrichment analysis using the KEGG database for exploratory purposes with sequences showing unadjusted $p < 0.05$. Interestingly, we found pathways related to inflammatory cytokines and NF-κB signaling (Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S2), which supports the involvement of the immune system not only with the pathogenesis but also with the response to treatment.

Table 2. Differentially expressed mRNAs in PBMCs from Good responders and Poor responders.

Ensembl_ID	BaseMean	Log2FC	p Value	Symbol	Name
ENSG00000273727	3.8	−1.65	4.10×10^{-5}	U1	U1 spliceosomal RNA
ENSG00000235621	9.8	0.82	1.16×10^{-4}	LINC00494	long intergenic non-protein coding RNA 494
ENSG00000158106	25.0	0.54	1.67×10^{-4}	RHPN1	rhophilin Rho GTPase binding protein 1
ENSG00000215012	75.3	0.25	2.13×10^{-4}	RTL10	retrotransposon Gag like 10
ENSG00000249572	1.8	−1.31	2.41×10^{-4}	N/A	novel transcript
ENSG00000233913	23.6	−1.95	3.18×10^{-4}	RPL10P9	ribosomal protein L10 pseudogene 9

Table 2. Cont.

Ensembl_ID	BaseMean	Log2FC	p Value	Symbol	Name
ENSG00000260766	12.5	0.49	3.98×10^{-4}	N/A	N/A
ENSG00000160307	18.5	−1.57	4.40×10^{-4}	S100B	S100 calcium binding protein B
ENSG00000226581	1.1	1.62	5.17×10^{-4}	LINC02848	long intergenic non-protein coding RNA 2848
ENSG00000204345	1.3	−1.40	5.83×10^{-4}	CD300LD	CD300 molecule like family member d
ENSG00000174473	1.7	1.56	7.12×10^{-4}	GALNTL6	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase like 6
ENSG00000211789	14.2	0.77	7.23×10^{-4}	TRAV12-2	T cell receptor alpha variable 12-2
ENSG00000205710	11.6	−0.80	7.28×10^{-4}	C17orf107	chromosome 17 open reading frame 107
ENSG00000227309	3.3	−0.95	7.79×10^{-4}	RPL31P19	ribosomal protein L31 (RPL31) pseudogene
ENSG00000154723	43.8	−0.26	7.79×10^{-4}	ATP5PF	ATP synthase peripheral stalk subunit F6
ENSG00000107968	221.6	−0.29	7.81×10^{-4}	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
ENSG00000211880	6.4	0.70	7.90×10^{-4}	TRAJ9	T cell receptor alpha joining 9
ENSG00000258511	2.1	1.13	7.95×10^{-4}	LINC02295	long intergenic non-protein coding RNA 2295
ENSG00000235361	0.8	−1.67	9.34×10^{-4}	N/A	novel transcript, antisense to ABR
ENSG00000226430	1.7	1.29	1.03×10^{-3}	USP17L7	ubiquitin specific peptidase 17 like family member 7
ENSG00000197353	6.9	−0.94	1.04×10^{-3}	LYPD2	LY6/PLAUR domain containing 2
ENSG00000180758	18.7	0.39	1.06×10^{-3}	GPR157	G protein-coupled receptor 157
ENSG00000211575	0.9	−1.60	1.19×10^{-3}	MIR760	microRNA 760
ENSG00000272666	12.3	−0.75	1.26×10^{-3}	KLHDC7B-DT	KLHDC7B divergent transcript
ENSG00000156510	15.3	0.55	1.29×10^{-3}	HKDC1	hexokinase domain containing 1
ENSG00000007038	5.5	0.88	1.32×10^{-3}	PRSS21	serine protease 21
ENSG00000254088	5.4	0.61	1.33×10^{-3}	SLC2A3P4	solute carrier family 2 member 3 pseudogene 4
ENSG00000281106	23.3	0.71	1.58×10^{-3}	TMEM272	transmembrane protein 272
ENSG00000180822	67.2	0.28	1.58×10^{-3}	PSMG4	proteasome assembly chaperone 4
ENSG00000236709	7.6	−1.10	1.61×10^{-3}	DAPK1-IT1	DAPK1 intronic transcript 1

3.3. Micro RNA Expression Differences between Good Responders and Poor Responders

We performed additional RNA-Seq differential expression analysis on micro RNA extracted from PBMCs of the same patients. The results of the comparison between good and poor responders are shown in Table 3.

Using mirPathv3.0-assisted data analysis [40] with the TOP25 miRNAs, we identified numerous pathways regulated by this set of miRNAs, including thyroid hormone signaling, TGF- β signaling, Hippo and adherent signaling, endocytosis and others. Noteworthy, this miRNA set also regulates important AMD-related genes such VEGF-A, PDGFA and PDGFRA involved in VEGF-signaling pathway, ECM-receptor interaction, cytokine-receptor interaction and cell cycle (Supplementary Figures S2–S6 and Supplementary Table S3). These results also support the involvement of relevant pathways, common to the immune system and the retina, with the response to treatment. Following the same strategy as with the mRNA data, we selected the TOP25 miRNAs to construct a predictive classification model based

on Differential Expression (DE)-based classifiers. Using a Sequential Minimal Optimization (SMO)-based classifier we obtained a ROC curve with an AUC = 0.826.

Table 3. Differentially expressed miRNAs in PBMCs from Good responders and Poor responders.

miRNA	BaseMean	Log2FC	p Value
hsa-miR-3614-5p	11.3	3.49	1.42×10^{-3}
hsa-miR-423-5p	1779.1	10.80	2.37×10^{-3}
hsa-miR-20a-5p	865.9	9.76	3.16×10^{-3}
hsa-miR-30c-1-3p	24.6	4.62	5.19×10^{-3}
hsa-miR-1249-5p	3.0	1.58	5.32×10^{-3}
hsa-miR-3605-3p	7.5	2.91	6.96×10^{-3}
hsa-miR-320b	22.2	4.48	7.55×10^{-3}
hsa-miR-320b-2	22.7	4.51	8.09×10^{-3}
hsa-miR-25-5p	11.8	3.56	9.93×10^{-3}
hsa-miR-34c-5p	4.7	2.22	1.36×10^{-2}
hsa-miR-6813-5p	2.8	1.48	1.67×10^{-2}
hsa-miR-30a-5p	225.9	7.82	1.73×10^{-2}
hsa-miR-132-3p	25.0	4.64	1.76×10^{-2}
hsa-miR-642a-5p	4.3	2.10	1.77×10^{-2}
hsa-miR-212-3p	6.9	2.78	1.97×10^{-2}
hsa-miR-181b-5p	1721.2	10.75	1.98×10^{-2}
hsa-miR-3127-5p	2.8	1.47	2.00×10^{-2}
hsa-miR-1273h-5p	6.4	2.68	2.11×10^{-2}
hsa-miR-181b-5p-2	1795.9	10.81	2.19×10^{-2}
hsa-miR-652-5p	24.7	4.63	2.51×10^{-2}
hsa-let-7i-5p	5009.0	12.29	2.51×10^{-2}
hsa-miR-369-3p	20.0	4.32	2.59×10^{-2}
hsa-miR-6511a-3p	4.7	2.24	2.62×10^{-2}
hsa-miR-6511a-3p-2	4.7	2.24	2.62×10^{-2}
hsa-miR-6511a-3p-3	4.7	2.24	2.62×10^{-2}
hsa-miR-6511a-3p-4	4.7	2.24	2.62×10^{-2}
hsa-miR-223-5p	93.8	6.55	2.69×10^{-2}
hsa-miR-2110	14.5	3.85	2.84×10^{-2}
hsa-miR-190a-5p	32.2	5.01	2.91×10^{-2}
hsa-miR-487a-3p	9.7	3.28	3.27×10^{-2}

3.4. Classification Model from mRNA Data

The whole transcriptome analysis (RNA-Seq) method allows measuring the expression levels of all the transcripts simultaneously. With that information, it is possible to develop different classification algorithms. Thus, there are several types of classifiers described in the literature. DE-based classifiers take into account the difference in the expression level of genes and they are often useful to discover disease biomarkers. For RNA-Seq data, this is typically done by fitting the distribution of the genes to negative binomial linear models and applying a likelihood ratio statistical test.

In general, the first step for a classification process is a feature selection step by pre-processing the data. This is done to reduce the computational complexity associated with the amount of data obtained by RNA-Seq. In addition, not all expressed genes may be relevant for a specific classification task. In fact, using uninformative features may even decrease the accuracy of the classifier by model overfitting.

However, since we did not observe any differentially expressed gene, between Good responders and Poor responders, after multiple testing corrections, we decided to investigate other classifiers based on entropy reduction.

To reduce the number of features to use, we performed a feature selection procedure (see Methods), using the Weka suite [41], on mRNA sequencing data from PBMCs obtained from the studied cohort. This process resulted in a significant reduction of features (>1000-fold). We then selected the 10 most informative mRNAs (ENSG00000249572, ENSG00000176531, ENSG00000240350, ENSG00000161298, ENSG00000049239, ENSG00000226479, ENSG00000198056, ENSG00000104450, ENSG00000156510, and ENSG00000158106) to obtain a predictive classification model for treatment response, using a Random Forest classifier optimized by the meta classifier Random Committee. The performance of the classifier is represented with a ROC curve (AUC = 0.950) in Figure 1.

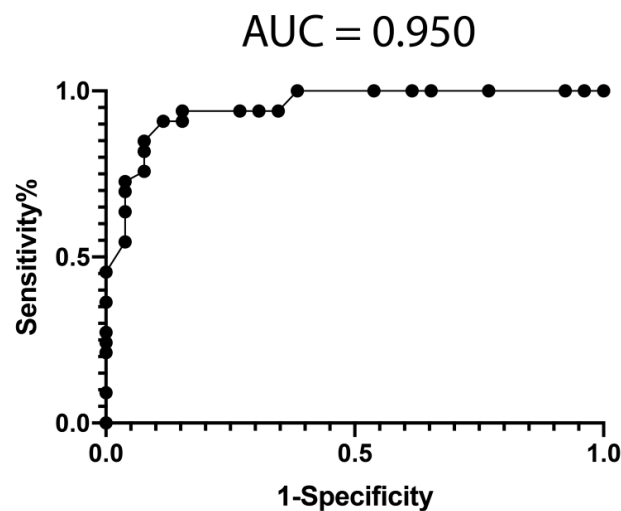


Figure 1. Classification model performance from informative mRNA data. A ROC was constructed with expression data from 10 mRNAs (ENSG00000249572, ENSG00000176531, ENSG00000240350, ENSG00000161298, ENSG00000049239, ENSG00000226479, ENSG00000198056, ENSG00000104450, ENSG00000156510, and ENSG00000158106) from the 59 patients. The classification model was built using a Random Forest classifier optimized by the meta classifier Random Committee, included in the WEKA suite. AUC = Area under the curve.

3.5. Classification Model from miRNA Data

We performed feature selection (see Methods) on miRNA sequencing data from PBMCs obtained from the studied cohort. We selected the 18 most informative miRNAs (hsa-miR-1284, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR-3127-5p, hsa-miR-3149, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-548ah-3p, hsa-miR-551b-5p, hsa-miR-579-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-6786-3p, hsa-miR-6798-3p, hsa-miR-6813-5p, hsa-miR-6850-3p, hsa-miR-6875-5p and hsa-miR-6889-5p) to obtain a predictive classification model for treatment response, using a Sequential Minimal Optimization (SMO)-based classifier. The performance of the classifier is represented with a ROC curve (AUC = 0.914) in Figure 2.

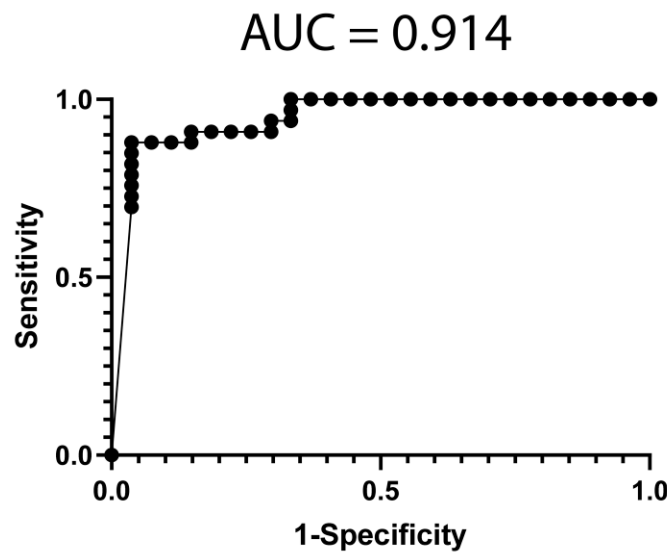


Figure 2. Classification model performance from informative miRNA data. A ROC was constructed with expression data from 18 miRNAs (hsa-miR-1284, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR-3127-5p, hsa-miR-3149, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-548ah-3p, hsa-miR-551b-5p, hsa-miR-579-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-6786-3p, hsa-miR-6798-3p, hsa-miR-6813-5p, hsa-miR-6850-3p, hsa-miR-6875-5p and hsa-miR-6889-5p) from the 59 patients. The classification model was built using a SMO-based classifier, included in the WEKA suite. AUC = Area under the curve.

3.6. Classification Model from Combined mRNA and miRNA Data

In order to obtain an optimal classification model, we combined the most discriminative mRNAs (ENSG00000249572, ENSG00000161298, ENSG00000226479 and ENSG00000198056) with the most discriminative miRNA (hsa-miR-20a-5p) using an adjusted naïve Bayes classifier. The performance of the classifier for treatment response is represented with a ROC curve (AUC = 0.968) in Figure 3, which improved the mRNA model (AUC = 0.950, Figure 1) and the miRNA model (AUC = 0.914, Figure 2).

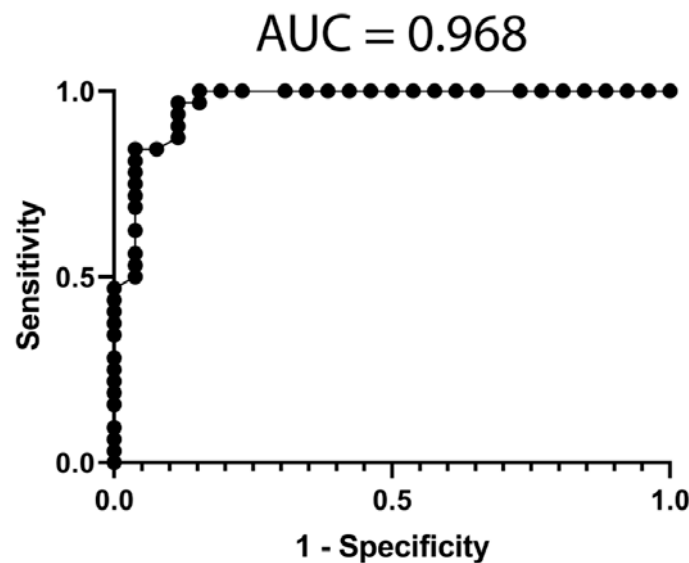


Figure 3. Classification model performance from informative mRNA and miRNA data. A ROC was constructed with expression data from mRNAs (ENSG00000249572, ENSG00000161298, ENSG00000226479 and ENSG00000198056) and 1 miRNAs (hsa-miR-20a-5p) from the 59 patients. The classification model was built using a Naïve Bayes classifier, included in the WEKA suite. AUC = Area under the curve.

4. Discussion

Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial disease comprising many risk factors. The main risk factors commonly associated with AMD are age, family history and cigarette smoke. Other risk factors include body mass index, ethnicity, gender, cardiovascular-related diseases, or dietary habits [42].

Anti-VEGF drugs are effective inhibitors of laser-induced CNV in animal models and they are the first line of therapy for wet AMD in humans [2,43]. There is no universal definition of treatment failure. Some professionals consider that the treatment has failed when fluid persists in the retina while others focus more on vision loss. In addition, treatment protocol, which can be altered by physicians for a variety of reasons, may also affect response. Furthermore, the “treat-and-observe” approach, often applied, may be related to some treatment failures.

In our study, 44% of the patients did not show satisfactory response to ranibizumab treatment after three months, based on our established criteria. This result, although elevated, is comparable with other real-world studies data [26,32,44,45]. When we compared the baseline characteristics of our cohort, based on the response to ranibizumab, we did not find any difference in systemic factors such as age, sex, tobacco consumption, hypertension, etc., or baseline ocular measurements, such as intraocular pressure (IOP), central retinal thickness, macular cube volume, retinal pigment epithelial detachment, presence of fluids or fibrosis (Table 1). This is in agreement with previous studies where they did not find an association of these parameters with response to ranibizumab treatment [46,47], although some reports found an association of smoking history and hypertension with response to ranibizumab in exudative AMD [48].

Interestingly, although RPE atrophy was higher in the group with a poorer response, as it is seen regularly in the clinic [49–51], it did not show discriminatory power between groups (AUC = 0.64, $p = 0.0544$) in the present study.

In the past, we have used RNA-Seq technology successfully to elucidate the involvement of relevant pathways to the response to pharmacological treatment, in a complex ocular disease, through integrative pathway enrichment [33,52]. Other groups have analyzed monocytes using microarray-based transcriptomics, to reveal altered immune-related genes differences between AMD patients and age-matched controls [53].

In our cohort, due to the number of samples included, as well as the intrinsic variability associated with human samples, multiple comparisons correction failed to identify any significant differences in expression of mRNA or miRNA between good or poor responders. However, the exploratory analysis identified relevant genes/pathways that may be associated with the response to ranibizumab and warrant further research. Of note, poor responders showed an increase in angiogenic and pro-inflammatory cytokines mediated by nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling activation, which may be of relevance because systemic inflammatory factors have been associated with AMD pathogenesis [54,55]. However, the role in AMD onset, or ranibizumab response, of the four mRNAs and one miRNA comprising the best classification model remains unclear because the information in the literature is scarce. ENSG00000249572 (lnc-ADAMTS12-6) is a novel transcript affiliated with the long noncoding RNA (lncRNA) class, located in chromosome 5 of the human genome. Although functional characterization is still lacking for most lncRNAs, they have been implicated in several human diseases through diverse mechanisms. Thus, lncRNAs can bind to genomic DNA, regulating local chromatin structure in the nucleus. They can also regulate gene expression post-transcriptionally by interacting with mRNA translation proteins and miRNAs [56]. This transcript has been associated with lncRNA deregulation occurring in PBMCs from Juvenile myelomonocytic leukemia patients carrying a mutation in the NF1 gene [57] suggesting a role in immune regulation. ENSG00000161298 (ZNF382) belongs to the KRAB domain zinc finger transcription factor (KZNF) family which has been shown to regulate differentiation, proliferation and apoptosis processes by interacting with activating protein 1 (AP-1), Fos proto-oncogene (FOS), Jun proto-oncogen (JUN) and NF- κ B signaling [58]. These interactions result in inhibition of these inflammatory pathways

which is in agreement with the notion that poor responders, showing reduced levels of this anti-inflammatory transcription factor, may be displaying a pro-inflammatory profile in PBMCs gene expression. In addition, ZNF382 upregulation reduces the expression of metalloproteinases, such as MMP1 [58], that are dysregulated in AMD [59]. ENSG00000226479 (TMEM185B) is a widely expressed protein coding gene belonging to the TMEM family which gathers proteins of mostly unknown functions. They usually have roles related to proliferation and some of them have been defined as potential prognostic biomarkers for lung cancer [60]. Interestingly, this member has been associated with Bare Lymphocyte Syndrome, type II, an immune system disease categorized as a form of combined immunodeficiency. Lastly, ENSG00000198056 encodes a small subunit of the Primase protein (PRIM1) involved in the replication of the DNA and cellular proliferation. This primase regulates critical processes in the retina since mutations on this primase promote apoptosis of retinal neurons through the activation of p53 and DNA damage checkpoints [61] and its function has been associated with the development of inherited retinal degenerations, such as recessive Retinitis Pigmentosa [62]. The fifth member of the best classification model is a miRNA (hsa-miR-20a-5p) expressed in the retina [63], able to regulate a high number of genes (Supplementary Table S4), including genes related to the regulation of cell proliferation [64], immune system [65] and apoptosis [66,67]. Interestingly, hsa-miR-20a-5p represses endothelial cell migration, in response to VEGF, regulating MKK3 and p38 MAP kinase activation [68,69].

In the present year, a machine-learning method for the classification of patients, at the first visit, requiring high or low treatment demand was presented showing promising results (AUCs ranging 0.76–0.79, 10-fold cross-validated) using morphological features from OCT [70]. Recently, a method to predict, retrospectively, the response to 2-year treatment of ranibizumab in AMD patients was reported [71]. This method relayed in a model-based meta-marker defined by a composite score of 7 baseline characteristics to categorize the response to ranibizumab. These seven characteristics were comprised of: age, central retinal lesion thickness, visual acuity, presence of cysts, type of CNV and PED and leakage sizes. In our cohort, we measured the response after 3 monthly injections, and we were not capable of predicting that response accurately based on any of the seven characteristics reported. The only statistically significant characteristic between Good responders and Poor responders in our cohort was the presence of RPE atrophy, which did not result as discriminatory among groups.

The multifactorial nature of the disease, the recent advances in molecular measurements (RNA-Seq) and computational techniques (machine learning-based) lead us to hypothesize that PBMC global transcriptomic analysis may provide further insights into the response to ranibizumab in AMD patients. In recent years, transcriptomics of peripheral blood mononuclear cells has been also used to capture the variability of the immune system in autoimmune or liver diseases, among others [72–74]. In our study, we obtained moderate results using differential expression-based methods (AUC = 0.886 with a 25-member signature for mRNA data and AUC = 0.826 with a 25-member signature for miRNA data). These results were somehow expected due to the high variability usually obtained when working with human samples [75]. For that reason, we decided to perform feature selection with entropy reduction-based which resulted in better models (AUC > 0.9 for mRNA and miRNA data) using fewer features, especially when we combined mRNA and miRNA data.

We acknowledge, however, that our study has some limitations. First, we analyzed the response of the patients after three months of treatment. Our reasoning was that, although ranibizumab may be effective after longer periods, it is often after these three months that the physicians decide whether to continue or modify the treatment or the regimen. Second, a similar study with a larger cohort in terms of the number of patients would be beneficial to validate the results. In order to reduce the possibility of overfitting, we performed 10-fold cross-validation to our feature selection and model construction. In addition, even though the cohort size is large enough to reach significant conclusions with the machine learning techniques we used, we believe that these results would need to be replicated in

other cohorts in the future. Given the disparity of regimens found in the literature [76,77], it is difficult to find comparable studies with available sequencing data. For these reasons, we plan to replicate a similar study in the future to include data, not only from mRNA and miRNA but also from DNA methylome, from a new study we are currently conducting.

In summary, here we describe a signature comprised of four mRNAs and one miRNA in PBMCs from AMD patients that allowed us to predict, retrospectively, a successful response to ranibizumab before the start of the treatment, with good accuracy. Furthermore, we consider that machine learning classifiers based on mRNA and miRNA from PBMCs, especially in combination with other methods, such as specific baseline characteristics, may improve the prediction of patients with insufficient response to ranibizumab and help establish patient-specific treatment plans at the first visit.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jpm11121329/s1>, Figure S1: NF- κ B/cytokine signaling pathway members regulated by TOP25 differentially expressed mRNAs: TOP25 miRNAs (from Table 2) were analyzed for exploratory KEGG pathway enrichment. Green: Genes downregulated in good responders vs poor responders. Red: Genes upregulated in good responders vs poor responders. Figure S2: Endocytosis regulation by TOP25 differentially expressed miRNAs: TOP25 miRNAs (from Table 3) were analyzed with DIANA-miRPath v3.0 for exploratory KEGG pathway enrichment. Yellow: Genes regulated by 1 miRNA. Orange: Genes regulated by 2 or more miRNAs. Figure S3: Gap junction members regulated by TOP25 differentially expressed miRNAs: TOP25 miRNAs (from Table 3) were analyzed with DIANA-miRPath v3.0 for exploratory KEGG pathway enrichment. Yellow: Genes regulated by 1 miRNA. Orange: Genes regulated by 2 or more miRNAs. Figure S4: Hippo signaling pathway members regulated by TOP25 differentially expressed miRNAs: TOP25 miRNAs (from Table 3) were analyzed with DIANA-miRPath v3.0 for exploratory KEGG pathway enrichment. Yellow: Genes regulated by 1 miRNA. Orange: Genes regulated by 2 or more miRNAs. Figure S5: Thyroid hormone signaling pathway members regulated by TOP25 differentially expressed miRNAs: TOP25 miRNAs (from Table 3) were analyzed with DIANA-miRPath v3.0 for exploratory KEGG pathway enrichment. Yellow: Genes regulated by 1 miRNA. Orange: Genes regulated by 2 or more miRNAs. Figure S6: Pathways-in-Cancer KEGG members regulated by TOP25 differentially expressed miRNAs: TOP25 miRNAs (from Table 3) were analyzed with DIANA-miRPath v3.0 for exploratory KEGG pathway enrichment. Yellow: Genes regulated by 1 miRNA. Orange: Genes regulated by 2 or more miRNAs., Table S1: Altered KEGG pathways by TOP25 mRNAs. TOP25 mRNAs differentially expressed were subjected to exploratory analysis. Table S2: Altered KEGG pathways by TOP25 miRNAs. TOP25 miRNAs differentially expressed were subjected to exploratory analysis. Table S3: List of putative genes regulated by hsa-miR-20a-5p according to TargetScan v7.2 database.

Author Contributions: Conceptualization was designed by I.M.L.; methodology, A.I.O., Á.P.-S. and I.M.L.; software, Á.P.-S.; validation, A.I.O., A.P., R.O., S.V. and R.P.; formal analysis, A.I.O., Á.P.-S., S.V., R.P. and I.M.L.; investigation, A.I.O., Á.P.-S., A.P., R.O., S.V., R.P. and I.M.L.; resources, I.M.L.; data curation, A.I.O., Á.P.-S., A.P., R.O. and R.P.; writing—original draft preparation, I.M.L.; writing—review and editing, A.I.O., Á.P.-S., A.P., R.O., S.V. and R.P., I.M.L.; supervision, S.V. and I.M.L.; funding acquisition, I.M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by a grant (PI19/01805) from the Instituto de Salud Carlos III, co-funded by European Regional Development Fund (ERDF) “A way to build Europe” and by Fundación Rioja Salud. I.M.L. is supported by a Miguel Servet contract (CPII20/00029) from the Instituto de Salud Carlos III, co-funded by European Social fund (ESF) “Investing in your future”.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Fundación Rioja Salud (CEICLAR, protocol code PI-130, approved 30 July 2013).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Curcio, C.A. Soft Drusen in Age-Related Macular Degeneration: Biology and Targeting Via the Oil Spill Strategies. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, AMD160–AMD181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fleckenstein, M.; Keenan, T.D.L.; Guymer, R.H.; Chakravarthy, U.; Schmitz-Valckenberg, S.; Klaver, C.C.; Wong, W.T.; Chew, E.Y. Age-related macular degeneration. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2021**, *7*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nguyen, C.L.; Oh, L.J.; Wong, E.; Wei, J.; Chilov, M. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration: A meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Ophthalmol.* **2018**, *18*, 130. [[CrossRef](#)]
4. Ziemssen, F.; Eter, N.; Fauser, S.; Bopp, S.; Radermacher, M.; Hasanbasic, Z.; Holz, F.G. Retrospective investigation of anti-VEGF treatment reality and effectiveness in patients with neovascular age-related macular degeneration (AMD) in Germany: Treatment reality of ranibizumab for neovascular AMD in Germany. *Ophthalmologe* **2015**, *112*, 246–254. [[CrossRef](#)]
5. Indaram, M.; Ma, W.; Zhao, L.; Fariss, R.N.; Rodriguez, I.R.; Wong, W.T. 7-Ketocholesterol increases retinal microglial migration, activation, and angiogenicity: A potential pathogenic mechanism underlying age-related macular degeneration. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lederman, M.; Weiss, A.; Chowers, I. Association of neovascular age-related macular degeneration with specific gene expression patterns in peripheral white blood cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 53–58. [[CrossRef](#)]
7. Fritsche, L.G.; Lauer, N.; Hartmann, A.; Stippa, S.; Keilhauer, C.N.; Oppermann, M.; Pandey, M.K.; Kohl, J.; Zipfel, P.F.; Weber, B.H.; et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 4694–4704. [[CrossRef](#)]
8. Martinez-Barricarte, R.; Recalde, S.; Fernandez-Robredo, P.; Millan, I.; Olavarrieta, L.; Vinuela, A.; Perez-Perez, J.; Garcia-Layana, A.; Rodriguez de Cordoba, S. Relevance of complement factor H-related 1 (CFHR1) genotypes in age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 1087–1094. [[CrossRef](#)]
9. Jabbarpoor Bonyadi, M.H.; Yaseri, M.; Soheilian, M. Association of combined complement factor H Y402H and ARMS2/LOC387715 A69S polymorphisms with age-related macular degeneration: An updated meta-analysis. *Ophthalmic Genet.* **2020**, *41*, 301–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Romero-Vazquez, S.; Llorens, V.; Soler-Boronat, A.; Figueras-Roca, M.; Adan, A.; Molins, B. Interlink between Inflammation and Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Role of Complement Factor H. *Biomedicines* **2021**, *9*, 763. [[CrossRef](#)]
11. Anand, A.; Sharma, N.K.; Gupta, A.; Prabhakar, S.; Sharma, S.K.; Singh, R.; Gupta, P.K. Single nucleotide polymorphisms in MCP-1 and its receptor are associated with the risk of age related macular degeneration. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ma, B.; Dang, G.; Yang, S.; Duan, L.; Zhang, Y. CX3CR1 polymorphisms and the risk of age-related macular degeneration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 9592–9596. [[PubMed](#)]
13. Yu, Y.; Bhangale, T.R.; Fagerness, J.; Ripke, S.; Thorleifsson, G.; Tan, P.L.; Souied, E.H.; Richardson, A.J.; Merriam, J.E.; Buitendijk, G.H.; et al. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 3699–3709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Huang, C.; Xu, Y.; Li, X.; Wang, W. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms and age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 1211–1221. [[PubMed](#)]
15. Ma, L.; Tang, F.Y.; Chu, W.K.; Young, A.L.; Brelén, M.E.; Pang, C.P.; Chen, L.J. Association of toll-like receptor 3 polymorphism rs3775291 with age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19718. [[CrossRef](#)]
16. Rutar, M.; Provis, J.M. Role of Chemokines in Shaping Macrophage Activity in AMD. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *854*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Xue, C.C.; Cui, J.; Gao, L.Q.; Zhang, C.; Dou, H.L.; Chen, D.N.; Wang, Y.X.; Jonas, J.B. Peripheral Monocyte Count and Age-Related Macular Degeneration. The Tongren Health Care Study. *Am. J. Ophthalmol.* **2021**, *227*, 143–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cinici, E.; Caglar, O.; Arslan, M.E.; Dilekmen, N.; Utlu, B.; Mardinoglu, A.; Turkez, H. Targeted Gene Candidates for Treatment and Early Diagnosis of Age-Related Macular Degeneration. *Biomed. Res. Int.* **2021**, *2021*, 6620900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Daftarian, N.; Zandi, S.; Piryae, G.; Nikougoftar Zarif, M.; Ranaei Pirmardan, E.; Yamaguchi, M.; Behzadian Nejad, Q.; Hasanpour, H.; Samiei, S.; Pfister, I.B.; et al. Peripheral blood CD163(+) monocytes and soluble CD163 in dry and neovascular age-related macular degeneration. *FASEB J.* **2020**, *34*, 8001–8011. [[CrossRef](#)]
20. Behnke, V.; Wolf, A.; Langmann, T. The role of lymphocytes and phagocytes in age-related macular degeneration (AMD). *Cell Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 781–788. [[CrossRef](#)]
21. Blasiak, J.; Watala, C.; Tuuminen, R.; Kivinen, N.; Koskela, A.; Uusitalo-Jarvinen, H.; Tuulonen, A.; Winiarczyk, M.; Mackiewicz, J.; Zmorzynski, S.; et al. Expression of VEGFA-regulating miRNAs and mortality in wet AMD. *J. Cell Mol. Med.* **2019**, *23*, 8464–8471. [[CrossRef](#)]
22. Cascella, R.; Strafella, C.; Longo, G.; Ragazzo, M.; Manzo, L.; De Felici, C.; Errichiello, V.; Caputo, V.; Viola, F.; Eandi, C.M.; et al. Uncovering genetic and non-genetic biomarkers specific for exudative age-related macular degeneration: Significant association of twelve variants. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7812–7821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cascella, R.; Strafella, C.; Caputo, V.; Errichiello, V.; Zampatti, S.; Milano, F.; Potenza, S.; Mauriello, S.; Novelli, G.; Ricci, F.; et al. Towards the application of precision medicine in Age-Related Macular Degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **2018**, *63*, 132–146. [[CrossRef](#)]

24. Grassmann, F.; Schoenberger, P.G.; Brandl, C.; Schick, T.; Hasler, D.; Meister, G.; Fleckenstein, M.; Lindner, M.; Helbig, H.; Fauser, S.; et al. A circulating microRNA profile is associated with late-stage neovascular age-related macular degeneration. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Menard, C.; Rezende, F.A.; Miloudi, K.; Wilson, A.; Tetreault, N.; Hardy, P.; SanGiovanni, J.P.; De Guire, V.; Sapienza, P. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. *Oncotarget* **2016**, *7*, 19171–19184. [[CrossRef](#)]
26. Wang, V.M.; Rosen, R.B.; Meyerle, C.B.; Kurup, S.K.; Ardeljan, D.; Agron, E.; Tai, K.; Pomykala, M.; Chew, E.Y.; Chan, C.C.; et al. Suggestive association between PLA2G12A single nucleotide polymorphism rs2285714 and response to anti-vascular endothelial growth factor therapy in patients with exudative age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* **2012**, *18*, 2578–2585.
27. Hagstrom, S.A.; Ying, G.S.; Pauer, G.J.T.; Sturgill-Short, G.M.; Huang, J.; Callanan, D.G.; Kim, I.K.; Klein, M.L.; Maguire, M.G.; Martin, D.F. Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology* **2013**, *120*, 593–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chang, W.; Noh, D.H.; Sagong, M.; Kim, I.T. Pharmacogenetic association with early response to intravitreal ranibizumab for age-related macular degeneration in a Korean population. *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 702–709.
29. Akiyama, M.; Takahashi, A.; Momozawa, Y.; Arakawa, S.; Miya, F.; Tsunoda, T.; Ashikawa, K.; Oshima, Y.; Yasuda, M.; Yoshida, S.; et al. Genome-wide association study suggests four variants influencing outcomes with ranibizumab therapy in exudative age-related macular degeneration. *J. Hum. Genet.* **2018**, *63*, 1083–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lores-Motta, L.; de Jong, E.K.; den Hollander, A.I. Exploring the Use of Molecular Biomarkers for Precision Medicine in Age-Related Macular Degeneration. *Mol. Diagn. Ther.* **2018**, *22*, 315–343. [[CrossRef](#)]
31. Amoaku, W.M.; Chakravarthy, U.; Gale, R.; Gavin, M.; Ghanchi, F.; Gibson, J.; Harding, S.; Johnston, R.L.; Kelly, S.P.; Lotery, A.; et al. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. *Eye* **2015**, *29*, 721–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhang, X.; Lai, T.Y.Y. Baseline Predictors of Visual Acuity Outcome in Patients with Wet Age-Related Macular Degeneration. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 9640131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Larrayoz, I.M.; de Luis, A.; Rua, O.; Velilla, S.; Cabello, J.; Martinez, A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39359. [[CrossRef](#)]
34. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)]
35. Pariente, A.; Perez-Sala, A.; Ochoa, R.; Pelaez, R.; Larrayoz, I.M. Genome-Wide Transcriptomic Analysis Identifies Pathways Regulated by Sterculic Acid in Retinal Pigmented Epithelium Cells. *Cells* **2020**, *9*, 1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Larrayoz, I.M.; Rua, O.; Velilla, S.; Martinez, A. Transcriptomic profiling explains racial disparities in pterygium patients treated with doxycycline. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 7553–7561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D199–D205. [[CrossRef](#)]
38. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27–30. [[CrossRef](#)]
39. Friedlander, M.R.; Mackowiak, S.D.; Li, N.; Chen, W.; Rajewsky, N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 37–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Vlachos, I.S.; Zagganas, K.; Paraskevopoulou, M.D.; Georgakilas, G.; Karagkouni, D.; Vergoulis, T.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A.G. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W460–W466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Frank, E.; Hall, M.; Trigg, L.; Holmes, G.; Witten, I.H. Data mining in bioinformatics using Weka. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 2479–2481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bowes Rickman, C.; Farsiu, S.; Toth, C.A.; Klingeborn, M. Dry age-related macular degeneration: Mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, ORSF68–ORSF80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Schmidt-Erfurth, U.; Chong, V.; Loewenstein, A.; Larsen, M.; Souied, E.; Schlingemann, R.; Eldem, B.; Mones, J.; Richard, G.; Bandello, F. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Br. J. Ophthalmol.* **2014**, *98*, 1144–1167. [[CrossRef](#)]
44. Dille, J.; Taylor, S. The response to ranibizumab therapy after three injections predicts 12-month outcomes in DME in the absence of rescue laser therapy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 2116.
45. Lux, A.; Llacer, H.; Heussen, F.M.; Jousseaume, A.M. Non-responders to bevacizumab (Avastin) therapy of choroidal neovascular lesions. *Br. J. Ophthalmol.* **2007**, *91*, 1318–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Singh, R.P.; Habbu, K.; Ehlers, J.P.; Lansang, M.C.; Hill, L.; Stoilov, I. The Impact of Systemic Factors on Clinical Response to Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 1581–1587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhao, L.; Grob, S.; Avery, R.; Kimura, A.; Pieramici, D.; Lee, J.; Rabena, M.; Ortiz, S.; Quach, J.; Cao, G.; et al. Common variant in VEGFA and response to anti-VEGF therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Curr. Mol. Med.* **2013**, *13*, 929–934. [[CrossRef](#)]
48. Piermarocchi, S.; Miotto, S.; Colavito, D.; Leon, A.; Segato, T. Combined effects of genetic and non-genetic risk factors affect response to ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* **2015**, *93*, e451–e457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Ying, G.S.; Huang, J.; Maguire, M.G.; Jaffe, G.J.; Grunwald, J.E.; Toth, C.; Daniel, E.; Klein, M.; Pieramici, D.; Wells, J.; et al. Baseline predictors for one-year visual outcomes with ranibizumab or bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2013**, *120*, 122–129. [[CrossRef](#)]
50. Ying, G.S.; Maguire, M.G. Analyses Comparing Visual Acuity Between Ranibizumab and Bevacizumab in the Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *JAMA Ophthalmol.* **2015**, *133*, 726. [[CrossRef](#)]
51. Jaffe, G.J.; Ying, G.S.; Toth, C.A.; Daniel, E.; Grunwald, J.E.; Martin, D.F.; Maguire, M.G. Macular Morphology and Visual Acuity in Year Five of the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 252–260. [[CrossRef](#)]
52. Rua, O.; Larrayoz, I.M.; Barajas, M.T.; Velilla, S.; Martinez, A. Oral doxycycline reduces pterygium lesions; results from a double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52696. [[CrossRef](#)]
53. Grunin, M.; Hagbi-Levi, S.; Rinsky, B.; Smith, Y.; Chowers, I. Transcriptome Analysis on Monocytes from Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Litwinska, Z.; Sobus, A.; Luczkowska, K.; Grabowicz, A.; Mozolewska-Piotrowska, K.; Safranow, K.; Kawa, M.P.; Machalinski, B.; Machalinska, A. The Interplay Between Systemic Inflammatory Factors and MicroRNAs in Age-Related Macular Degeneration. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 286. [[CrossRef](#)]
55. Ulanczyk, Z.; Sobus, A.; Luczkowska, K.; Grabowicz, A.; Mozolewska-Piotrowska, K.; Safranow, K.; Kawa, M.P.; Palucha, A.; Krawczyk, M.; Sikora, P.; et al. Associations of microRNAs, Angiogenesis-Regulating Factors and CFH Y402H Polymorphism-An Attempt to Search for Systemic Biomarkers in Age-Related Macular Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5750. [[CrossRef](#)]
56. McDonel, P.; Guttman, M. Approaches for Understanding the Mechanisms of Long Noncoding RNA Regulation of Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2019**, *11*, a032151. [[CrossRef](#)]
57. Hofmans, M.; Lammens, T.; Depreter, B.; Wu, Y.; Erlacher, M.; Caye, A.; Cave, H.; Flotho, C.; de Haas, V.; Niemeyer, C.M.; et al. Long non-coding RNAs as novel therapeutic targets in juvenile myelomonocytic leukemia. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Chen, S.; Xiao, Z.; Zhou, J.; Yang, M.; Feng, S.; Huang, Q.; Zou, J.; Zeng, T.; Li, Y.; Peng, L.; et al. ZNF382: A transcription inhibitor down-regulated in multiple tumors due to promoter methylation. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *500*, 220–225. [[CrossRef](#)]
59. Mansoor, N.; Wahid, F.; Azam, M.; Shah, K.; den Hollander, A.I.; Qamar, R.; Ayub, H. Molecular Mechanisms of Complement System Proteins and Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Curr. Mol. Med.* **2019**, *19*, 705–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Schmit, K.; Michiels, C. TMEM Proteins in Cancer: A Review. *Front. Pharm.* **2018**, *9*, 1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Yamaguchi, M.; Fujimori-Tonou, N.; Yoshimura, Y.; Kishi, T.; Okamoto, H.; Masai, I. Mutation of DNA primase causes extensive apoptosis of retinal neurons through the activation of DNA damage checkpoint and tumor suppressor p53. *Development* **2008**, *135*, 1247–1257. [[CrossRef](#)]
62. Farrar, G.J.; Carrigan, M.; Dockery, A.; Millington-Ward, S.; Palfi, A.; Chadderton, N.; Humphries, M.; Kiang, A.S.; Kenna, P.F.; Humphries, P. Toward an elucidation of the molecular genetics of inherited retinal degenerations. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, R2–R11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Wang, Y.; Wang, X.; Jiang, Y.; Liu, R.; Cao, D.; Pan, J.; Luo, Y. Identification of key miRNAs and genes for mouse retinal development using a linear model. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *22*, 494–506. [[CrossRef](#)]
64. Greenberg, E.; Hajdu, S.; Nemlich, Y.; Cohen, R.; Itzhaki, O.; Jacob-Hirsch, J.; Besser, M.J.; Schachter, J.; Markel, G. Differential regulation of aggressive features in melanoma cells by members of the miR-17-92 complex. *Open Biol.* **2014**, *4*, 140030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Skalsky, R.L.; Corcoran, D.L.; Gottwein, E.; Frank, C.L.; Kang, D.; Hafner, M.; Nusbaum, J.D.; Feederle, R.; Delecluse, H.J.; Luftig, M.A.; et al. The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002484. [[CrossRef](#)]
66. Wang, M.; Gu, H.; Qian, H.; Zhu, W.; Zhao, C.; Zhang, X.; Tao, Y.; Zhang, L.; Xu, W. miR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation. *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 2010–2021. [[CrossRef](#)]
67. Yang, Y.; Mei, Q. miRNA signature identification of retinoblastoma and the correlations between differentially expressed miRNAs during retinoblastoma progression. *Mol. Vis.* **2015**, *21*, 1307–1317.
68. Pin, A.L.; Houle, F.; Guillonneau, M.; Paquet, E.R.; Simard, M.J.; Huot, J. miR-20a represses endothelial cell migration by targeting MKK3 and inhibiting p38 MAP kinase activation in response to VEGF. *Angiogenesis* **2012**, *15*, 593–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Guo, Y.; Du, F.; Tan, Y.L.; Luo, J.; Xiong, D.; Song, W.T. VEGF-mediated angiogenesis in retinopathy of prematurity is co-regulated by miR-17-5p and miR-20a-5p. *Biochem. Cell Biol.* **2021**, *99*, 414–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Gallardo, M.; Munk, M.R.; Kurmann, T.; De Zanet, S.; Mosinska, A.; Karagoz, I.K.; Zinkernagel, M.S.; Wolf, S.; Sznitman, R. Machine Learning Can Predict Anti-VEGF Treatment Demand in a Treat-and-Extend Regimen for Patients with Neovascular AMD, DME, and RVO Associated Macular Edema. *Ophthalmol. Retin.* **2021**, *5*, 604–624. [[CrossRef](#)]
71. Diack, C.; Schwab, D.; Cosson, V.; Buchheit, V.; Mazer, N.; Frey, N. A Baseline Score to Predict Response to Ranibizumab Treatment in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **2021**, *10*, 11. [[CrossRef](#)]
72. Sharma, S.; Baweja, S.; Maras, J.S.; Shasthry, S.M.; Moreau, R.; Sarin, S.K. Differential blood transcriptome modules predict response to corticosteroid therapy in alcoholic hepatitis. *JHEP Rep.* **2021**, *3*, 100283. [[CrossRef](#)]

73. Gadd, V.L.; Patel, P.J.; Jose, S.; Horsfall, L.; Powell, E.E.; Irvine, K.M. Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease: Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Li, S.; Roupael, N.; Duraisingham, S.; Romero-Steiner, S.; Presnell, S.; Davis, C.; Schmidt, D.S.; Johnson, S.E.; Milton, A.; Rajam, G.; et al. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 195–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Li, Y.; Oosting, M.; Deelen, P.; Ricano-Ponce, I.; Smeekens, S.; Jaeger, M.; Matzaraki, V.; Swertz, M.A.; Xavier, R.J.; Franke, L.; et al. Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses to bacteria and fungi. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 952–960. [[CrossRef](#)]
76. Amoaku, W.; Balaskas, K.; Cudrnak, T.; Downey, L.; Groppe, M.; Mahmood, S.; Mehta, H.; Mohamed, Q.; Mushtaq, B.; Severn, P.; et al. Initiation and maintenance of a Treat-and-Extend regimen for ranibizumab therapy in wet age-related macular degeneration: Recommendations from the UK Retinal Outcomes Group. *Clin. Ophthalmol.* **2018**, *12*, 1731–1740. [[CrossRef](#)]
77. Khanna, S.; Komati, R.; Eichenbaum, D.A.; Hariprasad, I.; Ciulla, T.A.; Hariprasad, S.M. Current and upcoming anti-VEGF therapies and dosing strategies for the treatment of neovascular AMD: A comparative review. *BMJ Open Ophthalmol.* **2019**, *4*, e000398. [[CrossRef](#)]