

FRANCISCO AGUSTÍN ESCUDERO DOMÍNGUEZ

**ESTUDIO GENÉTICO DEL SÍNDROME  
PSEUDOEXFOLIATIVO**



EDICIONES UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**COLECCIÓN VÍTOR**

431

©

Ediciones Universidad de Salamanca  
y Francisco Agustín Escudero Domínguez

1.<sup>a</sup> edición: mayo, 2018  
I.S.B.N.: 978-84-9012-877-0  
Depósito legal: S 136-2018

Ediciones Universidad de Salamanca  
Apartado postal 325  
E-37080 Salamanca (España)

Realizado por:  
Cícero, S. L.  
Tel. 923 12 32 26  
37007 Salamanca (España)

Impreso en España-Printed in Spain

*Todos los derechos reservados.  
Ni la totalidad ni parte de este libro  
puede reproducirse ni transmitirse  
sin permiso escrito de  
Ediciones Universidad de Salamanca*

## RESUMEN

El síndrome pseudoexfoliativo es un trastorno sistémico generalizado de la matriz extracelular, con una especial repercusión patológica a nivel oftalmológico. A pesar de que múltiples líneas de evidencia apoyan la teoría de una predisposición genética a padecer la enfermedad, hasta el momento no se ha podido describir un patrón de herencia concreto. En el presente trabajo se analiza la posible intervención de varias variantes genéticas (polimorfismos de un solo nucleótido) localizadas en el gen LOXL1 y en varios genes reguladores de la autofagia en la patogénesis de la enfermedad en una población de origen español.

**PALABRAS CLAVE:** oftalmología, genética, síndrome pseudoexfoliativo, pseudoexfoliación, glaucoma pseudoexfoliativo, lisil-oxidasa-like 1 (LOXL1), autofagia, polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

## **ABSTRACT**

Pseudoexfoliation syndrome is a systemic disorder of the extracellular matrix, with a specific ophthalmic impact. To the best of our knowledge, although many lines of evidence support a genetic predisposition, a specific pattern of inheritance has not been described yet. The objective of this study is to analyze the possible intervention of several genetic variants (single nucleotide polymorphism) located in the LOXL1 gene and some autophagy-related genes in the pathogenesis of the disease in a sample of Spanish population.

**KEYWORDS:** ophthalmology, genetic, pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation, pseudoexfoliation glaucoma, lisil-oxidasa-like 1 (LOXL1), autophagy, single nucleotide polymorphism.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<hr/>	
<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1.1.- IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA PSEUDOEXFOLIACIÓN	11
1.2.- RESEÑA HISTÓRICA	12
1.3.- TERMINOLOGÍA	15
<b>2.- EPIDEMIOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
2.1.- FRECUENCIA EN LA POBLACIÓN GENERAL	18
2.1.1.- Influencia de la Edad	20
2.1.2.- Influencia del Sexo	21
2.2.- FRECUENCIA EN LA POBLACIÓN GLAUCOMATOSA	21
<b>3.- CLÍNICA.....</b>	<b>22</b>
3.1.- CRISTALINO	22
3.2.- IRIS	24
3.3.- PUPILA	26
3.4.- CÓRNEA	27
3.5.- ZÓNULA Y CUERPO CILIAR	28
3.6.- ÁNGULO IRIDOCORNEAL	30
3.7.- CUERPO VÍTREO	32
3.8.- NERVIO ÓPTICO	33
3.9.- SUPERFICIE OCULAR Y TEJIDOS ORBITARIOS	33
3.10.- ASIMETRÍA DE LA AFECTACIÓN	35
<b>4.- GLAUCOMA PSEUDOEXFOLIATIVO.....</b>	<b>37</b>
4.1.- GLAUCOMA SECUNDARIO DE ÁNGULO ABIERTO	37
4.2.- GLAUCOMA DE ÁNGULO CERRADO	40

<b>5.- PATOLOGÍA ASOCIADA.....</b>	<b>43</b>
5.1.- CATARATA	43
5.2.- SINEQUIAS IRIDIANAS POSTERIORES	44
5.3.- DISFUNCIÓN DE LA BARRERA HEMATO-ACUOSA	44
5.4.- ISQUEMIA	45
<b>6.- EL SÍNDROME DE PSEUDOEXFOLIACIÓN COMO ENFERMEDAD SISTÉMICA.....</b>	<b>46</b>
6.1.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL	46
6.2.- ENFERMEDAD CORONARIA ISQUÉMICA	47
6.3.- ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL	48
6.4.- DIABETES MELLITUS	49
<b>7.- MATERIAL PSEUDOEXFOLIATIVO.....</b>	<b>50</b>
7.1.- ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN	50
7.1.1.- Componente Glicídico	52
7.1.2.- Componente Proteico	52
7.2.- PRODUCCIÓN	53
7.3.- FISIOPATOLOGÍA	55
7.3.1.- Factores Fisiopatológicos	55
7.3.2.- Teoría Fisiopatológica	57
<b>8.- PATOGENÉTICA.....</b>	<b>59</b>
8.1.- LOXL1	60
<b>9.- AUTOFAGIA.....</b>	<b>65</b>
9.1.- EL PROCESO DE AUTOFAGIA	67
9.2.- FUNCIONES DE LA AUTOFAGIA	73
9.3.- AUTOFAGIA Y ENFERMEDAD PSEUDOEXFOLIATIVA	75
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>77</b>

---

<b>PACIENTES Y MÉTODOS</b>	<b>81</b>
<hr/>	
<b>1.- PACIENTES</b> .....	<b>83</b>
<b>2.- CONTROLES</b> .....	<b>85</b>
<b>3.- DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	<b>86</b>
<b>4.- MÉTODOS</b> .....	<b>87</b>
4.1.- AISLAMIENTO DEL DNA DE ALTO PESO MOLECULAR	<b>87</b>
4.1.1.- Obtención de muestras de sangre periférica	<b>87</b>
4.1.2.- Obtención de células mononucleadas de sangre periférica	<b>87</b>
4.1.3.- Aislamiento del DNA total de alto peso molecular	<b>87</b>
4.1.4.- Purificación del DNA	<b>88</b>
4.1.5.- Cuantificación del DNA	<b>88</b>
4.2.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	<b>89</b>
4.3.- DISCRIMINACIÓN ALÉLICA DE POLIMORFISMOS	<b>90</b>
4.3.1.- Discriminación alélica mediante digestión con endonucleasas de restricción	<b>90</b>
4.3.2.- Discriminación alélica mediante PCR con sondas taqman	<b>93</b>
<b>5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>105</b>
<b>6.- ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES</b> .....	<b>106</b>
 <b>RESULTADOS</b>	 <b>107</b>
<hr/>	
<b>1.- DATOS DEMOGRÁFICOS</b> .....	<b>109</b>
1.1.- PACIENTES	<b>109</b>

1.2.- EDAD Y SEXO	109
1.3.- ENFERMEDADES SISTÉMICAS Y HÁBITOS TÓXICOS	110
<b>2.- ESTUDIO GENÉTICO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA PSEUDOEXFOLIACIÓN.....</b>	<b>113</b>
2.1.- ESTUDIO DEL GEN LOXL1	113
2.2.- ESTUDIO DE LOS GENES DE AUTOFAGIA	124
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>135</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>153</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>157</b>
<hr/>	
<b>ANEXOS</b>	<b>181</b>
<hr/>	
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>187</b>
<hr/>	
<b>DIFUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>193</b>
<hr/>	

# Introducción

---





## 1.- INTRODUCCIÓN

---

### 1.1.- IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA PSEUDOEXFOLIACIÓN

---

El síndrome de pseudoexfoliación (SPEX) es una enfermedad relacionada con la edad caracterizada por la producción y acumulación progresiva de un material fibrilar extracelular a nivel de distintas estructuras del globo ocular con repercusiones significativas sobre la salud oftalmológica de los pacientes.

Esta síntesis y acúmulo de material pseudoexfoliativo induce una serie de cambios degenerativos a nivel ocular que precipitan el incremento de la presión intraocular (PIO), determinando la aparición de una entidad nosológica independiente que recibe el nombre de glaucoma pseudoexfoliativo (GPEX).

A pesar de que el SPEX pueda ser percibido por cierta parte de la comunidad oftalmológica como un problema menor restringido a áreas geográficas concretas (en Europa, la Península Escandinava; en España, ciertas zonas de Galicia), en los últimos años este síndrome ha sido reconocido como la primera causa identificable de glaucoma de ángulo abierto (GAA) [1, 2] y, en algunas de las áreas antes mencionadas, como la primera causa de glaucoma [3].

El diagnóstico de esta enfermedad requiere una exploración oftalmológica detallada con dilatación pupilar suficiente, por lo que en muchas ocasiones pasa desapercibida. Además, una vez establecido el diagnóstico, el GPEX presenta un peor pronóstico que otros GAA, con mayores variaciones diurnas de la PIO, mayor daño del nervio óptico, mayor pérdida de campo visual y, por tanto, una progresión más rápida e insidiosa [2].

De manera adicional, múltiples estudios de microscopía electrónica han permitido la identificación de acúmulos de fibrillas de pseudoexfoliación a nivel de tejidos orbitarios [4, 5], piel [6, 7] y órganos viscerales [8, 9] principalmente, poniendo de manifiesto que el SPEX no es únicamente un trastorno oftalmológico, sino un desorden generalizado de la matriz extracelular.

El conocimiento de la importancia del SPEX ha aumentado considerablemente en los últimos años. No sólo es causa de un tipo de GAA de pronóstico en muchas ocasiones incierto, sino que también puede inducir otros procesos patológicos oftalmológicos asociados, como la subluxación del cristalino, el glaucoma de ángulo cerrado, la disfunción de la barrera hemato-acuosa y graves complicaciones en la cirugía de la catarata, tales como la diálisis de la zónula, la rotura capsular posterior o la luxación vítrea del cristalino [10-12]. También parece que puede estar implicado en la etiología de la formación de la catarata y juega cierto papel en la obstrucción de la vena central de la retina [11-13]. Otros estudios lo relacionan incluso con los accidentes isquémicos transitorios, la enfermedad coronaria isquémica y el aneurisma de aorta abdominal [10, 11, 14-17].

A pesar de su prevalencia e importancia clínica, la etiopatogenia de la enfermedad no se conoce con exactitud. Un avance en el estudio de las causas de la enfermedad permitiría una mejor comprensión de la misma, así como la posibilidad de diseñar estrategias terapéuticas individualizadas que posibilitaran mejorar su pronóstico.

## 1.2.- RESEÑA HISTÓRICA

---

El primer oftalmólogo en estudiar el fenómeno de la pseudoexfoliación fue el finlandés John Lindberg (figura 1) [18]. A partir de 1914 e interesado por las publicaciones de Theodor Axenfeld sobre distintos tipo de degeneración iridiana senil [19, 20], Lindberg quiso, como parte de su proyecto de



investigación durante su especialización en Oftalmología, ampliar el conocimiento que sobre estos cambios atróficos propios del iris se tenía. Para ello y siguiendo la monografía sobre biomicroscopios del sueco Allvar Gullstrand [21], quien había recibido el Premio Nobel de Medicina en 1911 por sus trabajos en el campo de la fisiología óptica del globo ocular, diseñó su propia lámpara de hendidura.

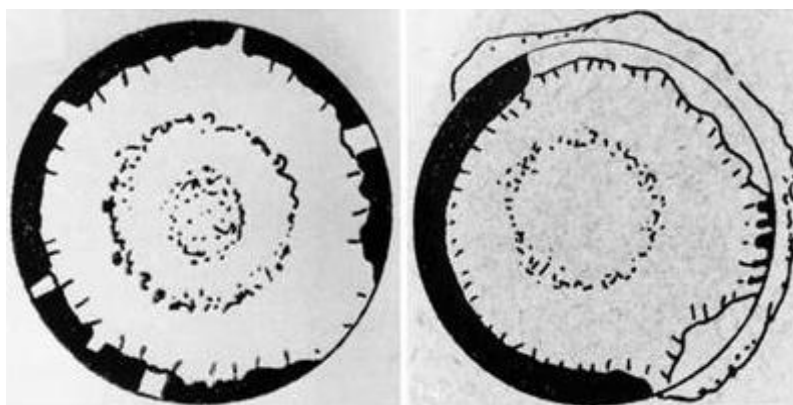
Estudió 202 pacientes de los cuales, tras una minuciosa exploración oftalmológica, realizó distintos dibujos en los que recogía sus hallazgos (figura 2). Mientras trabajaba en su proyecto le llamó poderosamente la atención la presencia de unos *copos* o *flecos* de color gris-azulado en el reborde pupilar de algunos de los pacientes.

Observó de igual manera que estas estructuras microscópicas podían formar una membrana o disco sobre la cápsula anterior del cristalino. Su interés se incrementó al comprobar que no existía ninguna publicación en la literatura médica de aquel momento que describiese el fenómeno.

De sus observaciones Lindberg infirió que estos cambios tenían relación con el envejecimiento, ya que su prevalencia aumentaba con la edad de los pacientes y era muy improbable encontrarlos en menores de 55 años. Estableció también su asociación con la escasa dilatación pupilar con midriáticos



**Figura 1:** John G. Lindberg. Tomado de *Tarkkanen et al. 2002* [18].

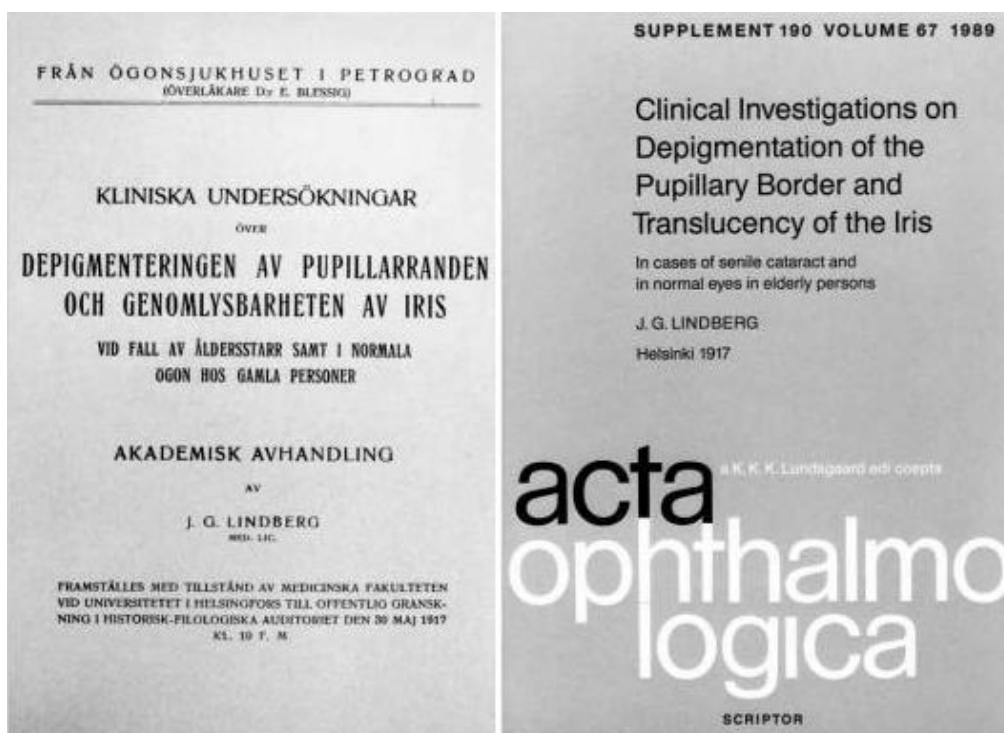


**Figura 2:** Dibujos realizados por Lindberg para su trabajo. Tomado de *Tarkkanen et al. 2002* [18].

que se conseguía en estos pacientes, así como una posible relación con el entonces denominado glaucoma crónico.

Lindberg presentó todos sus hallazgos en la lectura de su Tesis Doctoral y en la posterior publicación de la correspondiente monografía (figura 3) en la Universidad de Helsinki en 1917 [22]. De manera póstuma, muchos años después, se publicó en 1989 una traducción al inglés del trabajo de Lindberg (figura 3) acompañada por sus dibujos y conclusiones sobre la pseudoexfoliación [23], muchas de las cuales son aún hoy en día válidas.

Gracias a la estancia que Lindberg realizó en los años 1920-21 en el Departamento de Oftalmología del *Universitätsklinikum* de Friburgo, Alfred Vogt tuvo acceso a sus trabajos.



**Figura 3:** Tesis Doctoral de John Lindberg, publicada en 1917, y su traducción al inglés, publicada en 1989. Tomado de *Tarkkanen et al. 2002* [18].

Vogt postuló que el material acumulado provenía de la exfoliación o descamación de la cápsula anterior del cristalino. Lo denominó *exfoliatio superficialis capsulae anterioris* y estableció su frecuente asociación con un tipo específico de glaucoma que él denominó glaucoma capsular [24, 25].

Otros autores como Bussaca o Malling, sin embargo, pensaban que dicho material provenía de la precipitación sobre el cristalino sano de determinadas sustancias que se encontraban de manera natural en el humor acuoso [26, 27].

Se estableció así la existencia de 2 teorías etiológicas opuestas: la que propugnaba una degeneración/exfoliación de la cápsula cristalina [24, 25, 28, 29], frente a la que defendía la precipitación de partículas propias del acuoso [26, 27, 30, 31].

A lo largo de los años se fue determinando la presencia de este material a nivel de otras muchas estructuras intraoculares, como la malla trabecular, la zónula cristalina, el cuerpo ciliar o el endotelio corneal. El factor que permitió la determinación de la ausencia de participación del cristalino en la génesis del material de depósito fue la observación de la aparición del mismo posteriormente a la cirugía en ojos afáquicos sometidos a extracción intracapsular del cristalino [32-34] y su aparición igualmente sobre lentes intraoculares (LIO) en ojos pseudofáquicos [35-37].

### 1.3.- TERMINOLOGÍA

---

Para diferenciar la pseudoexfoliación de la verdadera exfoliación cristalina (entidad descrita en 1922 por Anton Elschmig, propia de los sopladores de vidrio, en la que se produce una auténtica lesión y descamación de la cápsula anterior del cristalino sometida al efecto de la radiación infrarroja emitida por el vidrio incandescente), Dvorak-Theobald acuñó por primera vez en 1954 el término *pseudoexfoliación del cristalino*, mientras que por las mismas fechas Sunde propuso el de *síndrome exfoliativo*.

Muy diferentes términos se han utilizado desde entonces, *exfoliación iridociliar con pseudoexfoliación capsular*, *exfoliación de la pseudocápsula*, *fibrilopatía epiteliocapsular*, *glaucoma pigmentario complejo*, *síndrome de exfoliación de las membranas basales*, *oxitalanosis del humor acuoso* o *elastosis ocular*.

Los términos más aceptados actualmente por la comunidad científica y, por tanto, los que se usan en este trabajo son el de Síndrome Pseudoexfoliativo o de Pseudoexfoliación (SPEX) y Glaucoma Pseudoexfoliativo (GPEX).

## 2.- EPIDEMIOLOGÍA

---

Para estimar la frecuencia del SPEX, acompañado o no de glaucoma, se han realizado múltiples estudios poblacionales transversales que han arrojado muy diferentes valores de prevalencia de la enfermedad según las áreas geográficas estudiadas.

Esta diversidad de resultados no debe atribuirse únicamente a las diferencias étnicas o raciales entre las distintas comunidades, sino a otros factores como la distribución de edad y sexo en los grupos seleccionados, los criterios diagnósticos establecidos y la habilidad del examinador para establecer el diagnóstico, así como la dificultad del mismo en muchos casos, sobre todo en las fases preclínicas de la enfermedad. Como ejemplo, en los pacientes con GPEX derivados a un centro de referencia en glaucoma por su oftalmólogo de área, el diagnóstico de SPEX había sido obviado en el 60% de los casos [38].

De igual manera, estos estudios epidemiológicos se han realizado sobre muy diversos grupos de población, incluyendo la población general o subgrupos de población seleccionados, como población de grupos etarios concretos, la población asistida en un centro hospitalario determinado, la población glaucomatosa o la población sometida a cirugía oftalmológica. Este hecho ha contribuido notablemente a aumentar la confusión sobre el tema en la literatura médica, más aún cuando se quieren realizar series comparativas.

En todos los casos, sin embargo, se ha comprobado que la prevalencia del SPEX se incrementa de manera progresiva a través de los siguientes grupos:

1. La población general
2. La población mayor de 50 años
3. Los pacientes con hipertensión ocular
4. Los pacientes con glaucoma
5. Los paciente con glaucoma sometidos a cirugía
6. Los pacientes ciegos por glaucoma o con glaucoma terminal

## 2.1.- FRECUENCIA EN LA POBLACIÓN GENERAL

Se ha demostrado la presencia del SPEX en todas las áreas del planeta. Y de casi todas ellas existen datos que estiman de una forma más o menos certera la frecuencia de la enfermedad (tabla 1).

En los Países Escandinavos, donde primero se describió la enfermedad, es donde se han encontrado las tasas más altas de prevalencia. En estudios realizados en grupos poblacionales de edad superior a los 60 años, se determinó una prevalencia de hasta el 25% para Islandia [39, 40] y superior en algunos casos al 20% en Finlandia [41, 42]. En Noruega [43] y Suecia [44] las cifras parecen ser algo menores, en torno al 17-18%, siendo Dinamarca [45] el país con una prevalencia más baja en la zona. El único grupo racial que comparte estas características epidemiológicas es el de judíos de origen ruso emigrados a los Estados Unidos de América (EEUU) [46].

En el resto de Europa Occidental, sólo Grecia presenta una prevalencia casi tan alta como los escandinavos, llegando su estimación hasta el 16% en algunos estudios [47]. Tasas muchos menores se describen en España (6,5%) (tabla 2) [48], Francia (5,5%) [49], Alemania (4,7%) [50] y el Reino Unido (4%) [50].

**Tabla 2:** Resumen del estudio de prevalencia de síndrome pseudoexfoliativo en población española en el Salnés Eye Study.

Edad	HOMBRES			MUJERES			AMBOS		
	N	PEX	P	N	PEX	P	N	PEX	P
40-49	79	0	0	54	0	0	133	0	0
50-59	81	0	0	52	0	0	133	0	0
60-69	78	4	5,1	45	3	6,7	123	7	5,7
70-79	79	8	10,1	45	10	20,4	124	18	14,5
>80	73	17	23,0	33	13	40,6	106	30	28,3
<b>TOTAL</b>	<b>390</b>	<b>29</b>	<b>5,4</b>	<b>229</b>	<b>26</b>	<b>8,0</b>	<b>619</b>	<b>55</b>	<b>6,5</b>

N: nº de pacientes; PEX: pacientes con sdme. pseudoexfoliativo; P: prevalencia.  
Modificado de *Viso et al. 2010* [48].

**Tabla 1:** Resumen de los principales estudios de prevalencia de síndrome pseudoexfoliativo. N: n° de pacientes; n: n° de pacientes por grupo de edad; PEX: n° de pacientes con sdme. pseudoexfoliativo; P: prevalencia.

Estudio	Raza	N	Edad	n	PEX	P
Ringvol y col. (Noruega, 1988) [43]	Caucásicos	1887	65-69	414	45	10,9
			70-74	554	71	12,8
			75-79	451	77	17,1
			>80	468	125	26,7
Cashwell y col. (EEUU, 1988) [51]	Caucásicos	2121	<60	1125	1	0,1
			60-69	522	9	1,7
			70-79	345	13	3,8
			80-89	129	10	7,8
Shiose y col. (Japón, 1991) [52]	Asiáticos	8126	<60	4430	101	1,24
			60-69	2296		
			70-79	1113		
			>80	287		
Rouhiainen y col. (Finlandia, 1992) [53]	Caucásicos	833	65	508	43	8,5
			75	325	43	13,2
Kozobolis y col. (Grecia, 1997) [47]	Caucásicos	777	40-49	23	0	0
			50-59	127	1	0,8
			60-69	248	26	10,5
			70-79	298	60	20,1
			>80	81	38	46,9
Nouri-Mahdavi y col. (Irán, 1999) [54]	Árabes	405	41-50	22	0	0
			51-60	161	12	7,5
			61-70	154	24	15,6
			71-80	58	13	22,4
			>80	10	4	40,0
McCarty y col. (Australia, 2000) [55]	Caucásicos	4499	40-49	1241	1	0,1
			50-59	1310	3	0,2
			60-69	1129	13	1,6
			>70	819	24	2,9
Rotchford y col. (Sudáfrica, 2003) [56]	Negros	1840	40-49	435	7	1,6
			50-59	480	19	4,0
			60-69	486	55	11,3
			>70	439	78	17,8
Aravind Eye Study (India, 2003) [57]	Indios	5150	40-49	2066	6	0,3
			50-59	1466	68	4,6
			60-69	1201	150	12,5
			>70	417	84	20,1
Reykjavik Eye Study (Islandia, 2003) [58]	Caucásicos	1045	50-59	362	9	2,5
			60-69	354	31	8,8
			70-79	251	42	16,7
			>80	78	26	33,3
Tanjong Pagar Survey (China, 2005) [59]	Asiáticos	1232	40-49	279	0	0
			50-59	382	0	0
			>60	571	4	0,7
Aström y col. (Suecia, 2007) [44]	Caucásicos	339	66	339	78	23
Sulaiman y col. (Arabia Saudí, 2015) [60]	Árabes	1967	<50	678	5	0,7
			50-59	960	34	3,5
			60-69	270	22	8,15
			70-79	50	6	12,0
			>80	9	2	22,2

Los datos provenientes de EEUU son muy similares. En el Framingham Eye Study [61] se determinó una prevalencia del 0,6% para sujetos de edades comprendidas entre los 52-62 años y del 5% para los de 75-85 años. En estudios comparativos también se observó una prevalencia significativamente menor en el grupo de sujetos de origen afroamericano [51, 62].

En último lugar, son las razas asiáticas las que han demostrado una prevalencia menor del SPEX, siendo de 3,4% en sujetos japoneses [52], 0,4% en chinos [63] y 0% en esquimales [64].

Se ha observado que la prevalencia puede también presentar importantes variaciones dentro de un mismo país entre regiones próximas geográficamente y con unas características ambientales similares. Así, por ejemplo, en la isla de Creta los porcentajes para las regiones de Heraklion, Chania, Lasithi y Rethymnon fueron del 11,5%, 13,4%, 16,9% y 27% respectivamente [47]. O en Francia, el de la ciudad de Brest fue del 20,6%, mientras que el de la de Toulon no llegó al 4% [49].

Se calcula que la prevalencia real del SPEX en una determinada población es probablemente el doble de la actualmente estimada. Larsen examinó *postmortem* 100 ojos de 50 pacientes mayores de 70 años encontrando evidencias de SPEX en un 12%, mientras que el diagnóstico *in vivo* se había realizado tan sólo en un 3% de ellos [65].

### **2.1.1.- Influencia de la Edad**

En todos los estudios, la prevalencia del SPEX se incrementa con la edad. Forsius describió cómo la incidencia de la enfermedad se duplica cada década a partir de los 50 años [66].

En un estudio finlandés el SPEX fue diagnosticado en un 10% de los individuos en el grupo de edad comprendido entre los 60-69 años, un 21% en el de 70-79 años y un 33% en el de 80-89 años [41].



### **2.1.2.- Influencia del Sexo**

No existen datos concluyentes que permitan establecer una diferencia entre sexos. En algunas series el SPEX aparece con más frecuencia en mujeres [38, 50, 61, 67, 68]. En un número menor de casos este predominio corresponde a los varones [47, 55, 66, 69]. Sin embargo, en la mayoría de los estudios no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos sexos [70-73].

## **2.2.- FRECUENCIA EN LA POBLACIÓN GLAUCOMATOSA**

---

La frecuencia del SPEX es significativamente superior en la población glaucomatosa que en un grupo similar libre de enfermedad ajustado por edad y sexo, cuya prevalencia en líneas generales duplica. Valores representativos de esta realidad son las prevalencias de un 46-57% en Islandia [40], 28-47% en Finlandia [74, 75], 33-60% en Noruega [76, 77] o 26% en Dinamarca [78].

Este fenómeno está presente en todos los países y poblaciones, incluso en aquellos en los que los porcentajes del SPEX son tan bajos que se esperaba que en un principio no afectarían de igual manera a las estadísticas de la población afectada de glaucoma.

De esta manera, el SPEX se ha definido como el primer factor de riesgo identificable para el desarrollo de GAA [1, 2] y, una vez establecido el diagnóstico, como el más importante factor de riesgo para la progresión de la enfermedad [79].

### 3.- CLÍNICA

---

El SPEX es una enfermedad caracterizada por la producción y acumulación progresiva de un material fibrilar extracelular a nivel de las distintas estructuras y tejidos del globo ocular.

En la mayoría de los casos los pacientes se encuentran asintomáticos y no refieren síntomas específicos de disminución de agudeza visual (AV). Sin embargo, son múltiples los signos de enfermedad que se pueden observar y que nos van a permitir establecer un diagnóstico y emitir un posible pronóstico en cada caso.

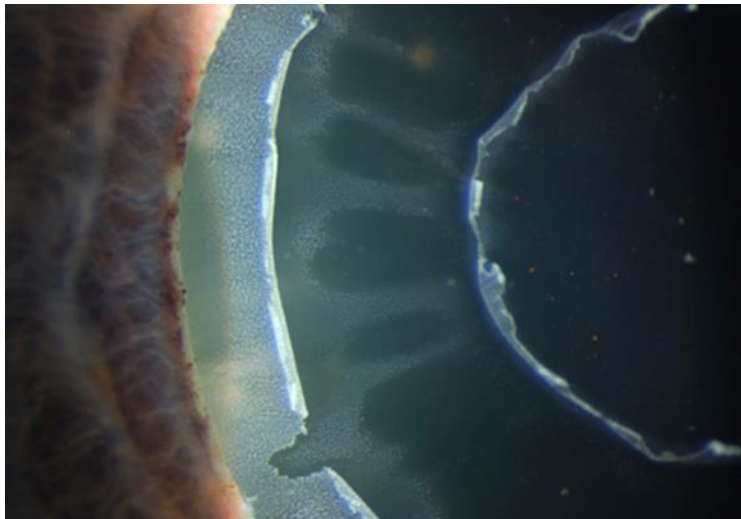
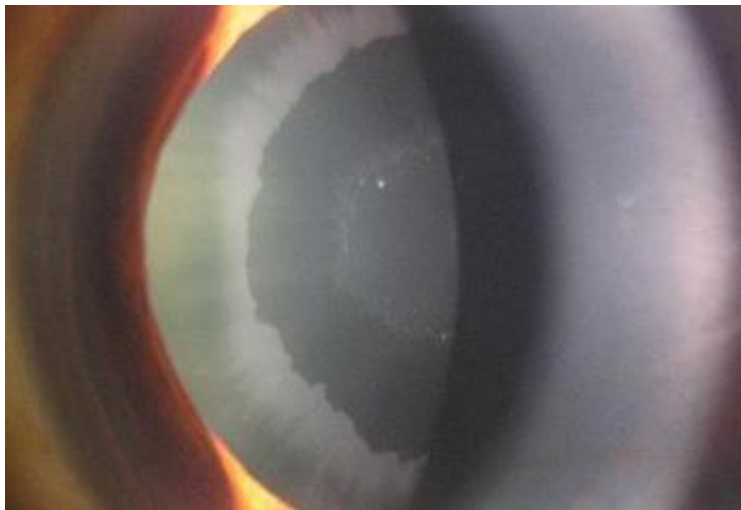
#### 3.1.- CRISTALINO

---

El depósito de un material fibrilar blanquecino sobre la superficie de la cápsula anterior del cristalino es el signo más importante y característico en el diagnóstico del SPEX. El patrón clásico que adopta este depósito consiste en 3 zonas concéntricas, generalmente bien diferenciadas, que son visibles bajo dilatación pupilar completa (figuras 4 y 5):

1. Una **zona central**, de aspecto homogéneo, en forma de disco, situada en el polo anterior de la cápsula cristalina y de diámetro ligeramente menor al de la pupila fisiológica. Esta zona puede estar ausente en un 20% [80] a un 60% [81] de los casos.
2. Una **zona periférica**, de aspecto granular, en forma de anillo, situada en la zona ecuatorial de la cápsula del cristalino, con un borde axial estriado o festoneado, del que en ocasiones parten proyecciones en forma de puente hacia el disco central. Esta zona periférica está presente en todos los individuos [82].

3. Una **zona intermedia** entre las anteriores, en forma de anillo igualmente, limpia de material pseudoexfoliativo debido al roce constante del iris con la superficie capsular durante los movimientos pupilares fisiológicos. Habitualmente esta zona no se encuentra totalmente libre de depósitos, apareciendo sobre ella restos de pseudoexfoliación aislados y las proyecciones de la zona periférica antes mencionadas.



**Figuras 4 y 5:** Depósito de material pseudoexfoliativo sobre el cristalino.  
Tomado de <http://ocularis.es/blog/pseudoexfoliacion/> y de <http://webvision.med.utah.edu/2012/03/pseudoexfoliation/>.

Pueden observarse variaciones de este patrón clásico descrito que dependen de la cantidad de material pseudoexfoliativo producido y acumulado, del estadio clínico y progresión de la enfermedad, así como de la relación topográfica existente entre el cristalino y el iris [11].

En estadios iniciales de la enfermedad, el material de depósito puede pasar desapercibido a pesar de una detallada exploración en la lámpara de hendidura. La microscopía confocal se ha demostrado útil para la detección precoz de depósitos hiperreflectivos de material pseudoexfoliativo sobre la cápsula cristalina y el endotelio corneal [83].

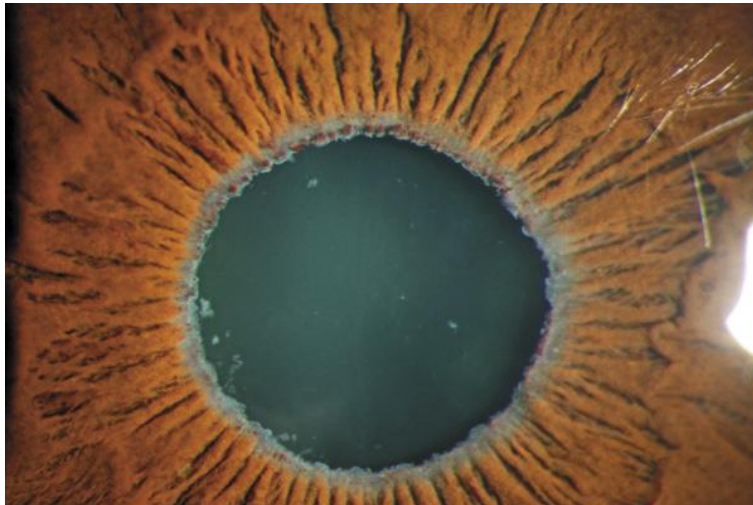
### 3.2.- IRIS

---

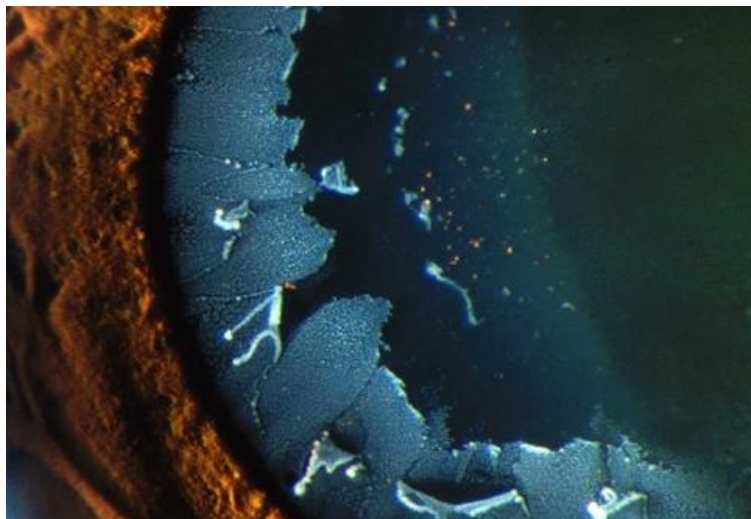
Los cambios que acontecen en el iris son también un signo precoz y fácilmente reconocible en el desarrollo del SPEX.

El roce continuo del borde pupilar contra la superficie del cristalino hace que el material pseudoexfoliativo depositado sobre ésta sea barrido de una forma continuada y acumulado a nivel de dicha estructura iridiana (figura 6). Estos depósitos pueden ser observados en un 32-94% de los pacientes [84]. Puede aparecer, así mismo, material de pseudoexfoliación sobre el resto de la superficie del iris, pero de una manera más inconstante y en formas más avanzadas de la enfermedad.

Otro hallazgo reseñable es la pérdida de pigmento a nivel del esfínter iridiano, que se va a depositar sobre distintas estructuras de la cámara anterior del ojo (figura 7), principalmente en la malla trabecular, incrementándose de esta manera la pigmentación del ángulo iridocorneal [85].



**Figura 6:** Presencia de material pseudoexfoliativo en el reborde pupilar.  
Tomado de <http://optometrytimes.modernmedicine.com/>.



**Figura 7:** Partículas de pigmento sobre la cápsula anterior del cristalino.  
Tomado de <https://es.pinterest.com/pin/374291419001434160/>.

Estos cambios, observables mediante transiluminación y gonioscopia, son curiosamente más notables en pacientes con afectación unilateral, aumentan su frecuencia con la edad y son más comunes

en ojos clínicamente afectados por el SPEX que en ojos con enfermedad subclínica y que en ojos sanos [85-87].

De igual manera, el iris de los ojos con SPEX presenta un mayor grosor y rigidez que el de los ojos control [88, 89].

### 3.3.- PUPILA

---

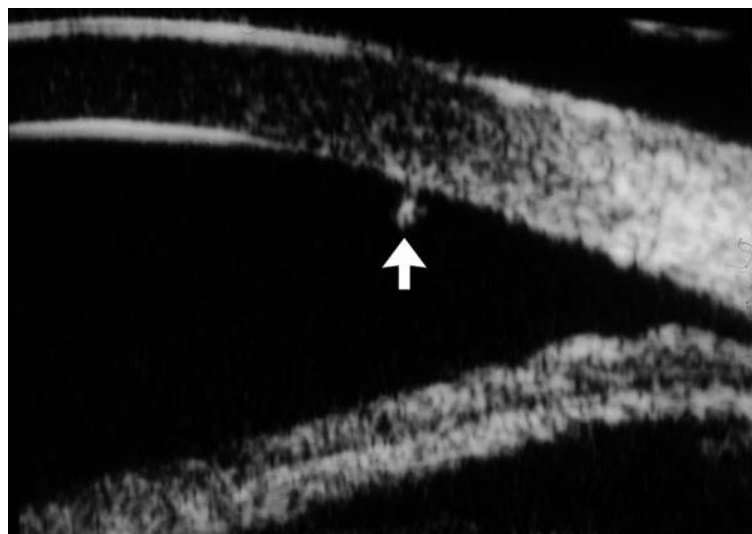
Es muy frecuente que la dilatación pupilar conseguida en estos ojos mediante la instilación tópica de midriáticos sea escasa o muy escasa, incluso en aquellos casos en los que nunca han estado sometidos a tratamiento con mióticos [90-93]. En pacientes con afectación clínica unilateral se produce una diferencia en la respuesta a la midriasis farmacológica significativa entre el ojo afecto y el sano [91]. Incluso la miosis que se consigue tras la instilación tópica de pilocarpina al 4% es menor en los ojos con SPEX [92]. Se ha demostrado también que de forma natural la pupila del ojo enfermo es más pequeña que la del ojo sano en la mayoría de las ocasiones [94].

En dos estudios diferentes [95, 96] se analizaron los cambios histológicos que se producen a nivel de los músculos dilatador y esfínter del iris mediante microscopía óptica y electrónica, encontrándose en ambos casos focos de fibrosis y tejido muscular degenerativo en los individuos afectados por SPEX o GPEX.

Se ha observado que puede ocurrir un incremento significativo de la PIO en estos ojos tras la midriasis farmacológica y que ese incremento guarda una relación directamente proporcional con la cantidad de pigmento liberado durante el proceso [97, 98]. De forma anecdótica, se ha observado también un incremento de la PIO tras la hemodialización de estos pacientes [99].

### 3.4.- Córnea

Depósitos dispersos de material pseudoexfoliativo pueden ser observados sobre la superficie del endotelio corneal (figura 8). Es necesario un examen exhaustivo que nos permita no confundir la presencia de este signo con precipitados retroqueráticos antiguos de origen inflamatorio [100].



**Figura 8:** Imagen de BMU que demuestra la presencia de material pseudoexfoliativo a nivel del endotelio corneal.

De igual manera, se pueden apreciar depósitos de pigmento que adoptan un patrón difuso sobre la parte más central del endotelio, encontrándose muy raramente la disposición en huso de Krukenberg típica del síndrome de dispersión pigmentaria [85]. Más frecuentemente se pueden observar una o varias líneas de pigmento en la cara interna de la porción más periférica de la córnea situadas por delante de la línea de Schwalbe [101].

Múltiples estudios con microscopía especular han demostrado una reducción significativa de la densidad celular, junto con cambio morfométricos en el tamaño y forma de las células endoteliales [102-105].

La paquimetría corneal indica un grosor corneal central incrementado en los ojos con SPEX [106], reflejo precoz de una posible disfunción endotelial. Algunos estudios sugieren también una disminución de la histéresis corneal [107, 108].

Aunque se piensa que todas estas alteraciones son consecuencia directa del SPEX, se sospecha que los cambios en la composición y dinámica del humor acuoso pueden jugar un papel importante hasta ahora poco conocido [109].

Los hallazgos corneales, aunque sutiles, suelen ser precoces, lo que se puede utilizar como una herramienta en el diagnóstico precoz de la enfermedad [110] y de valoración preoperatoria ante la cirugía de catarata [103].

### 3.5.- ZÓNULA Y CUERPO CILIAR

---

El material de pseudoexfoliación se puede también encontrar a nivel de los procesos ciliares y la zónula (figura 9). La exploración mediante cicloscopia de pacientes con aparente afectación unilateral ha puesto de manifiesto la presencia de depósitos en los procesos ciliares del 100% de los ojos afectados clínicamente y del 77% de los ojos contralaterales aparentemente sanos [111].

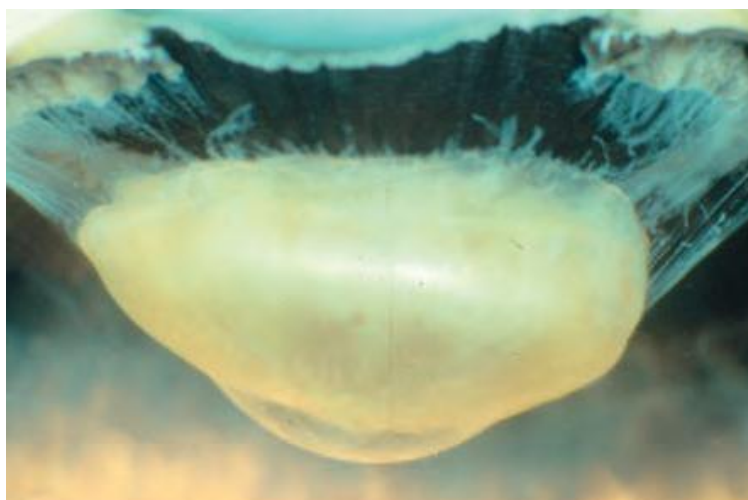
Los depósitos a nivel de la zónula explican la tendencia a la facodonesis y subluxación espontánea del cristalino de estos pacientes (figura 10). La fibras zonulares son recubierta por el material



pseudoexfoliativo, progresivamente debilitadas y en último lugar rotas, produciéndose así desinserciones más o menos amplias del saco capsular [89, 112-114].



**Figura 9:** Luxación de cristalino que permite observar el depósito de material pseudoexfoliativo a nivel de las fibras zonulares. Tomado de <http://www.asoglaucoma.info/asociacion/pseudoexfoliacion-la-herencia-celta/>.

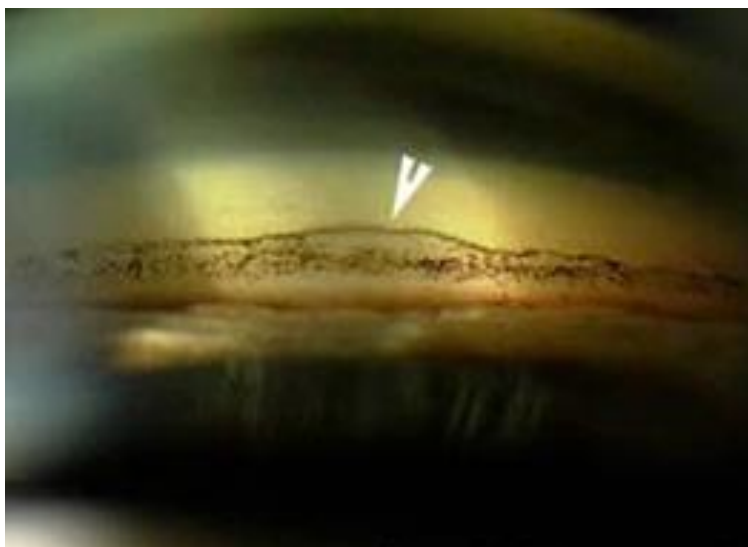


**Figura 10:** Diálisis zonular en examen *postmortem* de paciente con síndrome pseudoexfoliativo. Tomado de *Sein et al. 2013* [12].

### 3.6.- ÁNGULO IRIDOCORNEAL

---

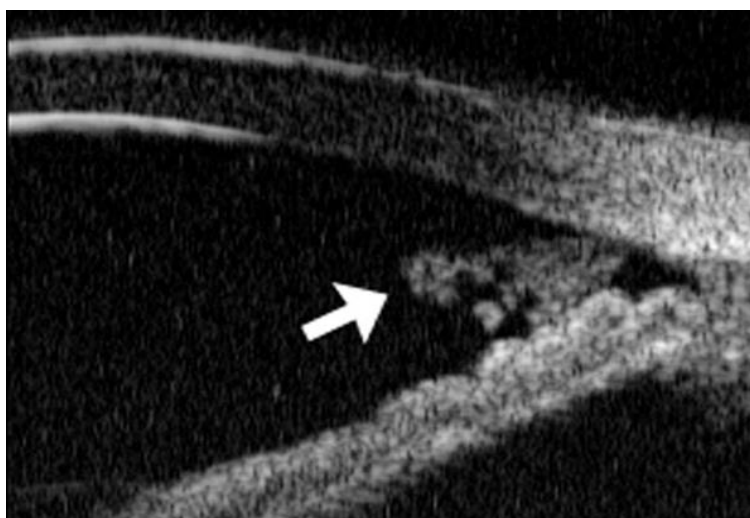
El aumento de la pigmentación de la malla trabecular anteriormente mencionado es un signo constante en el SPEX y aparece en todos los pacientes que presentan signos clínicos de enfermedad. A diferencia de lo que pasa en el síndrome de dispersión pigmentaria, la distribución del pigmento tiende a ser más irregular y parcheada y menos definida. El pigmento se deposita principalmente a nivel de la línea de Schwalbe y, en ocasiones, crea una línea (o varias) ligeramente ondulada por delante de ésta que recibe el nombre de línea de Sampaolesi (figura 11) [101]. Se ha demostrado que este depósito es un signo precoz de enfermedad que puede preceder incluso a la aparición del material pseudoexfoliativo sobre la cápsula anterior del cristalino y el reborde pupilar [85, 115].



**Figura 11:** Aumento de pigmentación y línea de Sampaolesi en ángulo iridocorneal de paciente con SPEX. Tomado de <http://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/cases/case8.htm>.

En casi todos los estudios en pacientes con afectación unilateral, el pigmento trabecular tiende a ser más denso en el ojo clínicamente afecto [116, 117]. De igual manera, los ojos con GPEX presentan mayor pigmentación que los ojos con SPEX sin glaucoma [118, 119] y que los ojos con glaucoma

primario de ángulo abierto (GPAA) [120, 121]. Wishart y colaboradores [115] estudiaron una serie de 76 pacientes con SPEX y GPEX y observaron que, cuando la pigmentación del ángulo era marcadamente asimétrica, la asociación del SPEX con glaucoma era más probable en el ojo más pigmentado y que, en todos los casos, este era el ojo que presentaba un daño glaucomatoso más avanzado. Esto pone de manifiesto una relación directamente proporcional entre el grado de pigmentación y la elevación de la PIO. A nivel del ángulo iridocorneal es igualmente posible encontrar depósito de material fibrilar de pseudoexfoliación (figura 12), generalmente sobre la porción filtrante de la malla trabecular.



**Figura 12:** Imagen de BMU que demuestra la presencia de material pseudoexfoliativo a nivel del ángulo iridocorneal.

A pesar de la falta de relación esperada en un principio entre el SPEX y el glaucoma de ángulo cerrado (GAC), se ha podido comprobar la presencia de ángulos estrechos en una proporción considerable de los pacientes [117]. De los 100 individuos con SPEX observados en un estudio, el 23% presentaba un ángulo iridocorneal de grado II o menor en la gonioscopia y 4 de ellos llegaron a desarrollar un GAC agudo [80]. En el caso de los 76 pacientes del estudio de Wishart y colaboradores

[115], el 32% de los ángulos fueron clasificados como estrechos, el 18% como potencialmente ocluidos y en un 14% se pudo determinar la presencia de sinequias anteriores periféricas.

Bartholomew [122] examinó la profundidad de la cámara anterior en 34 ojos con SPEX y 334 ojos control, encontrando una disminución de la misma relacionada con la edad, pero sin diferencias significativas entre los ojos enfermos y los controles. Gharagozloo y colaboradores [123], sin embargo, pudieron observar una diferencia significativa del volumen camerular entre los ojos de los pacientes con SPEX y los de los individuos sanos.

### 3.7.- CUERPO VÍTREO

---

Tras la cirugía de catarata, se pueden observar depósitos de material pseudoexfoliativo sobre la membrana hialoidea anterior, sobre las mechas vítreas que pueden aparecer cuando esta membrana se rompe, sobre la cápsula posterior del cristalino y sobre las LIO (figura 13), lo que indica que la presencia del cristalino no es imprescindible para la continuada y progresiva formación de este material.



**Figura 13:** Depósito de material pseudoexfoliativo sobre LIO. Tomado de *Sein et al. 2013* [12].

### **3.8.- NERVIÓ ÓPTICO**

---

En un estudio prospectivo en pacientes con hipertensión ocular sin tratamiento se observó una palidez papilar significativamente mayor en los ojos con SPEX, a pesar de no existir diferencias en la PIO ni el campo visual de los grupos [124].

Se ha calculado que el área media del disco óptico es menor en pacientes con SPEX, con o sin glaucoma, que en los individuos control [125, 126]. De igual manera, el área de atrofia peripapilar de estos ojos presenta una relación significativa con la cifras de PIO y la extensión del daño glaucomatoso en el campo visual [127]. La excavación papilar de estos pacientes tiende a ser más difusa en comparación con el GPAA, en el que los defectos más prominentes a nivel del anillo neuroretiniano ocurren selectivamente en los sectores ínfero y súperotemporal [128].

A nivel de la lámina cribosa, la microscopía electrónica ha podido demostrar una marcada alteración del tejido conectivo y una desorganización de las fibras elásticas de las trabéculas [129]. Los cambios encontrados podrían tener efectos negativos sobre las propiedades biomecánicas de esta importante estructura y, por consiguiente, predisponer al desarrollo de glaucoma en los ojos con SPEX.

### **3.9.- SUPERFICIE OCULAR Y TEJIDOS ORBITARIOS**

---

Aunque clínicamente la conjuntiva es normal, estudios de angiofluoresceingrafía (AFG) han demostrado una pérdida del patrón vascular limbar normal, junto a congestión de los vasos ciliares anteriores [130].

Resultados disminuidos en el test de Schirmer y tiempos de ruptura de la película lagrimal acortados son habituales en ojos con SPEX, lo que sugiere una mayor propensión a presentar síntomas de xeroftalmia [131].

Se ha podido identificar mediante microscopía electrónica la presencia de fibras de material de pseudoexfoliación a nivel de la pared de las arterias ciliares posteriores y de las venas vorticosas, así como en los músculos extraoculares, en el tejido conectivo del septum orbitario, en la vaina del nervio óptico y en la pared de los vasos centrales de la retina [5, 132, 133]. Estos hallazgos están presentes tanto en los ojos con evidentes signos clínicos de SPEX como en los ojos contralaterales sin aparente afectación clínica [5].

**Tabla 3:** Resumen de la clínica y complicaciones del síndrome pseudoexfoliativo.

TEJIDO	SIGNOS CLÍNICOS	COMPLICACIONES CLÍNICAS	COMPLICACIONES QUIRÚRGICAS
<b>Cristalino, cuerpo ciliar y zónula</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Depósito PEX capsular</li> <li>▪ Depósito PEX en zónula</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Catarata</li> <li>▪ Facodonesis</li> <li>▪ Subluxación de cristalino</li> <li>▪ Glaucoma agudo por bloqueo pupilar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rotura/diálisis zonular</li> <li>▪ Rotura capsular posterior</li> <li>▪ Vitreorragia</li> <li>▪ Descentrado de LIO</li> <li>▪ Opacificación capsular posterior</li> </ul>
<b>Iris</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atrofia del esfínter de la pupila</li> <li>▪ Asimetría del tamaño pupilar</li> <li>▪ Midriasis escasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dispersión de pigmento</li> <li>▪ Alteración de la barrera hemato-acuosa</li> <li>▪ Hipoxia en cámara anterior</li> <li>▪ Sinequias posteriores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Miosis intraoperatoria</li> <li>▪ Hiphema intra y postoperatorio</li> <li>▪ Inflamación postoperatoria mayor/Reacción fibrinoide</li> </ul>
<b>Malla trabecular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Depósito de pigmento</li> <li>▪ Asimetría de la PIO</li> <li>▪ Aumento de la PIO tras midriasis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipertensión ocular</li> <li>▪ Glaucoma de ángulo abierto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incremento postoperatorio de la PIO</li> </ul>
<b>Córnea</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Córnea <i>guttata</i> atípica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Descompensación endotelial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Descompensación Endotelial</li> </ul>
<b>Segmento posterior</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• OVCR</li> </ul>	

Modificado de Schlötzer-Schrehardt *et al.* 2006 [134].

### 3.10.- ASIMETRÍA DE LA AFECTACIÓN

---

Realizar una revisión de la literatura médica con el fin de comparar las frecuencias de la afectación monocular y binocular resulta particularmente confuso.

La afectación binocular parece ser especialmente frecuente en las publicaciones de origen europeo, donde la mayoría de los autores establecen una relación alta de 3:1 [47, 70, 72, 135, 136]. En otras series, sin embargo, incluyendo la mayoría de las norteamericanas, se presenta la afectación unilateral como la forma más común de enfermedad, con una relación igualmente alta de 3:1 [38, 67, 68, 137, 138]. Esto último parece ocurrir también en Japón, donde hasta un 80% de los individuos presentan afectación únicamente monocular [68, 120].

Por razones aún desconocidas, los pacientes con SPEX pueden presentar ambas formas de enfermedad, uni o bilateral, con marcada asimetría en un número elevado de casos. La afectación unilateral puede ser un estadio previo a la afectación bilateral, pero el desarrollo de la enfermedad en el ojo adelfo puede tardar muchos años en evidenciarse o, incluso, no llegar nunca a ocurrir [139]. Tarkkanen y Kivelä [140] describieron como, tras tres décadas de seguimiento, la mayoría de los pacientes con SPEX unilateral no llegaban a desarrollar enfermedad contralateral clínicamente observable.

Desde el punto de vista clínico, el ojo afecto va a presentar una peor agudeza visual, una opacidad cristaliniiana más avanzada, una PIO más alta, una pupila más pequeña y una pigmentación trabecular más pronunciada que el ojo aparentemente sano.

Desde el punto de vista histopatológico, sin embargo, ambos ojos están afectados por la enfermedad, demostrando la microscopía electrónica invariablemente la presencia de material

pseudoexfoliativo en la conjuntiva y el iris (principalmente en el músculo dilatador de la pupila y la pared de los vasos iridianos) del ojo clínicamente sano [141-143].

Estos datos apoyan el concepto del SPEX como un desorden generalizado bilateral con una presentación clínica asimétrica o marcadamente asimétrica. Las causas responsables de esta asimetría evidente propuestas hasta el momento, como la dinámica del humor acuoso o la función de la barrera hemato-acuosa, deben ser revisadas y sistemática y más profundamente estudiadas. De igual manera, queda aún por determinar la posibilidad de la existencia de distintos subtipos de SPEX con diferentes patrones de presentación y progresión clínicas.



## 4.- GLAUCOMA PSEUDOEXFOLIATIVO

---

El SPEX es considerado actualmente el factor de riesgo identificable más importante para el desarrollo de GAA [1, 2]. En ciertos grupos de población (poblaciones báltica, mediterránea o árabe, principalmente) la frecuencia de GAA secundario a SPEX alcanza porcentajes más elevados que la forma primaria de enfermedad, el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA). Por ejemplo, el GPEX supone el 77% de todos los GAA diagnosticados en la zona oriental de la Península Arábiga [144]. Además, el manejo clínico de este tipo específico de glaucoma resulta más complicado, con una mayor tasa de ausencia de respuesta al tratamiento que en el GPAA. El peor pronóstico de esta entidad viene determinado por una PIO más elevada, unas fluctuaciones diurnas de la PIO más acentuadas y la presencia de picos espontáneos de elevación de la PIO en estos pacientes [145, 146].

### 4.1.- GLAUCOMA SECUNDARIO DE ÁNGULO ABIERTO

---

La patogenia exacta de la elevación de la PIO es aún desconocida. El glaucoma asociado al SPEX es un glaucoma hipertensivo secundario a un aumento de la resistencia al normal drenaje del humor acuoso [123]. Johnson y Brubaker [147] calcularon que el flujo de drenaje del acuoso estaría disminuido en al menos un 20% en los ojos con GPEX, aunque estos datos podrían no ser del todo exactos ya que los individuos que ellos estudiaron recibían tratamiento tópico. El GPEX ocurre en presencia de un ángulo camerular abierto y una cámara anterior de profundidad normal [80, 93, 122].

Los mecanismo potenciales para el desarrollo de GPEX descritos hasta el momento incluyen el bloqueo de la malla trabecular por el depósito de material pseudoexfoliativo, el bloqueo de la malla

trabecular por el pigmento liberado por el iris, una posible disfunción de las células trabeculares y la existencia concurrente de un GPAA.

La obstrucción de la malla trabecular por el material de pseudoexfoliación, por el pigmento o por ambos, es considerada la causa más probable o principal responsable del incremento de la PIO [116, 148-150]. De hecho, la pérdida traumática del contacto irido-cristaliniano se ha descrito como un posible factor protector frente al desarrollo de GPEX [151]. En algunos estudios se ha establecido una relación directa entre la cantidad de material pseudoexfoliativo presente a nivel de la malla trabecular y el desarrollo de glaucoma [152-154]. Sin embargo, es también posible encontrar depósitos avanzados de dicho material con una PIO normal [155]. No se sabe aún por qué una gran cantidad de pacientes con SPEX de larga evolución no llegan a desarrollar GPEX.

En un estudio morfométrico de microscopía electrónica realizado en ojos con SPEX y GPEX se observó que la presencia de glaucoma estaba significativamente relacionada con la cantidad de material pseudoexfoliativo acumulado a nivel de la porción filtrante de la malla trabecular y del tejido yuxtacanalicular, así como con el espesor de este tejido y el área de la luz del canal de Schlemm [154].

Sampaolesi y colaboradores [101] describieron como, mientras que en el glaucoma secundario a dispersión pigmentaria se podía localizar pigmento a nivel de la malla trabecular, la pared del canal de Schlemm y los canales colectores, en el caso del GPEX las partículas de pigmento, de mayor tamaño y viscosidad, quedaban atrapadas en el interior de la malla trabecular sin progresar más adelante en el sistema colector de drenaje del humor acuoso.

La mayor parte de las publicaciones más recientes coinciden en señalar como causa responsable del incremento de la PIO y desarrollo del GPEX al acúmulo de material de pseudoexfoliación, así como a los cambios degenerativos que se producen a nivel del canal de Schlemm y el área yuxtacanalicular [153, 154, 156]. Además de la obstrucción mecánica pasiva del sistema de filtración del humor acuoso por material pseudoexfoliativo de origen extratrabecular, se ha sugerido una

posible implicación activa de las células trabeculares en el proceso de alteración del normal drenaje del acuso mediante la producción local del citado material y su participación en el proceso de remodelación de la matriz extracelular [154], aunque esta hipótesis resulta controvertida. En cualquiera de los casos, la reorganización del tejido yuxtacanalicular y de la normal anatomía del canal de Schlemm no se ha podido observar en ojos con GPEX leve o moderado y es probable que se asocie únicamente a estadios avanzados de la enfermedad.

Los agregados de material pseudoexfoliativo presentes en el ángulo iridocorneal pueden comportarse también como un *nidus* para una acumulación no específica de proteínas séricas. Estudios con inmunohistoquímica han detectado un incremento significativo de la cantidad de albúmina presente a nivel de la malla trabecular en ojos con SPEX, lo que teóricamente podría contribuir al incremento de la PIO [157, 158].

Las características fluctuaciones de la PIO que aparecen en los pacientes con GPEX se han relacionado con la posición corporal que adopta el individuo, particularmente con la posición de decúbito prono, en la que se produce una disminución de la profundidad de la cámara anterior y un incremento marcado de la PIO en comparación con los ojos control [159, 160]. Este fenómeno se ha atribuido a la laxitud del complejo zonular que permitiría un teórico desplazamiento anterior del cristalino.

Se ha podido establecer una relación entre las cifras de PIO en el momento del diagnóstico y el defecto medio en el campo visual [160], así como entre las fluctuaciones de la PIO y la pérdida de grosor en la capa de fibras nerviosas de la retina [161] en los pacientes con GPEX, pero no en aquellos que padecen GPAA. Este hallazgo sugiere que el daño glaucomatoso del nervio óptico en los pacientes con GPEX está más directamente relacionado con la PIO que en los pacientes con GPAA. Por ello, la reducción y estabilización de las cifras de PIO y sus fluctuaciones han demostrado una capacidad mucho mayor para mejorar el pronóstico del campo visual en los pacientes con GPEX [162].

Los pacientes con GPEX presentan un mayor riesgo de sufrir picos de incremento de la PIO transitorios tras la dilatación pupilar debido a la dispersión de partículas de pigmento y de material pseudoexfoliativo en la cámara anterior que se produce tras la instilación tópica de midriáticos. La máxima elevación de la PIO, que puede alcanzar hasta los 30 mmHg sobre la PIO basal del paciente, se alcanza de 2 a 3 horas tras la dilatación pupilar y tarda de 10 a 15 horas en volver a normalizarse [163]. Estas elevaciones transitorias, pero marcadas, de la PIO pueden desencadenar un cuadro sintomatológico similar al del glaucoma agudo, con dolor, ojo rojo y edema corneal, y, por supuesto, producir una progresión del daño glaucomatoso en estos ojos.

**Tabla 4:** Factores patogénicos en el GPEX.

<b>HIPERTENSIÓN OCULAR GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO</b>	• Material PEX producido localmente
	• Material PEX depositado pasivamente
	• Dispersión pigmentaria
	• Incremento de proteínas en humor acuoso
	• Proliferación/migración del cél. Trabeculares
<b>GLAUCOMA DE ÁNGULO ESTRECHO GLAUCOMA POR CIERRE ANGULAR</b>	• Debilidad zonular y subluxación cristalino
	• Rigidez iridiana y midriasis escasa
	• Sinequias iridianas posteriores
	• Incremento de proteínas en humor acuoso

Modificado de *Schlötzer-Schrehardt et al. 2006* [134].

#### 4.2.- GLAUCOMA DE ÁNGULO CERRADO

---

Tradicionalmente, el glaucoma de ángulo cerrado (GAC) era considerado raro o infrecuente en los pacientes con SPEX. Algunos autores habían descrito su aparición en estos pacientes como ocasional o esporádica y habían calculado su prevalencia en los individuos con SPEX como menor que en la

población general. A pesar de que en 2 series importantes se encontró una alta incidencia de ángulos iridocorneales estrechos potencialmente ocluibles en ojos con SPEX [80, 115], la frecuencia de este trastorno en las series de ojos con GAC se mencionaba rara vez y se veía como algo inusual.

Más recientemente, Ritch [116] logró demostrar la presencia de signos clínicos de SPEX o de material de pseudoexfoliación en biopsia conjuntival en 17 de 60 (28,3%) pacientes con GAC. Estudios retrospectivos posteriores han encontrado una asociación clara entre el SPEX y los ángulos potencialmente ocluibles y el cierre angular [164, 165].

No sólo la asociación entre el GAC y el SPEX no es rara, sino que algunas características de los ojos con SPEX predisponen al desarrollo de esta entidad. La aparición de un bloqueo pupilar puede estar causada por la combinación de varios factores, como la presencia de sinequias iridianas posteriores, el aumento del grosor y rigidez del iris y el desplazamiento anterior del cristalino secundario a un debilitamiento o diálisis del complejo zonular. Herbst [166] fue el primero en sugerir una relación causal entre el GAC y el SPEX al observar un paciente miope de raza negra con SPEX bilateral y GAC crónico unilateral. Mediante gonioscopia pudo evidenciar la presencia de un ángulo iridocorneal de grado III, marcadamente asimétrico, en el ojo contralateral. Frank y colaboradores [167] publicaron 2 casos de GAC agudo en individuos con SPEX, uno de ellos precipitado por la instilación tópica de pilocarpina, y propusieron la debilidad zonular y el desplazamiento del cristalino como factores desencadenantes.

#### **4.2.1.- Sinequias Iridianas Posteriores**

El epitelio pigmentado del iris y la superficie capsular, ambos recubiertos por material de pseudoexfoliación, tienden a formar adherencias entre sí, especialmente si el movimiento pupilar está inhibido por el uso de terapia con mióticos. La consistencia de estas adherencias hace que la unión del borde pupilar del iris al cristalino sea más fuerte que al propio estroma iridiano. Debido a estas uniones y

a la mayor rigidez del cuerpo del iris, cuando la presión del humor acuoso comienza a aumentar en la cámara posterior se produce un fenómeno de empuje o presión sobre el punto más débil, que es la raíz del iris. Este abombamiento localizado estrecha la cámara anterior, da al iris una configuración en *pseudoplateau* en la gonioscopia y conduce a un cierre progresivo del ángulo y al desarrollo de un GAC crónico. Se ha demostrado que la realización de una iridotomía con láser de Nd:YAG en estos ojos permite la reapertura del ángulo, al contrario de lo que ocurre en los iris de configuración en *plateau* o meseta verdadera [168, 169].

### **4.2.2.- Debilidad Zonular**

La zónula se ve afectada desde las fases más iniciales del desarrollo del SPEX. Se produce una rotura progresiva de la fibras zonulares que sujetan el saco cristalino al cuerpo ciliar, produciéndose un característico desplazamiento inferior del cristalino [88]. La debilidad y laxitud del soporte zonular permiten al cristalino desplazarse anteriormente, predisponiendo a estos ojos al bloqueo pupilar, especialmente en la posición de decúbito prono. En casos extremos, incluso, el cristalino se desplaza lo suficientemente hacia adelante como para desencadenar un bloqueo ciliar [170].

## 5.- PATOLOGÍA ASOCIADA

---

Además de todas las alteraciones oculares hasta ahora descritas asociadas al SPEX y al GPEX, existe una patología oftalmológica concomitante, no privativa de la pseudoexfoliación, cuya aparición y posterior desarrollo sí se pueden ver precipitados o acelerados por este proceso patológico.

### 5.1.- CATARATA

---

Aunque aún se desconoce la verdadera naturaleza de su relación, existen múltiples evidencias de la asociación del SPEX con el desarrollo de catarata [70, 73, 136, 171, 172]. La catarata típicamente asociada suele ser de tipo nuclear o subcapsular posterior [173].

La causa de una mayor incidencia de catarata en estos pacientes no es aún del todo bien conocida. Las hipótesis más aceptadas actualmente apuntan al constante estrés oxidativo y los fenómenos de isquemia que sufren estos ojos como causas probables de la opacificación del cristalino.

Es también conocido el hecho de que estos pacientes sufren una mayor tasa de complicaciones durante la cirugía de la catarata. El diámetro pupilar y la fragilidad zonular han sido definidos como los principales factores de riesgo [174]. La presencia de facodonesis, midriasis escasa, catarata avanzada, glaucoma y marcada pigmentación trabecular deben utilizarse como signos de alerta previos a la cirugía [175].

De igual manera, la opacificación de la cápsula posterior del cristalino que se produce en los pacientes pseudofáquicos es mayor en los ojos con SPEX frente a los ojos sanos [176].

## 5.2.- SINEQUIAS IRIDIANAS POSTERIORES

---

El SPEX predispone a la formación de sinequias entre el epitelio pigmentado de la cara posterior de la zona pupilar del iris y la cápsula anterior del cristalino.

Este fenómeno no es demasiado habitual en las fases iniciales de la enfermedad y las sinequias que se pueden observar con más frecuencia son las que se producen entre el iris y las LIO [177].

## 5.3.- DISFUNCIÓN DE LA BARRERA HEMATO-ACUOSA

---

Estudios con AFG, fluorofotometría y *laser flare-cell meter* han mostrado evidencias de una alteración de la función de la barrera hemato-acuosa [178-180]. La presencia de alfa-1-lipoproteína y ceruloplasmina en el humor acuoso de los ojos con SPEX sugiere un aumento de la permeabilidad vascular [181], lo que apoya igualmente esta teoría.

Además, la disfunción de esta barrera tras la cirugía intraocular aumenta significativamente en estos ojos [182]. En la práctica clínica, se ha observado una mayor propensión a sufrir un proceso inflamatorio significativo, incluso una reacción fibrinoide transitoria, después de la cirugía de catarata [183, 184].



#### 5.4.- ISQUEMIA

---

La presencia de alteraciones vasculares es muy habitual en los ojos con SPEX. Se va a producir un estrechamiento progresivo de la luz de los vasos que pueden llegar a obliterarse completamente en casos avanzados [185]. En estas situaciones, se puede observar una alteración del patrón vascular iridiano normal, desarrollándose fenómenos de circulación colateral y microneovascularización [186].

Diferentes estudios con AFG han puesto de manifiesto la oclusión parcial de capilares iridianos, junto a hipoperfusión, reducción del número de vasos, microneovascularización y fugas difusas y parcheadas de fluoresceína, principalmente en la región pupilar del iris [178, 179, 187-189]. La angiografía con verde de indocianina proporciona una mejor identificación de los vasos anastomóticos y la hipoperfusión iridiana [190].

Como consecuencia de esta hipoperfusión, la presión parcial de oxígeno en la cámara anterior de los pacientes con SPEX está significativamente disminuida [191]. Friedburg y colaboradores [192] encontraron signos angiográficos de rubeosis hasta en el 50% de los pacientes con SPEX que estudiaron, siendo la incidencia aún mayor en el grupo de individuos con edad superior a los 70 años.

Se ha propuesto una posible asociación del SPEX con la obstrucción de vena central de la retina (OVCR) [193, 194]. Gillies y colaboradores [195] encontraron 17 casos de OVCR en una serie retrospectiva de 250 pacientes con SPEX. Pohjanpelto [194] documentó 5 casos en una serie de 42 ojos con GPEX, en comparación con sólo 2 casos en otra de 46 ojos con GPAA. En un estudio retrospectivo de pacientes con obstrucción de rama venosa (ORVR) y OVCR, se encontró la presencia de SPEX en un 6% y 6,9% respectivamente [13]. En otra serie de ojos enucleados por glaucoma neovascular secundario a OVCR, el SPEX estaba presente en el 33% de los casos [196].

## 6.- EL SÍNDROME DE PSEUDOEXFOLIACIÓN COMO ENFERMEDAD SISTÉMICA

---

Diferentes estudios *postmortem* con microscopía electrónica sobre pacientes diagnosticados *in vivo* de SPEX, han permitido la identificación de microfibrillas de pseudoexfoliación a nivel de múltiples tejidos extraoculares: corazón, pulmón, hígado, riñón, vesícula biliar, meninges cerebrales y piel [4-9]. Estos hallazgos permiten contextualizar el SPEX ocular dentro de un desorden sistémico generalizado de la matriz extracelular.

Sin embargo, los resultados de los estudios clínicos realizados hasta la fecha son controvertidos y necesitan ser profundamente revisados, contrastados y ampliados. Hasta el momento no existen datos suficientemente concluyentes que permitan señalar al SPEX como un factor patológico sistémico definitivo que determine una disminución de la esperanza de vida de los pacientes.

### 6.1.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL

---

En el *Australian Blue Mountains Eye Study* [16] se definió por primera vez una asociación entre el SPEX y la hipertensión arterial (HTA). El estudio incluía un total de 3.645 individuos de edad superior a los 49 años, de los cuales 81 presentaban SPEX. Los autores concluyeron que el SPEX presentaba una asociación estadísticamente significativa con HTA, historia de angina/infarto agudo de miocardio (IAM) o ambos.

Un segundo estudio se llevó a cabo entre residentes de Hisayama en Japón [197]. Incluía 1.844 individuos de edad superior a los 50 años, de los cuales 50 presentaban SPEX. La prevalencia de HTA

entre los controles fue del 40%, mientras que ascendía hasta un 50,2% en el grupo de los pacientes con SPEX.

Sin embargo, en un estudio prospectivo realizado en Croacia con 646 pacientes de edad superior a los 50 años, los pacientes con SPEX no presentaron una prevalencia estadísticamente significativa superior de HTA [198].

En otro estudio realizado en Alemania entre pacientes con diversos tipos de glaucoma, se concluyó que la HTA parecía ser menos frecuente en los pacientes con GPEX [199].

Por último, en Finlandia la prevalencia de HTA fue del 33% en un grupo de 344 pacientes con GPAA y del 29% en un grupo de 155 pacientes con GPEX [200].

Queda demostrado, por tanto, que la prevalencia de HTA en los pacientes con SPEX y GPEX es alta en diferentes grupos de población y que no existen diferencias fundamentales entre ambos grupos, síndrome y glaucoma. Sin embargo, no hay evidencias suficientes hasta el momento que permitan definir al SPEX como factor de riesgo para el desarrollo de HTA.

## **6.2.- ENFERMEDAD CORONARIA ISQUÉMICA**

---

Como se ha comentado en el apartado anterior, en el *Australian Blue Mountains Eye Study* [16] se halló una asociación estadísticamente significativa entre SPEX e historia de angina o IAM.

En un estudio con ecocardiografía Doppler llevado a cabo en 27 pacientes con SPEX y 24 voluntarios sanos con edades superiores a los 63 años, los resultados apuntaron a una posible asociación entre el SPEX y una disfunción diastólica asintomática [201]. Estos hallazgos fueron confirmados en un trabajo posterior con angiografía coronaria [202].

Sekeroglu y colaboradores [203] estudiaron una serie de 1.480 pacientes programados para cirugía de catarata de los que 242 (16,4%) presentaban SPEX y 27 (1,8%) GPEX. La única enfermedad sistémica con la que se encontró una asociación significativa en estos individuos fue la cardiopatía isquémica, con una baja Odds ratio de 1,49.

Se han observado niveles significativamente elevados de homocisteína en plasma en pacientes con SPEX y GPEX, así como en el humor acuoso de pacientes con GPEX, lo que podría en parte explicar este incremento en el riesgo de enfermedad coronaria [204-207].

Como en el caso de la HTA, existen también estudios en los que no se ha hallado una asociación suficientemente significativa y en los que, por tanto, no se plantea la posibilidad del SPEX como factor de riesgo coronario [198]. De igual manera, no se ha encontrado un incremento en las tasas de mortalidad coronaria de los pacientes con SPEX en comparación con la población general [208].

### **6.3.- ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL**

---

Para evaluar la relación entre el SPEX y el aneurisma de aorta abdominal se llevó a cabo un estudio con 55 pacientes diagnosticados de aneurisma aórtico, usando como control un grupo de 41 pacientes con estenosis carotídea [209]. El SPEX estaba presente en 17 pacientes (34%) con aneurisma y 8 controles (19%). Esto indica que el SPEX puede jugar un papel relevante como factor de riesgo vascular, pero se desconoce su verdadero mecanismo de acción e implicación en cada uno de los trastornos estudiados hasta el momento.

#### 6.4.- DIABETES MELLITUS

---

Existen algunas publicaciones que sostienen que no hay diferencias en la frecuencia de la diabetes mellitus (DM) en los paciente con SPEX con respecto al resto de la población [198, 210]. Sin embargo, la mayoría de ellas ha demostrado que la frecuencia de la DM en los pacientes con SPEX es significativamente menor. Así, Psilas y colaboradores [211] encontraron una prevalencia del SPEX del 11% en un grupo de 325 diabéticos y del 24% en el grupo de controles. Posteriores estudios han confirmado esta tendencia [197, 199], aunque las razones de esta circunstancia son aún desconocidas.

## 7.- MATERIAL PSEUDOEXFOLIATIVO

---

### 7.1.- ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

---

Bajo microscopía óptica (figura 14) el material de pseudoexfoliación se presenta como un conjunto de agregados nodulares o fibrilares, eosinofílicos y positivos a la tinción con ácido periódico de Schiff, presentes en las superficies del segmento anterior del ojo [212].

Bajo microscopía electrónica (figura 15) estos agregados nodulares se convierten en ovillos o madejas irregulares de fibrillas electrodensas, aleatoriamente entrecruzadas, que pueden adoptar una configuración recta o más o menos curvada y que presentan ramificaciones [213, 214].

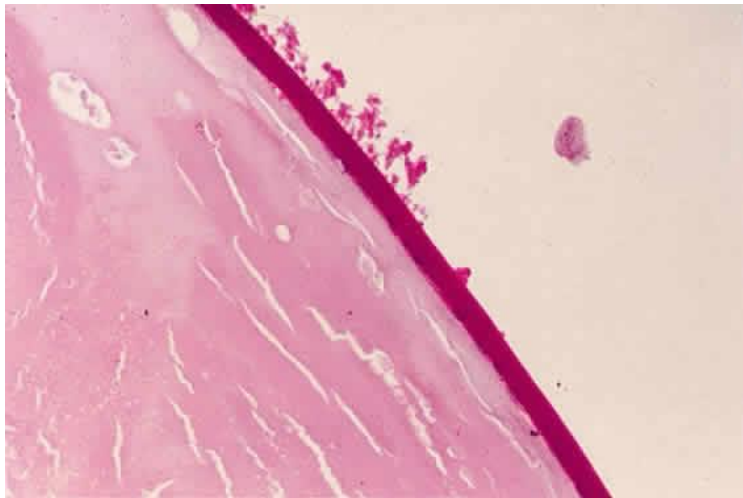
De forma general, se pueden distinguir 2 tipos principales de fibrillas:

1. Fibrillas **Tipo A**: tienen un diámetro de 18-25 nm, una longitud superior a 1  $\mu\text{m}$  y presentan un patrón de bandas dominante de aproximadamente 50 nm.
2. Fibrillas **Tipo B**: son más gruesas (30-45 nm), más cortas (0,3-0,5  $\mu\text{m}$ ) y presentan un patrón de bandas menos característico.

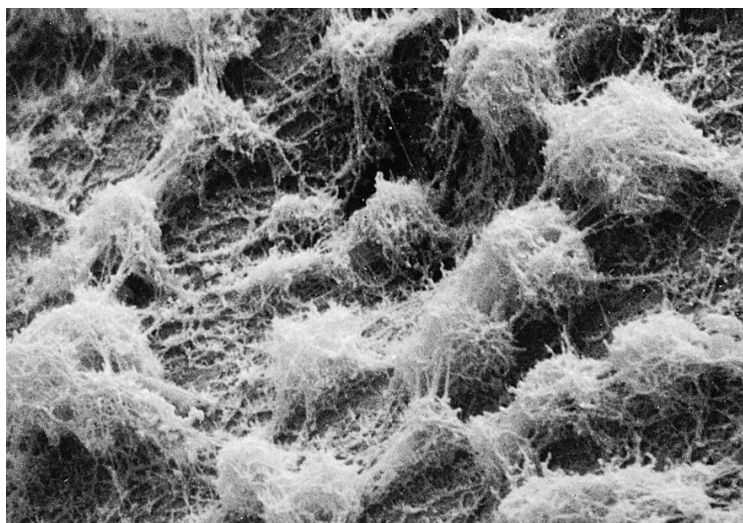
Estos 2 tipos de fibrillas característicos del material pseudoexfoliativo aparecen entremezclados con otras microfibrillas de sección tubular, de 3-7 nm u 8-10 nm de diámetro, que formarían las ramificaciones o agregados laterales. Toda esta estructura fibrilar se encuentra a su vez rodeada y englobada por una sustancia amorfa proteica interfibrilar [215].

A pesar de los múltiples estudios realizados hasta el momento, la composición exacta del material pseudoexfoliativo es aún desconocida. La realización de análisis bioquímicos completos se ve

dificultada por la cantidad insuficiente de material pseudoexfoliativo disponible, la insolubilidad del mismo y la falta de un modelo experimental desarrollado. Análisis con histoquímica e inmunohistoquímica indirecta sugieren una estructura compleja de glicoproteínas/proteoglicanos compuesto por un core proteico rodeado de glicoconjugados, probablemente glicosaminoglicanos, que también formarían la sustancia amorfa perifibrilar [216-218].



**Figura 14:** Depósitos de material fibrilar eosinofílico sobre la cápsula anterior del cristalino bajo microscopía óptica.



**Figura 15:** Depósitos de material pseudoexfoliativo sobre la cápsula anterior del cristalino bajo microscopía electrónica. Modificado de *Ritch et al. 2001* [11].

El material de pseudoexfoliación es resistente a la degradación enzimática, incluyendo la acción de la colagenasa, la tripsina, la pepsina y la papaína [219].

### **7.1.1.- Componente Glicídico**

Varios estudios han demostrado la tinción del material pseudoexfoliativo con técnicas colorantes propias de los glicosaminoglicanos, como el ácido periódico de Schiff, el azul Alcían o el rojo de Rutenio [212, 215, 220]. La presencia de glicosaminoglicanos ha sido igualmente puesta de manifiesto mediante análisis de inmunohistoquímica, evidenciando la presencia de heparán-sulfato, condroitín-sulfato, dermatán-sulfato y hialuronato [221-225]. Por todo ello, se ha propuesto que una de las claves en el desarrollo del SPEX sería un posible trastorno en la producción y metabolismo de los glicosaminoglicanos [220, 224]. Esta hipótesis se encuentra de igual manera apoyada en el hallazgo de altos niveles de hialuronato en el humor acuoso de los pacientes [226].

Análisis con técnicas de lectin-histoquímica han puesto de manifiesto un complejo de glicoconjugados en la composición del material de pseudoexfoliación, que incluye alfa-manosil, beta-galactosil, N-acetil-D-galactosaminil y N-acetil-D-glucosaminil [227-229].

En último lugar, se ha demostrado en estos pacientes la presencia intraocular del epítipo HNK-1, fracción del ácido 3-sulfoglucurónico, presente en múltiples glicoproteínas de adhesión celular [222].

### **7.1.2.- Componente Proteico**

El componente proteico del material de pseudoexfoliación incluye elementos de las membranas basales, como laminina, entactina y fibronectina, así como epítipos del sistema fibrilar elástico, como alfa-elastina, tropoelastina, fibrilina, amiloide P y vitronectina [230-232].



Estudios de inmunomicroscopía electrónica han demostrado una presencia abundante de fibrilina-1, el principal componente de las microfibrillas elásticas, en el material de pseudoexfoliación, lo que sugiere una posible sobreproducción y anormal agregación en la composición de las fibras elásticas de la matriz extracelular en los pacientes con SPEX [232, 233]. La presencia de otros componentes de las fibras elásticas, como las proteínas de unión al factor de crecimiento transformante beta latente 1 y 2 (LTBP1 Y LTBP2) ha sido también demostrada en los depósitos del material pseudoexfoliativo [234].

Las apolipoproteínas A1, B, E, y LP han sido igualmente implicadas en la composición del material pseudoexfoliativo y se ha descartado, sin embargo, la presencia de colágeno tipo I, II, III, IV, VI y VIII y de amiloide A [223, 224].

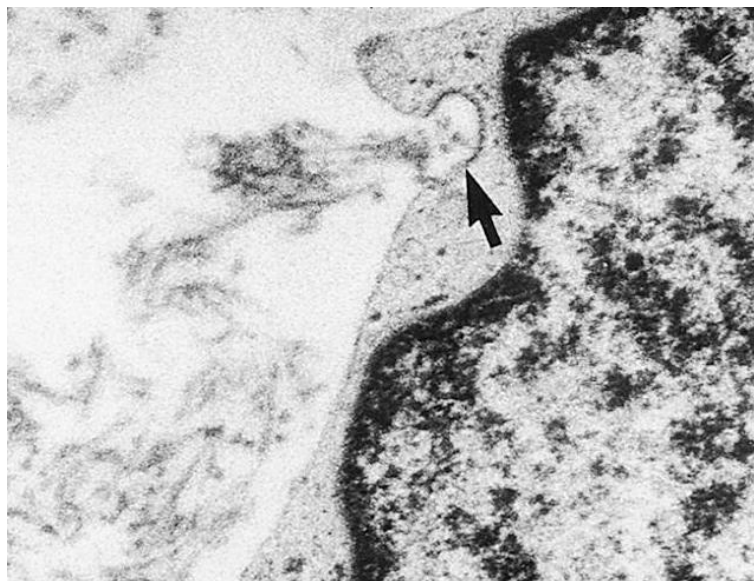
## 7.2.- PRODUCCIÓN

---

Algunos autores han sugerido que los tipos celulares que llevan a cabo la producción del material pseudoexfoliativo son aquéllos que la microscopía electrónica ha demostrado en más cercana relación topográfica con las fibras de pseudoexfoliación: células del epitelio precuatorial del cristalino [219], del epitelio pigmentado del iris [235], del endotelio corneal [236], del endotelio trabecular [154] y casi todos los tipos celulares presentes en el estroma iridiano (fibrocitos, melanocitos, células endoteliales, pericitos y células musculares lisas) [95]. Varios autores sugieren una producción local por todos estos tipos celulares y una secundaria distribución del material pseudoexfoliativo por el humor acuoso, que sería el responsable del depósito pasivo sobre la zona central de la cápsula cristaliniiana, la zónula, la membrana hialoidea anterior y las LIO.

Todos los tipos celulares antes mencionados presentan signos comunes de *fibrilogénesis* e indicios ultraestructurales de síntesis de material de pseudoexfoliación (figura 16):

- Las células poseen una superficie celular externa irregular, con concavidades y compartimentos extracelulares que contienen fibras de pseudoexfoliación y, ocasionalmente, fragmentos de membrana basal.
- Las fibras surgen perpendicularmente desde esta superficie celular, interrumpiendo la continuidad de la membrana basal, madurando paulatinamente en su progresión formando ramificaciones.
- Grupos de vesículas citoplasmáticas que contienen un material amorfo se fusionan con la membrana celular a nivel de las concavidades, expulsando su contenido al espacio extracelular.
- Las células presentan abundantes organelas de secreción, dando la impresión de una alta actividad metabólica celular.



**Figura 16:** aspecto de una célula productora de material pseudoexfoliativo bajo microscopía electrónica. Modificado de *Ritch et al. 2001* [11].

No se han observado hasta el momento fibras de pseudoexfoliación intracelularmente. Parece que su producción se llevaría a cabo en el espacio extracelular más próximo a la superficie celular. El

acúmulo progresivo de material de pseudoexfoliación sucesivamente degenera, destruye y reemplaza la matriz extracelular normal, lo que finalmente repercute en una degeneración de las células involucradas en el proceso [235].

## 7.3.- FISIOPATOLOGÍA

---

### 7.3.1.- Factores Fisiopatológicos

Una parte importante de los trabajos experimentales en este campo se ha realizado mediante el análisis de la composición del humor acuoso de los pacientes con SPEX, debido a que este elemento puede ser obtenido fácilmente durante la cirugía intraocular y, además, todos los tejidos intraoculares involucrados en el desarrollo de la enfermedad están en contacto directo y continuado con él. Diferentes estudios han demostrado un incremento en la concentración de factores de crecimiento (bFGF, HGF, CTGF, TGF- $\beta$ 1) [237], un desbalance entre las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y las proteínas inhibidoras tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) [238], un incremento de los marcadores de estrés oxidativo ( $\beta$ -isoprostaglandina-F $2\alpha$ ) concomitante a una disminución de los factores de protección antioxidante (ácido ascórbico) [239], y un incremento del péptido vasoactivo endotelina-1 [240].

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), que es el principal modulador de la formación de la matriz extracelular en muchas enfermedades fibróticas, es considerado un mediador clave en el proceso pseudoexfoliativo. Está notablemente incrementado en el humor acuoso de los pacientes con SPEX, tanto en la forma activa como en la forma latente de la enfermedad, es producido activamente por los tejidos del segmento anterior del ojo, promueve la formación de material pseudoexfoliativo *in vitro* y participa en la regulación de la mayoría de los genes anormalmente expresados en los ojos con SPEX identificados hasta el momento, como la fibrilina-1, las proteínas de

unión al factor de crecimiento transformante beta 1 y 2 (LTBP-1 y LTBP-2), la transglutaminasa tisular (TG2) y la clusterina o apolipoproteína J [241].

Existen evidencias de que las condiciones de estrés celular, como el estrés oxidativo y la isquemia/hipoxia, constituyen mecanismos importantes implicados en la fisiopatología del SPEX. Niveles notablemente reducidos de ácido ascórbico, el neutralizador de radicales libres más efectivo en el ojo, y un incremento concomitante de los marcadores de estrés oxidativo [239], sugieren una función defectuosa del sistema de defensa antioxidante y un aumento de dicho estrés en la cámara anterior de los ojos con SPEX. La reducción de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión S-transferasa) en los tejidos del segmento anterior del ojo confirma un defecto de protección frente al estrés oxidativo. Yilmaz y colaboradores [242] analizaron las concentraciones séricas de distintos marcadores de dicho estrés, como la mieloperoxidasa o el malondialdehído, así como las de diferentes factores antioxidantes, como las vitaminas A, C y E y la catalasa, en un total de 27 pacientes con SPEX. Mientras que los niveles séricos de mieloperoxidasa, vitaminas A y E y catalasa no mostraron diferencias con el grupo control, se detectó una disminución significativa de la concentración de vitamina C y un aumento concurrente del malondialdehído, lo que pone de manifiesto el daño generado por los radicales libres en la peroxidación lipídica de las membranas celulares.

El SPEX se asocia igualmente con fenómenos de isquemia ocular, concretamente con hipoperfusión del iris e hipoxia de la cámara anterior [191], y con una reducción del flujo sanguíneo micro y macrovascular a nivel ocular y retrobulbar [243]. Algunos autores han detectado una alta tasa de OVCR en pacientes con GPEX [13, 244]. A nivel sistémico, se ha observado una disminución del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media ipsilateral al ojo afectado [245] y de la perfusión capilar distal [246], lo que apunta muy probablemente a un trastorno o *estatus* isquémico generalizado.

La endotelina-1, que es conocida como el vasoconstrictor endógeno más potente, está significativamente aumentada en el humor acuoso de los pacientes con SPEX [240]. Al contrario, los

niveles en humor acuoso de óxido nítrico, importante vasodilatador fisiológico, están disminuidos en un conjunto bastante notable de los pacientes [247]. Este desbalance puede jugar un papel importante en la vasculopatía obliterante que sufre el iris durante el desarrollo de la enfermedad, causando fenómenos de isquemia local desde las fases más precoces.

Los niveles elevados de homocisteína en humor acuoso detectados en estos pacientes [248] pueden contribuir y promover todo el conjunto de alteraciones predisponentes al *estatus* isquémico, como la disfunción endotelial, el estrés oxidativo, el aumento de la agregación plaquetaria, la reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico y la alteración del normal metabolismo de la matriz perivascolar.

### 7.3.2.- Teoría Fisiopatológica

Basándose en los resultados de diferentes trabajos de análisis bioquímico, inmunohistoquímico y de biología molecular, Streeten y colaboradores [232] definieron por primera vez el SPEX como una elastosis que afecta a las microfibrillas elásticas. La mayoría de las evidencias publicadas en los últimos años sugieren que el SPEX es, de hecho, una fibrilopatía.

La fibrilina-1, el principal componente de las microfibrillas elásticas y presumiblemente también de las fibrillas del material de pseudoexfoliación, es una glicoproteína de gran tamaño, con alto contenido en cisteína, localizada en la matriz extracelular, que actúa como un componente estructural de las microfibrillas que ligan calcio. Tiene capacidad para realizar múltiples interacciones moleculares con otros elementos de la matriz, como la fibronectina, la fibulina-1 y la fibulina-2, el versicano y la LTBP-1, presentes todos ellos en la composición del material pseudoexfoliativo. En el SPEX se produciría una síntesis excesiva de subunidades fibrilares que se agregarían produciendo microfibrillas normales y aberrantes que, entrecruzadas juntas, darían lugar a las fibrillas de pseudoexfoliación maduras mediante interacciones moleculares secundarias con ciertos glicoconjugados y otros componentes de la matriz

extracelular. La anormal acumulación y agregación de proteínas sería promovida, o al menos permitida, por una disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma y por un defecto en la función de la clusterina, que actúa como una chaperona extracelular que en condiciones normales previene la agregación y precipitación de las proteínas mal plegadas.

De este modo, la teoría fisiopatológica propuesta describe el SPEX como un tipo específico de elastosis inducida por estrés, una microfibrilopatía elástica asociada a una producción excesiva de microfibrillas elásticas por una variedad de células potencialmente elastogénicas y su posterior agregación en forma de las típicas fibrillas de pseudoexfoliación maduras.

Factores de crecimiento, principalmente el TGF- $\beta$ 1, un incremento del estrés celular y oxidativo, un sistema de protección celular dañado y la agregación estable e irreversible de proteínas mal plegadas parecen estar implicados en este proceso fibrótico. Debido a un desbalance entre MMP y TIMP y al proceso extensivo de entrecruzamiento involucrado en la formación de las fibrillas aberrantes, el material patológico generado no es adecuadamente degradado y eliminado, sino progresivamente acumulado en los tejidos a lo largo del tiempo.

Curiosamente, mecanismos fisiopatológicos similares en los que se implica al TGF- $\beta$ 1, el estrés oxidativo y una alteración de las MMP han sido también postulados para el desarrollo de varias enfermedades fibróticas sistémicas en las que se produce de igual manera un acúmulo de material extracelular [249].

## 8.- PATOGENÉTICA

---

Aunque la patogénesis específica del SPEX y de su glaucoma asociado es aún desconocida, el conocimiento de la patología molecular de este proceso de fibrosis de la matriz extracelular ha avanzado mucho en los últimos años a nivel genómico, transcriptómico y proteómico. De forma global, estos datos apoyan el concepto patogénico del SPEX como un tipo de elastosis inducida por estrés que provocaría la producción de un excesivo y anormal entrecruzamiento de microfibrillas elásticas, que en último término determinaría la formación y depósito de agregados fibrilares en los tejidos oculares y sistémicos [134]. Factores de crecimiento profibróticos, concretamente el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), así como un desbalance proteolítico entre las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y las proteínas inhibidoras tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) parecen contribuir al acúmulo progresivo del material de pseudoexfoliación, como ya se ha comentado.

Los análisis de la expresión diferencial de genes realizados han revelado múltiples clases de genes que podrían estar implicados en la producción patológica del material de pseudoexfoliación [250]. Estos genes están principalmente relacionados con el metabolismo de la matriz extracelular, por ejemplo, FBN1 (gen de la fibrilina-1), TIMP1 y TIMP2 (genes de las proteínas inhibidoras tisulares de las metaloproteinasas 1 y 2), TGF- $\beta$ 1 (gen del factor de crecimiento transformante beta 1), así como con la regulación y respuesta al estrés celular, por ejemplo, ADORA3 (gen del receptor de adenosina A3), CLU (gen de la clusterina), y GSTM1 (gen de la glutatión S-transferasa microsomal 1).

Además de esto, como se ha referido existen evidencias de que condiciones de estrés celular, como el estrés oxidativo, fenómenos de isquemia/hipoxia o procesos inflamatorios crónicos de bajo grado constituyen así mismo elementos implicados en la patogenia del SPEX. Todo ello, combinado con mecanismos de citoprotección debilitados, como la maquinaria de defensa antioxidante, la función del sistema ubiquitina-proteasoma, la respuesta al estrés del retículo endoplásmico o los mecanismos de

reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA) [251], pueden ser los factores fibrogénicos desencadenantes de la enfermedad.

Múltiples líneas de evidencia, que incluyen estudios de agregación regional, agregación familiar y análisis de ligamiento genético, apoyan la teoría de una predisposición genética a padecer SPEX [252, 253]. Algunos estudios poblacionales y familiares sugieren que el SPEX es un trastorno de herencia autosómica dominante de penetrancia incompleta e inicio tardío [254]. A pesar de todo ello, no existe evidencia definitiva de un modelo de herencia simple, lo que sugiere un patrón de herencia complejo en el que contribuirían múltiples factores genéticos y/o factores ambientales [255].

### 8.1.- LISIL-OXIDASA-LIKE-1

Estudios genéticos recientes han demostrado una asociación altamente significativa entre el SPEX y ciertas variantes en la secuencia del gen que codifica la lisil-oxidasa-like-1 (LOXL1).

La LOXL1 es una proteína que pertenece a la familia de las enzimas lisil-oxidadas. Esta familia está formada por un grupo de enzimas amino-oxidadas, cobre-dependientes, que catalizan el entrecruzamiento de fibras de colágeno y elastina en la formación del tejido conectivo mediante la deaminación de cadenas laterales de lisina [256]. Comprende cinco miembros conocidos y descritos hasta el momento: la lisil-oxidasa (LOX) y las lisil-oxidasa-like 1 al 4 (LOXL1-4).

Parece que la LOXL1 está relacionada específicamente con el entrecruzamiento de la tropoelastina y está implicada en la formación, mantenimiento y remodelación de las fibras elásticas y, por tanto, en la prevención de la pérdida de elasticidad de los tejidos [257]. Con el fin de cumplir su función de entrecruzamiento, el pro-péptido de la LOXL1 es selectivamente dirigido hasta los centros de elastogénesis mediante su unión a tropoelastina y fibulina-5. Después de su fijación a la estructura de *andamiaje* del tejido conjuntivo, el pro-péptido es escindido por la endometaloproteinasa-procolágeno-C-



terminal-proteinasa o proteína morfogénica ósea 1 (BMP1) para la activación de su acción enzimática. La deaminación de los residuos de lisina de la tropoelastina causa el entrecruzamiento espontáneo de los monómeros de tropoelastina y la consecuente formación de polímeros de elastina.

Estudios en ratones con déficit de LOXL1 han demostrado defectos masivos de fibras elásticas y, como consecuencia, prolapso de órganos pélvicos, cambios enfisematosos con agrandamiento de los espacios pulmonares aéreos, alteraciones vasculares y aumento de la laxitud cutánea [257]. A nivel ocular, muestran una mayor predisposición a desarrollar neovascularización coroidea tras terapia de inducción con láser, debido a la alteración de la normal homeostasis de las fibras elásticas de la membrana de Bruch [258].

Thorleifsson y colaboradores [259] fueron los primeros en describir tres variantes comunes o polimorfismos simples de un nucleótido (SPN) en la secuencia del gen LOXL1 situado en el cromosoma 15q24.1 que estaban fuertemente asociados al desarrollo de SPEX y GPEX en individuos escandinavos procedentes de Islandia y Suecia:

1. Polimorfismo rs2165241, situado en el intrón 1
2. Polimorfismo rs1048661 (R141L), situado en el exón 1, no-sinónimo
3. Polimorfismo rs3825942 (G153D), situado en el exón 1, no-sinónimo

Los SPN no-sinónimos, rs1048661 (R141L) y rs3825942 (G153D), producen un cambio en dos aminoácidos distintos en el extremo N-terminal del pro-péptido de LOXL1 en las posiciones 141 (Arginina por Leucina) y 153 (Glicina por Ácido aspártico) respectivamente [259]. Ambos polimorfismos se localizan en el exón 1, que codifica el único dominio N-terminal de la proenzima. Este dominio tiene una importancia significativa para la correcta activación de la enzima, así como para el reconocimiento y unión del sustrato enzimático [260]. Aunque los efectos biológicos de esta sustitución son aún desconocidos, es de suponer que la correcta función de la enzima puede verse afectada.

Los tres haplotipos observados formados por los alelos de los dos SPN exónicos rs1048661 y rs3825942 (G-G, G-A y T-G) fueron clasificados según el riesgo de asociación con la enfermedad que demostraban estadísticamente. El cuarto haplotipo posible (T-A) no se encontró en ningún individuo del estudio. El haplotipo G-G fue definido como de *alto riesgo*, determinando que su presencia aumentaba el riesgo de padecer SPEX por 27. Además, se calculó que la homocigosis para este haplotipo aumentaba la probabilidad de padecer la enfermedad por 700, frente a aquellos individuos que presentaban el haplotipo de más *bajo riesgo* G-A. Sin embargo, comparado con la población general, el verdadero riesgo se incrementaba tan sólo en 2,5 veces, ya que aproximadamente el 25% de los controles sanos eran portadores del haplotipo de alto riesgo en estado homocigótico.

Aunque una de la variantes del SNP rs2165241 localizado en el intrón 1 presentaba una asociación significativa mayor con GPEX que los dos polimorfismos exónicos, al realizar el análisis multivariante con todos los SNP esta significación estadística se perdía. Parece que el SPN intrónico presenta una fuerte asociación al GPEX porque su aparición estaría vinculada a los alelos G y G de los SNP exónicos que forman el haplotipo de alto riesgo.

Tras este descubrimiento se han llevado a cabo multitud de estudios similares en poblaciones de EEUU, Australia, Europa, Japón, China, India, etc., aunque no en población española, que confirman la susceptibilidad genética a padecer SPEX que determinan los SPN de LOXL1 descritos. No se han hallado diferencias significativas entre los grupos de SPEX y GPEX, lo que sugiere que LOXL1 contribuye al desarrollo inicial de la enfermedad más que a la elevación de la PIO y la aparición del consecuente glaucoma. En este sentido, no se ha podido demostrar tampoco una asociación de LOXL1 con ningún otro tipo de glaucoma, incluyendo el GPAA, el glaucoma normotensivo, el glaucoma secundario a dispersión pigmentaria o el glaucoma de ángulo cerrado.

En todos los estudios realizados hasta el momento, el alelo G del SPN rs3825942 (G153D) ha resultado ser el alelo de alto riesgo, salvo en estudios realizados en la población sudafricana de raza

negra en los que el alelo de mayor riesgo fue el alelo A [261, 262]. En el caso del SPN rs1048661 (R141L) existe una mayor variabilidad, siendo el alelo G el de riesgo para los grupos caucásicos, el alelo T para los orientales e, incluso, no ha mostrado un incremento del riesgo en algunas poblaciones.

Paralelamente, las variantes genéticas asociadas a la enfermedad o alelos de riesgo son comunes y presentan una alta prevalencia, en algunos casos de hasta un 88%, en la población sana. Consecuentemente, para el polimorfismo rs3825942 la sensibilidad del alelo G calculada fue del 100%, mientras que su especificidad resultó tan sólo del 3% [263]. En el caso del polimorfismo rs1048661, la sensibilidad del alelo G fue del 95,7% y su especificidad del 13% [263]. Estos datos indican que además del riesgo asociado a los polimorfismos de LOXL1 deben existir otras variantes genéticas y/o factores ambientales que contribuyan al desarrollo del fenotipo pseudoexfoliativo.

Como ya se ha comentado anteriormente, los dos polimorfismos no-sinónimos de LOXL1 asociados a SPEX y GPEX se encuentran en el exón 1, parte del gen que codifica el único dominio N-terminal del pro-péptido, fundamental para su correcta función enzimática [260]. Hasta el momento no se han podido observar variantes del extremo C-terminal de la proteína, donde los dominios catalíticos están localizados, asociadas a la enfermedad. El alelo de riesgo G del SNP rs1048661 se ha asociado con la reducción en un 40% de la expresión de LOXL1 a nivel ocular [264]. Sin embargo, el alelo de riesgo G del polimorfismo rs3825942, que confiere la mayor predisposición para el desarrollo de SPEX en la mayoría de las poblaciones, no determina ninguna alteración en los niveles de expresión del gen.

De manera global, se ha comprobado que la expresión de LOXL1 está disregulada en los tejidos afectados por la enfermedad y que este desbalance depende del estadio del proceso fibrótico [264]. Los datos disponibles actualmente indican que LOXL1 está transitoriamente activado y sobreexpresado en las fases iniciales de fibrogénesis pseudoexfoliativa, junto con otros componentes requeridos para la formación de las fibras elásticas como la tropoelastina, la fibrila-1 y la fibulina-4, y que participa activamente en la formación de los agregados fibrilares aberrantes que se acumulan en los tejidos de los

pacientes con SPEX. De ahí que LOXL1 se haya encontrado como uno de los componentes de estos agregados fibrilares del material pseudoexfoliativo junto a otros componentes de las fibras elásticas, principalmente fibrilina-1, pero llamativamente no junto a su proteína de unión habitual fibulina-5, lo que sugiere un cambio en la especificidad de sustrato de LOXL1 en los lugares de formación de matriz extracelular patológica [265].

En estadios más avanzados de la enfermedad, independientemente de la presencia o no de glaucoma, la expresión de LOXL1 disminuye por debajo de los niveles fisiológicos normales requeridos para un correcto mantenimiento y estabilidad de las fibras elásticas [266]. Los niveles tisulares inadecuados de LOXL1 resultantes afectan negativamente al normal metabolismo de la elastina y conducen a los cambios elastóticos ya descritos.

## 9.- AUTOFAGIA

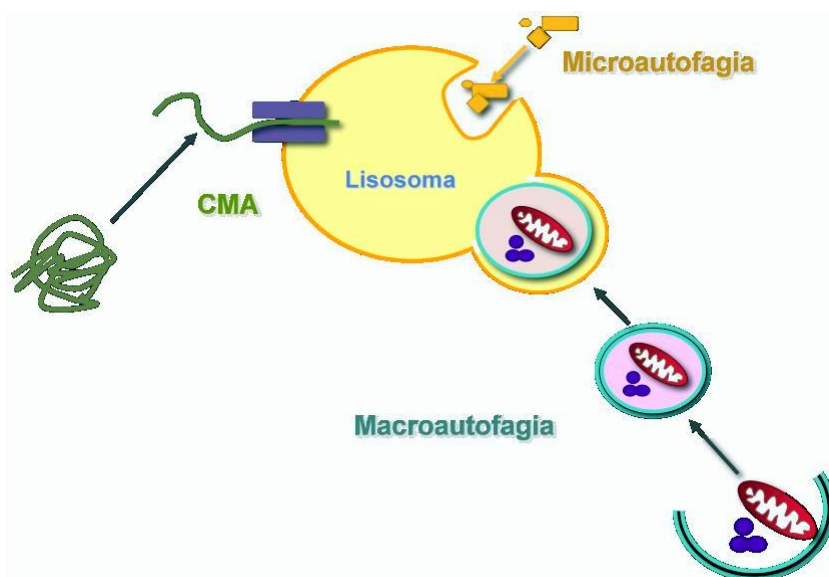
---

Christian de Duve [267] fue el primero en acuñar en 1966 el término autofagia (del griego, *auto-* uno mismo y *phagos-comer*) para definir un proceso catabólico, altamente conservado en eucariotas, mediante el cual las células digieren distintos materiales citoplasmáticos, incluyendo el exceso de organelas o aquellas deterioradas o aberrantes [268, 269], a través de unas vacuolas o vesículas de membrana sencilla localizadas intracelularmente que contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas llamadas lisosomas, con el fin de lograr la descomposición de dichos materiales y el eventual reciclado de las moléculas resultantes. Este proceso juega un papel esencial en la adaptación a condiciones ambientales adversas, en la remodelación celular durante el desarrollo y crecimiento y en el acúmulo de organelas y proteínas alteradas en las células durante el envejecimiento [270].

Hasta el momento se ha identificado 3 tipos principales de autofagia (figura 17) [271]:

1. MACROAUTOFAGIA, caracterizada por la formación de una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma que engloba al material a digerir y que posteriormente se fusiona con el lisosoma.
2. MICROAUTOFAGIA, en la que el lisosoma rodea los materiales citoplasmáticos diana mediante invaginación de su membrana y los captura.
3. AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS, en la que se produce un tránsito de los materiales a través de la membrana lisosomal mediado por la proteína chaperona citosólica Hsc70, las proteínas co-chaperonas y la proteína de membrana lisosomal tipo 2A (LAMP-2A).

De forma habitual, el término general de autofagia se utiliza en la literatura científica para referirse al subtipo específico de macroautofagia, como se hará en adelante en este trabajo.



**Figura 17:** Mecanismos de degradación intracelular mediante autofagia.

En los últimos años, la delección de los genes reguladores de la autofagia (genes ATG) en varios modelos animales, incluyendo los mamíferos, ha demostrado que este proceso catabólico de autodigestión interviene en una variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos mayor que la inicialmente esperada, como la respuesta celular adaptativa al ayuno y otras formas de estrés, la renovación de proteínas y organelas intracelulares, el desarrollo y diferenciación celular, la eliminación de microorganismos, la supresión tumoral o la presentación de antígenos [270, 272-275].

De igual manera, distintos estudios en ratones con delección específica de ciertos genes ATG han permitido establecer la conexión entre un proceso autofágico alterado genéticamente y varios fenotipos de enfermedad concretos, incluyendo el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, infecciosas y metabólicas [270, 276-278]. Sin embargo, los resultados en animales de experimentación no permiten demostrar directamente que estos defectos genéticos en la autofagia estén implicados en la patogénesis de la enfermedad en humanos. Por ello resulta particularmente importante el estudio y comprensión de las bases genéticas de las enfermedades potencialmente relacionadas con alteraciones

en los procesos de autofagia celular. En el caso de este trabajo, el estudio de una posible relación entre la autofagia y el SPEX.

## 9.1.- EL PROCESO DE AUTOFAGIA

---

La autofagia ocurre prácticamente en todas las células eucariotas. Constituye, junto con el sistema ubiquitina-proteasoma, la principal ruta de degradación proteolítica intracelular. Sin embargo, mientras que el sistema proteasómico está especializado en degradar moléculas jóvenes, los procesos autofágicos intervienen en la eliminación de moléculas de vida media larga y, además, son la única vía capaz de degradar organelas celulares completas, tales como mitocondrias (*mitofagia*), peroxisomas (*pexofagia*), ribosomas (*ribofagia*), etc [279, 280].

En un principio se definió la autofagia como un proceso proteolítico mayoritariamente inespecífico, en comparación con la actividad dirigida del sistema ubiquitina-proteasoma. Sin embargo, posteriormente se ha podido comprobar la existencia de un mecanismo de autofagia no selectivo, basal y permanente, que forma parte de la normal homeostasis y mantenimiento celular, y otro selectivo que elimina estructuras celulares dañadas actuando como un sistema de control de calidad [279].

A diferencia de la vía proteasómica, en la autofagia participan los lisosomas. De forma general, los lisosomas son estructuras intracelulares muy heterogéneas, rodeadas generalmente por una membrana sencilla, en cuyo interior se aprecian de forma constante depósitos densos y restos membranosos desorganizados. Los lisosomas contienen un gran número de hidrolasas ácidas que requieren un pH bajo para mantener su correcta función enzimática [280]. El pH lisosomal se mantiene gracias a la actividad de la ATPasas-vacuolares (V-ATPasa), bombas de protones presentes su membrana [281].

En la década de 1980, a partir de estudios realizados sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se identificaron más de 30 genes que codificaban proteínas involucradas en los procesos de autofagia a los que se denominó ATG (*autophagy gene*). Posteriormente se pudo comprobar que dichos genes están conservados en la evolución, presentando similitud en las secuencias y mutaciones en genes ortólogos de otros tipos celulares, incluyendo los mamíferos [282]. De estas proteínas, sólo 18 (ATG1-10, ATG12-14, ATG16-18, ATG29 y ATG31) participan activamente en la formación del autofagosoma y reciben el nombre de autofagosoma-ATG-proteínas, por lo que se consideran la maquinaria fundamental de este proceso de renovación celular.

**Tabla 5:** Genes ATG identificados en levaduras y sus ortólogos en humanos.

COMPLEJO/SISTEMA	LEVADURAS	MAMÍFEROS	FUNCIÓN
<b>Complejo ATG1/Ulk</b>	Atg1	Ulk1/2	Proteína serina/treonina kinasa
	Atg13	ATG13	Regulador del complejo Ulk mediante fosforilación
	Atg17	FIP200	Componente del complejo ATG1
	Atg29		Componente del complejo ATG1
	Atg31		Componente del complejo ATG1
		ATG101	Componente del complejo Ulk en humanos
<b>Sistema ATG9</b>	Atg2	ATG2	Proteína de membrana periférica
	Atg9	ATG9	Proteína transmembrana
	Atg18	WIPI1/2	Proteína de membrana periférica
<b>Complejo PI3K</b>	Vps15	PIK3R4/VPS15	Proteína serina/treonina kinasa
	Vps34	PIK3C3/VPS34	PI3K
	Vps30/Atg6	BECN1	Componente del complejo PI3K
	Atg14	ATG14	Subunidad del complejo PI3K
<b>Sistemas de Conjugación tipo Ubiquitina</b>	Atg3	ATG3	Enzima tipo E2
	Atg4	ATG4A-D	Cisteín proteinasa
	Atg5	ATG5	Conjugado ATG5-ATG12
	Atg7	ATG7	Enzima tipo E <sub>1</sub>
	Atg8		Ubl
	Atg10	ATG10	Enzima tipo E <sub>2</sub>
	Atg12	ATG12	Ubl
	Atg16	ATG16L1/2	Componente del complejo ATG12-ATG5-ATG16

Modificado de Mizhusima et al. 2011 [283] y Pyo et al. 2012 [282].



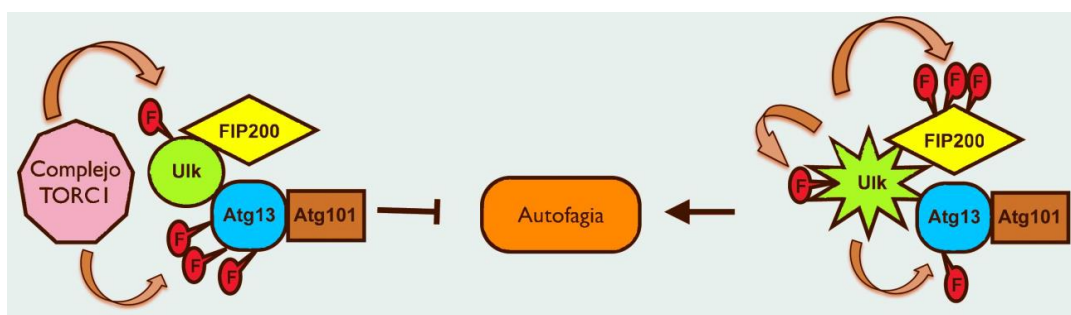
Chen y Klionsky [284] dividen la autofagia en 4 etapas:

### 1. INDUCCIÓN:

La puesta en marcha de los mecanismos de autofagia responde a diferentes estímulos, el más estudiado de los cuales hasta el momento es el ayuno.

La inducción se inicia con la activación del denominado complejo Ulk, que está formado por las proteínas Ulk1 y 2 (*unc-51-like kinase 1 y 2*) (homólogos de ATG1 en levaduras), FIP200 (homólogo de ATG17 en levaduras), ATG13 y ATG101.

El principal inhibidor del complejo Ulk es TORC1, proteína quinasa diana del complejo de rapamicina. En condiciones normales TORC1 se encuentra unido al complejo Ulk, al que fosforila a diferentes niveles inhibiendo su función. En cambio, cuando llega una señal para la inducción de autofagia, como puede ser la falta de nutrientes, TORC1 se inactiva y se disocia del complejo, permitiendo así a Ulk1 la fosforilación de otros componentes del complejo, como ATG13 y FIP200, lo que determina la puesta en marcha del siguiente paso.



**Figura 18:** Regulación del complejo Ulk en la inducción de la autofagia.

### 2. NUCLEACIÓN:

Es el paso en el que se reclutan fosfolípidos y proteínas para la formación de una cisterna membranosa denominada membrana de aislamiento o fagoforo (figura 20) que comienza a rodear los materiales citoplasmáticos a digerir. En levaduras, esta membrana se

origina a partir de una estructura permanente, un compartimento perivacuolar que recibe el nombre de estructura preautofagosomal (PAS) [285]. En mamíferos, se desconoce la estructura celular a partir de la que se origina la nucleación, aunque se han propuesto posibles orígenes a nivel de distintos compartimentos, como un subdominio del retículo endoplásmico llamado omegasoma, la membrana externa de la mitocondria o la membrana citoplasmática [286, 287].

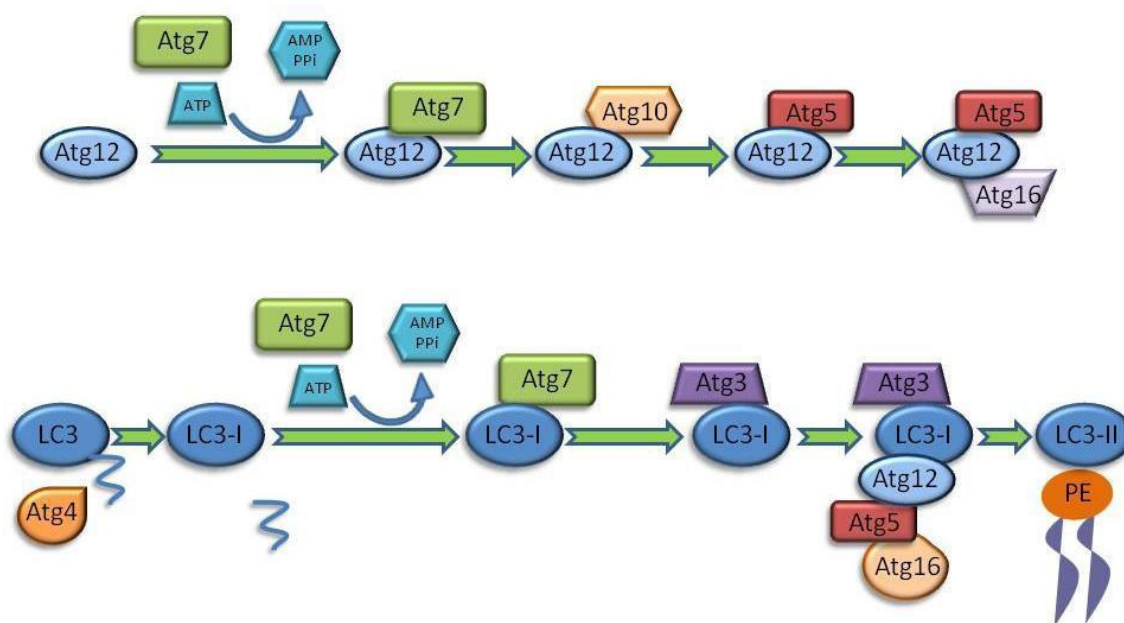
Aún no se comprende bien el mecanismo molecular de la nucleación, pero se sabe que es esencial la activación de un complejo que contiene la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). En mamíferos existen tres PI3K diferentes, tipo I, II y III. Mientras que la PI3K-I inhibe la autofagia, la PI3K-III la induce. Para realizar su función de promoción de la autofagia, esta PI3K-III forma un complejo uniéndose a las proteínas Beclin-1 (homólogo de ATG6 en levaduras) y Vps15. Este complejo es regulado positivamente por las proteínas BRAMA, ATG14L, UVRAG y Bif1, y negativamente por la proteína antiapoptótica Bcl-2 del retículo endoplásmico, así como por la proteína Rubicon [288].

### 3. EXPANSIÓN:

Es el proceso en el que se produce un alargamiento o extensión de la membrana de aislamiento. Cuando se fusionan los extremos de esta vesícula en expansión, el contenido citoplasmático a degradar queda encerrado en una vesícula de doble membrana que recibe el nombre de autofagosoma (figura 20).

Para que este proceso pueda llegar a producirse es necesaria la conjugación de la proteína LC3 (homólogo de ATG8 en levaduras) a la membrana del autofagosoma en formación. La lipidación de la proteína LC3 por una fosfatidiletanolamina (PE) de la membrana autofagosomal consta de dos pasos en los que están implicadas varias proteínas ATG. Estos pasos precisan unos sistemas de conjugación similares al que media en la conjugación de la ubiquitina con sus sustratos.

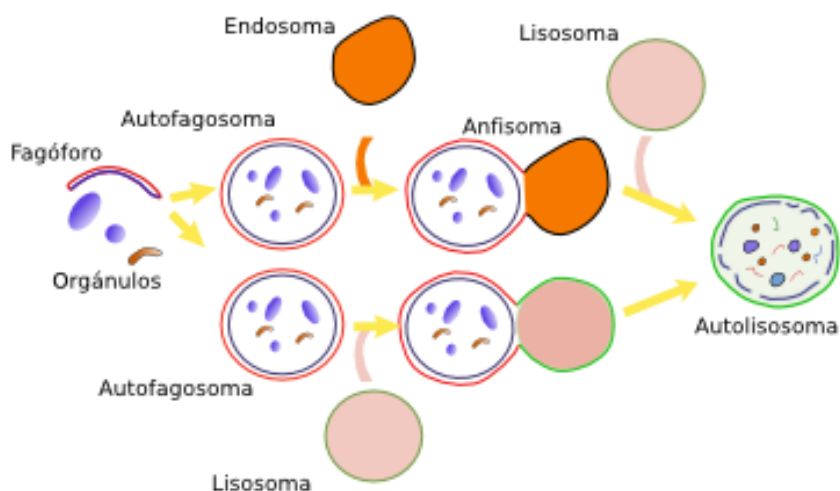
- PASO 1: en esta primera fase, ATG7, enzima con actividad tipo  $E_1$ , activa a ATG12 y la transfiere a ATG10, enzima con actividad tipo  $E_2$ , que permite la unión covalente de ATG12 con ATG5. Posteriormente, el conjugado ATG5-ATG12 se asocia no-covalentemente con ATG16.
- PASO 2: en la segunda parte de la reacción, la proteasa ATG4 escinde el extremo carboxilo-terminal de LC3, convirtiéndola en LC3-I. Entonces, nuevamente ATG7, enzima con actividad tipo  $E_1$ , activa a LC3-I y la transfiere a ATG3, enzima con actividad tipo  $E_2$ . En este momento, el trímero ATG5-ATG12-ATG16 formado en el primer paso y con actividad tipo  $E_3$  interviene mediando la conjugación de LC3-I con la PE del autofagosoma, resultando así la forma final LC3-II, necesaria para completar el proceso de expansión.



**Figura 19:** Sistema de conjugación de la proteína LC3 a la membrana lisosomal.

#### 4. FORMACIÓN DEL AUTOLISOSOMA O AUTOFAGOLISOSOMA:

Previamente a la formación del autofagolisosoma, el autofagosoma formado y en proceso de migración hacia los lisosomas se puede fusionar durante su desplazamiento con endosomas tardíos producto de la endocitosis celular, incorporando así a la ruta de degradación materiales extracelulares y recibiendo el nombre de anfisoma (figura 20) [289].



**Figura 20:** Esquema de las distintas fases de la autofagia. Modificado de *Klionsky et al. 2011* [271].

Posteriormente, la formación del autofagolisosoma (figura 20) se lleva a cabo mediante la fusión del autofagosoma/anfisoma con lisosomas que contienen las hidrolasas que degradan tanto la membrana interna del autofagosoma/anfisoma como su contenido.

Los aminoácidos y los fosfolípidos producto de la degradación son liberados al citoplasma a través de proteínas permeasas (transportadores lisosomales de aminoácidos SLC36A4/LYAAT 1 y 2) localizadas en la membrana del autofagolisosoma para ser reciclados [290]. Por el contrario, cuando no se necesita reutilizar la carga degradada (por ejemplo, cuando se trata de una bacteria o material tóxico) se secreta al espacio extracelular.

Hasta el momento se han identificado diferentes moléculas reguladoras de la maduración del autofagosoma/anfísoma y de su fusión con el lisosoma, entre las que se incluyen UVRAG, Rubicon, presenilina-1, VCP (*valosin-containing protein*), y sintaxina-5, proteína del complejo SNARE [291-293]. ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) ha sido igualmente propuesto como un posible regulador de la fusión [294].

## 9.2.- FUNCIONES DE LA AUTOFAGIA

---

En organismos multicelulares, la disponibilidad de nutrientes y de factores de crecimiento está íntimamente relacionada con el tamaño de las células, el cual requiere de un balance entre la síntesis y la degradación de macromoléculas. Diversos estudios demuestran que la autofagia controla el tamaño de la célula [295]. En un estudio comparativo se observó que el crecimiento del hígado de ratones neonatos y de adultos depende de la tasa de recambio de proteínas más que de la síntesis *de novo* [296]. En el nematodo *C. elegans*, la disminución inducida de la autofagia genera organismos de menor tamaño sin disminuir el número de células [297]. Por tanto, modular la tasa de autofagia es una estrategia para regular el tamaño celular [298].

La autofagia regula también la proliferación celular. La falta de nutrientes o de factores de crecimiento incrementa la tasa basal de autofagia y favorece la degradación de proteínas de vida media larga para generar metabolitos que permitan compensar esa falta de nutrientes exógenos. En la mayoría de organismos, estas condiciones promueven que las células adopten un estado quiescente. Cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles, la autofagia se inhibe y las células continúan proliferando.

La autofagia favorece la estabilidad del genoma, por lo que se ha propuesto como un posible mecanismo protector en el desarrollo del cáncer [299]. La haploinsuficiencia de genes proautofágicos

como Beclin-1 se observa comúnmente en cánceres de ovario, mama y próstata. La autofagia protege también al genoma evitando rearrreglos cromosómicos, pues la pérdida de Beclin-1 interactúa en algunas situaciones con la proteína antiapoptótica Bcl2 y tiene un efecto supresor de la tumorigénesis [300].

La autofagia está igualmente implicada en situaciones de estrés en las cuales la célula tiene que reorganizarse, por ejemplo, en respuesta a la hipoxia o la alta temperatura o como defensa contra infecciones por microorganismos [301, 302].

Sin embargo, la autofagia tiene un papel dual ya que puede promover también la muerte celular cuando es inducida por ciertas señales estresantes, como el daño al DNA. Durante el desarrollo embrionario, se produce un tipo de muerte celular asociada a autofagia que se denomina muerte celular programada tipo II. Ocurre en la metamorfosis de los insectos, en la formación de los miembros en aves y en la formación del paladar en los mamíferos [303].

Desde hace varios años se ha observado que durante el envejecimiento la eficiencia de la autofagia disminuye, siendo esta la causa de que se acumulen macromoléculas y organelas dañadas, que a su vez provocan que diversas vías catabólicas disminuyan [304, 305]. Esto se debe a que la abundancia de proteínas esenciales para la macroautofagia disminuye con la edad. Asimismo, ocurren cambios en la membrana lisosomal que provocan inestabilidad en LAMP2, el receptor de la autofagia mediada por chaperonas, causando que también se reduzca su eficiencia. De igual manera, la función de los lisosomas disminuye con el envejecimiento en diversos organismos. Una característica común de las células envejecidas es la acumulación de un material indigerible conocido como lipofuscina, que se almacena en autofagosomas incapaces de fusionarse con los lisosomas [306].

### 9.3.- AUTOFAGIA Y PSEUDOEXFOLIACIÓN

---

El SPEX, como se ha expuesto anteriormente, es una enfermedad caracterizada por la producción y acumulación progresiva de un material fibrilar extracelular a nivel de las distintas estructuras y tejidos del globo ocular. Este material, de forma general, lo componen una serie de agregados nodulares formados por distintas fibras de naturaleza proteica y glicoproteica que se producirían de manera aberrante durante los procesos homeostáticos de mantenimiento, recambio y reparación de la matriz extracelular. Para que se produzca el acúmulo de este material aberrante formado tendría que coexistir, al menos teóricamente, un defecto en los distintos mecanismos celulares de control y aclaramiento de sustancias anómalas en el organismo.

El SPEX, como se ha expuesto de igual manera anteriormente, es una enfermedad relacionada con la edad. Lindberg lo definió por primera vez como una enfermedad que raramente aparece por debajo de los 55 años. Así mismo, todos los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento ponen de manifiesto esta relación entre el SPEX y la edad avanzada.

La autofagia es una de las principales rutas de degradación proteolítica intracelular, entre cuyas funciones se encuentra la eliminación de las proteínas alteradas acumuladas en las células durante el desarrollo y envejecimiento. Este mecanismo de *control de calidad* y protección celular se ve alterado y disminuido en su eficacia con la edad [305].

Hasta el momento, diferentes trabajos han estudiado la posibilidad de una relación entre el SPEX y distintos mecanismos moleculares que pudieran estar involucrados en la patogenia de la enfermedad: el sistema ubiquitina-proteasoma, los sistemas de defensa antioxidante, etc [251]. Sin embargo, actualmente no existe ninguna publicación que haya intentado encontrar una relación entre el desarrollo del SPEX y la presencia de variantes genéticas que pudieran provocar una alteración en los mecanismos de autofagia. Es por ello que en este trabajo se ha propuesto esa hipótesis, estudiando para

ello 4 SNP de distintos genes ATG y comparando su distribución en la población sana y en la población con SPEX.



# Hipótesis y Objetivos

---





## 1.- HIPÓTESIS

---

El proceso patológico del SPEX se caracteriza por la acumulación crónica de un material anormal de naturaleza fibrilar, resultado de una producción excesiva y/o una eliminación deficiente.

La proteína LOXL1 es una enzima implicada en los procesos de maduración de la matriz extracelular y en el mantenimiento y homeostasis de las fibras elásticas [11]. Estudios en poblaciones de distintos países han podido demostrar que determinados polimorfismos en el gen que codifica esta proteína afectan al normal metabolismo de la elastina y promueven los procesos fibróticos que acontecen en el SPEX, aunque esta asociación no ha sido aún estudiada en la población española.

Además, cada vez existen más evidencias de que las condiciones de estrés celular constituyen uno de los principales mecanismos involucrados en la fisiopatología del SPEX [251]. Estas mismas condiciones son factores que estimulan la respuesta autofágica como sistema de citoprotección encargado de eliminar los productos patológicos celulares originados por dicho estrés [301, 302]. De igual manera, los procesos de autofagia se ven disminuidos con el envejecimiento [304, 305], así como el SPEX es una enfermedad cuya prevalencia aumenta invariablemente con la edad [66]. Es por ello que una alteración de la respuesta autofágica secundaria a la presencia de polimorfismos en los principales genes reguladores de la autofagia podría provocar una alteración de este mecanismo catabólico que determinara una insuficiente eliminación del material de pseudoexfoliación y, por consiguiente, su acumulación.

## 2.- OBJETIVOS

---

### 2.1.- Objetivo general

---

- Determinar si variaciones en los genes que codifican la proteína LOXL1 y las proteínas implicadas en la autofagia pueden modificar el riesgo de desarrollar síndrome pseudoexfoliativo en una población española.

### 2.2.- Objetivos específicos

---

- Caracterizar clínicamente una serie de 100 pacientes diagnosticados de síndrome pseudoexfoliativo.
- Determinar la distribución de genotipos de distintos polimorfismos del gen LOXL1 en pacientes con síndrome pseudoexfoliativo y en individuos sanos.
- Determinar la distribución de genotipos de polimorfismos de distintos genes implicados en la autofagia en pacientes con síndrome pseudoexfoliativo y en individuos sanos.
- Correlacionar los genotipos con las características clínicas de los pacientes, con especial atención en la presencia/ausencia de glaucoma.

# Pacientes y Métodos

---





## 1.- PACIENTES

---

Para formar el grupo de casos de nuestro estudio se seleccionaron los pacientes diagnosticados de SPEX y GPEX en el Servicio de Oftalmología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca desde el 1 de Enero de 2012 hasta el 30 de Mayo de 2013 que cumplían los criterios de inclusión del estudio (anexo 1).

Se estudiaron un total de 100 pacientes, de los que 60 fueron diagnosticados de SPEX, mientras que 40 presentaban GPEX.

Se recogieron muestras de sangre periférica de todos los sujetos, previa firma del consentimiento informado correspondiente (anexo 2), siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

A todos los pacientes se les realizó una anamnesis y una exploración oftalmológica completa, en la que se incluía:

### 1.- Recogida de datos:

- Datos demográficos: edad y sexo.
- Antecedentes personales sistémicos y oftalmológicos.
- Tratamientos sistémicos y oftalmológicos.

### 2.- Exploración Oftalmológica:

- Toma de mejor agudeza visual corregida con escala ETDRS.
- Exploración oftalmológica detallada en la lámpara de hendidura del polo anterior, prestando especial atención a la presencia de material pseudoexfoliativo a nivel del reborde iridiano y otras

estructuras de la cámara anterior. Además, todos los pacientes fueron sometidos a dilatación pupilar mediante instilación tópica de tropicamida y/o fenilefrina para valorar la presencia de depósitos de material de pseudoexfoliación en la cápsula anterior del cristalino y estudiar la morfología del nervio óptico con lente de 90 dioptrías.

- Doble medición de PIO mediante tonometría de no contacto con CT80 de Topcon® y tonometría de aplanación con Perkins MK-II de Haag-Streit®.

### 3.- Pruebas Complementarias:

- Tomografía de coherencia óptica con Stratus OCT de Zeiss® de la papila de ambos ojos. Se utilizaron los análisis *RNFL Thickness* y *Fast Optic Disc* que permiten cuantificar el grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina (*RNFL Thickness Average Analysis*) y establecer un cálculo de la excavación del disco óptico (*Optic Nerve Head Analysis*).
- Campimetría computerizada con Humphrey Visual Field Analyser 750 de Zeiss®. Se realizó una prueba central 30-2 con estrategia *SITA standar* de ambos ojos.



## 2.- CONTROLES

---

Para formar el grupo control se seleccionaron 90 sujetos incluidos en la lista de espera de catarata del Servicio de Oftalmología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca que cumplieran los criterios de inclusión acordados para el estudio (anexo1), con un rango de edad y sexo similar al del grupo de pacientes.

Todos los controles seleccionados habían sido sometidos a una exhaustiva exploración oftalmológica previa, descartándose cualquier tipo de patología ocular, salvo el desarrollo de catarata quirúrgica.

Se recogieron muestras de sangre periférica de todos los controles, previa firma del consentimiento informado correspondiente (anexo 2), siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

### 3.- DISEÑO DEL ESTUDIO

---

Se ha realizado un estudio analítico observacional prospectivo de casos y controles.

En cada uno de los genes del estudio se analizó un polimorfismo por cambio de un solo nucleótido (SNP), salvo en el caso del gen LOXL1 en el que se analizaron tres SNP diferentes.

## 4.- MÉTODOS

---

### 4.1.- AISLAMIENTO DEL DNA DE ALTO PESO MOLECULAR

---

#### 4.1.1.- Obtención de muestras de sangre periférica

Se obtuvieron 10ml de sangre periférica mediante venopunción antecubital y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

#### 4.1.2.- Obtención de células mononucleadas de sangre periférica

Las células nucleadas de la sangre se aislaron mediante lisis eritrocitaria con solución hipotónica y centrifugación repetida (centrifugación de la sangre total en 50ml de ddH<sub>2</sub>O durante 30 minutos, 1500rpm, a 4°C).

Tras la recuperación de la interfase, las células mononucleadas se lavaron en tampón Fornace (0,25M Sacarosa; 50mM Tris-HCL pH 7,5; 25mM KCL; 5mM MgCl<sub>2</sub>), que aporta la osmolaridad necesaria para evitar la lisis leucocitaria, y se precipitaron mediante centrifugación a 580g durante 20 minutos. El botón de células nucleadas obtenido se resuspendió de nuevo en tampón Fornace a una concentración estimada de 5x10<sup>6</sup> células/ml, tras lo cual la mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas. Tras la incubación, se procedió a purificar el DNA con fenol y cloroformo.

#### 4.1.3.- Aislamiento del DNA total de alto peso molecular

A la muestra obtenida en el paso anterior se añadió EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético, concentración final 10mM) que posibilita la inactivación de las nucleasas, SDS (Dodecil sulfato sódico, concentración final 1%) para romper las membranas celulares y Proteinasa K (*Boehringer Mannheim*,

concentración final 50µg/ml) para degradar las proteínas. Esta mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

#### 4.1.4.- Purificación del DNA

Tras la incubación anterior, se purificó el DNA mediante extracción con fenol-CIAA (cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 v/v) y se centrifugó durante 10 minutos a 1800rpm.

Se recuperó la fase acuosa sobrenadante superior que contenía el DNA en solución, evitando la interfase proteica, y se añadió el mismo volumen obtenido de fenol-CIAA. Se centrifugó nuevamente a 1800rpm durante 10 minutos.

Una vez recuperada de nuevo la fase acuosa, el DNA en solución se precipitó mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto al 100% frío (-20°C). El DNA extraído se lavó con etanol al 70% y, tras una breve centrifugación a 16600g, se dejó evaporar el etanol residual y se disolvió el DNA en 200µl de ddH<sub>2</sub>O estéril.

#### 4.1.5.- Cuantificación del DNA

La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA así obtenido se estiman tras medir su absorbancia a 260 y 280nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático Nanodrop ND2000 (*Thermo Fischer Scientific*) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de DNA/mL} = (\text{D.O.}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

*DO: densidad óptica*

*50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50 µg de DNA/mL*

El cociente  $D.O_{.260}/D.O_{.280}$  se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1,65 y 2,0. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del DNA. Valores superiores parecen indicar un exceso de RNA, el cual se elimina tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando nuevamente según el método anteriormente descrito.

La muestra de DNA obtenida, con una concentración aproximada de 1000-1500  $\mu\text{g/ml}$ , se almacenó en tubos Eppendorf® a  $-20^{\circ}\text{C}$ , con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación por microorganismos.

#### **4.2.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

---

Las reacciones de amplificación se realizaron con los productos comerciales PCR SuperMix (*Gibco-BRL*) y PCR MasterMix (*Promega*) y se emplearon entre 1  $\mu\text{l}$  y 4  $\mu\text{l}$  de la mezcla de los dos oligonucleótidos flanqueantes (sentido:*forward* y anti-sentido:*reverse*) y 1  $\mu\text{l}$  del DNA obtenido por el método anteriormente descrito a concentración 0,1-0,2  $\mu\text{g/ml}$ .

Para asegurar que no existía contaminación, se preparó como control una reacción conteniendo todos los reactivos antes citados excepto el DNA molde.

Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador automático (*Life Technologies-Invitrogen*) y la manipulación post-PCR se llevó a cabo en un laboratorio distinto de donde se realizó el aislamiento del DNA y se preparó la reacción de amplificación.

#### 4.3.- DISCRIMINACIÓN ALELICA DE POLIMORFISMOS

Se emplearon dos métodos para la discriminación alélica de los SNP a estudio.

##### 4.3.1.- Discriminación alélica mediante digestión con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas capaces de reconocer una secuencia específica de nucleótidos dentro de una molécula de DNA y escindir la cadena de DNA en ese punto concreto, llamado sitio o diana de restricción. El estudio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction fragment length polymorphism* o *RFLP*) es una técnica que permite discriminar distintos alelos de un gen analizando el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del DNA con enzimas de restricción.

Las digestiones se llevaron a cabo incubando 10  $\mu$ l del producto de PCR con 1  $\mu$ l de la endonucleasa de restricción seleccionada, *Sma*I (*Fermentas*), utilizando un tampón de digestión específico para la endonucleasa durante 6 horas a una temperatura de 30°C. Posteriormente, las muestras incubadas se colocaron en un termociclador en el que las se sometió al siguiente proceso (tabla 6):

**Tabla 6:** Fases realizadas por el termociclador para la digestión por *Sma*I.

Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	52°C	5 minutos	Desnaturalización
45	94°C	30 segundos	Desnaturalización
	55°C	1 minuto	Anillamiento
	72°C	1 minuto	Extensión
1	72°C	7 minutos	Extensión

Los fragmentos obtenidos tras la digestión fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% (*Gel Company Inc.*), preparados con tampón TBE (Tris 0,044M, ác. bórico 0,044M, EDTA 1mM, pH 8,3) y teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (*Life Technologies-Invitrogen*). La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 30 minutos.

Para monitorizar la migración del DNA en el gel se incluyeron dos colorantes en la solución digerida de carga: xileno-cianol (*Bio-Rad*) y azul de bromofenol (*Bio-Rad*). En todos los geles se incluyó un marcador de tamaño, correspondiente con el DNA del fago  $\Phi$ X-174 cortado con la endonucleasa *HaellI*.

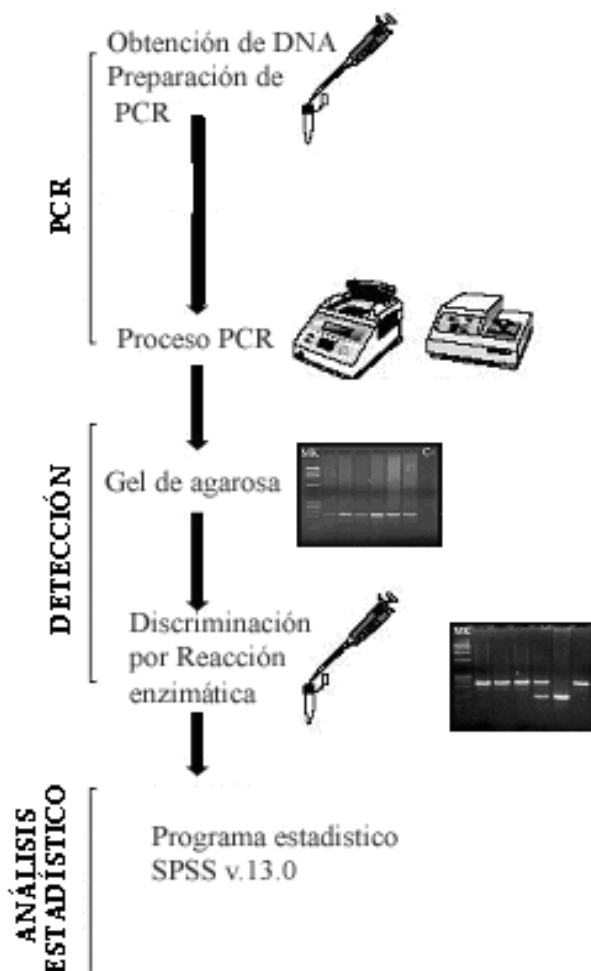


Figura 21: Discriminación alélica mediante digestión con endonucleasas de restricción.

Tras la electroforesis, los fragmentos se visualizaron en el gel de agarosa gracias a SYBR® Safe, que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz ultravioleta (254nm). Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC40) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (Kodak Digital Science 1D) (figura 21).

#### 4.3.1.1.- Análisis del polimorfismo rs1048661 (R141L) en el gen LOXL1

El gen que codifica la enzima LOXL1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 15, localización 15q24.1. El polimorfismo rs1048661 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de arginina (R) por leucina (L) en la posición 141 (R141L) del extremo N-terminal de la proteína. La secuencia de nucleótidos reconocida por la endonucleasa *Sma*I (figura 22) hace que se generen distintos fragmentos de DNA dependiendo de la secuencia génica de cada individuo.

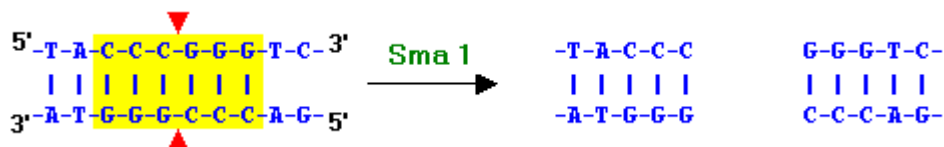


Figura 22: Secuencia reconocida por la enzima *Sma*I.

Los genotipos generados por este polimorfismo son (figura 23):

- Genotipo T/T: (homocigoto): tres fragmentos de 395, 226 y 130 pares de bases (pb)
- Genotipo G/G (homocigoto): cuatro fragmentos de 226, 201, 194 y 130 pb
- Genotipo G/T (heterocigoto): cinco fragmentos de 395, 226, 201, 194 y 130 pb



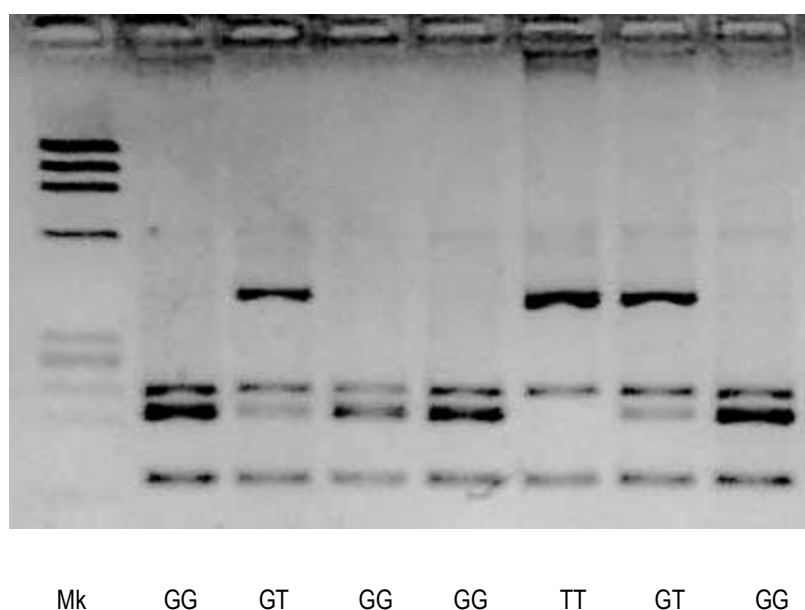


Figura 23: Genotipos del polimorfismo rs1048661 de LOXL1 (Mk: marcador).

#### 4.3.2.- Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan

En la PCR con sondas TaqMan los procesos de amplificación del DNA y detección alélica se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna reacción posterior.

Mediante detección por fluorescencia durante el proceso de amplificación se puede medir la cantidad de DNA sintetizado, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es directamente proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar la cinética de la reacción de amplificación en cada momento [307]. Los termocicladores que llevan a cabo la PCR con sondas Taqman incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con sondas Taqman pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. En nuestro

estudio se han empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos para la discriminación alélica: un donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM.

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, la DNA polimerasa *Taq*, que tiene actividad 5'exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose así la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 24).

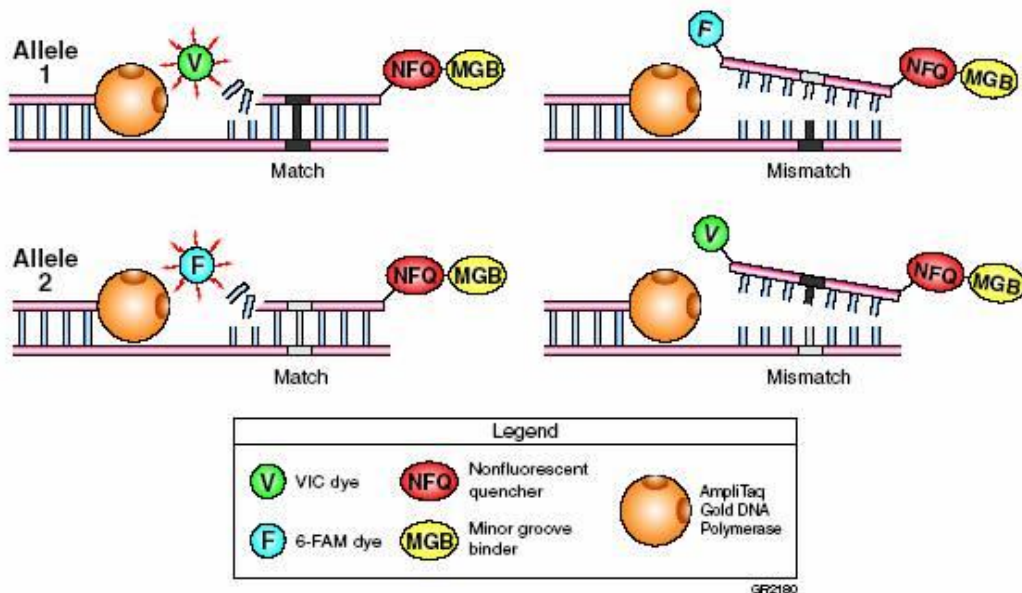


Figura 24: Mecanismo de la PCR con sondas Taqman.

El incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de la fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Nuestro estudio se realizó en un termociclador de Applied Biosystems® que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados (figura 25).

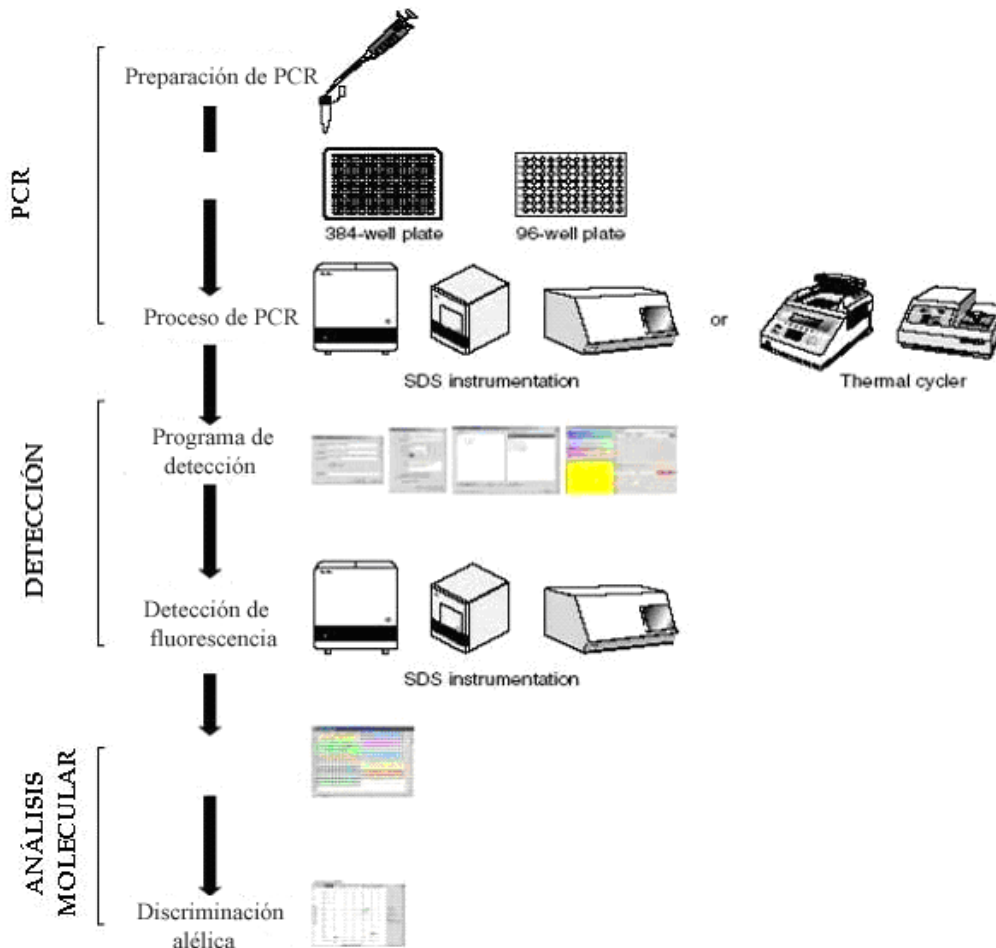


Figura 25: Discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en el termociclador automático StepOne Real-Time PCR de Applied Biosystems®, siguiendo el mismo esquema para los distintos SNP:

a) *Realización del sustrato:*

En una placa de 96 celdas, se pone como sustrato en cada una de ellas:

- 5 µl del compuesto comercial PCR Taqman®, que proporciona la enzima necesaria para la amplificación, la DNA polimerasa *Taq*.
- 0,25 µl del compuesto comercial que contiene el oligonucleótido cebador primer “forward”, el oligonucleótido cebador primer “reverse” y las sondas marcadas con fluorocromo de VIC y FAM.
- 4,25 µl de agua destilada.
- 0,5 µl = 5 ng de DNA (concentración 10-20 µg/ml).

Como control se rellenan cuatro celdillas de cada placa con el mismo sustrato sin DNA.

b) *Fases del programa:*

Se coloca la placa realizada en el citado termociclador de Applied Biosystems®, en el que las muestras se someten al siguiente proceso (tabla 7):

**Tabla 7:** Fases realizadas por el StepOne Real-Time PCR de Applied Biosystems®.

Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	50°C	3 minutos	Desnaturalización
30	92°C	30 segundos	Desnaturalización
	60°C	30 segundos	Anillamiento
	72°C	1 minuto	Extensión
1	72°C	10 minutos	Extensión

c) *Análisis:*

Se realiza un análisis de la detección de fluorescencia que nos da una representación gráfica en la que se muestran los resultados de la discriminación alélica realizada y su distribución en nuestro grupo de pacientes y controles.

#### 4.3.2.1.- Análisis de polimorfismos en el gen LOXL1

El gen que codifica la enzima LOXL1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 15, localización 15q24.1. Se llevó a cabo el estudio de dos SNP diferentes de este gen:

El polimorfismo rs3825942 de LOXL1 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de glicina (G) por ácido aspártico (D) en la posición 153 (G153D) del extremo N-terminal de la proteína.

Para la realización de PCR a tiempo real se emplearon como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

5' TCCGTCTCCCAGCAACGGCACGGGG 3'  
5' CTCCGCCTCCTCGGTCTCGGCTTCG 3'

Las sondas marcadas con fluorocromos utilizadas fueron:

**VIC:** GGGG**A**CTCC  
**FAM:** GGGG**G**CTCC

El polimorfismo rs2165241 de LOXL1 es un SNP intrónico que no provoca cambios en la secuencia de la proteína.

Para la realización de la PCR a tiempo real se emplearon como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

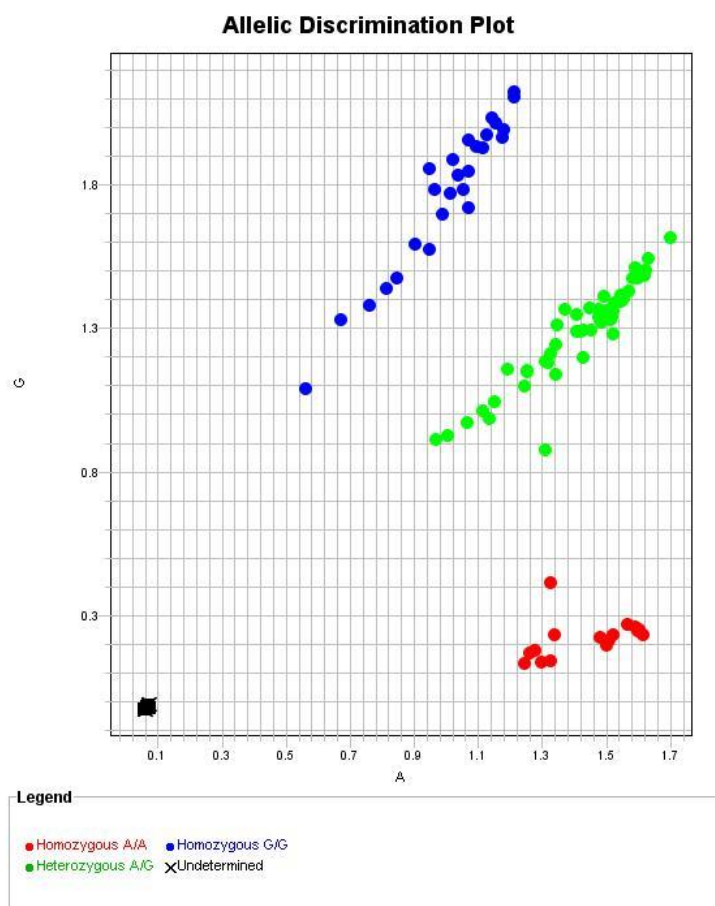
5' AACTGAGCTCTCAAATGCCACAATA 3'  
5' TGGCAGAGGCATGCCTGGGACTTGG 3'

Las sondas marcadas con fluorocromos utilizadas fueron:

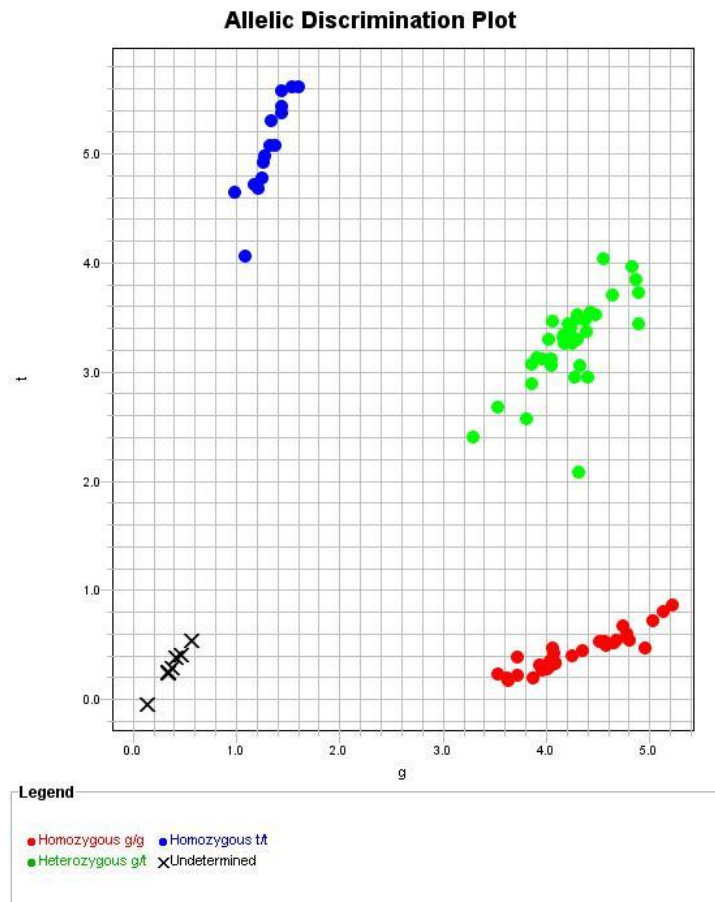
**VIC:** AATA**G**TGGC

**FAM:** AATA**T**TGGC

La reacción de amplificación y la posterior discriminación alélica para ambos SNP se realizó en el termociclador automático StepOne Real-Time PCR de Applied Biosystems® de acuerdo al esquema ya explicado (ver 4.3.2.), obteniendo la configuración alélica de los grupos control y paciente para ambos polimorfismos (figuras 26 y 27).



**Figura 26:** Representación gráfica de la distribución alélica del SNP rs3825942 del gen LOXL1 en el grupo control.



**Figura 27:** Representación gráfica de la distribución alélica del SNP rs2165241 del gen LOXL1 en el grupo de pacientes.

#### 4.3.2.2.- Análisis del polimorfismo rs2241880 en el gen ATG16L1

El gen que codifica ATG16L1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2, localización 2q37.1. El polimorfismo rs2241880 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de treonina (T) por alanina (A) en la posición 300 (T300A) del extremo N-terminal de la proteína.

Para la realización de PCR a tiempo real empleamos como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

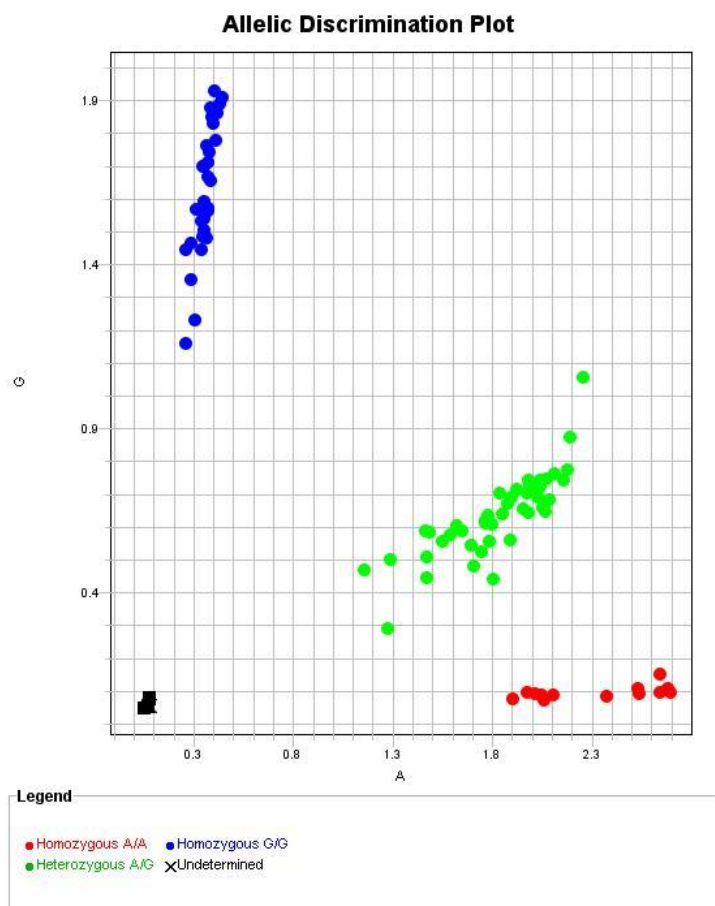
5' CCCAGTCCCCCAGGACAATGTGGAT 3'  
 5' CTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGT 3'

Las sondas marcadas con fluorocromos utilizadas fueron:

**VIC:** GGATACTCA

**FAM:** GGATGCTCA

Tras la reacción de amplificación y la posterior discriminación alélica, se obtuvo la correspondiente configuración alélica de los grupos control y paciente (figura 28).

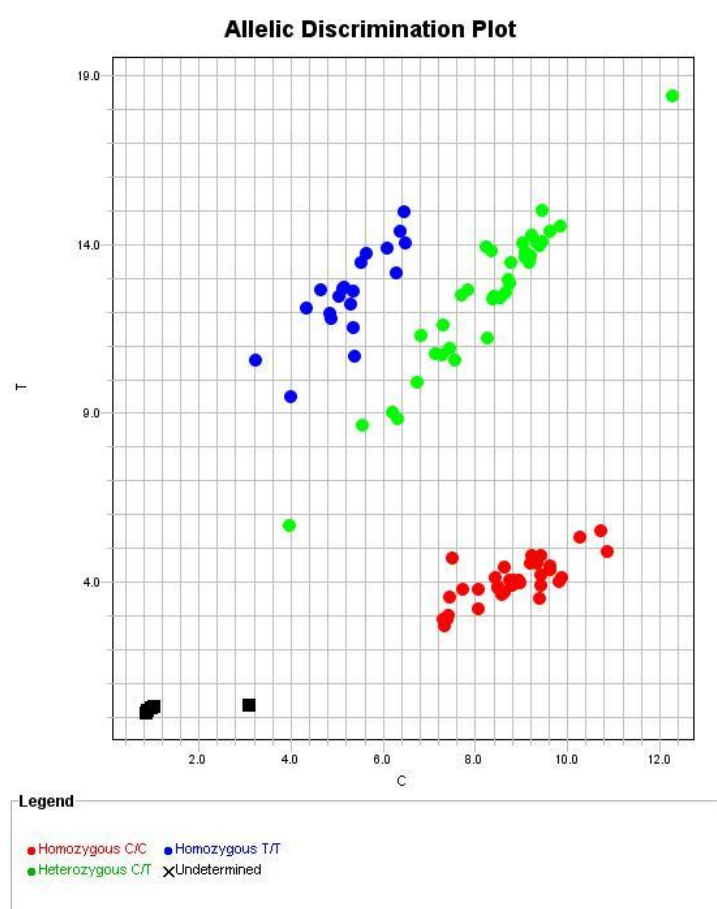


**Figura 28:** Representación gráfica de la distribución alélica del SNP rs2241880 del gen ATG16L1 en el grupo control.



#### 4.3.2.3.- Análisis del polimorfismo rs1864183 en el gen ATG10

El gen que codifica ATG10 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 5, localización 5q14.2. El polimorfismo rs1864183 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de treonina (T) por metionina (M) en la posición 212 (T212M) del extremo N-terminal de la proteína.



**Figura 29:** Representación gráfica de la distribución alélica del SNP rs1864183 del gen ATG10 para el grupo control.

Para la realización de PCR a tiempo real empleamos como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

5' CTACCTCTGAGTTATGCCAAAGCAA 3'  
5' GTCTCAGGATGAACGAAATGTCCCT 3'

Las sondas marcadas con fluorocromos utilizadas fueron:

**VIC:** GCAACGTCT

**FAM:** GCAATGTCT

Tras la reacción de amplificación y la posterior discriminación alélica, se obtuvo la correspondiente configuración alélica de los grupos control y paciente (figura 29).

#### 4.3.2.4.- Análisis del polimorfismo rs3759601 en el gen ATG2B

El gen que codifica ATG2B se encuentra en el brazo largo del cromosoma 14, localización 14q32.2. El polimorfismo rs3759601 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de glutamina (Q) por ácido glutámico (E) en la posición 1383 (Q1383E) del extremo N-terminal de la proteína.

Para la realización de PCR a tiempo real empleamos como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

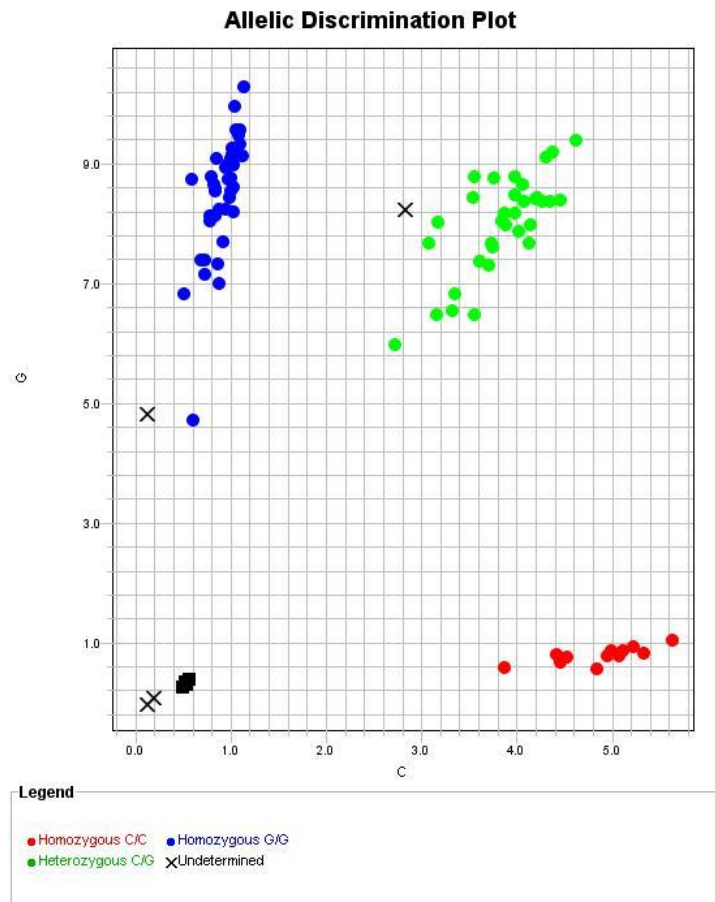
5' GCTGACTGTACCTTAGACCTTCTTT 3'  
5' AAAGGCTCCAGGCTTCATATCTGCC 3'

Las sondas marcadas con fluorocromos utilizadas fueron:

**VIC:** CTTTCAAAG

**FAM:** CTTTGAAAG

Tras la reacción de amplificación y la posterior discriminación alélica, se obtuvo la correspondiente configuración alélica de los grupos control y paciente (figura 30).



**Figura 30:** Representación gráfica de la distribución alélica del SNP rs3759601 d ATG2B para el grupo de pacientes.

#### 4.3.2.5.- Análisis del polimorfismo rs2245214 en el gen ATG5

El gen que codifica ATG5 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6, localización 6q21. El polimorfismo rs2245214 es un SNP intrónico que no provoca cambios en la secuencia de la proteína.

Para la realización de PCR a tiempo real empleamos como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

5' ATTTTATATGAACTTATCAGTAGA 3'

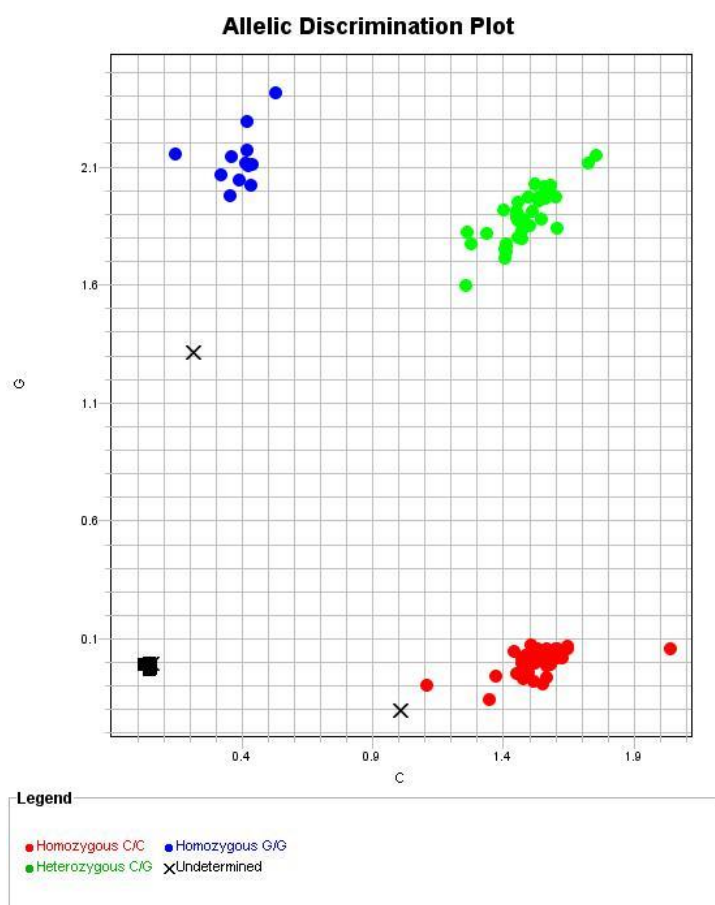
5' TAGCCAAAAAAGAAGCTTCATATAA 3'

Las sondas marcadas con fluorocromos utilizadas fueron:

**VIC:** TAGA**C**TAGC

**FAM:** TAGA**G**TAGC

Tras la reacción de amplificación y la posterior discriminación alélica, se obtuvo la correspondiente configuración alélica de los grupos control y paciente (figura 31).



**Figura 31:** Representación gráfica de la distribución alélica del SNP rs2245214 del gen ATG5 para el grupo control.

## 5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables recogidas en el estudio. Las variables continuas se describieron en términos de tendencia central y las variables categóricas u ordinales mediante frecuencias y porcentajes.

Antes de realizar el análisis de asociación se comprobó si los distintos polimorfismos cumplían el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles, como representantes de la población general.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los grupos se analizaron con el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson, expresando la magnitud de la asociación mediante la Odds ratio (OR) y su precisión mediante el intervalo de confianza de la OR. En todos los casos se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se obtenían valores de  $p < 0,05$ .

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (versión 17.0; *SPSS Inc.*, Chicago, IL).

## 6.- ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

---

El estudio fue presentado y aceptado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Todas las muestras se obtuvieron, previa firma del consentimiento informado correspondiente (anexo2), siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Se tuvieron presentes en todo momento los principios expuestos en la Declaración de Helsinki (*Asociación Médica Mundial, 59ª Asamblea General, Corea, 2008*) para la investigación médica en seres humanos.

# Resultados

---







## 1.- DATOS DEMOGRÁFICOS

---

### 1.1.- PACIENTES

---

Para la realización de nuestro trabajo hemos estudiado un total de 190 individuos procedentes del Servicio de Oftalmología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, distribuidos en dos grupos (figura 32):

1. Un grupo **control** de 90 individuos sanos.
2. Un grupo de **casos** de 100 individuos que presentaban pseudoexfoliación. Este grupo lo hemos dividido a su vez en dos subgrupos: los sujetos con SPEX (60) y los sujetos con GPEX (40).

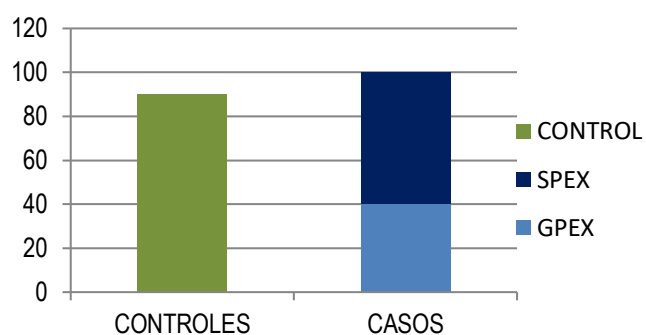


Figura 32: Distribución de los grupos de la muestra.

### 1.2.- EDAD Y SEXO

---

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de sexo ni edad entre el grupo control y el grupo de pacientes (tabla 8), ni entre los subgrupos de pacientes con SPEX y GPEX (tabla 9).

**Tabla 8:** Edad y sexo de los casos y el grupo control, y análisis estadístico de las diferencias entre ambos grupos.

	<b>CASOS (n=100)</b>	<b>CONTROLES (n=90)</b>	<b>p</b>
<b>EDAD (años±DS)</b>	74,6 ± 7,5	76,5 ± 8,2	<b>0,09</b>
<b>SEXO</b>	47 hombres (47%) 53 mujeres (53%)	52 hombres (58%) 38 mujeres (42%)	<b>0,13</b>

**Tabla 9:** Edad y sexo de los pacientes con SPEX y GPEX, y análisis estadístico de las diferencias entre ambos grupos.

	<b>SPEX (n=60)</b>	<b>GPEX (n=40)</b>	<b>p</b>
<b>EDAD (años±DS)</b>	73,9 ± 7,91	75,5 ± 7,79	<b>0,32</b>
<b>SEXO</b>	25 hombres (42%) 35 mujeres (58%)	11 hombres (27%) 29 mujeres (73%)	<b>0,15</b>

### 1.3.- ENFERMEDADES SISTÉMICAS Y HÁBITOS TÓXICOS

---

Se realizó un análisis de los antecedentes sistémicos de los individuos del estudio en el que incluimos las enfermedades y los hábitos tóxicos más frecuentes que suponen un factor de riesgo cardiovascular. Tras analizar dichos factores en los grupos de casos y controles y en los subgrupos de enfermedad, SPEX y GPEX, comprobamos una distribución homogénea de los mismos entre los distintos grupos (tablas 10-17).

**Tabla 10:** Distribución de la presencia de HTA en el grupo de casos comparado con el grupo control.

HTA			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>CASOS</b>	55 (55%)	45 (45%)	<b>0,59</b>
<b>CONTROLES</b>	46 (51,1%)	44 (48,9%)	

**Tabla 11:** Distribución de la presencia de DM en el grupo de casos comparado con el grupo control.

DM			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>CASOS</b>	18 (18%)	82 (82%)	<b>0,36</b>
<b>CONTROLES</b>	21 (23,3%)	69 (76,7%)	

**Tabla 12:** Distribución de la presencia de hipercolesterolemia en el grupo de casos comparado con el grupo control.

HIPERCOLESTEROLEMIA			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>CASOS</b>	20 (20%)	80 (80%)	<b>0,36</b>
<b>CONTROLES</b>	23 (25,6%)	67 (74,4%)	

**Tabla 13:** Distribución de la presencia de hábito tabáquico en el grupo de casos comparado con el grupo control.

TABACO			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>CASOS</b>	16 (16%)	84 (84%)	<b>0,74</b>
<b>CONTROLES</b>	16 (17,8%)	74 (82,2%)	

**Tabla 14:** Distribución de la presencia de HTA en el grupo de SPEX comparado con el grupo de GPEX.

HTA			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>SPEX</b>	32 (53,3%)	28 (46,7%)	<b>0,68</b>
<b>GPEX</b>	23 (57,5%)	17 (42,5%)	

**Tabla 15:** Distribución de la presencia de DM en el grupo de SPEX comparado con el grupo de GPEX.

DM			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>SPEX</b>	11 (18,3%)	49 (81,7%)	<b>0,92</b>
<b>GPEX</b>	7 (17,5%)	33 (82,5%)	

**Tabla 16:** Distribución de la presencia de hipercolesterolemia en el grupo de SPEX comparado con grupo de GPEX.

HIPERCOLESTEROLEMIA			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>SPEX</b>	13 (21,7%)	47 (78,3%)	<b>0,61</b>
<b>GPEX</b>	7 (17,5%)	33 (82,5%)	

**Tabla 17:** Distribución de la presencia de hábito tabáquico en el grupo de SPEX comparado con el grupo de GPEX.

TABACO			
	SI	NO	<i>p</i>
<b>SPEX</b>	10 (16,7%)	50 (83,3%)	<b>0,82</b>
<b>GPEX</b>	6 (15%)	34 (85%)	

## 2.- ESTUDIO GENÉTICO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA PSEUDOEXFOLIACIÓN

### 2.1.- ESTUDIO DEL GEN LOXL1

Este gen es uno de los componentes de la familia lixil-oxidasa y codifica una enzima que tiene un papel esencial en la correcta formación del tejido conectivo. Se han descrito diferentes variantes transcripcionales que codifican distintas isoformas de la proteína y se ha demostrado su implicación en el desarrollo de la pseudoexfoliación en diversas poblaciones. En nuestro trabajo hemos incluido los tres SNP de LOXL1 más estudiados hasta el momento (tabla 18).

**Tabla 18:** SNP de LOXL1 estudiados en este trabajo.

GEN	SNP	Localización Cromosómica	Región Génica	Cambio en el DNA	Cambio en la Proteína
LOXL1	rs1048661	15q24.1	Exón 1	G>T	Arg141Leu
LOXL1	rs3825942	15q24.1	Exón 1	A>G	Gly153Asp
LOXL1	rs2165241	15q24.1	Intrón 1	C>T	---

## LOXL1 (rs3825942)

El polimorfismo rs3825942 de LOXL1 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de glicina (G) por ácido aspártico (D) en la posición 153 (G153D) del extremo N-terminal de la proteína y que determina la aparición de tres genotipos diferentes: AA, AG y GG.

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas del grupo de pacientes y el grupo control para este polimorfismo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = <0,001$ ), con una Odds ratio de 5,71 (tabla 19), definiéndose de esta manera el alelo G como alelo de riesgo para padecer la enfermedad.

**Tabla 19:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs3825942 en casos y controles.

LOXL1 rs3825942				
ALELO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)
A	6 (3%)	27 (15%)	<b>&lt;0,001</b>	<b>5,71</b> (2,30-14,17)
G	194 (97%)	153 (85%)		
GENOTIPO				
AA	1 (1%)	3 (3,3%)	<b>&lt;0,001</b>	
AG	4 (4%)	21 (23,3%)		
GG	95 (95%)	66 (73,3%)		
AA	1 (1%)	3 (3%)	0,26	
AG + GG	99 (99%)	87 (97%)		
AA + AG	5 (5%)	24 (27%)	<b>&lt;0,001</b>	<b>6,91</b> (2,51-19,03)
GG	95 (95%)	66 (73%)		

Al comparar la distribución de las frecuencias genotípicas, comprobamos que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = <0,001$ ), pudiéndose observar una proporción significativamente mayor del genotipo GG en el grupo de pacientes (tabla 19).

Al realizar el análisis comparativo de las distribuciones genotípicas agrupando a los sujetos que presentan el alelo A en sus dos formas homocigótica y heterocigótica (AA y GA), respecto a los homocigotos para el alelo G (GG), observamos una significación estadística ( $p = <0,001$ ), siendo la presencia del alelo A muy minoritaria en el grupo de pacientes, con una Odds ratio de 6,91 (tabla 19), lo que permite definir el genotipo GG como el genotipo de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

En la comparación de la distribución genotípica agrupando a los sujetos que presentan el alelo G (GG y GA) frente a los homocigotos para el alelo A (AA), no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,26$ ) (tabla 19), lo que nos lleva a concluir que este genotipo AA no jugaría, en principio, ningún papel de riesgo o protección frente a la enfermedad.

Cuando comparamos la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo rs3825942 de los sujetos que presentan SPEX respecto a los que han desarrollado GPEX, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 20).

**Tabla 20:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs3825942 en SPEX y GPEX.

LOXL1 rs3825942			
ALELO	GPEX n (%)	SPEX n (%)	<i>p</i>
A	3 (4%)	3 (2%)	0,61
G	77 (96%)	117 (98%)	
GENOTIPO			
AA	0 (0%)	1 (2%)	0,25
AG	3 (8%)	1 (2%)	
GG	37 (92%)	58 (96%)	
AA AG + GG	0 (0%) 40 (100%)	1 (2%) 59 (98%)	0,41
AA + AG GG	3 (8%) 37 (92%)	2 (4%) 58 (96%)	0,35



**LOXL1 (rs2165241)**

El polimorfismo rs2165241 de LOXL1 es un SNP intrónico que no provoca cambios en la secuencia de la proteína y que determina la aparición de tres genotipos: CC, CT y TT.

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas del grupo de pacientes y el grupo control para este polimorfismo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = <0,001$ ), con una Odds ratio de 2,19 (tabla 21), definiéndose de esta manera el alelo T como alelo de riesgo para padecer la enfermedad.

**Tabla 21:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs2165241 en casos y controles.

LOXL1 rs2165241				
ALELO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)
C	59 (29%)	86 (48%)	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,19</b> <b>(1,43-3,33)</b>
T	141 (71%)	94 (52%)		
GENOTIPO				
CC	8 (8%)	24 (27%)	<b>0,001</b>	
CT	43 (45%)	38 (42%)		
TT	49 (47%)	28 (31%)		
CC	8 (8%)	24 (27%)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,24</b> <b>(0,10-0,57)</b>
CT + TT	92 (92%)	66 (73%)		
CC + CT	51 (51%)	62 (69%)	<b>0,01</b>	<b>2,13</b> <b>(1,17-3,85)</b>
TT	49 (49%)	28 (31%)		

Al comparar las distribución de las frecuencias genotípicas, comprobamos igualmente que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = 0,001$ ), pudiéndose observar una proporción significativamente mayor del genotipo CC en el grupo de controles que en el de enfermos (tabla 21).

Al realizar el análisis comparativo de las distribuciones genotípicas agrupando a los sujetos que presentan el alelo T en sus dos formas homocigótica y heterocigótica (TT y CT) respecto a los homocigóticos para el alelo C (CC), observamos una significación estadística ( $p = <0,001$ ), con una Odds ratio de 0,24 (tabla 21), lo que permite determinar un papel protector del genotipo homocigótico CC frente al desarrollo de la enfermedad.

De igual manera, en la comparación de la distribución genotípica agrupando a los sujetos que presentan el alelo C (CC y CT) frente a los homocigotos para el alelo T (TT), observamos una significación estadística ( $p = 0,01$ ), con una Odds ratio de 2,13 (tabla 21), lo que demuestra que ser portador del genotipo TT confiere un aumento del riesgo en el desarrollo de la enfermedad.

Cuando comparamos la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo rs2165241 de los sujetos que presentan SPEX respecto a los que han desarrollado GPEX, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 22).

**Tabla 22:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs2165241 en SPEX y GPEX.

LOXL1 rs2165241			
ALELO	GPEX n (%)	SPEX n (%)	<i>p</i>
C	18 (23%)	41 (34%)	0,08
T	62 (77%)	79 (66%)	
GENOTIPO			
CC	2 (5%)	6 (10%)	0,18
CT	14 (35%)	29 (48%)	
TT	24 (60%)	25 (42%)	
CC	2 (5%)	6 (10%)	0,37
CT + TT	38 (95%)	54 (90%)	
CC + CT	16 (40%)	35 (58%)	0,07
TT	24 (60%)	25 (42%)	

**LOXL1 (rs1048661)**

El polimorfismo rs1048661 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de arginina (R) por leucina (L) en la posición 141 (R141L) del extremo N-terminal de la proteína y que determina la aparición de tres genotipos diferentes: GG, GT y TT.

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas del grupo de pacientes y el grupo control para este polimorfismo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,19$ ) (tabla 23).

Al comparar la distribución de las frecuencias genotípicas, comprobamos igualmente que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p = 0,10$ ) (tabla 23).

**Tabla 23:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs1048661 en casos y controles.

LOXL1 rs1048661				
ALELO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)
G	155 (77%)	129 (72%)	0,19	
T	45 (23%)	51 (28%)		
GENOTIPO				
GG	57 (57%)	47 (52%)	0,10	
GT	41 (41%)	35 (39%)		
TT	2 (2%)	8 (9%)		
GG GT + TT	57 (57%) 43 (43)	47 (52%) 43 (48%)	0,51	
GG + GT TT	98 (98%) 2 (2%)	82 (91%) 8 (9%)	<b>0,03</b>	<b>0,21 (0,04-1,01)</b>

Al realizar el análisis comparativo de las distribuciones genotípicas agrupando a los sujetos que presentan el alelo G en sus dos formas homocigótica y heterocigótica (GG y GT) respecto a los homocigotos para el alelo T (TT), observamos una significación estadística ( $p = 0,03$ ) (tabla 23). Esto determinaría teóricamente un papel protector del genotipo homocigótico TT frente al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, al calcular el riesgo para dicha asociación (OR: 0,21; IC 95%: 0,04-1,01) (tabla 23), el intervalo de confianza obtenido nos hace rechazar esa significación.

En la comparación de la distribución genotípica agrupando a los sujetos que presentan el alelo T (TT y GT) frente a los homocigotos para el alelo G (GG), no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,51$ ) (tabla 23).

Cuando comparamos la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo rs1048661 de los sujetos que presentan SPEX respecto a los que han desarrollado GPEX, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 24).

**Tabla 24:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs1048661 en SPEX y GPEX.

LOXL1 rs1048661			
ALELO	GPEX n (%)	SPEX n (%)	<i>p</i>
G	64 (80%)	91 (76%)	0,49
T	16 (20%)	29 (24%)	
GENOTIPO			
GG	24 (60%)	33 (55%)	0,48
GT	16 (40%)	25 (42%)	
TT	0 (0%)	2 (3%)	
GG	24 (60%)	33 (55%)	0,62
GT + TT	16 (40%)	27 (45%)	
GG + GT	40 (100%)	58 (97%)	0,24
TT	0 (0%)	2 (3%)	

## ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Nos planteamos cuál podría ser el riesgo de padecer pseudoexfoliación si la persona presentaba simultáneamente varios de los alelos estudiados que han demostrado aumentar la susceptibilidad de padecer la enfermedad en nuestro estudio.

Para ello realizamos un análisis de haplotipos, estableciendo una comparación de las frecuencias de las distintas combinaciones de alelos presentes en los individuos de nuestra población y estimando la existencia de una significación estadística.

Para nuestra población el haplotipo GGT quedó definido como el haplotipo de riesgo para padecer la enfermedad (tabla 25). En oposición, los haplotipos GAC y TAC demostraron tener cierto papel protector frente al desarrollo de la enfermedad (tabla 25).

**Tabla 25:** Distribución porcentual de haplotipos de los tres SNP de LOXL1 estudiados en casos y controles.

HAPLOTIPOS			CASO	CONTROL	p	OR (IC 95%)
rs1048661	rs3825942	rs2165241				
G	G	T	40,4	28,5	0,008	1,70 (1,02-3,06)
G	G	C	21,1	22,4	0,733	
T	G	C	18	18,9	0,809	
T	G	T	16,2	10,5	0,076	
G	A	C	2,6	10,1	0,002	0,23 (0,06-0,96)
G	A	T	1,3	4,4	0,063	
T	A	C	0,4	4,8	0,020	0,08 (0,00-2,03)
T	A	T	-	0,4	-	

## 2.2.- ESTUDIO DE LOS GENES DE AUTOFAGIA

Este grupo de genes se encargan de regular un proceso catabólico reparativo en el que las células digieren los productos de desecho de su propio metabolismo con el fin de mejorar la supervivencia celular, llamado autofagia. Se han descrito diferentes variantes transcripcionales de los distintos genes implicados en el proceso de autofagia. En nuestro trabajo hemos incluido cuatro SNP de distintos genes ATG: ATG16L1, ATG10, ATG2B y ATG5 (tabla 26).

**Tabla 26:** SNP de genes ATG estudiados en este trabajo.

GEN	SNP	Localización Cromosómica	Región Génica	Cambio en el DNA	Cambio en la Proteína
<b>ATG16L1</b>	rs2241880	2q37.1	Exón 9	A>G	Thr300Ala
<b>ATG10</b>	rs1864183	5q14.2	Exón 6	C>T	Thr212Met
<b>ATG2B</b>	rs3759601	14q32.2	Exón 25	C>G	Gln1383Glu
<b>ATG5</b>	rs2245214	6q21	Intrón 6	C>G	---



**ATG16L1 (rs2241880)**

El polimorfismo rs2241880 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de treonina (T) por alanina (A) en la posición 300 (T300A) del extremo N-terminal de la proteína y que determina la aparición de tres genotipos diferentes: AA, AG y GG.

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas del grupo de pacientes y el grupo control para este polimorfismo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = 0,006$ ), con una Odds ratio de 1,77 (tabla 27), definiéndose de esta manera el alelo A como alelo de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

**Tabla 27:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs2241880 en casos y controles.

ATG16L1 rs2241880				
ALELO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)
A	107 (54%)	71 (39%)	<b>0,006</b>	<b>1,77</b> <b>(1,17-2,66)</b>
G	93 (46%)	109 (61%)		
GENOTIPO				
AA	30 (30%)	13 (14%)	<b>0,02</b>	
AG	47 (47%)	45 (50%)		
GG	23 (23%)	32 (36%)		
AA AG + GG	30 (30%) 70 (70%)	13 (14%) 77 (86%)	<b>0,01</b>	<b>2,54</b> <b>(1,23-5,25)</b>
AA + AG GG	77 (77%) 23 (23%)	58 (64%) 32 (36%)	<u>0,056</u>	<u>0,54</u> <u>(0,29-1,02)</u>

Al comparar la distribución de las frecuencias genotípicas, comprobamos igualmente que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = 0,02$ ), pudiéndose observar una proporción significativamente mayor del genotipo AA en el grupo de pacientes (tabla 27).

Al realizar el análisis comparativo de las distribuciones genotípicas agrupando a los sujetos que presentan el alelo G en sus dos formas homocigótica y heterocigótica (GG y AG), respecto a los homocigotos para el alelo A (AA), observamos una significación estadística ( $p = 0,01$ ), siendo la presencia del alelo G mayoritaria en el grupo de controles, con una Odds ratio de 2,54 (tabla 27), lo que permite definir el genotipo AA como el genotipo de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

En la comparación de la distribución genotípica agrupando a los sujetos que presentan el alelo A (AA y AG) frente a los homocigotos para el alelo G (GG), no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,056$ ) (tabla 27), aunque el *p*valor es cercano a la significación.

Cuando comparamos la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo rs2241880 de los sujetos que presentan SPEX respecto a los que han desarrollado GPEX, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 28).

**Tabla 28:** Distribuciones genotípica y alélica del polimorfismo rs2241880 en SPEX y GPEX.

ATG16L1 rs2241880			
ALELO	GPEX n (%)	SPEX n (%)	<i>p</i>
A	48 (60%)	59 (49%)	0,13
G	32 (40%)	61 (51%)	
GENOTIPO			
AA	16 (40%)	14 (23%)	0,20
AG	16 (40%)	31 (52%)	
GG	8 (20%)	15 (25%)	
AA AG + GG	16 (40%) 24 (60%)	14 (23%) 46 (77%)	0,07
AA + AG GG	32 (80%) 8 (20%)	45 (75%) 15 (25%)	0,56

**ATG10 (rs1864183)**

El polimorfismo rs1864183 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de treonina (T) por metionina (M) en la posición 212 (T212M) del extremo N-terminal de la proteína y que determina la aparición de tres genotipos diferentes: CC, CT y TT.

En el análisis de la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del grupo de pacientes y el grupo control para este polimorfismo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 29).

**Tabla 29:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs1864183 en casos y controles.

ATG10 rs1864183			
ALELO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	<i>p</i>
C	103 (52%)	105 (58%)	0,18
T	97 (48%)	75 (42%)	
GENOTIPO			
CC	29 (29%)	35 (39%)	0,35
CT	45 (45%)	35 (39%)	
TT	26 (26%)	20 (22%)	
CC	29 (29%)	35 (39%)	0,15
CT + TT	71 (71%)	55 (61%)	
CC + CT	74 (74%)	70 (78%)	0,54
TT	26 (26%)	20 (22%)	

De igual manera, cuando comparamos la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo rs1864183 de los sujetos que presentan SPEX respecto a los que han desarrollado GPEX, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 30).

**Tabla 30:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs1864183 en SPEX y GPEX.

ATG10 rs1864183			
ALELO	GPEX n (%)	SPEX n (%)	<i>p</i>
C	37 (46%)	66 (55%)	0,23
T	43 (54%)	54 (45%)	
GENOTIPO			
CC	8 (20%)	21 (35%)	0,25
CT	21 (52%)	24 (40%)	
TT	11 (28%)	15 (25%)	
CC CT + TT	8 (20%) 32 (80%)	21 (35%) 39 (65%)	0,11
CC + CT TT	29 (72%) 11 (28%)	45 (75%) 15 (25%)	0,78

## ATG2B (rs3759601)

El polimorfismo rs3759601 es un SNP exónico no-sinónimo que provoca un cambio de glutamina (Q) por ácido glutámico (E) en la posición 1383 (Q1383E) del extremo N-terminal de la proteína y que determina la aparición de tres genotipos diferentes: CC, CG y GG.

En el análisis de la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del grupo de pacientes y el grupo control para este polimorfismo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 31).

**Tabla 31:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs3759601 en casos y controles.

ATG2B rs3759601			
ALELO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	<i>p</i>
C	65 (33%)	63 (35%)	0,61
G	135 (67%)	117 (65%)	
GENOTIPO			
CC	13 (13%)	10 (11%)	0,48
CG	39 (39%)	43 (48%)	
GG	48 (48%)	37 (41%)	
CC CG + GG	13 (13%) 87 (87%)	10 (11%) 80 (89%)	0,69
CC + CG GG	52 (52%) 48 (48%)	53 (59%) 37 (41%)	0,34

De igual manera, cuando comparamos la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo rs2245214 de los sujetos que presentan SPEX respecto a los que han desarrollado GPEX, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 32).

**Tabla 32:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs3759601 en SPEX y GPEX.

ATG2B rs3759601			
ALELO	GPEX n (%)	SPEX n (%)	<i>p</i>
C	23 (26%)	46 (38%)	0,71
G	57 (74%)	74 (62%)	
GENOTIPO			
CC	6 (15%)	9 (15%)	0,33
CG	11 (28%)	28 (47%)	
GG	23 (57%)	23 (38%)	
CC CG + GG	6 (15%) 34 (85%)	9 (15%) 51 (85%)	0,80
CC + CG GG	17 (43%) 23 (57%)	37 (62%) 23 (38%)	0,18

## ATG5 (rs2245214)

El polimorfismo rs2245214 es un SNP intrónico que no provoca cambios en la secuencia de la proteína y que determina la aparición de tres genotipos: CC, CG y GG.

En el análisis de la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del grupo de pacientes y el grupo control para este polimorfismo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 33).

**Tabla 33:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs2245214 en casos y controles.

ATG5 rs2245214			
ALELO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	<i>p</i>
C	133 (66%)	118 (65%)	0,85
G	67 (34%)	62 (35%)	
GENOTIPO			
CC	41 (41%)	40 (45%)	0,33
CG	51 (51%)	38 (42%)	
GG	8 (8%)	12 (13%)	
CC CG + GG	41 (41%) 59 (59%)	40 (45%) 50 (55%)	0,63
CC + CG GG	92 (92%) 8 (8%)	78 (87%) 12 (13%)	0,23



De igual manera, cuando comparamos la distribución de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo rs2245214 de los sujetos que presentan SPEX respecto a los que han desarrollado GPEX, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (tabla 34).

**Tabla 34:** Distribuciones alélica y genotípica del polimorfismo rs2245214 en SPEX y GPEX.

ATG5 rs2245214			
ALELO	GPEX n (%)	SPEX n (%)	<i>p</i>
C	52 (65%)	81 (67%)	0,71
G	28 (35%)	39 (33%)	
GENOTIPO			
CC	17 (42%)	24 (40%)	0,33
CG	18 (45%)	33 (55%)	
GG	5 (13%)	3 (5%)	
CC	17 (42%)	24 (40%)	0,80
CG + GG	23 (58%)	36 (60%)	
CC + CG	35 (87%)	57 (95%)	0,18
GG	5 (13%)	3 (5%)	



# Discusión

---





El SPEX y su consecuente complicación, el GPEX, conforman una entidad clínica crónica potencialmente invalidante que supone un importante motivo de consulta a partir de la 7ª década de la vida en nuestro medio.

El desarrollo de SPEX está invariablemente asociado al proceso de envejecimiento. Se ha demostrado en múltiples estudios que la prevalencia de esta enfermedad se incrementa significativamente con la edad [66]. Es por ello que ante el aumento de la esperanza de vida alcanzado en las últimas décadas en los países occidentales, esta entidad haya adquirido una mayor importancia clínica, hasta el punto de ser reconocida como la primera causa identificable de GAA [1, 2].

El SPEX puede inducir otros procesos patológicos oftalmológicos asociados, como la subluxación del cristalino, la disfunción de la barrera hemato-acuosa o importantes complicaciones durante la cirugía de la catarata [10-12]. El GPEX, por su parte, presenta un peor pronóstico que otros GAA, con una progresión más rápida e insidiosa y un mayor daño del nervio óptico [2].

A pesar de su prevalencia e importancia clínica, la etiopatogenia de la enfermedad no se conoce con exactitud. Dado su posible carácter genético, puesto de manifiesto en trabajos previos [252-255], nos pareció interesante realizar un estudio de distintos polimorfismos, algunos ya analizados en otras poblaciones, que nos permitiese determinar la relación que estos pudieran tener con la susceptibilidad de padecer SPEX/GPEX en la población española.

Para ello, seleccionamos de manera secuencial todos los pacientes que presentaban pseudoexfoliación en la consulta del Servicio de Oftalmología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y los estratificamos según su afectación en dos subgrupos: SPEX y GPEX.

Para formar el grupo control decidimos seleccionar individuos incluidos en la lista de espera quirúrgica de nuestro Servicio de Oftalmología que no presentaban pseudoexfoliación ni ninguna otra patología oftalmológica importante, salvo el desarrollo de catarata quirúrgica. Múltiples estudios han demostrado que la edad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la catarata [308, 309] y que, en consecuencia, su prevalencia aumenta con la edad, al igual que ocurre con el SPEX. Esto nos permitió conseguir con facilidad que los individuos elegidos para formar el grupo control fueran mayores de 65 años, edad que la mayoría de estudios consideran suficiente para haber podido desarrollar la pseudoexfoliación y no ser clasificados como sanos erróneamente.

Al comparar nuestro grupo de pacientes con el grupo control no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de edad y sexo (tabla 8). Si bien existen ciertos estudios que sugieren una presencia mayor de la enfermedad en el género femenino [67, 68], en la mayoría de las publicaciones no se establece una diferencia significativa entre ambos sexos [70-73], como ocurre en este trabajo. Nuestros resultados en este sentido tampoco pueden considerarse definitivos, ya que, aunque consideramos que el grupo control es representativo de la población general, puede estar afectado por un cierto sesgo de selección al ser pacientes reclutados de una lista de espera quirúrgica.

De igual manera, dentro del grupo de pacientes, no hallamos diferencias significativas en cuanto a la distribución de edad y sexo entre ambos subgrupos de enfermedad, SPEX y GPEX (tabla 9). Aunque el desarrollo de GPEX podría ser una evolución en el tiempo del SPEX y, por tanto, podrían existir diferencias en la distribución de la edad, no hemos encontrado en la literatura médica estudios que muestren diferencias significativas al respecto. Esto hablaría en favor de la intervención de otros factores en el desarrollo de la enfermedad glaucomatosa, más allá del tiempo de producción del material pseudoexfoliativo.

Algunos grupos de trabajo, basándose en hallazgos histopatológicos extraoculares [4-9], han definido el SPEX como un desorden sistémico generalizado de la matriz extracelular. En este sentido, se ha realizado una serie de estudios epidemiológicos con el fin de establecer una asociación causal entre el SPEX ocular y diversas afecciones sistémicas, con resultados contradictorios y no concluyentes hasta la fecha. Es por ello que en nuestro trabajo decidimos estudiar y comparar la presencia de las principales enfermedades cardiovasculares en los diferentes grupos. Al analizar los resultados, pudimos observar que no existe un aumento significativo de la presencia de estas enfermedades (HTA, enfermedad coronaria isquémica y DM) en el grupo de pacientes respecto al grupo control (tablas 10, 11 y 12). Observamos igualmente una distribución homogénea de dichas patologías en ambos subgrupos de pacientes, SPEX y GPEX (tablas 14, 15 y 16). Del mismo modo, hemos podido comprobar que en nuestra población el hábito tabáquico no representa un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad pseudoexfoliativa, ni para su progresión a glaucoma (tablas 13 y 17).

## ESTUDIO DEL GEN LOXL1

---

El primer hallazgo importante en los estudios de asociación genética y la pseudoexfoliación fue la descripción de determinadas variantes del gen que codifica la enzima LOXL1. Thorleifsson y colaboradores [259] realizaron un análisis de asociación del genoma completo mediante el que identificaron múltiples polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que se relacionaban con la enfermedad glaucomatosa en población procedente de Islandia. En su trabajo determinaron la existencia de tres SNP diferentes, localizados a nivel de una pequeña región con fuerte desequilibrio de ligamiento localizada en el cromosoma 15q24.1, que codifica la proteína LOXL1, que presentaban una asociación significativa con el glaucoma. En el grupo de estudio habían incluido pacientes con diagnóstico de GPAA, GPEX y

glaucoma indeterminado. Al estratificar sus análisis por subgrupos de enfermedad, descubrieron que la asociación de los citados SNP con el GPAA era, aunque significativa, marginal. Sin embargo, en el caso del GPEX la asociación demostró ser fuertemente significativa. Repitieron sus análisis reclutando nuevos pacientes afectos de SPEX pero sin enfermedad glaucomatosa en este caso, obteniendo los mismos resultados estadísticos que en el caso del GPEX. Y postularon de esta manera por primera vez la asociación del gen de LOXL1 con la pseudoexfoliación.

La proteína LOXL1 pertenece a la familia de las lisil-oxidasas, grupo de enzimas amino-oxidasas que intervienen en la formación del tejido conectivo de la matriz extracelular [256]. Comprende cinco miembros conocidos y descritos hasta el momento: la lisil-oxidasa (LOX) y las lisil-oxidasa-like 1 al 4 (LOXL1-4). Los cinco genes de los que dependen estas proteínas tienen una estructura exónica similar consistente en siete exones, cinco de los cuales (exones 2 al 6) presentan una alta similitud entre genes y codifican en todos los casos una secuencia de aminoácidos altamente conservada que conforma el dominio catalítico C-terminal de la enzima con actividad amino-oxidasa, lo que sugiere que todos los miembros de la familia realizarían dicha actividad. La secuencia de la estructura N-terminal, sin embargo, está pobremente conservada y se ha propuesto que pueda participar en actividades enzimáticas adicionales, como la regulación del control del crecimiento y desarrollo celular, el envejecimiento, la supresión tumoral o la quimiotaxis. La principal diferencia en la secuencia genética de estas proteínas reside principalmente en el exón 1, donde se hayan dos de los tres SNP descritos por Thorleifsson, que codifica el propéptido que, una vez que la LOXL1 se aproxima a la estructura de andamiaje del tejido conectivo, tiene que ser eliminado para la correcta activación catalítica de la enzima [260].

En nuestro trabajo hemos seleccionado los tres SNP descritos inicialmente por Thorleifsson (tabla 17), situados todos ellos en el gen que codifica la LOXL1, para evaluar el posible papel de estas variantes genéticas en la susceptibilidad a padecer SPEX/GPEX en la población española. Dos de los SNP analizados (rs1048661 y rs3825942) son mutaciones de cambio de sentido situados en el exón 1, mientras que el tercero (rs2165241) es una mutación silente situada en el intrón 1.



En nuestra población, dos SNP de LOXL1, rs3825942 y rs2165241, han demostrado una asociación significativa con la enfermedad pseudoexfoliativa.

El mayor riesgo de desarrollo de SPEX/GPEX está asociado al alelo G y al genotipo GG de rs3825942, siendo la probabilidad de los portadores de dichas variantes genéticas de sufrir la enfermedad 5,71 y 6,91 veces mayor que la del resto de sujetos respectivamente (tabla 21).

Este SNP es el más extensamente analizado en todas las publicaciones presentes en la literatura médica. Nuestros resultados [310] concuerdan con los estudios realizados hasta la fecha en múltiples poblaciones de origen caucásico y asiático de distinta localización [259, 311-340] (tabla 35). En todos ellos se considera la expresión del alelo G y del genotipo homocigoto GG como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad pseudoexfoliativa. Ahora bien, existen trabajos realizados con individuos de raza negra originarios de Sudáfrica en los que, al contrario de lo que ocurre en el nuestro y en el resto de publicaciones, el alelo A y el genotipo AA aparecen como factores de riesgo en sus poblaciones para el desarrollo de la enfermedad [261, 262]. Es decir, el alelo G y el genotipo GG de rs3825942 se asocian con un mayor riesgo de SPEX en todos los grupos étnicos, con la excepción de los sudafricanos de raza negra, en los que se relaciona con una menor probabilidad de desarrollar la enfermedad.

En el caso del rs2165241, el alelo T y el genotipo TT demuestran igualmente una asociación significativa con la pseudoexfoliación, aunque el riesgo que inducen para el desarrollo de la pseudoexfoliación es menor, siendo de 2,19 y 2,13 veces superior que el del resto de sujetos respectivamente (tabla 23).

La convergencia de nuestros resultados en este SNP con la del resto de publicaciones es menor que en el caso anterior (tabla 35). Se trata del polimorfismo menos extensamente estudiado de los tres y carecemos de referencias para algunas poblaciones, como las razas negra o árabe. Los estudios realizados con individuos de origen caucásico de diversa localización geográfica, coinciden en señalar al

alelo T y al genotipo TT como factores de riesgo para el desarrollo de la pseudoexfoliación [259, 311, 312, 314-316, 319-322]. Sin embargo, las distribuciones alélica y genotípica para este polimorfismo observadas en poblaciones de origen asiático, incluyendo chinos, japoneses y coreanos, difieren del resto de resultados, siendo en estos casos el alelo C y el genotipo CC los considerados de riesgo [330, 337-340]. Incluso en un estudio realizado en Japón, no se pudo comprobar ningún tipo de asociación [333].

En cuanto al último SNP estudiado, rs1048661, nuestros resultados apuntan a una falta de asociación con la enfermedad pseudoexfoliativa al no haber podido observar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 19).

Por el contrario, en un estudio publicado con posterioridad a nuestros resultados, Álvarez y colaboradores [310] sí pudieron objetivar una asociación significativa entre el alelo G y el genotipo GG de este polimorfismo y la enfermedad pseudoexfoliativa en una población española. Aunque una parte importante de los trabajos publicados realizados con individuos de origen caucásico coinciden con esta asociación [259, 311-314, 317, 319-321, 323-326], la discordancia de resultados con poblaciones de un mismo origen no es única y aparece del mismo modo, por ejemplo, en estudios llevados a cabo con individuos de origen griego o estadounidense [316, 322]. Además, como ocurría en el polimorfismo rs2165241, las distribuciones alélica y genotípica observadas en poblaciones de origen asiático, incluyendo chinos, japoneses y coreanos, difieren del resto de resultados y son en este caso el alelo T y el genotipo TT los que aparecen como factores de riesgo para nuestra enfermedad [330, 333-340].

En resumen, parece que los tres SNP de LOXL1 están involucrados en el desarrollo de la pseudoexfoliación, pero en los individuos de origen sudafricano y asiático deben existir otros factores genéticos y/o ambientales que modifican los efectos de rs3825942 y de rs1048661 y rs216524 respectivamente, en comparación con el resto de grupos étnicos.

Tabla 35: Alelos de riesgo en pacientes SPEX/GPEX de los distintos SNP de LOXL1 en diferentes poblaciones.

rs3825942			rs2165241		rs1048661	
	Alelo	P	Alelo	P	Alelo	P
España [310]	G	3.36x10 <sup>-5</sup>	T	2.50x10 <sup>-4</sup>	nA	0.19
España [311]	G	2.54x10 <sup>-8</sup>	T	6.30x10 <sup>-16</sup>	G	8.47x10 <sup>-8</sup>
Islandia [259]	G	4.10x10 <sup>-9</sup>	T	4.3x10 <sup>-12</sup>	G	1.80x10 <sup>-6</sup>
Suecia [259]	G	9.10x10 <sup>-14</sup>	T	3.1x10 <sup>-17</sup>	G	2.70x10 <sup>-7</sup>
Finlandia [312]	G	4.82x10 <sup>-10</sup>	T	7.36x10 <sup>-14</sup>	G	1.47x10 <sup>-5</sup>
Austria [313]	G	5.76x10 <sup>-15</sup>	sD	sD	G	2.55x10 <sup>-7</sup>
Alemania [314]	G	1.21x10 <sup>-11</sup>	T	6.77x10 <sup>-30</sup>	G	4.32x10 <sup>-16</sup>
Italia [314]	G	1.66x10 <sup>-18</sup>	T	2.19x10 <sup>-10</sup>	G	0.0009
Polonia [315]	G	0.0047	T	0.021	nA	0.09
Grecia [316]	G	1.56x10 <sup>-5</sup>	T	0.016	nA	0.49
Grecia [317]	G	8.65x10 <sup>-4</sup>	sD	sD	G	0.0045
Grecia [318]	G	0.0003	sD	sD	nA	0.12
EEUU [319]	G	3.10x10 <sup>-17</sup>	T	4.85x10 <sup>-24</sup>	G	7.74x10 <sup>-9</sup>
EEUU [320]	G	0.0194	T	0.001	G	0.0222
EEUU [321]	G	1.3x10 <sup>-13</sup>	T	1.50x10 <sup>-5</sup>	G	0.0031
EEUU [322]	G	4.53x10 <sup>-5</sup>	T	1.09x10 <sup>-8</sup>	sD	sD
Australia [323]	G	7.83x10 <sup>-5</sup>	sD	sD	G	8.49x10 <sup>-4</sup>
Turquía [324]	G	5.8x10 <sup>-16</sup>	sD	sD	G	7.08x10 <sup>-7</sup>
Pakistán [325]	G	1x10 <sup>-7</sup>	sD	sD	G	1x10 <sup>-7</sup>
Arabia Saudí [326]	G	5x10 <sup>-6</sup>	sD	sD	G	0.0056
México [327]	G	0.0019	T	1x10 <sup>-5</sup>	nA	0.71
Uyгур [328]	G	<0.001	T	<0.001	G	0.013
China [329]	G	0.0018	sD	sD	nA	0.14
China [330]	G	8x10 <sup>-4</sup>	C	0.01	T	6.95x10 <sup>-11</sup>
India [331]	G	0.0001	sD	sD	nA	0.15
India del Sur [332]	G	4.68x10 <sup>-30</sup>	T	1.98x10 <sup>-15</sup>	G	4.28x10 <sup>-5</sup>
Japón [333]	G	4.10x10 <sup>-4</sup>	nA	sD	T	7.70x10 <sup>-18</sup>
Japón [334]	G	1.4x10 <sup>-5</sup>	sD	sD	T	3x10 <sup>-19</sup>
Japón [335]	G	<0.0001	sD	sD	T	<0.0001
Japón [336]	G	7x10 <sup>-8</sup>	sD	sD	T	<1x10 <sup>-8</sup>
Japón [337]	G	1.30x10 <sup>-11</sup>	C	2.31x10 <sup>-7</sup>	T	6.41x10 <sup>-48</sup>
Japón [338]	G	2.42x10 <sup>-22</sup>	C	7.87x10 <sup>-7</sup>	T	5.65x10 <sup>-33</sup>
Korea [339]	G	9.12x10 <sup>-6</sup>	C	2.59x10 <sup>-3</sup>	T	2.13x10 <sup>-12</sup>
Korea [340]	G	0.0003	C	0.0011	T	5.74x10 <sup>-12</sup>
Sudáfrica [261]	A	<0.0001	sD	sD	G	0.0010
Sudáfrica [262]	A	5.2x10 <sup>-13</sup>	sD	sD	G	1.7x10 <sup>-5</sup>

A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina; nA: no asociación; sD: sin datos.

Modificado de *Álvarez et al. 2015* [310].

Finalmente, en los tres SNP estudiados hemos realizado un análisis comparativo de la distribución de frecuencias de los distintos alelos y genotipos entre los dos subgrupos de enfermedad, SPEX y GPEX, pudiendo comprobar la ausencia de diferencias significativas (tablas 20, 22 y 24). Esto indica que LOXL1 tendría un papel en el proceso de formación y/o acumulación del material pseudoexfoliativo, pero no en la progresión de la enfermedad hacia el glaucoma. Thorleifsson y colaboradores [259], tras demostrar en un primer momento la asociación de los tres SNP con el GPEX y en un segundo tiempo con el SPEX, compararon posteriormente la distribución de estos factores de riesgo entre ambas formas de enfermedad, observando, al igual que en nuestro estudio, que era homogénea. La mayoría de trabajos publicados hasta la fecha avalan en este punto nuestros resultados.

También nos planteamos cuál podría ser el riesgo de padecer pseudoexfoliación si la persona presentaba simultáneamente varios de los genotipos estudiados que han demostrado aumentar la susceptibilidad de padecer la enfermedad, para lo que realizamos un análisis de haplotipos. Para nuestra población el haplotipo GGT quedó definido como el haplotipo de riesgo (tabla 25), coincidentemente con los resultados obtenidos en poblaciones de origen caucásico. En oposición, acorde con los datos expuestos previamente, el haplotipo de riesgo para individuos asiáticos fue TGC. Los haplotipos GAC y TAC demostraron tener cierto papel protector frente al desarrollo de la enfermedad en nuestra población (tabla 25).

Hay que tener en cuenta que las variantes genéticas de LOXL1 consideradas de riesgo para el desarrollo de la pseudoexfoliación aparecen también con una alta frecuencia en la población sana, es decir, tienen una alta sensibilidad (proporción de personas que tienen el trastorno y prueba positiva), pero una especificidad baja (proporción de personas que no tienen el trastorno y prueba negativa) [263]. Esto significa que, aunque casi todos los pacientes que desarrollarán pseudoexfoliación pueden ser identificados mediante pruebas genéticas, sería muy difícil excluir mediante dichas pruebas a las personas que no padecerían este trastorno, lo que les confiere, por tanto, una utilidad limitada. De igual manera, la prevalencia de los SNP analizados de LOXL1 es muy similar entre los individuos con SPEX y

GPEX. Es decir, tampoco estas pruebas genéticas serían capaces de aislar a aquellos individuos con pseudoexfoliación que pudieran desarrollar glaucoma.

A esto se suma el hecho de que estos alelos y haplotipos de riesgo difieren de unas poblaciones a otras dependiendo de su origen étnico o racial. Incluso la asociación que se observa en una población de un origen étnico determinado, no es confirmada por otros estudios realizados en individuos del mismo origen.

Sin embargo, no se debe obviar la posibilidad de que estos polimorfismos sean relevantes en la aparición de la pseudoexfoliación. Se ha podido constatar la presencia de LOXL1 en los depósitos de material pseudoexfoliativo presentes a nivel ocular [11], lo que sugiere que este gen juega un papel destacable en la patogenia de la enfermedad y que probablemente existan otras variantes genéticas de LOXL1 aún no conocidas que influyan en el desarrollo de SPEX y GPEX.

En este sentido, son varios los trabajos recientes en los que se ha secuenciado la región codificante completa del gen de LOXL1 en distintas poblaciones en busca de posibles nuevos polimorfismos relacionados con la pseudoexfoliación [262, 310, 326, 332, 341]. Esto ha permitido identificar nuevos SNP exónicos como, por ejemplo, rs41435250 (exón1) y rs3522 (exón 7), cuya asociación con la enfermedad no es aún del todo clara debido a los escasos y contradictorios resultados observados hasta el momento. En ausencia de una asociación definitiva de las variantes exónicas de LOXL1 y la enfermedad, es la secuenciación de las regiones promotoras y reguladoras del gen la que puede aportar nuevos datos que permitan avanzar en la investigación de la verdadera relación de LOXL1 y la pseudoexfoliación.

Más recientemente, los individuos de nuestro trabajo fueron incluidos en un estudio multipoblacional junto con sujetos procedentes de otros 23 países [342], con el fin de comprobar y comparar el riesgo que las variantes de LOXL1 ya descritas producían en distintas poblaciones, confirmándose la tendencia de nuestros resultados. La secuenciación de LOXL1 en este estudio ha

permitido identificar un nuevo SNP exónico, rs201011613 [A>T], que provoca un cambio de tirosina por fenilalanina en la posición 407 de la secuencia proteica (Tyr407Phe), cambio localizado en el dominio catalítico C-terminal de la enzima. El alelo T para este polimorfismo ha demostrado tener un marcado carácter protector frente al desarrollo de la enfermedad y, además, su presencia en los sujetos enfermos es prácticamente nula, lo que le confiere una alta especificidad. Paralelamente, un estudio de asociación del genoma completo realizado en estos pacientes ha permitido identificar cinco *loci* en probable relación con el desarrollo de la enfermedad pseudoexfoliativa: 13q12 (POMP), 11q23.3 (TMEM136), 6p21 (AGPAT1), 3p24 (RBMS3) y 5q23 (SEMA6A).

En conclusión, el gen LOXL1 es el factor de riesgo genético más estudiado y mejor conocido hasta el momento en la patogenia de la pseudoexfoliación. La asociación de los tres SNP de LOXL1, rs1048661, rs3825942 y rs2165241, con el SPEX ha sido comprobada, como ya hemos visto, en múltiples grupos poblacionales de distinto origen étnico y localización geográfica. Sin embargo, hasta la publicación de nuestros resultados [310] no existía ningún trabajo que hubiera determinado la existencia o no de dicha asociación en la población española, resultados que han sido confirmados recientemente al ser incluidos en un estudio multipoblacional [342]. De forma paradójica, dependiendo del grupo étnico de los individuos que se estudien, los alelos específicos de estos SNP pueden conferir un aumento del riesgo o comportarse como un factor de protección frente al desarrollo de la enfermedad. Paralelamente, el hecho de que la frecuencia de los alelos de riesgo sea también elevada en la población control sana sugiere la probable implicación de otros genes y/u otras variantes de la propia LOXL1 en la patogénesis de la pseudoexfoliación. Por consiguiente, la secuenciación completa del gen LOXL1, incluyendo sus regiones exónica, intrónica, promotora y reguladora, en distintos grupos de población podría contribuir a la completa comprensión del papel de la LOXL1 y la implicación de sus variantes genéticas en el proceso de la enfermedad. Además, la caracterización de cómo las influencias ambientales interactúan con estas variantes de riesgo genético para producir las manifestaciones de la enfermedad es fundamental.

## ESTUDIO DE GENES ATG

---

La autofagia es un proceso catabólico reparativo, altamente conservado en eucariotas, mediante el cual las células digieren distintos compuestos citoplasmáticos deteriorados o aberrantes y los productos de desecho de su propio metabolismo a través de unas vacuolas que contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas llamadas lisosomas, con el fin de lograr la descomposición de dichos materiales y el eventual reciclado de las moléculas resultantes, mejorando de esta manera la supervivencia celular [269]. Este proceso se comporta como un mecanismo de protección celular y juega un papel esencial en la adaptación a condiciones ambientales adversas, en la remodelación celular durante el desarrollo y crecimiento y en la eliminación de organelas y proteínas alteradas en las células durante el envejecimiento [269].

El conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso autofágico comenzó con el descubrimiento de los genes *ATG* (*autophagy-related genes*) descritos por primera vez en levaduras. Estos genes participan en diferentes etapas de la ruta catabólica formando parte de importantes complejos y juegan un papel clave en la inducción de los mecanismos de autofagia, en la formación del autofagosoma y en la posterior fusión de éste con el lisosoma [282]. De igual manera, su desregulación ha demostrado estar implicada en el desarrollo de distintas enfermedades [273-278].

A pesar de que la patogénesis específica de la enfermedad pseudoexfoliativa resulta aún una incógnita, el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en este proceso de fibrosis de la matriz extracelular ha avanzado mucho en los últimos años. En este sentido se ha podido demostrar que la sobreexpresión de determinados factores de crecimiento, particularmente el TGF- $\beta$ 1, principal modulador de la formación de la matriz extracelular en muchas enfermedades fibróticas, un aumento del estrés oxidativo celular, un incremento de la respuesta al estrés del retículo endoplásmico, una alteración de la función proteasómica, de los mecanismos de reparación del DNA y de los sistemas de

citoprotección, y fenómenos de isquemia/hipoxia en los tejidos oculares están implicados en su aparición y desarrollo [238-243, 251].

Aunque el papel de la autofagia en la patogenia de la pseudoexfoliación ha sido escasamente estudiado hasta el momento [343, 344], existen otros factores que podrían apoyar la hipótesis de su participación en el proceso de la enfermedad. Recientemente se ha podido demostrado *in vitro* que son los mecanismos de autofagia los que ayudan a eliminar del retículo endoplásmico proteínas pro-colágeno mal plegadas propias de enfermedades de la matriz extracelular, en vez de los mecanismos de degradación proteica asociados a dicha organela [345]. Del mismo modo, se ha comprobado la implicación de la autofagia en el proceso de degradación de las conexinas de las *gap-junctions* [346] y se ha observado que su inhibición resulta en un fenotipo profibrótico por aumento de acúmulo de colágeno en animales de experimentación [347].

Paralelamente a esto, conocemos la existencia de una serie de factores que inducen una sobreactivación de los mecanismos de autofagia y, por tanto, de la protección celular, como son la hipoxia/isquemia, el estrés oxidativo o ciertos factores de crecimiento, como el TGF- $\beta$ 1 [284, 301]. Todos estos factores, como hemos explicado anteriormente, se encuentran incrementados en los ojos de los pacientes con pseudoexfoliación.

Consecuentemente a todo ello, en estos pacientes se produciría, al menos teóricamente, un aumento en la inducción de la autofagia, que se comportaría como un mecanismo de protección celular ayudando a eliminar el material pseudoexfoliativo acumulado. Por tanto, una alteración en los mecanismos normales de la autofagia podría cursar con una eliminación deficitaria del mismo.

Para la realización de nuestro trabajo hemos seleccionado cuatro SNP distintos localizados en cuatro genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de la autofagia, ATG16L1 (rs2241880), ATG10 (rs1864183), ATG2B (rs3759601) y ATG5 (rs2245214), para evaluar el posible papel de estas



variantes genéticas en la susceptibilidad a padecer la enfermedad pseudoexfoliativa en la población española (tabla 26).

Tres de los SNP analizados (genes ATG16L1, ATG10 y ATG2B) son mutaciones de cambio de sentido situadas en distintos exones, mientras que el SNP del gen ATG5 es una mutación intrónica. Seleccionamos los genes ATG5, ATG10 y ATG16L1 porque codifican, junto con ATG12, proteínas que forman parte del complejo de ubiquitinización, y ATG2B porque codifica una proteína necesaria para completar el cierre de la membrana aislada en el proceso de formación del autofagosoma.

En nuestra población, tan solo uno de estos SNP de genes ATG, rs2241882, ha demostrado una asociación significativa con la enfermedad pseudoexfoliativa.

El riesgo de SPEX/GPEX que induciría el SNP estudiado en ATG16L1, rs2241882, está asociado con el alelo A y el genotipo AA, aunque dicho riesgo resulta solamente 1,77 y 2,54 veces superior que el del resto de sujetos respectivamente (tabla 27). Al realizar el análisis comparativo de la distribución de frecuencias de los distintos alelos y genotipos en este polimorfismo entre los dos subgrupos de enfermedad, SPEX y GPEX, sin embargo, comprobamos una ausencia de diferencias significativas (tabla 28).

Por el contrario, no hemos podido observar diferencias estadísticamente significativas en el resto de los tres SNP de genes ATG analizados, tanto al comparar el grupo de pacientes con el grupo control (tablas 29, 31 y 31), como cuando comparamos los dos subgrupos de enfermedad, SPEX y GPEX (tablas 30, 32 y 34).

El gen ATG16L1 codifica una proteína clave que interactúa con otras dos proteínas de la maquinaria autofágica, ATG5 y ATG12, para formar un complejo proteico no covalente esencial para el proceso de la autofagia. Este complejo está implicado en la formación del autofagosoma, estructura que

secuestra los productos citoplasmáticos a degradar y que posteriormente se fusiona con los lisosomas que degradan estos materiales [283].

El polimorfismo de ATG16L1 estudiado, rs2241880, se localiza en el exón 9 y da lugar a la sustitución de un aminoácido de treonina por otro de alanina (Thr300Ala). En nuestro trabajo hemos observado que el alelo A y el genotipo AA aumentan el riesgo de padecer la enfermedad pseudoexfoliativa en la población estudiada. En un trabajo de tesis publicado en nuestro departamento, se pudo comprobar al estudiar un grupo de mujeres con carcinoma de endometrio que el genotipo AA se asociaba con un aumento del riesgo de desarrollar carcinoma de tipo II o no endometriode, una forma más agresiva de enfermedad [348]. Recientemente, se ha demostrado en un estudio con ratones que esa misma variante, sin embargo, disminuye el riesgo de metástasis cerebrales en el cáncer de pulmón no microcítico [349]. Por el contrario, el alelo G había sido descrito anteriormente por varios autores como factor de riesgo para padecer la enfermedad de Crohn [350]. Sin embargo, otros autores sostienen que ser portador del alelo G en cualquiera de sus dos formas genotípica, homocigótica (GG) y heterocigótica (AG), protege frente al cáncer gástrico [351]. En este mismo sentido, Grimm y colaboradores [352] han podido demostrar que los portadores del genotipo GG presentan una mayor supervivencia y menor potencial metastásico en el cáncer colorrectal. Como podemos observar, los resultados respecto a este SNP son ambivalentes, determinando la posible participación de ambas variantes genéticas en distintas enfermedades. Un mejor conocimiento de cómo este polimorfismo afecta a la función de la proteína podría ayudarnos a comprender esta variedad de asociaciones.

Tras una exhaustiva búsqueda en la literatura médica, hemos podido comprobar que aún son muy limitadas las publicaciones que relacionan la autofagia con la pseudoexfoliación o con cualquier otro tipo de trastorno fibrótico o enfermedad de la matriz extracelular que pudieran ayudarnos a realizar una mejor interpretación de nuestros resultados.

Sin embargo, de manera paralela, sí pudimos observar algunos estudios que planteaban una posible relación entre la autofagia, mecanismo citoprotector que se ve alterado durante el envejecimiento, y la catarata, manifestación habitual del envejecimiento del cristalino [353-355]. El grupo control de nuestro estudio había sido reclutado de una lista de espera quirúrgica de cataratas, entonces comprendimos que este factor podía haberse comportado como un sesgo de confusión afectando a la validez de nuestros resultados y podía habernos hecho aceptar conclusiones equivocadas.

Por ese motivo, realizamos un análisis comparativo de nuestros pacientes con un nuevo grupo control libre de enfermedad ocular, incluida la catarata, que cumplían los criterios de inclusión y exclusión de nuestro estudio, no observando diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas o genotípicas de ninguno de los SNP de los genes ATG analizados entre los individuos portadores de la enfermedad y los nuevos sujetos control [356]. De igual manera, los datos encontrados tampoco evidencian diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, SPEX y GPEX [356].

Esta falta de asociación demostrada con el nuevo grupo control parece rechazar la hipótesis inicial que nos habíamos formulado en base a nuestros primeros resultados de que una alteración en la correcta función de la autofagia debida a una variante genética de ATG16L1 en nuestra población podría colaborar en el acúmulo del material pseudoexfoliativo por un déficit en su eliminación mediante este mecanismo de reparación celular. Sin embargo, esto no excluye de manera definitiva la participación de la autofagia en la etiopatogenia de la enfermedad. Son necesarios nuevos estudios que confirmen o rechacen la tendencia de estos resultados en otras poblaciones y que incluyan otros genes ATG reguladores de los mecanismos de autofagia.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

---

- La diferencia interobservador para el diagnóstico del SPEX es un problema que se intentó paliar mediante la realización de una exploración minuciosa con una midriasis suficiente de todos los pacientes y controles incluidos en el estudio. Así mismo, todos los pacientes fueron explorados por las dos mismas personas.
- El tamaño de muestra puede ser insuficiente para algunos análisis, especialmente en el caso de los análisis comparativos entre los dos subgrupos de casos, SPEX y GPEX.
- Dadas las características intrínsecas a cualquier estudio genético de análisis de polimorfismos, resulta difícil en ocasiones extrapolar a la población general los resultados obtenidos en la muestra seleccionada.

# Conclusiones

---





De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo de Tesis Doctoral y como consecuencia de los resultados obtenidos y su discusión, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

**PRIMERA:** existen diferencias significativas en dos de los tres SNP de LOXL1 analizados entre el grupo de pacientes y el grupo control en nuestra población. El mayor riesgo de desarrollo de SPEX/GPEX está asociado al genotipo GG de rs3825942, siendo la probabilidad de los portadores de esta variante genética de sufrir la enfermedad 6,91 veces mayor que la de sujetos sanos. El genotipo TT de rs2165241 es igualmente más frecuente en pacientes con pseudoexfoliación, confiriendo un riesgo de 2,13 veces superior de desarrollar la enfermedad. El polimorfismo rs1048661 no se asoció con la enfermedad.

**SEGUNDA:** no existen diferencias significativas en los tres SNP de LOXL1 analizados entre los dos subgrupos de enfermedad, SPEX y GPEX, en nuestra población, lo que sugiere que el gen LOXL1 podría tener un papel en el proceso de formación y/o acumulación del material pseudoexfoliativo, pero no en la progresión de la enfermedad hacia el glaucoma.

**TERCERA:** las variantes genéticas de LOXL1 consideradas de riesgo para el desarrollo de la pseudoexfoliación aparecen también con una alta frecuencia en la población sana, lo que sugiere la posible implicación de otras variantes genéticas de LOXL1, de otros genes y/o de la interacción de factores ambientales en la patogénesis de la enfermedad pseudoexfoliativa.

**CUARTA:** el genotipo AA del polimorfismo rs2241880 de ATG16L1 fue significativamente más frecuente en pacientes con pseudoexfoliación que en controles en nuestra población, por lo que su presencia podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, estos resultados no pueden considerarse concluyentes ya que la presencia de catarata en los sujetos control podría haber actuado como un posible factor de confusión.

**QUINTA:** las variantes genéticas estudiadas de los genes ATG10, ATG2B y ATG5 no se asocian con la presencia de SPEX en la población analizada. Aun así no se puede excluir un posible papel de la autofagia en la aparición de la enfermedad. El análisis de polimorfismos de los genes reguladores de la autofagia debe ser ampliado y nuestros resultados confirmados o descartados en posteriores estudios en diferentes poblaciones y con un mayor tamaño muestral.



# Bibliografía

---





1. Ritch, R., *Exfoliation syndrome-the most common identifiable cause of open-angle glaucoma*. J Glaucoma, 1994. **3**(2): p. 176-7.
2. Ritch, R., U. Schlotzer-Schrehardt, and A.G. Konstas, *Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome?* Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(3): p. 253-75.
3. Moreno-Montanes, J., A. Alvarez Serna, and A. Alcolea Paredes, *Pseudoexfoliative glaucoma in patients with open-angle glaucoma in the northwest of Spain*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1990. **68**(6): p. 695-9.
4. Ringvold, A., *On the occurrence of pseudo-exfoliation material in extrabulbar tissue from patients with pseudo-exfoliation syndrome of the eye*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1973. **51**(3): p. 411-8.
5. Schlotzer-Schrehardt, U., M. Kuchle, and G.O. Naumann, *Electron-microscopic identification of pseudoexfoliation material in extrabulbar tissue*. Arch Ophthalmol, 1991. **109**(4): p. 565-70.
6. Sugino, T., *[Exfoliative materials in the skin of patients with exfoliation syndrome]*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1990. **94**(9): p. 856-69.
7. Streeten, B. and A. Dark, *Pseudoexfoliation syndrome*, in *Pathobiology of Ocular Disease*, K.G. Gamer A, Editor. 1994, Marcel Dekker: New York. p. 591-629.
8. Streeten, B.W., et al., *Pseudoexfoliative fibrilloglycopathies in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome*. Arch Ophthalmol, 1992. **110**(12): p. 1757-62.
9. Schlotzer-Schrehardt, U.M., et al., *Pseudoexfoliation syndrome. Ocular manifestation of a systemic disorder?* Arch Ophthalmol, 1992. **110**(12): p. 1752-6.
10. Naumann, G.O., U. Schlotzer-Schrehardt, and M. Kuchle, *Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations*. Ophthalmology, 1998. **105**(6): p. 951-68.
11. Ritch, R. and U. Schlotzer-Schrehardt, *Exfoliation syndrome*. Surv Ophthalmol, 2001. **45**(4): p. 265-315.
12. Sein, J., et al., *Exfoliation syndrome: new genetic and pathophysiologic insights*. Curr Opin Ophthalmol, 2013. **24**(2): p. 167-74.
13. Cursiefen, C., et al., *[Pseudoexfoliation syndrome in patients with retinal vein branch and central vein thrombosis]*. Klin Monbl Augenheilkd, 1997. **211**(1): p. 17-21.
14. Tarkkanen, A., *Is exfoliation syndrome a sign of systemic vascular disease?* Acta Ophthalmol, 2008. **86**(8): p. 832-6.
15. Elhawary, E., et al., *Pseudoexfoliation syndrome, a systemic disorder with ocular manifestations*. Hum Genomics, 2012. **6**: p. 22.
16. Mitchell, P., J.J. Wang, and W. Smith, *Association of pseudoexfoliation syndrome with increased vascular risk*. Am J Ophthalmol, 1997. **124**(5): p. 685-7.

17. Repo, L.P., et al., *Color Doppler imaging of the ophthalmic artery blood flow spectra of patients who have had a transient ischemic attack. Correlations with generalized iris translucence and pseudoexfoliation syndrome*. *Ophthalmology*, 1995. **102**(8): p. 1199-205.
18. Tarkkanen, A. and T. Kivela, *John G. Lindberg and the discovery of exfoliation syndrome*. *Acta Ophthalmol Scand*, 2002. **80**(2): p. 151-4.
19. Axenfeld, T., *Über besondere Formen von Iristrophie, besonders die Hyaline Degeneration des pupillarsaumes und die pupillare Pigmentatrophie des Irishinterblattes*. *Bericht Ophth Gesellschaft Heidelberg*, 1911. **37**: p. 276-285.
20. Axenfeld, T., *Weitere Erfahrungen über Pigmentdegeneration des retinalen Pupillarsaumes*. *Bericht Ophth Gesellschaft Heidelberg*, 1913. **39**: p. 276-285.
21. Gullstrand, A., *Einführung in die Methoden der Dioptrik des Auges*. 1911, Leipzig.
22. Lindberg, J., *Kliniska Undersökningar över Depigmentering av Pupillarranden och Genomlysbarheten av Iris vid Fall av Aldersstarr samt i Normala Ögon hos Gamla Personer*. 1917: Helsingfors.
23. Lindberg, J.G., *Clinical investigations on depigmentation of the pupillary border and translucency of the iris in cases of senile cataract and in normal eyes in elderly persons*. *Acta Ophthalmol Suppl*, 1989. **190**: p. 1-96.
24. Vogt, A., *Ein neues Spaltlampenbild des Pupillargebietes: HeilBlauer Pupillarsaumfilz mit Häutchenbildung auf der Linsenvorderkapsel*. *Klin Monatsbl Augenhk*, 1925. **75**: p. 1-12.
25. Vogt, A., *Ein neues Spaltlampenbild: Abschilferung des Linsenvorderkapsel als Wahrscheinliche Ursache von senilem chronischen Glaukom*. *Schweiz Med Wehenschr*, 1926. **56**: p. 413-423.
26. Busacca, A., *Struktur und Bedeutung der Hautchenniederschläge in der vorderen und hinteren Augenkammer*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1927. **119**: p. 135-153.
27. Malling, B., *Untersuchungen über das Verhältnis zwischen Iridocyclitis und Glaukom*. *Acta Ophthalmol*, 1923. **1**: p. 97-130.
28. Baumgart, B., *Considerazioni sull'exfoliation superficialis capsulae di Vogt*. *Boll Ocul*, 1933. **12**: p. 560-97.
29. Gifford, H., Jr., *A clinical and pathologic study of exfoliation of the lens capsule*. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1957. **55**: p. 189-212; discussion 212-6.
30. Dvorak-Theobald, G., *Pseudo-exfoliation of the lens capsule: relation to true exfoliation of the lens capsule as reported in the literature and role in the production of glaucoma capsulocuticularis*. *Am J Ophthalmol*, 1954. **37**(1): p. 1-12.
31. Sunde, O.A., *On the so-called senile exfoliation of the anterior lens capsule; a clinical and anatomical study*. *Acta Ophthalmol Suppl*, 1956(Suppl 45): p. 1-85.
32. Caccamise, W.C., *The exfoliation syndrome in the aphakic eye*. *Am J Ophthalmol*, 1981. **91**(1): p. 111-2.

33. Radian, A.B. and A.L. Radian, *Senile pseudoexfoliation in aphakic eyes*. Br J Ophthalmol, 1975. **59**(10): p. 577-9.
34. Sugar, H.S., *Onset of the exfoliation syndrome after intracapsular lens extraction*. Am J Ophthalmol, 1980. **89**(4): p. 601-2.
35. FitzSimon, J.S. and D.H. Johnson, *Exfoliation material on intraocular lens implants*. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(3): p. 355.
36. Ringvold, A. and J. Bore, *Pseudo-exfoliation pattern on posterior IOL*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1990. **68**(3): p. 353-5.
37. Stewart, J.F. and J.L. Jay, *Pseudoexfoliation material on an acrylic lens*. Br J Ophthalmol, 1995. **79**(11): p. 1050-1.
38. Crittendon, J.J. and M.B. Shields, *Exfoliation syndrome in the southeastern United States. II. Characteristics of patient population and clinical course*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 103-6.
39. Forsius, H., *Prevalence of pseudoexfoliation of the lens in Finns, Lapps, Icelanders, Eskimos, and Russians*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1979. **99**(2): p. 296-8.
40. Sveinsson, K., *The frequency of senile exfoliation in Iceland. Fibrillopathy or pseudoexfoliation*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1974. **52**(5): p. 596-602.
41. Krause, U., *Frequency of capsular glaucoma in central Finland*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1973. **51**(2): p. 235-40.
42. Krause, U., et al., *Prevalence of exfoliation syndrome in Finland*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 120-2.
43. Ringvold, A., et al., *The Middle-Norway eye-screening study. I. Epidemiology of the pseudo-exfoliation syndrome*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1988. **66**(6): p. 652-8.
44. Astrom, S. and C. Linden, *Incidence and prevalence of pseudoexfoliation and open-angle glaucoma in northern Sweden: I. Baseline report*. Acta Ophthalmol Scand, 2007. **85**(8): p. 828-31.
45. Backhaus, B. and S.E. Lorentzen, *Prevalence of pseudoexfoliation in non-glaucomatous eyes in Denmark*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1966. **44**(1): p. 1-4.
46. Levey SB, W.S., Abrams DA, *Pseudoexfoliation syndrome in the Russian immigrant population*. Ann Ophthalmol, 1995. **27**: p. 366-8.
47. Kozobolis, V.P., et al., *Epidemiology of pseudoexfoliation in the island of Crete (Greece)*. Acta Ophthalmol Scand, 1997. **75**(6): p. 726-9.
48. Viso, E., M.T. Rodriguez-Ares, and F. Gude, *Prevalence of pseudoexfoliation syndrome among adult Spanish in the Salnes eye Study*. Ophthalmic Epidemiol, 2010. **17**(2): p. 118-24.

49. Colin, J., et al., *The prevalence of exfoliation syndrome in different areas of France*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 86-9.
50. Asved, H., *Prevalence of fibrillopathia epitheliocapsularis (pseudoexfoliation) and capsular glaucoma*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1975. **99**: p. 293-5.
51. Cashwell, L.F., Jr. and M.B. Shields, *Exfoliation syndrome. Prevalence in a southeastern United States population*. Arch Ophthalmol, 1988. **106**(3): p. 335-6.
52. Shiose, Y., et al., *Epidemiology of glaucoma in Japan--a nationwide glaucoma survey*. Jpn J Ophthalmol, 1991. **35**(2): p. 133-55.
53. Rouhiainen, H. and M. Terasvirta, *Presence of pseudoexfoliation on clear and opacified crystalline lenses in an aged population*. Ophthalmologica, 1992. **204**(2): p. 67-70.
54. Nouri-Mahdavi, K., et al., *Pseudoexfoliation syndrome in central Iran: a population-based survey*. Acta Ophthalmol Scand, 1999. **77**(5): p. 581-4.
55. McCarty, C.A. and H.R. Taylor, *Pseudoexfoliation syndrome in Australian adults*. Am J Ophthalmol, 2000. **129**(5): p. 629-33.
56. Rotchford, A.P., et al., *Exfoliation syndrome in black South Africans*. Arch Ophthalmol, 2003. **121**(6): p. 863-70.
57. Krishnadas, R., et al., *Pseudoexfoliation in a rural population of southern India: the Aravind Comprehensive Eye Survey*. Am J Ophthalmol, 2003. **135**(6): p. 830-7.
58. Jonasson, F., et al., *Prevalence of open-angle glaucoma in Iceland: Reykjavik Eye Study*. Eye (Lond), 2003. **17**(6): p. 747-53.
59. Foster, P.J. and S.K. Seah, *The prevalence of pseudoexfoliation syndrome in Chinese people: the Tanjong Pagar Survey*. Br J Ophthalmol, 2005. **89**(2): p. 239-40.
60. Al-Saleh, S.A., et al., *Prevalence of ocular pseudoexfoliation syndrome and associated complications in Riyadh, Saudi Arabia*. Saudi Med J, 2015. **36**(1): p. 108-12.
61. Hiller, R., R.D. Sperduto, and D.E. Krueger, *Pseudoexfoliation, intraocular pressure, and senile lens changes in a population-based survey*. Arch Ophthalmol, 1982. **100**(7): p. 1080-2.
62. Ball, S.F., *Exfoliation syndrome prevalence in the glaucoma population of South Louisiana*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 93-8.
63. Young, A.L., W.W. Tang, and D.S. Lam, *The prevalence of pseudoexfoliation syndrome in Chinese people*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(2): p. 193-5.
64. Forsius, H. and H. Luukka, *Pseudoexfoliation of the anterior capsule of the lens in Lapps and Eskimos*. Can J Ophthalmol, 1973. **8**(2): p. 274-7.
65. Larsen, J.S., *Senile exfoliation (pseudo-exfoliation, fibrillopathia epitheliocapsularis) of the lens capsule in a postmortem material. Microscopic investigation of 100 eyes*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1969. **47**(3): p. 676-84.

66. Forsius, H., *Exfoliation syndrome in various ethnic populations*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 71-85.
67. Esmail, F., [*Pseudoexfoliation syndrome*]. Klin Monbl Augenheilkd, 1991. **198**(5): p. 335-9.
68. Klemetti, A., *Intraocular pressure in exfoliation syndrome*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 54-8.
69. Bartholomew, R.S., *Incidence of pseudoexfoliation in South African Negroes and Scots*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1979. **99**(2): p. 299-301.
70. Moreno Montanes, J., A. Alcolea Paredes, and S. Campos Garcia, *Prevalence of pseudoexfoliation syndrome in the northwest of Spain*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1989. **67**(4): p. 383-5.
71. Shimizu, K., Y. Kimura, and K. Aoki, *Prevalence of exfoliation syndrome in the Japanese*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 112-5.
72. Stefaniotou, M., G. Petroutsos, and K. Psilas, *The frequency of pseudoexfoliation in a region of Greece (Epirus)*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1990. **68**(3): p. 307-9.
73. Summanen, P. and A.M. Tonjum, *Exfoliation syndrome among Saudis*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 107-11.
74. Perasalo, R. and C. Raitta, *Glaucoma of institutionalized geriatric patients*. Acta Ophthalmol Suppl, 1987. **182**: p. 5-8.
75. Valle, O., *Prevalence of simple and capsular glaucoma in the Central Hospital District of Kotka*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 116-9.
76. Ringvold, A., et al., *The middle-Norway eye-screening study. II. Prevalence of simple and capsular glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1991. **69**(3): p. 273-80.
77. Aasved, H., *The frequency of fibrillopathia epitheliocapsularis (so-called senile exfoliation or pseudoexfoliation) in patients with open-angle glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1971. **49**(2): p. 194-210.
78. Ohrt V, N.J., *The incidence of glaucoma capsulare based on a Danish hospital material*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1981. **59**: p. 888-93.
79. Leske, M.C., et al., *Factors for progression and glaucoma treatment: the Early Manifest Glaucoma Trial*. Curr Opin Ophthalmol, 2004. **15**(2): p. 102-6.
80. Layden, W.E. and R.N. Shaffer, *Exfoliation syndrome*. Am J Ophthalmol, 1974. **78**(5): p. 835-41.
81. Ruprecht, K.W., et al., [*Pseudoexfoliation syndrome. Clinical and statistical studies*]. Klin Monbl Augenheilkd, 1985. **187**(1): p. 9-13.
82. Eivind, H., *The frequency of senile exfoliation of the anterior surface of the lens in inflammatory glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1948. **26**(2): p. 231-5.

83. Sbeity, Z., et al., *Non-contact in vivo confocal scanning laser microscopy in exfoliation syndrome, exfoliation syndrome suspect and normal eyes*. Acta Ophthalmol, 2011. **89**(3): p. 241-7.
84. Ghosh, M. and J.S. Speakman, *The iris in senile exfoliation of the lens*. Can J Ophthalmol, 1974. **9**(3): p. 289-97.
85. Prince, A.M. and R. Ritch, *Clinical signs of the pseudoexfoliation syndrome*. Ophthalmology, 1986. **93**(6): p. 803-7.
86. Aasved, H., *Incidence of defects in the pigmented pupillary ruff in eyes with and without fibrillogenesis epitheliocapsularis (so-called senile exfoliation or pseudoexfoliation of the anterior lens capsule)*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1973. **51**(5): p. 710-5.
87. Norn, M.S., *Iris pigment defects in normals*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1971. **49**(6): p. 887-94.
88. Bartholomew, R.S., *Lens displacement associated with pseudocapsular exfoliation. A report on 19 cases in the Southern Bantu*. Br J Ophthalmol, 1970. **54**(11): p. 744-50.
89. Futa, R. and N. Furuyoshi, *Phakodonesis in capsular glaucoma: a clinical and electron microscopic study*. Jpn J Ophthalmol, 1989. **33**(3): p. 311-7.
90. Watson, N.J., S. Winder, and F.D. Green, *Pupil dilatation in the pseudoexfoliation syndrome*. Eye (Lond), 1995. **9** ( Pt 3): p. 341-3.
91. Carpel, E.F., *Pupillary dilatation in eyes with pseudoexfoliation*. Am J Ophthalmol, 1988. **105**: p. 692-4.
92. Lundvall, A. and C. Zetterstrom, *Exfoliation syndrome and the effect of phenylephrine and pilocarpine on pupil size*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1993. **71**(2): p. 177-80.
93. Tarkkanen, A.H., *Exfoliation syndrome*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1986. **105** ( Pt 2): p. 233-6.
94. Hahnenberger, R., *Anisocoria in untreated unilateral open-angle glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1984. **62**(1): p. 135-41.
95. Asano, N., U. Schlotzer-Schrehardt, and G.O. Naumann, *A histopathologic study of iris changes in pseudoexfoliation syndrome*. Ophthalmology, 1995. **102**(9): p. 1279-90.
96. Repo, L.P., et al., *Pseudoexfoliation syndrome with poorly dilating pupil: a light and electron microscopic study of the sphincter area*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1996. **234**(3): p. 171-6.
97. Mapstone, R., *Pigment release*. Br J Ophthalmol, 1981. **65**(4): p. 258-63.
98. Nanba K, S.K., Imai A, *Clinical evaluation of pseudoexfoliation and capsular glaucoma*. Folia Ophthalmol Jpn, 1978. **29**: p. 1567-75.
99. Masuda, H., Y. Shibuya, and A. Ohira, *Markedly increased unilateral intraocular pressure during hemodialysis in a patient with ipsilateral exfoliative glaucoma*. Am J Ophthalmol, 2000. **129**(4): p. 534-6.



100. Chern, K.C., et al., *Pseudoexfoliation syndrome masquerading as uveitis*. Am J Ophthalmol, 1994. **118**(3): p. 392-3.
101. Sampaolesi, R., J. Zarate, and O. Croxato, *The chamber angle in exfoliation syndrome. Clinical and pathological findings*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 48-53.
102. de Juan-Marcos, L., et al., *[Morphometric changes of corneal endothelial cells in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma]*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2013. **88**(11): p. 439-44.
103. Hattori, Y., *[Corneal endothelial examination of pseudoexfoliation syndrome]*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1990. **94**(10): p. 957-63.
104. Knorr, H.L., et al., *[Morphometric and qualitative changes in corneal endothelium in pseudoexfoliation syndrome]*. Fortschr Ophthalmol, 1991. **88**(6): p. 786-9.
105. Wang, L., R. Yamasita, and S. Hommura, *Corneal endothelial changes and aqueous flare intensity in pseudoexfoliation syndrome*. Ophthalmologica, 1999. **213**(6): p. 387-91.
106. Puska, P., et al., *Corneal thickness and corneal endothelium in normotensive subjects with unilateral exfoliation syndrome*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2000. **238**(8): p. 659-63.
107. Yenerel, N.M., et al., *Corneal biomechanical properties of patients with pseudoexfoliation syndrome*. Cornea, 2011. **30**(9): p. 983-6.
108. Cankaya, A.B., et al., *Ocular response analyzer to assess corneal biomechanical properties in exfoliation syndrome and exfoliative glaucoma*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. **250**(2): p. 255-60.
109. Brooks, A.M., et al., *Progressive corneal endothelial cell changes in anterior segment disease*. Aust N Z J Ophthalmol, 1987. **15**(1): p. 71-8.
110. Miyake, K., M. Matsuda, and M. Inaba, *Corneal endothelial changes in pseudoexfoliation syndrome*. Am J Ophthalmol, 1989. **108**(1): p. 49-52.
111. Mizuno, K. and S. Muroi, *Cycloscopy of pseudoexfoliation*. Am J Ophthalmol, 1979. **87**(4): p. 513-8.
112. Chijiwa, T., et al., *Degeneration of zonular fibrils in a case of exfoliation glaucoma*. Ophthalmologica, 1989. **199**(1): p. 16-23.
113. Dark, A.J., B.W. Streeten, and C.C. Cornwall, *Pseudoexfoliative disease of the lens: a study in electron microscopy and histochemistry*. Br J Ophthalmol, 1977. **61**(7): p. 462-72.
114. Takei, Y. and K. Mizuno, *Electron-microscopic study of pseudo-exfoliation of the lens capsule*. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 1978. **205**(4): p. 213-20.
115. Wishart, P.K., G.L. Spaeth, and E.M. Poryzees, *Anterior chamber angle in the exfoliation syndrome*. Br J Ophthalmol, 1985. **69**(2): p. 103-7.

116. Ritch, R., *Exfoliation syndrome and occludable angles*. Trans Am Ophthalmol Soc, 1994. **92**: p. 845-944.
117. Kunishi Y, K.M., Yoshino H, *Gonioscopic features of pseudoexfoliation*. Jpn J Clin Ophthalmol, 1998. **52**: p. 1683-9.
118. Puska, P., *The amount of lens exfoliation and chamber-angle pigmentation in exfoliation syndrome with or without glaucoma*. Acta Ophthalmol Scand, 1995. **73**(3): p. 226-32.
119. Rouhiainen, H. and M. Terasvirta, *Pigmentation of the anterior chamber angle in normal and pseudoexfoliative eyes*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1990. **68**(6): p. 700-2.
120. Futa, R., et al., *Clinical features of capsular glaucoma in comparison with primary open-angle glaucoma in Japan*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1992. **70**(2): p. 214-9.
121. Konstas, A.G. and G.N. Dutton, *Gonioscopic findings in Greek patients with exfoliation glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1991. **69**(3): p. 281-7.
122. Bartholomew, R.S., *Anterior chamber depth in eyes with pseudoexfoliation*. Br J Ophthalmol, 1980. **64**(5): p. 322-3.
123. Gharagozloo, N.Z., R.H. Baker, and R.F. Brubaker, *Aqueous dynamics in exfoliation syndrome*. Am J Ophthalmol, 1992. **114**(4): p. 473-8.
124. Linner, E., B. Schwartz, and D. Araujo, *Optic disc pallor and visual field defect in exfoliative and non-exfoliative, untreated ocular hypertension*. Int Ophthalmol, 1989. **13**(1-2): p. 21-4.
125. Jonas, J.B. and K.I. Papastathopoulos, *Optic disk appearance in pseudoexfoliation syndrome*. Am J Ophthalmol, 1997. **123**(2): p. 174-80.
126. Budde, W.M. and J.B. Jonas, *[Morphology of the optic papilla in glaucoma. II. Secondary chronic open angle glaucoma]*. Klin Monbl Augenheilkd, 1999. **215**(4): p. 221-7.
127. Puska, P. and C. Raitta, *Peripapillary atrophy in unilateral capsular glaucoma*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993. **231**(11): p. 642-6.
128. Tezel, G. and T.H. Tezel, *The comparative analysis of optic disc damage in exfoliative glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1993. **71**(6): p. 744-50.
129. Netland, P.A., et al., *Elastosis of the lamina cribrosa in pseudoexfoliation syndrome with glaucoma*. Ophthalmology, 1995. **102**(6): p. 878-86.
130. Laatikainen, L., *Fluorescein angiographic studies of the peripapillary and perilimbal regions in simple, capsular and low-tension glaucoma*. Acta Ophthalmol Suppl, 1971. **111**: p. 3-83.
131. Kozobolis, V.P., et al., *Evaluation of tear secretion and tear film stability in pseudoexfoliation syndrome*. Acta Ophthalmol Scand, 1999. **77**(4): p. 406-9.
132. Kuchle, M., U. Schlotzer-Schrehardt, and G.O. Naumann, *Occurrence of pseudoexfoliative material in parabolbar structures in pseudoexfoliation syndrome*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1991. **69**(1): p. 124-30.

133. Eagle, R.C., Jr., R.L. Font, and B.S. Fine, *The basement membrane exfoliation syndrome*. Arch Ophthalmol, 1979. **97**(3): p. 510-5.
134. Schlotzer-Schrehardt, U. and G.O. Naumann, *Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome*. Am J Ophthalmol, 2006. **141**(5): p. 921-937.
135. Madden, J.G. and M.J. Crowley, *Factors in the exfoliation syndrome*. Br J Ophthalmol, 1982. **66**(7): p. 432-7.
136. Hirvelä H, L.H., Laatikainen L, *Prevalence and risk factors of lens opacities in the elderly in Finland*. Ophthalmology, 2000. **102**: p. 108-17.
137. Brooks, A.M. and W.E. Gillies, *The presentation and prognosis of glaucoma in pseudoexfoliation of the lens capsule*. Ophthalmology, 1988. **95**(2): p. 271-6.
138. Henry, J.C., et al., *Long-term follow-up of pseudoexfoliation and the development of elevated intraocular pressure*. Ophthalmology, 1987. **94**(5): p. 545-52.
139. Barthe, J., et al., *[An epidemiologic approach to the exfoliative syndrome in the High Pyrenees]*. Bull Soc Ophthalmol Fr, 1985. **85**(6-7): p. 795-7.
140. Tarkkanen, A. and T. Kivela, *Cumulative incidence of converting from clinically unilateral to bilateral exfoliation syndrome*. J Glaucoma, 2004. **13**(3): p. 181-4.
141. Prince, A.M., et al., *Preclinical diagnosis of pseudoexfoliation syndrome*. Arch Ophthalmol, 1987. **105**(8): p. 1076-82.
142. Kivela, T., J. Hietanen, and M. Uusitalo, *Autopsy analysis of clinically unilateral exfoliation syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(10): p. 2008-15.
143. Hammer, T., U. Schlotzer-Schrehardt, and G.O. Naumann, *Unilateral or asymmetric pseudoexfoliation syndrome? An ultrastructural study*. Arch Ophthalmol, 2001. **119**(7): p. 1023-31.
144. Bialasiewicz, A.A., et al., *[Cataract patients with pseudoexfoliation (PEX) syndrome among a population with high prevalence of PEX. Clinical findings and morphological and surgical characteristics]*. Ophthalmologie, 2005. **102**(12): p. 1181-5.
145. Konstas, A.G., et al., *Clinical presentation and initial treatment patterns in patients with exfoliation glaucoma versus primary open-angle glaucoma*. Ophthalmic Surg Lasers, 1997. **28**(2): p. 111-7.
146. Konstas, A.G., D.A. Mantsiris, and W.C. Stewart, *Diurnal intraocular pressure in untreated exfoliation and primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(2): p. 182-5.
147. Johnson, D.H. and R.F. Brubaker, *Dynamics of aqueous humor in the syndrome of exfoliation with glaucoma*. Am J Ophthalmol, 1982. **93**(5): p. 629-34.
148. Haydon, P.R., *[Pseudoexfoliation syndrome as a cause of chronic glaucoma]*. Klin Monbl Augenheilkd, 1986. **189**(4): p. 293-301.

149. Konstas, A.G., et al., *Prevalence, diagnostic features, and response to trabeculectomy in exfoliation glaucoma*. *Ophthalmology*, 1993. **100**(5): p. 619-27.
150. Kuchle, M., W.J. Iliff, and W.R. Green, *[Combined true exfoliation and pseudoexfoliation of the anterior lens capsule]*. *Klin Monbl Augenheilkd*, 1996. **208**(2): p. 127-9.
151. Konstas, A.G. and S. Diafas, *Loss of iridolenticular contact in eyes with exfoliation syndrome may protect against glaucoma*. *Acta Ophthalmol Scand*, 1999. **77**(4): p. 467-70.
152. Gottanka, J., et al., *Correlation of pseudoexfoliative material and optic nerve damage in pseudoexfoliation syndrome*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997. **38**(12): p. 2435-46.
153. Ringvold, A. and T. Vegge, *Electron microscopy of the trabecular meshwork in eyes with exfoliation syndrome. (Pseudoexfoliation of the lens capsule)*. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*, 1971. **353**(2): p. 110-27.
154. Schlotzer-Schrehardt, U. and G.O. Naumann, *Trabecular meshwork in pseudoexfoliation syndrome with and without open-angle glaucoma. A morphometric, ultrastructural study*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. **36**(9): p. 1750-64.
155. Benedikt, O. and P. Roll, *The trabecular meshwork of a non-glaucomatous eye with the exfoliation syndrome. Electronmicroscopic study*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1979. **384**(3): p. 347-55.
156. Richardson, T.M. and D.L. Epstein, *Exfoliation glaucoma: a quantitative perfusion and ultrastructural study*. *Ophthalmology*, 1981. **88**(9): p. 968-80.
157. Kuchle, M., et al., *Blood-aqueous barrier in pseudoexfoliation syndrome: evaluation by immunohistochemical staining of endogenous albumin*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1996. **234**(1): p. 12-8.
158. Schlötzer-Schrehardt, U., M. Kuchle, and G. Naumann, *Mechanisms of glaucoma development in pseudoexfoliation syndrome*, in *Pathogenesis and Risk Factors of Glaucoma*, G.F. Gramer E, Editor. 1999, Springer: Heidelberg. p. 34-49.
159. Lanzl, I.M., R.L. Merte, and A.D. Graham, *Does head positioning influence anterior chamber depth in pseudoexfoliation syndrome?* *J Glaucoma*, 2000. **9**(3): p. 214-8.
160. Teus, M.A., et al., *Intraocular pressure as a risk factor for visual field loss in pseudoexfoliative and in primary open-angle glaucoma*. *Ophthalmology*, 1998. **105**(12): p. 2225-9; discussion 2229-30.
161. Gumus, K., et al., *Diurnal variation of intraocular pressure and its correlation with retinal nerve fiber analysis in Turkish patients with exfoliation syndrome*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006. **244**(2): p. 170-6.
162. Bergea, B., L. Bodin, and B. Svedbergh, *Impact of intraocular pressure regulation on visual fields in open-angle glaucoma*. *Ophthalmology*, 1999. **106**(5): p. 997-1004; discussion 1004-5.
163. Shihadeh, W.A., et al., *Delayed intraocular pressure elevation after pupillary dilation in exfoliation syndrome*. *Acta Ophthalmol*, 2011. **89**(6): p. 560-2.

164. Gross, F.J., D. Tingey, and D.L. Epstein, *Increased prevalence of occludable angles and angle-closure glaucoma in patients with pseudoexfoliation*. Am J Ophthalmol, 1994. **117**(3): p. 333-6.
165. Kasner O, I.J., Overburry O, *Pseudo-exfoliation and chronic angle closure glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38 (Suppl)**: p. S1053.
166. Herbst, R.W., *Angle closure glaucoma in a patient with pseudoexfoliation of the lens capsule*. Ann Ophthalmol, 1976. **8**(7): p. 853-6.
167. Franks, W.A., et al., *Secondary angle closure in association with pseudoexfoliation of the lens capsule*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1990. **68**(3): p. 350-2.
168. Pavlin, C.J., R. Ritch, and F.S. Foster, *Ultrasound biomicroscopy in plateau iris syndrome*. Am J Ophthalmol, 1992. **113**(4): p. 390-5.
169. Ritch, R., *Plateau iris is caused by abnormally positioned ciliary processes*. J Glaucoma, 1992. **1**: p. 23-6.
170. von der Lippe, I., M. Kuchle, and G.O. Naumann, *Pseudoexfoliation syndrome as a risk factor for acute ciliary block angle closure glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1993. **71**(2): p. 277-9.
171. Dark, A.J., *Cataract extraction complicated by capsular glaucoma*. Br J Ophthalmol, 1979. **63**(7): p. 465-8.
172. Hietanen, J., et al., *Exfoliation syndrome in patients scheduled for cataract surgery*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1992. **70**(4): p. 440-6.
173. Puska, P. and A. Tarkkanen, *Exfoliation syndrome as a risk factor for cataract development: five-year follow-up of lens opacities in exfoliation syndrome*. J Cataract Refract Surg, 2001. **27**(12): p. 1992-8.
174. Naumann, G.O., M. Kuchle, and U. Schonherr, *[Pseudo-exfoliation syndrome as a risk factor for vitreous loss in extra-capsular cataract extraction. The Erlangen Eye Information Group]*. Fortschr Ophthalmol, 1989. **86**(6): p. 543-5.
175. Moreno, J., S. Duch, and J. Lajara, *Pseudoexfoliation syndrome: clinical factors related to capsular rupture in cataract surgery*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1993. **71**(2): p. 181-4.
176. Kuchle, M., et al., *Pseudoexfoliation syndrome and secondary cataract*. Br J Ophthalmol, 1997. **81**(10): p. 862-6.
177. Brazitikos, P.D. and A. Roth, *Iris modifications following extracapsular cataract extraction with posterior chamber lens implantation*. J Cataract Refract Surg, 1991. **17**(3): p. 269-80.
178. Brooks, A.M. and W.E. Gillies, *The development of microneovascular changes in the iris in pseudoexfoliation of the lens capsule*. Ophthalmology, 1987. **94**(9): p. 1090-7.
179. Brooks, A.M. and W.E. Gillies, *Fluorescein angiography and fluorophotometry of the iris in pseudoexfoliation of the lens capsule*. Br J Ophthalmol, 1983. **67**(4): p. 249-54.

180. Ravalico, G., D. Tognetto, and F. Baccara, *Heparin-surface-modified intraocular lens implantation in eyes with pseudoexfoliation syndrome*. J Cataract Refract Surg, 1994. **20**(5): p. 543-9.
181. Baba, H., *Investigation of the pathogenesis of glaucoma capsulare with special discussion of alpha 1 Lp and Cp in aqueous humor*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1982. **218**(6): p. 283-6.
182. Kuchle, M., et al., *The blood-aqueous barrier in eyes with pseudoexfoliation syndrome*. Ophthalmic Res, 1995. **27 Suppl 1**: p. 136-42.
183. Baltatzis, S., G. Georgopoulos, and P. Theodossiadis, *Fibrin reaction after extracapsular cataract extraction: a statistical evaluation*. Eur J Ophthalmol, 1993. **3**(2): p. 95-7.
184. Walinder, P.E., et al., *Fibrinoid reaction after extracapsular cataract extraction and relationship to exfoliation syndrome*. J Cataract Refract Surg, 1989. **15**(5): p. 526-30.
185. Ringvold, A., *Electron microscopy of the wall of iris vessels in eyes with and without exfoliation syndrome (pseudoexfoliation of the lens capsule)*. Virchows Arch A Pathol Pathol Anat, 1969. **348**(4): p. 328-41.
186. Ringvold, A. and M. Davanger, *Iris neovascularisation in eyes with pseudoexfoliation syndrome*. Br J Ophthalmol, 1981. **65**(2): p. 138-41.
187. Boguszakova, J. and Z. Dubska, *[The fluoroangiographic picture of the iris in pseudoexfoliative glaucoma]*. Cesk Oftalmol, 1987. **43**(4): p. 237-43.
188. Vannas, A., *Vascular changes in pseudoexfoliation of the lens capsule and capsular glaucoma. A fluorescein angiographic and electron microscopic study*. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 1972. **184**(3): p. 248-53.
189. Sakai, K. and K. Kojima, *Flourescein angiography and electron microscopic study of the iris with exfoliation syndrome*. Folia Ophthalmol Jpn, 1982. **33**: p. 72-82.
190. Parodi, M.B., et al., *Iris indocyanine green angiography in pseudoexfoliation syndrome and capsular glaucoma*. Acta Ophthalmol Scand, 2000. **78**(4): p. 437-42.
191. Helbig, H., et al., *Anterior-chamber hypoxia and iris vasculopathy in pseudoexfoliation syndrome*. Ger J Ophthalmol, 1994. **3**(3): p. 148-53.
192. Friedburg D, B.G., *Flourescein angiographic features of the pseudoexfoliation syndrome*. Glaucoma, 1982. **4**: p. 13-6.
193. Meyer, E., et al., *Pseudoexfoliation: epidemiology, clinical and scanning electron microscopic study*. Ophthalmologica, 1984. **188**(3): p. 141-7.
194. Pohjanpelto, P., *Long-term prognosis of visual field in glaucoma simplex and glaucoma capsular*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1985. **63**(4): p. 418-23.
195. Gillies WE, W.R., *Pseudoexfoliation of the lens capsule and glaucoma*. Aust J Ophthalmol, 1977. **5**: p. 18-20.



196. Karjalainen, K., A. Tarkkanen, and L. Merenmies, *Exfoliation syndrome in enucleated haemorrhagic and absolute glaucoma*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1987. **65**(3): p. 320-2.
197. Miyazaki, M., et al., *The prevalence of pseudoexfoliation syndrome in a Japanese population: the Hisayama study*. J Glaucoma, 2005. **14**(6): p. 482-4.
198. Brajkovic J, K.-S.I., Ergegovic A, Miletic-Juric A, *Ocular pseudoexfoliation syndrome and internal systemic diseases* Acta Clin Croat, 2007. (**Suppl. 1**): p. 57-61.
199. Jonas, J.B. and A.E. Grundler, *Prevalence of diabetes mellitus and arterial hypertension in primary and secondary open-angle glaucomas*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998. **236**(3): p. 202-6.
200. Tarkkanen, A., A. Reunanen, and T. Kivela, *Frequency of systemic vascular diseases in patients with primary open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma*. Acta Ophthalmol, 2008. **86**(6): p. 598-602.
201. Bojic, L., et al., *Pseudoexfoliation syndrome and asymptomatic myocardial dysfunction*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2005. **243**(5): p. 446-9.
202. Citirik, M., et al., *A possible link between the pseudoexfoliation syndrome and coronary artery disease*. Eye (Lond), 2007. **21**(1): p. 11-5.
203. Sekeroglu, M.A., et al., *Systemic associations and prevalence of exfoliation syndrome in patients scheduled for cataract surgery*. Eur J Ophthalmol, 2008. **18**(4): p. 551-5.
204. Puustjarvi, T., et al., *Plasma and aqueous humour levels of homocysteine in exfoliation syndrome*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004. **242**(9): p. 749-54.
205. Altintas, O., et al., *Homocysteine and nitric oxide levels in plasma of patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and primary open-angle glaucoma*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2005. **243**(7): p. 677-83.
206. Tranchina, L., et al., *Levels of plasma homocysteine in pseudoexfoliation glaucoma*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011. **249**(3): p. 443-8.
207. Turkcu, F.M., et al., *Plasma homocysteine, folic acid, and vitamin B(1)(2) levels in patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and normotensive glaucoma*. Medicina (Kaunas), 2013. **49**(5): p. 214-8.
208. Shrum, K.R., M.G. Hattenhauer, and D. Hodge, *Cardiovascular and cerebrovascular mortality associated with ocular pseudoexfoliation*. Am J Ophthalmol, 2000. **129**(1): p. 83-6.
209. Schumacher, S., et al., *Pseudoexfoliation syndrome and aneurysms of the abdominal aorta*. Lancet, 2001. **357**(9253): p. 359-60.
210. Allingham, R.R., et al., *Pseudoexfoliation syndrome in Icelandic families*. Br J Ophthalmol, 2001. **85**(6): p. 702-7.
211. Psilas, K.G., M.J. Stefanidou, and M.B. Aspiotis, *Pseudoexfoliation syndrome and diabetes mellitus*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1991. **69**(5): p. 664-6.

212. Morrison, J.C. and W.R. Green, *Light microscopy of the exfoliation syndrome*. Acta Ophthalmol Suppl, 1988. **184**: p. 5-27.
213. Davanger, M., *Pseudo-exfoliation material. Electron microscopy after the application of lanthanum as tracer particles and ionic stain*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1980. **58**(4): p. 512-9.
214. Davanger, M., *On the ultrastructure and the formation of pseudo-exfoliation material*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1980. **58**(4): p. 520-7.
215. Davanger, M. and O.O. Pedersen, *Pseudo-exfoliation material on the anterior lens surface. Demonstration and examination of an interfibrillar ground substance*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1975. **53**(1): p. 3-18.
216. Davanger, M., *On the molecular composition and physico-chemical properties of the pseudo-exfoliation material*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1977. **55**(4): p. 621-33.
217. Davanger, M., *On the interfibrillar matrix of the pseudo-exfoliation material*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1978. **56**(2): p. 233-40.
218. Davanger, M., *Studies on the pseudo-exfoliation material: a review*. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 1978. **208**(1-3): p. 65-8.
219. Seland, J.H., *Histopathology of the lens capsule in fibrillogenesis epitheliocapsularis (FEC) or so-called senile exfoliation or pseudoexfoliation. An electron microscopic study*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1979. **57**(3): p. 477-99.
220. Baba, H., *Histochemical and polarization optical investigation for glycosaminoglycans in exfoliation syndrome*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1983. **221**(3): p. 106-9.
221. Fitzsimmons, T.D., P. Fagerholm, and O. Wallin, *Hyaluronan in the exfoliation syndrome*. Acta Ophthalmol Scand, 1997. **75**(3): p. 257-60.
222. Kubota, T., et al., *Double staining of proteoglycans and the HNK-1 carbohydrate epitope in pseudoexfoliation material*. Curr Eye Res, 1998. **17**(1): p. 60-4.
223. Harnisch, J.P., et al., *Identification of a basement membrane proteoglycan in exfoliation material*. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 1981. **215**(4): p. 273-8.
224. Schlotzer-Schrehardt, U., S. Dorfler, and G.O. Naumann, *Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule*. Curr Eye Res, 1992. **11**(4): p. 343-55.
225. Tawara, A., et al., *Distribution and characterization of proteoglycans associated with exfoliation material*. Curr Eye Res, 1996. **15**(11): p. 1101-11.
226. Lamari, F., et al., *Profiling of the eye aqueous humor in exfoliation syndrome by high-performance liquid chromatographic analysis of hyaluronan and galactosaminoglycans*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. **709**(2): p. 173-8.
227. Amari, F., et al., *Lectin electron microscopic histochemistry of the pseudoexfoliative material in the skin*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. **35**(11): p. 3962-6.



228. Hietanen, J. and A. Tarkkanen, *Glycoconjugates in exfoliation syndrome. A lectin histochemical study of the ciliary body and lens*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1989. **67**(3): p. 288-94.
229. Hietanen, J., A. Tarkkanen, and T. Kivela, *Galactose-containing glycoconjugates of the iris, the aqueous outflow passages and the cornea in capsular glaucoma. A lectin histochemical study*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1995. **233**(4): p. 192-9.
230. Li, Z.Y., B.W. Streeten, and R.N. Wallace, *Association of elastin with pseudoexfoliative material: an immunoelectron microscopic study*. Curr Eye Res, 1988. **7**(12): p. 1163-72.
231. Li, Z.Y., B.W. Streeten, and N. Yohai, *Amyloid P protein in pseudoexfoliative fibrilloglycopathology*. Curr Eye Res, 1989. **8**(2): p. 217-27.
232. Streeten, B.W., S.A. Gibson, and A.J. Dark, *Pseudoexfoliative material contains an elastic microfibrillar-associated glycoprotein*. Trans Am Ophthalmol Soc, 1986. **84**: p. 304-20.
233. Schlotzer-Schrehardt, U., et al., *Increased extracellular deposition of fibrillin-containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(5): p. 970-84.
234. Schlotzer-Schrehardt, U., et al., *[Latent TGF-beta 1 binding protein (LTBP-1); a new marker for intra-and extraocular PEX deposits]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2000. **216**(6): p. 412-9.
235. Shimizu, T. and R. Futa, *The fine structure of pigment epithelium of the iris in capsular glaucoma*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1985. **223**(2): p. 77-82.
236. Schlotzer-Schrehardt, U.M., S. Dorfler, and G.O. Naumann, *Corneal endothelial involvement in pseudoexfoliation syndrome*. Arch Ophthalmol, 1993. **111**(5): p. 666-74.
237. Gartaganis, S.P., et al., *Increased aqueous humor basic fibroblast growth factor and hyaluronan levels in relation to the exfoliation syndrome and exfoliative glaucoma*. Acta Ophthalmol Scand, 2001. **79**(6): p. 572-5.
238. Ho, S.L., et al., *Elevated aqueous humor tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome*. Br J Ophthalmol, 2005. **89**(2): p. 169-73.
239. Koliakos, G.G., et al., *8-Isoprostaglandin F2a and ascorbic acid concentration in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome*. Br J Ophthalmol, 2003. **87**(3): p. 353-6.
240. Koliakos, G.G., et al., *Endothelin-1 concentration is increased in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(4): p. 523-7.
241. Schlotzer-Schrehardt, U., et al., *Role of transforming growth factor-beta1 and its latent form binding protein in pseudoexfoliation syndrome*. Exp Eye Res, 2001. **73**(6): p. 765-80.
242. Yilmaz, A., U. Adigüzel, and L. Tamer, *Serum oxidant/antioxidant balance in exfoliation syndrome*. Clin Exp Ophthalmol, 2005. **33**: p. 63-66.
243. Yuksel, N., et al., *Ocular hemodynamics in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma*. Ophthalmology, 2001. **108**(6): p. 1043-9.

244. Gillies, W.E. and A.M. Brooks, *Central retinal vein occlusion in pseudoexfoliation of the lens capsule*. Clin Exp Ophthalmol, 2002. **30**(3): p. 176-87.
245. Akarsu, C. and B. Unal, *Cerebral haemodynamics in patients with pseudoexfoliation glaucoma*. Eye (Lond), 2005. **19**(12): p. 1297-300.
246. Hollo, G., P. Lakatos, and K. Farkas, *Cold pressor test and plasma endothelin-1 concentration in primary open-angle and capsular glaucoma*. J Glaucoma, 1998. **7**(2): p. 105-10.
247. Kotikoski, H., et al., *Biochemical markers of the L-arginine-nitric oxide pathway in the aqueous humour in glaucoma patients*. Acta Ophthalmol Scand, 2002. **80**(2): p. 191-5.
248. Bleich, S., et al., *Elevated homocysteine levels in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation glaucoma*. Am J Ophthalmol, 2004. **138**(1): p. 162-4.
249. Lee, S., S. Lee, and K. Sharma, *The pathogenesis of fibrosis and renal disease in scleroderma: recent insights from glomerulosclerosis*. Curr Rheumatol Rep, 2004. **6**(2): p. 141-8.
250. Zenkel, M., et al., *Differential gene expression in pseudoexfoliation syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(10): p. 3742-52.
251. Zenkel, M., et al., *Impaired cytoprotective mechanisms in eyes with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(12): p. 5558-66.
252. Damji, K.F., et al., *Is pseudoexfoliation syndrome inherited? A review of genetic and nongenetic factors and a new observation*. Ophthalmic Genet, 1998. **19**(4): p. 175-85.
253. Orr, A.C., et al., *Exfoliation syndrome: clinical and genetic features*. Ophthalmic Genet, 2001. **22**(3): p. 171-85.
254. Forsman, E., et al., *Exfoliation syndrome: prevalence and inheritance in a subisolate of the Finnish population*. Acta Ophthalmol Scand, 2007. **85**(5): p. 500-7.
255. Wiggs, J.L., *Association Between LOXL1 and pseudoexfoliation*. Arch Ophthalmol, 2008. **126**(3): p. 420-1.
256. Csiszar, K., *Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. **70**: p. 1-32.
257. Liu, X., et al., *Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 178-82.
258. Yu, H.G., et al., *Increased choroidal neovascularization following laser induction in mice lacking lysyl oxidase-like 1*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(6): p. 2599-605.
259. Thorleifsson, G., et al., *Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma*. Science, 2007. **317**(5843): p. 1397-400.
260. Thomassin, L., et al., *The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42848-55.

261. Rautenbach, R.M., et al., *An investigation into LOXL1 variants in black South African individuals with exfoliation syndrome*. Arch Ophthalmol, 2011. **129**(2): p. 206-10.
262. Williams, S.E., et al., *Major LOXL1 risk allele is reversed in exfoliation glaucoma in a black South African population*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 705-12.
263. Challa, P., *Genetics of pseudoexfoliation syndrome*. Curr Opin Ophthalmol, 2009. **20**(2): p. 88-91.
264. Schlotzer-Schrehardt, U., et al., *Genotype-correlated expression of lysyl oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and normal patients*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1724-35.
265. Schlötzer-Schrehardt, U., et al., *Interaction Between LOXL1 and Elastic Fiber Proteins in Fibrogenesis Associated With Pseudoexfoliation Syndrome*, in ARVO. 2009, Investigative Ophthalmology & Visual Science Ericeira (Portugal). p. 863.
266. Schlotzer-Schrehardt, U., *Molecular pathology of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma--new insights from LOXL1 gene associations*. Exp Eye Res, 2009. **88**(4): p. 776-85.
267. De Duve, C. and R. Wattiaux, *Functions of lysosomes*. Annu Rev Physiol, 1966. **28**: p. 435-92.
268. Cuervo, A.M., *Autophagy: in sickness and in health*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 70-7.
269. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
270. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. **147**(4): p. 728-41.
271. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
272. Mizushima, N. and B. Levine, *Autophagy in mammalian development and differentiation*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 823-30.
273. Rabinowitz, J.D. and E. White, *Autophagy and metabolism*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1344-8.
274. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin, *Autophagy in immunity and inflammation*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 323-35.
275. Choi, A.M., S.W. Ryter, and B. Levine, *Autophagy in human health and disease*. N Engl J Med, 2013. **368**(19): p. 1845-6.
276. White, E., *Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(6): p. 401-10.
277. Rubinsztein, D.C., G. Marino, and G. Kroemer, *Autophagy and aging*. Cell, 2011. **146**(5): p. 682-95.
278. Nixon, R.A., *The role of autophagy in neurodegenerative disease*. Nat Med, 2013. **19**(8): p. 983-97.

279. Kraft, C., M. Peter, and K. Hofmann, *Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 836-41.
280. Knecht, E., et al., *Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(15): p. 2427-43.
281. Kane, P.M., *The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(1): p. 177-91.
282. Pyo, J.O., J. Nah, and Y.K. Jung, *Molecules and their functions in autophagy*. Exp Mol Med, 2012. **44**(2): p. 73-80.
283. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *The role of Atg proteins in autophagosome formation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 107-32.
284. Chen, Y. and D.J. Klionsky, *The regulation of autophagy - unanswered questions*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 2): p. 161-70.
285. Suzuki, K. and Y. Ohsumi, *Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2156-61.
286. Axe, E.L., et al., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 685-701.
287. Cuervo, A.M., *The plasma membrane brings autophagosomes to life*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(8): p. 735-7.
288. Criollo, A., et al., *Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 1029-39.
289. Berg, T.O., et al., *Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21883-92.
290. Sagne, C., et al., *Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7206-11.
291. Liang, C., et al., *Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(7): p. 776-87.
292. Renna, M., et al., *Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 3): p. 469-82.
293. Tresse, E., et al., *VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD*. Autophagy, 2010. **6**(2): p. 217-27.
294. Rusten, T.E., et al., *ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy*. Curr Biol, 2007. **17**(20): p. 1817-25.
295. Vellai, T., et al., *The regulation of aging: does autophagy underlie longevity?* Trends Cell Biol, 2009. **19**(10): p. 487-94.

296. Conde, R.D. and O.A. Scornik, *Faster synthesis and slower degradation of liver protein during developmental growth*. *Biochem J*, 1977. **166**(1): p. 115-21.
297. Aladzsisy, I., et al., *Autophagy genes unc-51 and bec-1 are required for normal cell size in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2007. **177**(1): p. 655-60.
298. Neufeld, T.P., *Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development*. *Mech Dev*, 2003. **120**(11): p. 1283-96.
299. Gozuacik, D. and A. Kimchi, *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2891-906.
300. Pattingre, S. and B. Levine, *Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer?* *Cancer Res*, 2006. **66**(6): p. 2885-8.
301. Kroemer, G., G. Marino, and B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 280-93.
302. Murrow, L. and J. Debnath, *Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease*. *Annu Rev Pathol*, 2013. **8**: p. 105-37.
303. Gozuacik, D. and A. Kimchi, *Autophagy and cell death*. *Curr Top Dev Biol*, 2007. **78**: p. 217-45.
304. Cuervo, A.M., et al., *Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells*. *Autophagy*, 2005. **1**(3): p. 131-40.
305. Martinez-Lopez, N., D. Athonvarangkul, and R. Singh, *Autophagy and aging*. *Adv Exp Med Biol*, 2015. **847**: p. 73-87.
306. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. *Nature*, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
307. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Biotechnology (N Y)*, 1993. **11**(9): p. 1026-30.
308. Truscott, R.J., *Age-related nuclear cataract-oxidation is the key*. *Exp Eye Res*, 2005. **80**(5): p. 709-25.
309. Michael, R. and A.J. Bron, *The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011. **366**(1568): p. 1278-92.
310. de Juan-Marcos, L., et al., *Association of Lysyl Oxidase-Like 1 Gene Polymorphisms in Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma in a Spanish Population*. *Ophthalmic Genet*, 2016. **37**(1): p. 25-30.
311. Alvarez, L., et al., *LOXL1 gene variants and their association with pseudoexfoliation glaucoma (XFG) in Spanish patients*. *BMC Med Genet*, 2015. **16**: p. 72.
312. Lemmela, S., et al., *Association of LOXL1 gene with Finnish exfoliation syndrome patients*. *J Hum Genet*, 2009. **54**(5): p. 289-97.

313. Mossbock, G., et al., *Lysyl oxidase-like protein 1 (LOXL1) gene polymorphisms and exfoliation glaucoma in a Central European population*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 857-61.
314. Pasutto, F., et al., *Association of LOXL1 common sequence variants in German and Italian patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(4): p. 1459-63.
315. Malukiewicz, G., et al., *Analysis of LOXL1 single nucleotide polymorphisms in Polish population with pseudoexfoliation syndrome*. Acta Ophthalmol, 2011. **89**(1): p. e64-6.
316. Metaxaki, I., et al., *Association of lysyl oxidase-like 1 gene common sequence variants in Greek patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1446-52.
317. Chiras, D., et al., *Development of novel LOXL1 genotyping method and evaluation of LOXL1, APOE and MTHFR polymorphisms in exfoliation syndrome/glaucoma in a Greek population*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1006-16.
318. Anastasopoulos, E., et al., *Association of LOXL1 polymorphisms with pseudoexfoliation, glaucoma, intraocular pressure, and systemic diseases in a Greek population. The Thessaloniki eye study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(7): p. 4238-43.
319. Aragon-Martin, J.A., et al., *Evaluation of LOXL1 gene polymorphisms in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 533-41.
320. Challa, P., et al., *Analysis of LOXL1 polymorphisms in a United States population with pseudoexfoliation glaucoma*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 146-9.
321. Fan, B.J., et al., *DNA sequence variants in the LOXL1 gene are associated with pseudoexfoliation glaucoma in a U.S. clinic-based population with broad ethnic diversity*. BMC Med Genet, 2008. **9**: p. 5.
322. Yang, X., et al., *Genetic association of LOXL1 gene variants and exfoliation glaucoma in a Utah cohort*. Cell Cycle, 2008. **7**(4): p. 521-4.
323. Hewitt, A.W., et al., *Ancestral LOXL1 variants are associated with pseudoexfoliation in Caucasian Australians but with markedly lower penetrance than in Nordic people*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(5): p. 710-6.
324. Kasim, B., et al., *Association of LOXL1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome/glaucoma and primary open angle glaucoma in a Turkish population*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 114-20.
325. Micheal, S., et al., *Role of Lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in Pakistani patients with pseudoexfoliative glaucoma*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 1040-4.
326. Abu-Amero, K.K., et al., *Analysis of LOXL1 polymorphisms in a Saudi Arabian population with pseudoexfoliation glaucoma*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 2805-10.
327. Jaimes, M., et al., *Prevalence of high-risk alleles in the LOXL1 gene and its association with pseudoexfoliation syndrome and exfoliation glaucoma in a Latin American population*. Ophthalmic Genet, 2012. **33**(1): p. 12-7.



328. Mayinu and X. Chen, *Evaluation of LOXL1 polymorphisms in exfoliation syndrome in the Uygur population*. Mol Vis, 2011. **17**: p. 1734-44.
329. Lee, K.Y., et al., *Association of LOXL1 polymorphisms with pseudoexfoliation in the Chinese*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 1120-6.
330. Chen, L., et al., *Evaluation of LOXL1 polymorphisms in exfoliation syndrome in a Chinese population*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 2349-57.
331. Ramprasad, V.L., et al., *Association of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the LOXL1 gene with pseudoexfoliation syndrome in India*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 318-22.
332. Dubey, S.K., et al., *Lysyl oxidase-like 1 gene in the reversal of promoter risk allele in pseudoexfoliation syndrome*. JAMA Ophthalmol, 2014. **132**(8): p. 949-55.
333. Fuse, N., et al., *Evaluation of LOXL1 polymorphisms in eyes with exfoliation glaucoma in Japanese*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1338-43.
334. Hayashi, H., et al., *Lysyl oxidase-like 1 polymorphisms and exfoliation syndrome in the Japanese population*. Am J Ophthalmol, 2008. **145**(3): p. 582-585.
335. Mabuchi, F., et al., *Lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in Japanese patients with primary open angle glaucoma and exfoliation syndrome*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1303-8.
336. Mori, K., et al., *LOXL1 genetic polymorphisms are associated with exfoliation glaucoma in the Japanese population*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1037-40.
337. Ozaki, M., et al., *Association of LOXL1 gene polymorphisms with pseudoexfoliation in the Japanese*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(9): p. 3976-80.
338. Tanito, M., et al., *LOXL1 variants in elderly Japanese patients with exfoliation syndrome/glaucoma, primary open-angle glaucoma, normal tension glaucoma, and cataract*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1898-905.
339. Park, D.Y., et al., *Evaluation of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in pseudoexfoliation syndrome in a Korean population*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 448-53.
340. Sagong, M., B.Y. Gu, and S.C. Cha, *Association of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome in Koreans*. Mol Vis, 2011. **17**: p. 2808-17.
341. Guadarrama-Vallejo, D., A. Miranda-Duarte, and J.C. Zenteno, *The T allele of lysyl oxidase-like 1 rs41435250 is a novel risk factor for pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma independently and through intragenic epistatic interaction*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1937-44.
342. Aung, T., et al., *Genetic association study of exfoliation syndrome identifies a protective rare variant at LOXL1 and five new susceptibility loci*. Nat Genet, 2017. **49**(7): p. 993-1004.
343. Wolosin, J.M., R. Ritch, and A.M. Bernstein, *Is Autophagy Dysfunction a Key to Exfoliation Glaucoma?* J Glaucoma, 2016.

344. Want, A., et al., *Autophagy and Mitochondrial Dysfunction in Tenon Fibroblasts from Exfoliation Glaucoma Patients*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0157404.
345. Ishida, Y., et al., *Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(11): p. 2744-54.
346. Lichtenstein, A., et al., *Autophagy: a pathway that contributes to connexin degradation*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 6): p. 910-20.
347. Kim, S.I., et al., *Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)-beta1*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 11677-88.
348. M, F.P., *Estudio de la ruta de la autofagia en carcinoma de endometrio esporádico*, in *Departamento de Medicina*. 2016, Universidad de Salamanca.
349. Li, Q.X., et al., *The Thr300Ala variant of ATG16L1 is associated with decreased risk of brain metastasis in patients with non-small cell lung cancer*. Autophagy, 2017. **13**(6): p. 1053-1063.
350. Cheng, J.F., et al., *T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(10): p. 1258-66.
351. Burada, F., et al., *ATG16L1 T300A Polymorphism is Correlated with Gastric Cancer Susceptibility*. Pathol Oncol Res, 2016. **22**(2): p. 317-22.
352. Grimm, W.A., et al., *The Thr300Ala variant in ATG16L1 is associated with improved survival in human colorectal cancer and enhanced production of type I interferon*. Gut, 2016. **65**(3): p. 456-64.
353. Morishita, H. and N. Mizushima, *Autophagy in the lens*. Exp Eye Res, 2016. **144**: p. 22-8.
354. Morishita, H., et al., *Deletion of autophagy-related 5 (Atg5) and Pik3c3 genes in the lens causes cataract independent of programmed organelle degradation*. J Biol Chem, 2013. **288**(16): p. 11436-47.
355. Costello, M.J., et al., *Autophagy and mitophagy participate in ocular lens organelle degradation*. Exp Eye Res, 2013. **116**: p. 141-50.
356. de Juan-Marcos, L., et al., *Investigation of Association between Autophagy-Related Gene Polymorphisms and Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma in a Spanish Population*. Semin Ophthalmol, 2016: p. 1-6.



# Anexos

---





## **ANEXO I: CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN**

---

### **PACIENTE CON SÍNDROME PSEUDOEXFOLIATIVO (SPEX):**

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

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

- Mayor de 18 años.
- Español
- Diagnóstico de PEX: material PEX en el reborde pupilar o superficie anterior del cristalino
- Haber recibido información suficiente del estudio y haber firmado el consentimiento informado

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Pacientes con el diagnóstico de glaucoma.
- No cumplir todos los criterios de inclusión.

### **PACIENTE CON GLAUCOMA PSEUDOEXFOLIATIVO (GPEX):**

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

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

- Mayor de 18 años.
- Español
- Diagnóstico de glaucoma y PEX: material PEX en reborde pupilar o superficie anterior del cristalino
- Haber recibido información suficiente del estudio y haber firmado el consentimiento informado

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Cualquier otro glaucoma diferente del glaucoma pseudoexfoliativo.
- Pacientes en quienes no es preciso el diagnóstico de glaucoma.
- No cumplir todos los criterios de inclusión.

### **PACIENTE CONTROL**

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

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

- Mayor de 18 años.
- Español
- No patología ocular (excepto desarrollo de catarata quirúrgica)
- Haber recibido información suficiente del estudio y haber firmado el consentimiento informado

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Pacientes con el diagnóstico de glaucoma o síndrome pseudoexfoliativo
- No cumplir todos los criterios de inclusión.



## ANEXO II: CONSENTIMIENTO INFORMADO



### Consentimiento informado Estudio Genético

Se me va a extraer una muestra de sangre para realizar un estudio genético. Se me ha explicado por parte del Dr. .... y he entendido que:

1. El objetivo de dicho estudio es analizar los genes que pueden estar implicados en la PSEUDOEXFOLIACIÓN. Del tipo y número de genes se conoce muy poco hasta el momento, por lo que este estudio debe ser considerado de investigación básica y sin ninguna repercusión práctica a corto plazo.
2. La unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca realizará los estudios genéticos y preservará el anonimato de la muestra, guardando confidencialidad sobre la identidad del paciente.
3. Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica, guardando estricta confidencialidad sobre la identidad del paciente.
4. Mi ADN sin identificación podrá ser utilizado como control en otros estudios genéticos: SI/NO (Táchese lo que no proceda)

He sido informado de los puntos anteriores y de los temas que de ellos se derivan por el facultativo Dr. ....

En ....., a ..... de ..... 201....

Firma:



# Abreviaturas

---







°C: grados Celsius

μl: microlitro

A: adenina

ADORA3: gen del receptor de adenosina A3

AFG: angiofluoresceingrafía

Ala: alanina

APOE: apolipoproteína E

Arg: arginina

Asp: ácido aspártico

ATG: gen de la autofagia

AV: agudeza visual

bFGF: factor de crecimiento básico de los fibroblastos

BMP1: proteína morfogénica ósea 1

BMU: biomicroscopía ultrasónica

C: citosina

CLU: gen de la clusterina

CTGF: factor de crecimiento del tejido conectivo

ddH<sub>2</sub>O: agua bidestilada

DMAE: degeneración macular asociada a la edad

DNA: ácido desoxiribonucleico

DS: desviación estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEUU: Estados Unidos de América

ESCRT: *endosomal sorting complex required for transport*

ETDRS: *early treatment diabetic retinopathy study*

FBN1: fibrilina 1

g: fuerza centrífuga relativa

G: guanina

GAA: glaucoma de ángulo abierto

GAC: glaucoma de ángulo cerrado

Gln: glutamina

Glu: ácido glutámico

Gly: glicina

GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto

GPEX: glaucoma pseudoexfoliativo

GST: glutatión-S-transferasa

GSTM1: glutatión-S-transferasa microsomal 1

HCl: ácido clorhídrico

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

IC: intervalo de confianza

KCl: cloruro potásico

LAMP2: proteína de membrana lisosomal tipo 2A

Leu: leucina

LIO: lente intraocular

LOX: lixil-oxidasa

LOXL1: lixil-oxidasa-like-1

LTBP1 y 2: proteínas de unión al factor de crecimiento transformante beta latente 1 y 2

M: mol

Met: metionina

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mM: milimol

MMP: metaloproteinasa de la matriz extracelular

n: tamaño muestral

nº: número

ng: nanogramo

nm: nanometro

OCT: tomografía de coherencia óptica

OR: Odds ratio

ORVR: obstrucción de rama venosa de la retina

OVCR: obstrucción de vena central de la retina

P: prevalencia

PAS: estructura preautofagosomal

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: fosfatidiletanolamina

pH: potencia de hidrogeniones

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa

PIO: presión intraocular

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato sódico

SNP: polimorfismo simple de un nucleótido

SPEX: síndrome pseudoexfoliativo

T: timina

TG2: transglutaminasa tisular

TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta 1

Thr: treonina

TIMP: proteína inhibidora tisular de las metaloproteinasas

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

TNF-R1 y 2: receptores del factor de necrosis tumoral 1 y 2

TORC1: proteína quinasa diana del complejo de rapamicina

Ulk1 y 2: *unc-51-like kinase 1 y 2*

VCP: *valosin-containing protein*

# Difusión de Resultados

---





# Genetic association study of exfoliation syndrome identifies a protective rare variant at *LOXLI* and five new susceptibility loci

Exfoliation syndrome (XFS) is the most common known risk factor for secondary glaucoma and a major cause of blindness worldwide. Variants in two genes, *LOXLI* and *CACNA1A*, have previously been associated with XFS. To further elucidate the genetic basis of XFS, we collected a global sample of XFS cases to refine the association at *LOXLI*, which previously showed inconsistent results across populations, and to identify new variants associated with XFS. We identified a rare protective allele at *LOXLI* (p.Phe407, odds ratio (OR) = 25,  $P = 2.9 \times 10^{-14}$ ) through deep resequencing of XFS cases and controls from nine countries. A genome-wide association study (GWAS) of XFS cases and controls from 24 countries followed by replication in 18 countries identified seven genome-wide significant loci ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ). We identified association signals at 13q12 (*POMP*), 11q23.3 (*TMEM136*), 6p21 (*AGPAT1*), 3p24 (*RBMS3*) and 5q23 (near *SEMA6A*). These findings provide biological insights into the pathology of XFS and highlight a potential role for naturally occurring rare *LOXLI* variants in disease biology.

XFS is an age-related systemic disorder involving the extracellular matrix (ECM). It is characterized by the excessive production and progressive accumulation of an abnormal extracellular material in various tissues<sup>1</sup>. Manifesting most conspicuously in the eye, XFS is the most common cause of secondary glaucoma worldwide<sup>2</sup> and is also a prognostic factor for progression of open-angle glaucoma<sup>3</sup>. This disease is common in many populations, with an estimated 60–70 million individuals affected<sup>4–7</sup>. Exfoliation glaucoma (XFG) has a worse prognosis than other major types of glaucoma, and it is often resistant to intraocular-pressure-lowering medical treatment, more often requiring laser and surgical intervention<sup>3,8</sup>. Cumulatively, XFS and XFG represent a major cause of blindness globally.

The strong pattern of familial aggregation for XFS indicates substantial genetic contribution to disease pathology<sup>9,10</sup>, and *LOXLI*, a gene encoding lysyl oxidase homolog 1, was the first genetic locus reported to be associated with this disease<sup>11</sup>. Despite the overwhelming strength of the genetic association seen at polymorphisms mapping to *LOXLI*, the results are inconsistent owing to risk alleles being ‘flipped’ in certain populations<sup>12,13</sup>. Such stark allele reversals imply that the genetic architecture underlying XFS disease biology is complex and worthy of further study.

Recently, *CACNA1A* was identified as the second locus associated with XFS<sup>14</sup>. Realizing that large and inclusive international collaborative efforts are essential in providing new biological leads in complex disease pathogenesis<sup>15–20</sup>, we report here a worldwide collaborative XFS study aimed at further understanding the genetic basis of the disorder. First, because of the allele reversals seen for common polymorphisms at *LOXLI* led by rs3825942[G>A] (p.Gly153Asp) and, to a lesser extent, rs1048661[T>G] (p.Leu141Arg)<sup>12,21–28</sup> (**Supplementary Fig. 1**), we aimed to refine the *LOXLI* genetic landscape by performing deep sequencing of the entire gene in 5,570 XFS and XFG cases and 6,279 controls from nine countries

(**Supplementary Table 1**). The previously reported *CACNA1A* locus was also sequenced to assess whether rare variants in the gene encoding non-synonymous amino acid substitutions could provide further insights<sup>29–31</sup>. In our effort to identify additional genetic variants associated with XFS, we also conducted an expanded GWAS of 13,838 cases and 110,275 controls from countries across six continents (**Supplementary Figs. 2 and 3**, and **Supplementary Table 2**).

## RESULTS

### A rare missense variant in *LOXLI* protects against XFS

We conducted deep resequencing of the entire *LOXLI* and *CACNA1A* loci (Online Methods) in 5,570 XFS cases and 6,279 controls. This sequencing effort confirmed previously reported strong allele reversals at key common variants and also at recently reported noncoding variants in *LOXLI* (**Supplementary Tables 3–5**)<sup>13,21,23</sup>.

We first analyzed the sequencing data to find unifying, consistent common variants associated with XFS across ancestry groups that could have been missed by previous efforts. Single-variant analysis showed that, of all common variants polymorphic across all collections studied, rs3825942[G>A] (encoding *LOXLI* p.Gly153Asp) remained the most significantly associated (fixed-effects  $P = 4.14 \times 10^{-62}$ ) but showed very high heterogeneity across the study groups (random-effects  $P = 0.0039$ ). No common variant in *LOXLI* was consistently associated across all the collections, and no common variant in this gene surpassed genome-wide significance in random-effects analysis (**Supplementary Table 6**). Conditioning for allele dosage at rs3825942[G>A] abolished all residual evidence of association across the collections (**Supplementary Table 6**). The commonly reported rs1048661[T>G] (p.Leu141Arg) polymorphism was not significant in the meta-analysis of sequencing data either before ( $P = 0.25$ ) or after

A full list of authors and affiliations appears at the end of the paper.

Received 30 September 2016; accepted 26 April 2017; published online 29 May 2017; doi:10.1038/ng.3875

**Table 1 Association of all rare, deleterious nonsynonymous variants at *LOXL1* with risk of exfoliation syndrome**

Collection	<i>n</i> cases	<i>n</i> controls	Allele burden,		Carrier freq.,		Allele OR	L95	U95	<i>P</i>
			cases	controls	cases	controls				
Japan	2,827	3,013	34	100	1.20	3.32	0.36	0.24	0.53	$8.03 \times 10^{-8}$
Greece	355	1,075	3	17	0.85	1.58	0.53	0.16	1.82	0.44
Italy	454	267	10	3	2.20	1.12	1.97	0.54	7.19	0.39
Russia	476	859	2	5	0.42	0.58	0.72	0.14	3.72	1
United States	212	161	2	2	0.94	1.24	0.76	0.11	5.41	1
Mexico	116	205	2	9	1.72	4.39	0.39	0.083	1.81	0.34
South Africa	95	250	1	21	1.05	8.40	0.12	0.016	0.90	0.014
India	648	263	12	8	1.85	3.04	0.61	0.25	1.49	0.32
Pakistan	383	186	7	4	1.83	2.15	0.85	0.25	2.92	0.76
Stratified meta-analysis for all sequenced collections							0.46	0.34	0.62	$4.2 \times 10^{-7}$

No additional filters by functional effect prediction algorithm were applied. Frequencies for rare variant carriers are given as percentages. L95, lower 95% confidence limit; U95, upper 95% confidence limit.

( $P = 0.53$ ) conditioning on rs3825942[G>A] ( $P_{\text{het}} < 1 \times 10^{-10}$ ;  $I^2 = 98.3\%$ ). Recognizing that single-variant analysis could have missed a consistent *LOXL1* haplotypic association that is not reversed across populations, we followed up our search by phasing the haplotypes of 57 SNPs across the entire sequenced *LOXL1* locus using 20-SNP sliding windows. All analyzed haplotypes showed reversal of effect across the locus, with no exceptions (**Supplementary Data 1**). It is thus unlikely that we have missed an ‘unflipped’ common variant that shows consistent association with XFS across our worldwide sample.

The resequencing of *LOXL1* identified a total of 63 unique nonsynonymous variants across the nine countries studied (**Supplementary Fig. 4** and **Supplementary Table 7**). Because of the limited insights available from the reversed common *LOXL1* haplotypes, we next evaluated the hypothesis that rare alleles within *LOXL1* (minor allele frequency (MAF) < 1%) could collectively contribute to XFS risk. We observed a broad enrichment for rare nonsynonymous *LOXL1* variants in the normal controls in comparison to the XFS cases (OR = 0.46,  $P = 4.2 \times 10^{-7}$ ; **Table 1**). As the vast majority of the nonsynonymous variants did not exert functional effects<sup>31–34</sup>, we performed a second test restricting the analysis to aggregate only rare nonsynonymous variants conservatively predicted to be deleterious by all five of the functional effect prediction algorithms used (SIFT, PolyPhen-2–HumDiv, LRT score, MutationTaster and Condel)<sup>33</sup>. In so doing, we observed a substantially larger protective effect conferred by the rare variant burden (OR = 0.18,  $P = 4.23 \times 10^{-11}$ ; **Table 2**). This protective effect of alleles conservatively predicted to affect *LOXL1* function remained significant even after accounting for cosegregation at the rs3825942[G>A] sentinel SNP (**Supplementary Table 8**).

One of the rare nonsynonymous variants, rs201011613[A>T], encoding *LOXL1* p.Tyr407Phe, showed genome-wide significant association in single-variant analysis. This variant was conservatively predicted by all five protein function prediction algorithms to affect *LOXL1* function and is found exclusively in the Japanese population (**Table 3**, **Supplementary Fig. 4a,b** and **Supplementary Table 7**). The rare rs201011613[T] (*LOXL1* p.407Phe) allele was observed in only 2 of the 3,909 XFS cases (0.026%) but was observed in 68 of the 5,338 age- and hospital-matched controls with no eye disorder (0.64%) (**Table 3**), conferring 25-fold resistance to XFS (Fisher’s exact test,  $P = 2.9 \times 10^{-14}$ ). We examined individuals carrying the rare p.Phe407 allele who had also undergone genome-wide genotyping for the presence of population substructure but found no evidence that these carriers clustered along the major axes of population stratification (**Supplementary Fig. 5**)<sup>35,36</sup>.

We next examined the haplotype background for all 37 Japanese individuals carrying the p.407Phe allele who underwent sequencing for the *LOXL1* locus (**Table 3**) and found that, in 35 of the 37 individuals, the p.Phe407 allele segregated with the common rs3825942[A] (p.Asp153) haplotype. As previously discussed, this common rs3825942[A] haplotype was associated with protection from XFS in Japan but conferred susceptibility to XFS in black Africans and was thus only nominally significant in the meta-analysis of all collections that underwent *LOXL1* resequencing (random-effects  $P = 0.0039$ ; **Supplementary Table 3**). Although the rare, protective p.Phe407 allele does not segregate with the common p.Arg141Leu polymorphism, functional biological testing would be needed to assess the relative impact of all three nonsynonymous variants (at amino acid positions 141, 153 and 407) on *LOXL1* function.

**Table 2 Association of rare nonsynonymous variants at *LOXL1* with risk of exfoliation syndrome**

Collection	<i>n</i> cases	<i>n</i> controls	Allele burden,		Carrier freq.,		OR	L95	U95	<i>P</i>
			cases	controls	cases	controls				
Japan	2,827	3,013	11	85	0.39	2.82	0.14	0.073	0.26	$3.49 \times 10^{-13}$
Greece	355	1,075	1	6	0.28	0.56	0.50	0.061	4.19	1
Italy	454	267	1	3	0.22	1.12	0.20	0.020	1.88	0.15
Russia	476	859	0	4	0	0.47	0	N/A	N/A	0.56
United States	212	161	1	1	0.47	0.62	0.76	0.047	12.18	1
Mexico	116	205	0	0	0	0	0	NA	NA	1
South Africa	95	250	0	2	0	0.80	0	NA	NA	0.38
India	648	263	5	7	0.77	2.66	0.29	0.091	0.91	0.047
Pakistan	383	186	0	3	0	1.61	0	NA	NA	0.035
Stratified meta-analysis for all sequenced collections							0.18	0.11	0.30	$4.23 \times 10^{-11}$
Meta-analysis excluding Russia, Mexico, South Africa and Pakistan <sup>a</sup>							0.19	0.11	0.31	$1.41 \times 10^{-10}$

Variants were tagged as deleterious by five functional prediction algorithms (SIFT, PolyPhen-2–HumDiv, LRT score, MutationTaster and Condel). Frequencies for rare variant carriers are given as percentages. NA, not possible to estimate because of zero counts in cases.

<sup>a</sup>Excluding collections where no rare, deleterious nonsynonymous substitutions were found in either cases or controls.



**Table 3 Association of *LOXL1* p.Tyr407Phe (rs201011613[A>T]) with exfoliation syndrome**

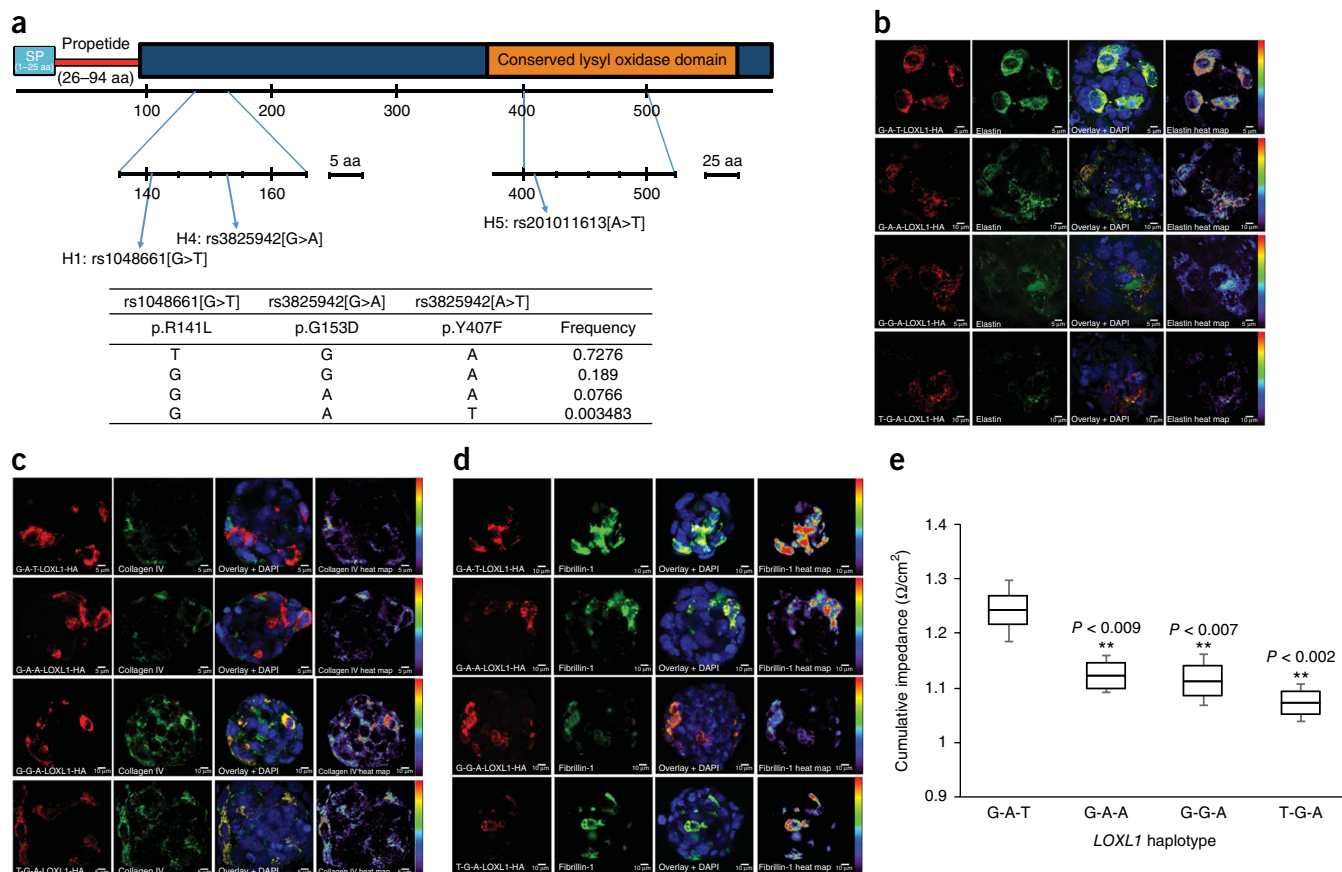
Collection	<i>n</i> cases	<i>n</i> controls	Allele count in cases	Allele count in controls	Freq., cases (%)	Freq., controls (%)	OR	L95	U95	<i>P</i>
Japan sequencing	2,827	3,013	1	36	0.018	0.60	0.029	0.0040	0.21	$8.3 \times 10^{-10}$
Japan replication	1,082	2,325	1	32	0.046	0.69	0.067	0.0091	0.49	$8.9 \times 10^{-5}$
Japan combined	3,909	5,338	2	68	0.026	0.64	0.040	0.0098	0.16	$2.9 \times 10^{-14}$
Europe sequencing	1613	2,567	0	0	0.0	0.0	–	–	–	–
South Africa sequencing	95	250	0	0	0.0	0.0	–	–	–	–
South Asia sequencing	1,031	449	0	0	0.0	0.0	–	–	–	–

The p.Tyr407Phe rare variant was found exclusively in the Japanese population and was not polymorphic in Europe, Africa or South Asia. *P* values were obtained from Fisher's exact tests.

At the *CACNA1A* locus, a total of 200 unique rare nonsynonymous amino acid substitutions were observed in the coding sequence of *CACNA1A* after resequencing in East Asians, Europeans, South Africans and South Asians. In contrast to *LOXL1*, we did not observe any consistent evidence of association between rare variant burden at *CACNA1A* and susceptibility to XFS (**Supplementary Table 9**). This is not surprising, as only some common variant GWAS loci harbor an additional rare variant burden<sup>37</sup>.

### Biological relevance of *LOXL1* p.Tyr407Phe

XFS is characterized by excessive production and progressive accumulation of an abnormal fibrillar material, termed exfoliation material, containing ECM components such as elastin, fibrillin-1 and fibronectin, localized to the surface of various cell types including lens epithelial cells<sup>1,38,39</sup>. *LOXL1* has been reported to modulate ECM biogenesis by cross-linking elastin and collagen in connective tissues<sup>40–42</sup>. We thus performed experiments assaying the effects of *LOXL1* variants



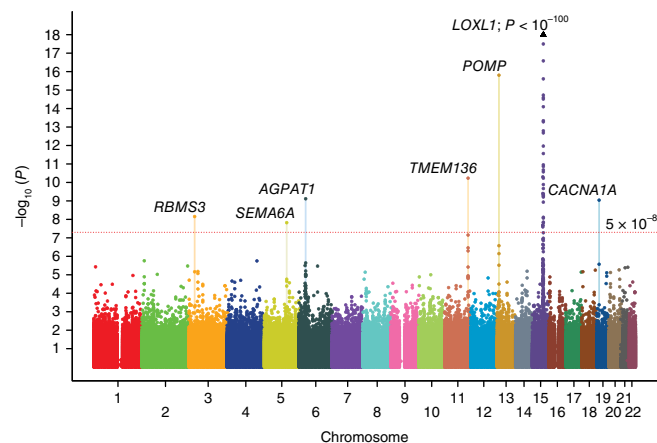
**Figure 1** *LOXL1* p.Tyr407Phe regulates ECM synthesis and improves cellular adhesion. (a) Schematic diagram of *LOXL1* indicating the protein domain positions for the variants evaluated in this study. (b) Immunofluorescent staining of HA-tagged *LOXL1* variants overexpressed in HLECs labeled with antibody to HA for detection of overexpressed forms of *LOXL1* (red) and antibody to elastin (green). Cell nuclei are stained in blue. The heat map for elastin indicates the intensity of elastin staining from red (increased expression) to purple (decreased expression). (c) Immunofluorescent staining of HA-tagged *LOXL1* variants overexpressed in HLECs labeled with antibody to HA for detection of overexpressed forms of *LOXL1* (red) and antibody to collagen IV (green). Cell nuclei are stained in blue. The heat map for collagen IV indicates the intensity of collagen IV staining from red (increased expression) to purple (decreased expression). (d) Immunofluorescent staining of HA-tagged *LOXL1* variants overexpressed in HLECs labeled with antibody to HA for detection of overexpressed forms of *LOXL1* (red) and antibody to fibrillin-1 (green). Cell nuclei are stained in blue. The heat map for fibrillin-1 indicates the intensity of fibrillin-1 staining from red (increased expression) to purple (decreased expression). (e) Cumulative average of impedance values (as a surrogate for cellular adhesion strength) measured over 35 h following nucleofection of HLECs overexpressing the four tested *LOXL1* haplotypes. In each plot, the middle line represents the median, the box shows the interquartile range, and the whiskers extend to the minimum and maximum values. Data are shown from four independent experiments.  $**P < 0.01$  when compared to the rare, protective *LOXL1* p.Phe407-carrying G-A-T haplotype. The four haplotypes tested were *LOXL1* G-A-T, G-A-A, T-G-A and G-G-A. This experiment was further validated in **Supplementary Figure 7**.

on ECM metabolism, using elastin, fibrillin-1, collagen type IV and fibronectin as cellular biochemical readouts and overall relative cell adhesion as a cellular physiological readout.

We assessed the functional effects of the common flipped p.Arg141Leu and p.Gly153Asp polymorphisms as well as the rare, protective p.Tyr407Phe variant using four constructs carrying these three variants in naturally occurring haplotypes (Fig. 1a). This experimental design also allowed for measurement of the effect of p.Tyr407Phe while conditioning on the effects of all p.Arg141Leu–p.Gly153Asp haplotype combinations. The ability to condition on and account for the effect of p.Gly153Asp is particularly important as the rare, protective p.Phe407 allele segregates with the p.Asp153 allele. Using human lens epithelial cell (HLEC) 3D cell cultures transiently expressing the four haplotypes, we observed that LOXL1 protein was secreted at detectable levels, and no significant difference in LOXL1 secretion could be observed between any of the four haplotypes (Supplementary Fig. 6a).

In contrast, when we overexpressed the rare p.Phe407-carrying Arg141–Asp153–Phe407 (G–A–T) *LOXL1* haplotype in HLEC cultures, we observed a dose-dependent increase in elastin levels on immunoblots (Supplementary Fig. 6b), with the increase in elastin levels recapitulated in immunofluorescence analysis of 3D spheroid cultures (Fig. 1b). Overexpression of this rare p.Phe407-carrying haplotype also resulted in a decrease in collagen IV levels (Fig. 1c) and an increase in fibrillin-1 levels (Fig. 1d) when compared to the other three haplotypes that included the wild-type p.Tyr407 allele. This result suggests that the rare p.Phe407 allele has an overall upregulating effect on ECM components such as elastin and fibrillin.

As the ECM is important for cellular adhesion, we next asked whether these observed functional biochemical effects of the rare *LOXL1* p.Phe407 allele on ECM components *in vitro* would translate to a physiological outcome affecting cell–cell adhesion. To this end, HLEC 3D spheroids overexpressing the four haplotypes were analyzed for relative cellular adhesion strength using the microelectrodes of the Roche xCelligence real-time cell analysis system. In this methodology, the change in cellular impedance readout is directly proportional to the quality of cell attachment<sup>43–45</sup>. We observed that the rare, protective p.Phe407-carrying G–A–T *LOXL1* haplotype conferred a significant increase in the strength of cellular adhesion in comparison to the remaining three haplotypes carrying the wild-type p.Tyr407 allele ( $P < 0.01$  for all comparisons; Fig. 1e). We observed no significant difference in the relative strength of cellular adhesion when the three remaining haplotypes carrying p.Tyr407 (but with different combinations of the p.Arg141Leu and p.Gly153Asp alleles) were compared to one another (Fig. 1e), suggesting that the common p.Arg141Leu and p.Gly153Asp polymorphisms do not have a significant effect on the strength of cellular adhesion in this assay. To ensure that the increase in the strength of cell–cell adhesion was unique to the rare, protective p.Phe407 (rs201011613[T]) allele, two additional *LOXL1* haplotype constructs covering the G–G–T (Arg141–Gly153–Phe407) and T–G–T (Leu141–Gly153–Phe407) haplotypes were cloned. We retested all six haplotype constructs together for differences in cell–cell adhesion (Supplementary Fig. 7) and continued to observe that the introduction of the rare, protective p.Phe407 (rs201011613[T]) allele significantly increased physiological cell–cell adhesion irrespective of the p.Arg141Leu and p.Gly153Asp background alleles. In contrast, the haplotypes carrying the wild-type, baseline p.Tyr407 (rs201011613[A]) allele had significantly lower cell–cell adhesion, also irrespective of the p.Arg141Leu and p.Gly153Asp alleles ( $P < 1 \times 10^{-4}$  for all comparisons, unpaired *t* test; Supplementary Fig. 7).



**Figure 2** Manhattan plot of the results from the GWAS discovery plus replication meta-analysis comprising 13,620 XFS cases and 109,837 controls. Genetic markers are plotted according to chromosomal location on the horizontal axis, and statistical significance is plotted on the vertical axis. SNP markers at seven independent loci surpassed genome-wide significance (defined as  $P \leq 5 \times 10^{-8}$ ). They are *LOXL1*, *CACNA1A*, *POMP*, *TMEM136*, *AGPAT1*, *SEMA6A* and *RBMS3*.

### GWAS identifies five new loci associated with XFS

As XFS is a complex disease, we also sought to identify new genetic loci associated with this disorder. For the GWAS discovery stage, we directly genotyped a total of 9,035 XFS cases and 17,008 controls, enrolled from 24 countries across six continents, using the Illumina OmniExpress BeadChip (Supplementary Table 2). After quality checks, we were able to analyze 683,397 directly genotyped autosomal SNP markers for association with XFS disease status (Supplementary Data 2) (see the Supplementary Note for full detail).

The GWAS discovery meta-analysis identified consistent and significant association (OR = 1.17,  $P = 2.97 \times 10^{-10}$ ,  $I^2 = 0\%$ ; Supplementary Fig. 8) at a new locus defined by SNP rs7329408 mapping to *FLT1–POMP–SLC46A3* on chromosome 13. We also observed a clear excess of smaller than expected *P* values at the tail end of the quantile–quantile distribution ( $P \leq 1 \times 10^{-4}$ ; Supplementary Fig. 8; refs. 37,46,47), suggesting that there are additional loci to be identified. We took forward all markers showing  $P \leq 1 \times 10^{-4}$  in the GWAS discovery stage for further assessment in the replication stage (see Supplementary Table 10 for power calculations) comprising 4,803 XFS cases and 93,267 controls independently ascertained from 18 countries (Supplementary Table 2). SNPs at five distinct new loci showed consistent evidence of replication, and meta-analysis of all 13,838 cases and 110,275 controls from the GWAS and replication series demonstrated genome-wide significant association at the five loci ( $1.56 \times 10^{-16} \leq P \leq 1.5 \times 10^{-8}$ ; Fig. 2, Table 4 and Supplementary Fig. 9; see Supplementary Table 11 for ancestry- and geography-stratified analysis of the five new loci). These loci are *FLT1–POMP–SLC46A3* (rs7329408; chromosome 13), *TMEM136–ARHGEF12* (rs11827818; chromosome 11), *AGPAT1* (rs3130283; chromosome 6), *RBMS3* (rs12490863; chromosome 3) and *SEMA6A* (rs10072088; chromosome 5). Regional association maps showing the genomic organization of the five loci within a 1-Mb region flanking the sentinel SNP are appended as Supplementary Figure 10. We verified that the genotyping was of good quality at the sentinel SNPs for all five loci (Supplementary Fig. 11). We also confirmed genome-wide significant association at the previously reported *CACNA1A* marker, rs4926244 (Supplementary Table 12). Of the five new loci, only rs7329408 showed a significant latitude gradient effect, with the odds

**Table 4 Summary of genetic associations for the five newly identified loci**

Chr.	SNP (effect/reference)	Position	Gene locus	Stage	Association tests				Heterogeneity tests	
					OR	L95	U95	<i>P</i>	<i>P</i> <sub>het</sub>	<i>r</i> <sup>2</sup> (%)
13	rs7329408 (A/G)	29,166,671	<i>FLT1-POMP</i>	GWAS discovery	1.17	1.11	1.22	$2.97 \times 10^{-10}$	0.9	0.00
				Replication summary	1.18	1.11	1.25	$9.63 \times 10^{-8}$	0.17	23.20
				All data summary	1.17	1.13	1.22	$1.56 \times 10^{-16}$	0.62	0.00
				European summary <sup>a</sup>	1.22	1.15	1.29	$7.82 \times 10^{-12}$		
				Asian summary	1.13	1.07	1.19	$1.61 \times 10^{-5}$		
11	rs11827818 (G/A)	120,198,728	<i>TMEM136</i>	GWAS discovery	1.10	1.05	1.16	0.0001	0.10	28.10
				Replication summary	1.18	1.11	1.25	$1.96 \times 10^{-8}$	0.36	8.00
				All data summary	1.14	1.09	1.18	$5.86 \times 10^{-11}$	0.09	23.10
				European summary <sup>a</sup>	1.14	1.08	1.20	$2.09 \times 10^{-6}$		
				Asian summary	1.15	1.08	1.22	$4.35 \times 10^{-6}$		
6	rs3130283 (A/C)	32,138,545	<i>AGPAT1</i>	GWAS discovery	1.19	1.11	1.27	$1.29 \times 10^{-6}$	0.38	5.60
				Replication summary	1.15	1.07	1.24	0.00013	0.96	0.00
				All data summary	1.17	1.11	1.23	$7.62 \times 10^{-10}$	0.81	0.00
				European summary <sup>a</sup>	1.13	1.06	1.22	0.00034		
				Asian summary	1.24	1.14	1.34	$2.27 \times 10^{-7}$		
3	rs12490863 (A/G)	29,907,310	<i>RBMS3</i>	GWAS discovery	1.15	1.09	1.22	$4.9 \times 10^{-7}$	0.69	0.00
				Replication summary	1.12	1.04	1.20	0.002	0.13	26.50
				All data summary	1.14	1.09	1.19	$7 \times 10^{-9}$	0.23	12.50
				European summary <sup>a</sup>	1.19	1.11	1.27	$1.64 \times 10^{-6}$		
				Asian summary	1.12	1.05	1.20	0.00053		
5	rs10072088 (G/A)	116,019,417	<i>SEMA6A</i>	GWAS discovery	0.89	0.85	0.94	$2.3 \times 10^{-5}$	0.85	0.00
				Replication summary	0.88	0.83	0.94	0.00017	0.10	36
				All data summary	0.89	0.85	0.93	$1.5 \times 10^{-8}$	0.66	0.00
				European summary <sup>a</sup>	0.90	0.85	0.94	$2.83 \times 10^{-5}$		
				Asian summary	0.88	0.81	0.96	0.0024		

Chr., chromosome.

<sup>a</sup>This summary includes 7,113 cases and 95,863 controls from North America and northern, southern, eastern and central-western Europe, and does not include Latin and South America.

ratio of the risk allele highest in polar regions and lowest in equatorial regions (**Supplementary Table 13** and **Supplementary Note**).

### Biological insights from GWAS associated loci

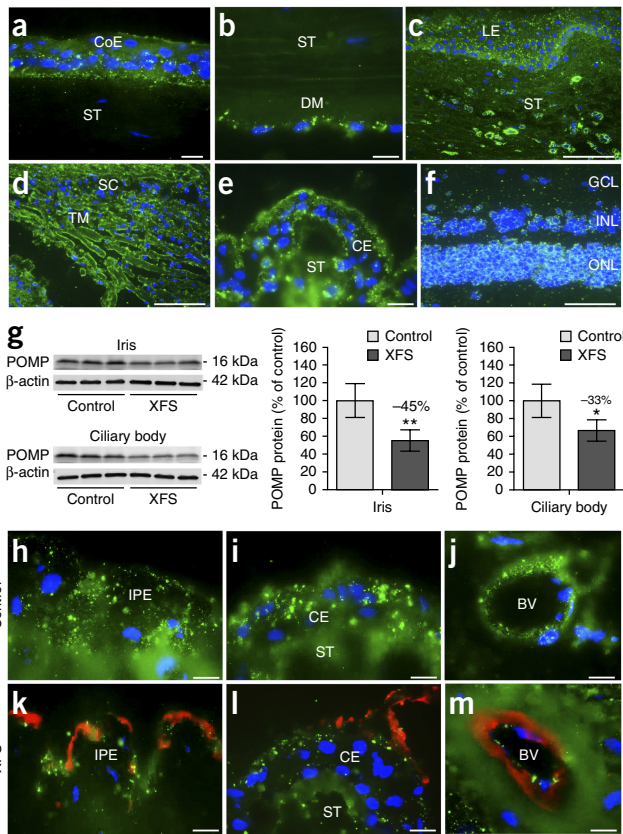
We annotated 33 genes mapping to or located closest to the seven genome-wide significant loci (identified using the 150,000-bp genomic region centered on the sentinel SNP and SNP markers showing  $r^2 > 0.5$  with the sentinel SNP (**Supplementary Table 14**) or defined by credible set analysis<sup>37,48,49</sup>; Online Methods). Except for rs3130283 in the *AGPAT* locus, which is located within the broad major histocompatibility complex (MHC) locus on chromosome 6 that is well known to have long-range complex LD patterns, we observed that defining an ‘associated locus region’ either generically as the region within 150 kb of the index variant or as the region containing proxy SNPs with  $r^2 > 0.5$  with the index variant resulted in identification of the same genes (**Supplementary Fig. 10** and **Supplementary Table 14**). All credible sets for the seven genome-wide significant loci were located within relatively narrow genomic regions (<100,000 bp) and within the region formed by the proxy SNPs showing  $r^2 > 0.5$  with the index variant (inclusive of the index variant; **Supplementary Table 14**).

We next assessed the potential biological contribution for each of the 33 genes by determining whether these genes showed overlap with (i) genes expressed in anterior segment tissues such as the iris and ciliary body, as determined using publicly available databases<sup>50–54</sup>, (ii) genes associated with relevant eye-related phenotypes in knockout mice, (iii) genes whose expression is regulated by *cis* expression quantitative trait loci (eQTLs)<sup>55,56</sup>, (iv) genes prioritized by text mining in PubMed, (v) genes showing pleiotropy with other forms of glaucoma and (vi) genes highlighted from unbiased genome-wide molecular pathway analysis. We summarize this additional information

in **Supplementary Table 15**. A genome-wide search using publicly available databases<sup>57</sup> identified potential molecular interactions between the proteins encoded by several of the 33 genes located within the seven genome-wide significant loci (**Supplementary Table 15**), suggesting that the significantly associated loci could be implicating broader, yet-undescribed biological disease pathways. A search of the UCSC Genome Browser showed that none of the seven genome-wide significant loci harbor any long noncoding RNAs except for *LOXL1* (which harbors *LOXL1-AS1*, transcribed in the opposite direction from *LOXL1*) and the *FLT1-POMP-SLC46A3* locus (**Supplementary Fig. 12**). Further interrogation using the INRICH (interval-based enrichment analysis tool) software package<sup>58</sup>, designed to detect enriched association signals for LD-independent genomic regions within biologically relevant gene sets, did not identify any statistically significant biological pathways highlighted by the seven genome-wide significant loci (**Supplementary Data 3**).

We next studied the expression of genes associated with the three most significantly associated loci. These loci (and genes) were 13q12 (*POMP*, *FLT1*, *SLC46A3*), 11q23.3 (*TMEM136*, *ARHGFE12*) and 6p21 (*AGPAT1*). Expression for these six genes was tested in fresh ocular tissues obtained from human donor eyes with appropriate research consent (Online Methods). For mRNA expression analyses, 41 normal eyes with no known ocular disease (mean age,  $77.1 \pm 8.1$  years; 20 female, 21 male) and 21 eyes with XFS (mean age,  $80.1 \pm 7.9$  years; 11 female, 10 male) were used. mRNA expression of all six genes was detected at moderate levels in the panel of eye tissues analyzed (**Supplementary Fig. 13**). The highest expression levels were observed in tissues relevant for the synthesis of exfoliation material (iris and ciliary body) and for glaucoma pathophysiology (retina). Expression levels in these tissues did not significantly correlate

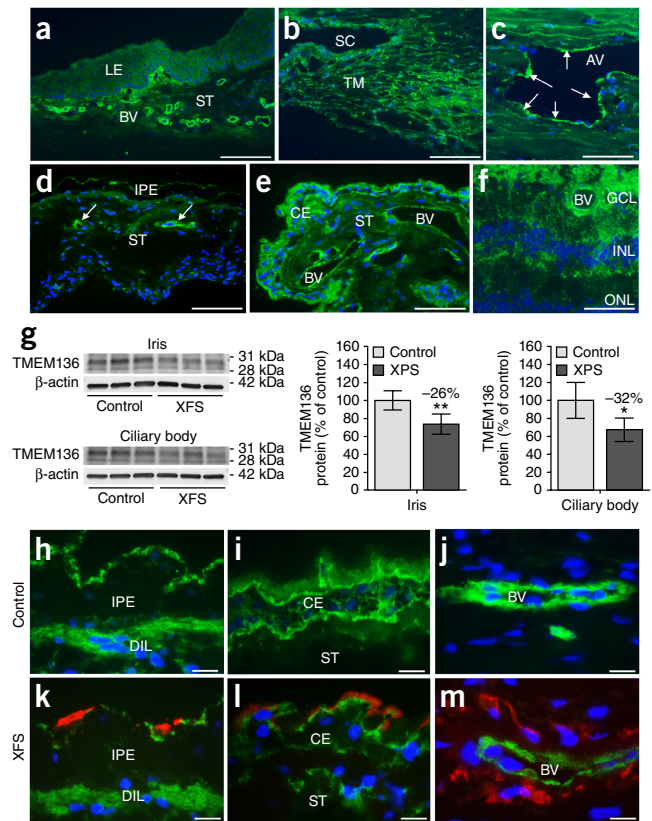




**Figure 3** Expression of POMP protein in ocular tissues of normal human donor eyes and donor eyes with XFS, as determined by immunoblotting and immunohistochemistry. (a–f) Immunofluorescence labeling of normal eye tissues shows punctate POMP immunopositivity (green fluorescence) in the cytoplasm of the corneal epithelium (a), the corneal endothelium (b), the limbal epithelium and stromal cells (c), the trabecular meshwork endothelium (d), the ciliary epithelium (e) and the retinal cell layers (f). (g–m) Reduced POMP protein expression levels in the iris and ciliary body tissues of XFS eyes as compared to age-matched controls shown by immunoblot analysis (g) and immunofluorescence labeling of iridal (h,k) and ciliary (i,l) epithelia, as well as vascular endothelia in the iris (k,m). Reduced staining intensity in XFS tissues is associated with LOXL1-positive exfoliation material accumulations (red immunofluorescence) on the surface of the iris pigment epithelium (k), ciliary epithelium (m) and iris blood vessel walls (m). Immunoblots (cropped images) and densitometry analysis show reduced POMP protein expression in iris and ciliary body tissue lysates of XFS eyes as compared to control eyes (g). Data are shown as the POMP/ $\beta$ -actin ratio ( $n = 6$  for each group; mean  $\pm$  s.d.;  $*P < 0.01$ ,  $**P < 0.005$ , unpaired two-sided  $t$  test); uncropped versions of all immunoblots are shown in **Supplementary Figure 16**. BV, blood vessel; CE, ciliary epithelium; CoE, corneal epithelium; DM, descemet membrane; GCL, retinal ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPE, iris pigment epithelium; LE, limbal epithelium; ONL, outer nuclear layer; SC, Schlemm's canal; ST, stroma; TM, trabecular meshwork. DAPI nuclear counterstaining is shown in blue. Scale bars, 100  $\mu$ m in c, d and f and 20  $\mu$ m in a, b, e and h–m.

with the genotypes of the sentinel SNPs underlying the three loci (**Supplementary Fig. 14**).

Comparing tissues from XFS and control eyes, the mRNA expression levels of *POMP* and *TMEM136* were significantly reduced by up to 41% in anterior segment tissues, such as iris and ciliary body, from XFS eyes in comparison to age-matched control eyes (**Supplementary Fig. 15**). These results in XFS-relevant tissues suggest that *POMP* (rather than *FLT1* and *SLC46A3*, which are located nearby) is the likely disease-related gene for the chromosome 13 locus and that



**Figure 4** Expression of *TMEM136* protein in the ocular tissues of normal human donor eyes and donor eyes with XFS, as determined by immunoblotting and immunohistochemistry. (a–f) Immunofluorescence labeling of normal eye tissues shows cytoplasmic *TMEM136* immunopositivity (green fluorescence) in limbal blood vessels (a), trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelium (b), walls of aqueous veins (arrows) (c), blood vessels of the iris (arrows) (d), blood vessels and epithelia of the ciliary body (e) and retinal blood vessels and cell layers (f). (g–k) Reduced *TMEM136* protein expression levels in iris and ciliary body tissues of XFS eyes as compared to age-matched controls shown by immunoblot analysis (g) and immunofluorescence labeling of iridal (h,k) and ciliary (i,l) epithelia, as well as vascular endothelia in the iris (j,m). Reduced staining intensity in XFS tissues is associated with LOXL1-positive exfoliation material accumulations (red immunofluorescence) on the surface of the iris pigment epithelium (k), ciliary epithelium (l) and iris blood vessel walls (m). Immunoblots (cropped images) and densitometry analysis show reduced *TMEM136* protein (isoform 1 at 28 kDa and isoform 3 at 31 kDa) expression in iris and ciliary body tissue lysates of XFS eyes as compared to control eyes (g). Data are shown as the *TMEM136*/ $\beta$ -actin ratio (mean  $\pm$  s.d.;  $n = 6$  for each group;  $*P < 0.01$ ,  $**P < 0.005$ , unpaired two-sided  $t$  test); uncropped versions of all immunoblots are shown in **Supplementary Figure 17**. AV, aqueous vein; BV, blood vessel; CE, ciliary epithelium; DIL, dilator muscle; GCL, retinal ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPE, iris pigment epithelium; LE, limbal epithelium; ONL, outer nuclear layer; SC, Schlemm's canal; ST, stroma; TM, trabecular meshwork. DAPI nuclear counterstaining is in blue. Scale bars, 200  $\mu$ m in a, 100  $\mu$ m in b–f and 20  $\mu$ m in h–m.

*TMEM136* (rather than the neighboring *ARHGEF12*) is the likely disease-related gene for the chromosome 11 locus.

*POMP* and *TMEM136* protein expression was further analyzed by immunoblotting and immunofluorescence microscopy. *POMP*, a proteasome maturation protein, was expressed in most ocular cell types in immunofluorescence analysis (**Fig. 3**). However, *POMP* protein levels were significantly reduced in iris (45% decrease) and ciliary

body (33% decrease) specimens from XFS eyes in comparison to control eyes when protein expression was investigated by immunoblot analysis (Fig. 3g and Supplementary Fig. 16) and immunofluorescence microscopy (Fig. 3h–m). These results are consistent with the differential mRNA expression shown in Supplementary Figure 15.

TMEM136, a transmembrane protein of unknown function, was primarily localized by immunofluorescence to the vascular endothelial cells of blood vessels in eye tissues (Fig. 4). Analysis of TMEM136 protein levels by immunoblotting in tissues from XFS eyes showed significantly reduced expression levels in iris (26% decrease) and ciliary body (32% decrease) in comparison to the levels observed in control eyes (Fig. 4g and Supplementary Fig. 17), also consistent with the differential mRNA expression analysis shown in Supplementary Figure 15. Similar findings of reduced TMEM136 protein staining in epithelial and endothelial cells in XFS eyes in comparison to control eyes were also obtained using immunofluorescence microscopy (Fig. 4h–m).

We then replicated the immunofluorescence microscopy findings in tissues from a further three donor eyes with XFS and three matched controls using an independent batch of antibodies, co-staining for LOXL1, POMP and TMEM136. We confirmed reduced expression of POMP and TMEM136 in important ocular anterior segment structures in XFS eyes in comparison to control eyes, using both low magnification (Supplementary Fig. 18) and higher magnification (Supplementary Figs. 19 and 20).

## DISCUSSION

XFS is a disorder of aging involving the ECM, with LOXL1 hypothesized to have a central role in disease pathogenesis. As all common *LOXL1* haplotypes detected by the resequencing effort showed reversal of genetic effect, the functional consequences of these haplotypes remain in doubt. Even a recent study describing a region in intron 1 of *LOXL1* and 5' upstream of *LOXL1-AS1* containing a promoter that influences *LOXL1-AS1* expression showed that all strongly associated variants influencing the promoter activity of *LOXL1-AS1* also had genome-wide significant reversal of the genetic effect<sup>21</sup>. The common allele reversals at *LOXL1* are unlikely to be due to sampling differences within the same population in light of multiple replications confirming these reversals. They are also unlikely to be due to different LD structures across different populations, as the reversals occur across all phased haplotypes along the broad *LOXL1* locus (Supplementary Data 1) in the absence of gross differences in LD architecture (Supplementary Fig. 21).

Deep resequencing of *LOXL1* enabled us to observe that the rare p.Tyr407Phe variant had a protective effect strong enough (resistance OR = 25) to surpass genome-wide significance on its own. Although the effect is strong, the protection provided is not absolute, as the variant was observed in two XFS cases. Both cases also carried a copy of the rs11827818[G] risk allele in the *TMEM136* locus, in keeping with XFS being a complex disease. Our experiments confirm a clear functional and physiological role for the rare p.Phe407 allele, but the roles of the common p.Gly153Asp and p.Leu141Arg polymorphisms are less clear.

The protective p.Tyr407Phe substitution is located in the evolutionarily conserved catalytic domain of LOXL1 (ref. 59). Follow-up biological experiments suggest that the protective effect may be a consequence of stabilization of the ECM due to increased elastin and fibrillin-1 deposition. This notion is supported by histopathological observations of decreased elastic fiber formation and tissue stiffness, as well as impaired cell adhesion, in the ocular tissues of patients with XFS<sup>60,61</sup>. We speculate that carrying the rare, protective p.Tyr407 variant could maintain cellular integrity and render cells more resistant to environ-

mental stressors that destabilize or disrupt the ECM. One limitation of this approach is that the biological mechanisms for p.Tyr407Phe were not tested at the RNA level, which might be relevant as there is a possibility that p.Tyr407Phe could affect RNA stability<sup>62–64</sup>.

The seven loci emerging from the GWAS do not implicate a single pathogenesis pathway, supporting the hypothesis that XFS is a complex systemic disease of aging that can arise from genetic lesions in multiple pathways and different tissue types. For example, the marked downregulation of POMP (Fig. 3), a ubiquitously expressed proteasome maturation protein, in XFS tissues suggests a reduction of ubiquitin-conjugating enzymes in XFS tissues<sup>65</sup>. Abnormalities in the closely related autophagy pathway, a process that also involves ubiquitin–proteasome signaling<sup>66,67</sup>, have also been implicated in XFS<sup>68</sup>. TMEM136 expression was predominantly localized to vascular endothelia. Interestingly, a pronounced and early vasculopathy, partly involving deposition of XFS material around ocular blood vessels (Fig. 4), appears to have a major role in XFS pathophysiology<sup>69,70</sup>.

In this study, we identified three XFS susceptibility loci in addition to *POMP* and *TMEM136*, which map to *AGPAT1* in the class III MHC region (6p21), to *RBMS3* (3p24) and near *SEMA6A* (5q23). In the CHARGE consortium, *AGPAT1* has been identified as a susceptibility locus for omega-6 (n-6) polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels, which may be related to cardiovascular risk in aging populations<sup>71</sup>. The MHC locus (where *AGPAT1* resides) has also been reported to be involved in conditions such as Alzheimer's and Parkinson's disease<sup>72,73</sup>, which, like XFS, are age-related conditions. Although the biological roles of *AGPAT1*, *RBMS3* and *SEMA6A* are not well understood, the consistent evidence of association at these loci opens up further avenues for research into XFS disease biology.

In summary, we now show that a rare *LOXL1* variant, p.Tyr407Phe, strongly protects against XFS, raising the possibility of potential pharmacological targeting of LOXL1 for therapeutic purposes<sup>29,74–76</sup>. In addition, we have identified five new XFS-associated loci that implicate new biological pathways that could be important for disease pathogenesis.

**URLs.** PLINK software, <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>; R statistical program package, <https://www.r-project.org/>; IMPUTE2 software, [https://mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute\\_v2.html](https://mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute_v2.html); power calculator for genetic association studies, <http://zzz.bwh.harvard.edu/gpc/>; Primer3 software, <http://primer3.ut.ee>.

## METHODS

Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and references, are available in the [online version of the paper](#).

*Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.*

## ACKNOWLEDGMENTS

This research is supported by the Biomedical Research Council, Agency for Science, Technology and Research, Singapore (to C.C.K.), by the Glaucoma Foundation of New York (to C.C.K.), by grants from the National Medical Research Council, Singapore NMRC/TCR/008-SERI/2013 and NMRC/STAR/0023/2014 to T.A. and NMRC/CBRG/0032/2013 to E.N.V.), by the Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF-E23) from Germany to F.P. and U.S.-S., and by grants from the US National Institutes of Health: UM1 CA186107, R01 CA49449, R01 AR056291, R01 CA131332, P01 CA055075, R01 CA134958 and R01 EY015473 to J.L.W. For XFS cases in the US GWAS data set, genotyping services were provided through a grant to J.L.W. (HG008597) by the Center for Inherited Disease Research (CIDR). CIDR is fully funded through a federal



contract from the US National Institutes of Health to The Johns Hopkins University, contract HHSN268201200008I. The Beijing, China, collection was supported by funding from the National Natural Science Foundation of China (81030016 and 81570837), the Program of Beijing Scholars (2013), the National Major Scientific and Technological Special Project for Significant New Drugs Development (2011ZX09302-007-05) and Leading Talents–High-Level Talents of the Health System of Beijing (2009-1-05) to N. Wang. We dedicate this article to the ophthalmologist Eva Forsman from Finland who passed away after diagnosing all of the exfoliation syndrome cases from Finland.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.C.K., F.P., J.L.W., T.A. and M.O. jointly conceived the project. M.C.L., U.S.-S., M.Z., D.B., Y.F.C., X.Y.N., A.W.O.C., E.N.V., S.R.G., A.S.Y.C. and Y.C. conducted functional biological experiments. G.T., R.P.I., K.P.B., Z.L., G.P., S.S., J.N.C.B., S.U., Z.Y., L. Huang, J.N.F., R.Q.S., K.S.S., P. Kraft, I.J., A.G., M.A.P.-V., A.M.H., E.N.V., C.-Y.C. and J.L.H. conducted statistical analysis. S. Raychaudhuri provided critical input on statistical analysis. Z.X., S.Q.M., H.M.S., X.Y.C., S.Q.P. and K.K.H. conducted genotyping and sequencing experiments. T.A., M.O., T.M., A.H., S.E.W., Y.S.A., A.C.O., S. Nakano, K. Mori, A.P.C., K.H., S. Manabe, S. Kazama, T. Zarnowski, K.I., M. Ircek, M.C.-P., K. Sugiyama, P. Schlottmann, S.F.L., H.L., Y.N., M.B., K.H.P., S.C.C., K.Y., J.C.Z., J.B.J., R.S.K., S.A.P., N. Kalpana, R.G., L.V., T.D., D.P.E., L.d.J.M., M.P., S. Moghimi, R.I., D.B.-H., P. Kappelgaard, B. Wirostko, S.T., D.G., K.B., W.L.G., X.C., J.S., H.J., L.J., C.Q., H.Z., X.L., B.Z., Y.-X.W., L.X., S.L., P.R., G.C., S.T., G.M., N. Weisschuh, U.H., U.-C.W.-L., C.M., P. Founti, A. Chatzikiyriakidou, T.P., E.A., A.L., R.S., N.P., V.S., R.V., C. Shivkumar, N. Kobakhidze, M.R.K., A.N.B., S.Y., A.I., H.N., N. Khatibi, A.F., C.L., L.D., T.R., P. Frezzotti, D.P., E.S., P. Manunta, Y.M., K. Miyata, T.H., E.C., S.I., A.Y., M.Y., Y.K., T.O., T. Sakurai, T. Sugimoto, H.C., M.A., M. Inatani, M.M., N.G., F.M., N.Y., Y.I., M.U., C. Sotozono, J.W.J., M.S., K.H.P., J.A., M.C.-A., S.M.E., A. Rafei, V.H.K.Y., M.I.K., O.O.O., A.O.A., I.U., A.O., N.K.-A., C.T., Y.S., W.S., S.O., N.J.U., I.A., H.A., F.A., E.K.-J., U.L., I.L., V.C., R.P.G., G.S.M., S. Roy, E.D., E. Silke, A. Rao, P. Sahay, P. Fornero, O.C., D.S., T. Zompa, R.A.M., E. Souzeau, P. Mitchell, J.J.W., A.W.H., M.C., J.G.C., S.Y.A., E.L.A., A.E., V.V., G.K., R.F., S.A.A.-O., O.O., L.A.A., B.C., R.H., S.-L.H., F.A.E.-D., R.G.-S., F.M.-T., A. Salas, K.P., L. Hansapinyo, B. Wanichwecharugruang, N.K., A. Sakuntabhai, H.X.N., G.T.T.N., T.V.N., W.Z., A.B., D.S.K., M.L.H., S.D., S. Herms, S. Heegaard, M.M.N., S. Moebus, R.M.R., A.Z., T.R.C., M.R., L.A., M.G., H.G.-I., P.P.R.-C., L.F.-V.C., C.O., N.T., E.A., B.B., D.A., B.K., M.R.W., A.L.C., Y.L., P.C., L. Herndon, R.W.K., J.K., K.C., C.J.C., A. Crandall, L.M.Z., T.Y.W., M.N., S. Kinoshita, A.I.d.H., E.V., J.H.F., R.K.L., A.J.S., B.J.S., N. Wang, D.C., R.Q., T. Kivela, A. Reis, F.E.K., R.N.W., L.R.P., F.J., R.R.A., R.R., T. Kubota, S. Micheal, F.T., J.E.C., K.A.-A., M.H., J.H.K., S. Nelson, D.M., P. Sundaresan, M.D. and K.T. were involved in sample collection, phenotyping and processing. U.T., G.T. and K. Stefansson supervised, conducted and provided analysis of deCODE data. The manuscript was written by C.C.K., with critical input from T.A., T.K., U.T., J.L.W., L.R.P. and F.P. All co-authors approved the manuscript for publication.

#### COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

- Vesti, E. & Kivelä, T. Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**, 345–368 (2000).
- Ritch, R. & Schlötzer-Schrehardt, U. Exfoliation syndrome. *Surv. Ophthalmol.* **45**, 265–315 (2001).
- Leske, M.C. *et al.* Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch. Ophthalmol.* **121**, 48–56 (2003).
- Ritch, R., Schlötzer-Schrehardt, U. & Konstas, A.G. Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome? *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 253–275 (2003).
- Olawoye, O.O. *et al.* Exfoliation syndrome in Nigeria. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* **19**, 402–405 (2012).
- Kivelä, T. Ocular pseudoexfoliation syndrome and life span: act 2. *EBioMedicine* **2**, 640–641 (2015).
- Ritch, R. Ocular and systemic manifestations of exfoliation syndrome. *J. Glaucoma* **23** (Suppl. 1), S1–S8 (2014).
- Ritch, R. Exfoliation syndrome—the most common identifiable cause of open-angle glaucoma. *J. Glaucoma* **3**, 176–177 (1994).
- Allingham, R.R. *et al.* Pseudoexfoliation syndrome in Icelandic families. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 702–707 (2001).
- Orr, A.C. *et al.* Exfoliation syndrome: clinical and genetic features. *Ophthalmic Genet.* **22**, 171–185 (2001).
- Thorleifsson, G. *et al.* Common sequence variants in the *LOXLI* gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* **317**, 1397–1400 (2007).
- Williams, S.E. *et al.* Major *LOXLI* risk allele is reversed in exfoliation glaucoma in a black South African population. *Mol. Vis.* **16**, 705–712 (2010).
- Wiggs, J.L. & Pasquale, L.R. Expression and regulation of *LOXLI* and elastin-related genes in eyes with exfoliation syndrome. *J. Glaucoma* **23** (Suppl. 1), S62–S63 (2014).
- Aung, T. *et al.* A common variant mapping to *CACNA1A* is associated with susceptibility to exfoliation syndrome. *Nat. Genet.* **47**, 387–392 (2015).
- Al Olama, A.A. *et al.* A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat. Genet.* **46**, 1103–1109 (2014).
- Liu, J.Z. *et al.* Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* **47**, 979–986 (2015).
- Paternoster, L. *et al.* Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* **47**, 1449–1456 (2015).
- Ehret, G.B. *et al.* The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. *Nat. Genet.* **48**, 1171–1184 (2016).
- Liu, C. *et al.* Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. *Nat. Genet.* **48**, 1162–1170 (2016).
- Surendran, P. *et al.* Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* **48**, 1151–1161 (2016).
- Hauser, M.A. *et al.* Genetic variants and cellular stressors associated with exfoliation syndrome modulate promoter activity of a lncRNA within the *LOXLI* locus. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6552–6563 (2015).
- Chen, H. *et al.* Ethnicity-based subgroup meta-analysis of the association of *LOXLI* polymorphisms with glaucoma. *Mol. Vis.* **16**, 167–177 (2010).
- Fan, B.J. *et al.* *LOXLI* promoter haplotypes are associated with exfoliation syndrome in a U.S. Caucasian population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 2372–2378 (2011).
- Ozaki, M. *et al.* Association of *LOXLI* gene polymorphisms with pseudoexfoliation in the Japanese. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 3976–3980 (2008).
- Tanito, M. *et al.* *LOXLI* variants in elderly Japanese patients with exfoliation syndrome/glaucoma, primary open-angle glaucoma, normal tension glaucoma, and cataract. *Mol. Vis.* **14**, 1898–1905 (2008).
- Pasutto, F. *et al.* Association of *LOXLI* common sequence variants in German and Italian patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 1459–1463 (2008).
- Mori, K. *et al.* *LOXLI* genetic polymorphisms are associated with exfoliation glaucoma in the Japanese population. *Mol. Vis.* **14**, 1037–1040 (2008).
- Nakano, M. *et al.* Novel common variants and susceptible haplotype for exfoliation glaucoma specific to Asian population. *Sci. Rep.* **4**, 5340 (2014).
- Flannick, J. *et al.* Loss-of-function mutations in *SLC30A8* protect against type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **46**, 357–363 (2014).
- Bonnefond, A. *et al.* Rare *MTNR1B* variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **44**, 297–301 (2012).
- Majithia, A.R. *et al.* Rare variants in *PPARG* with decreased activity in adipocyte differentiation are associated with increased risk of type 2 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 13127–13132 (2014).
- Majithia, A.R. *et al.* Prospective functional classification of all possible missense variants in *PPARG*. *Nat. Genet.* **48**, 1570–1575 (2016).
- Do, R. *et al.* Exome sequencing identifies rare *LDLR* and *APOA5* alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature* **518**, 102–106 (2015).
- Luo, Y. *et al.* Exploring the genetic architecture of inflammatory bowel disease by whole-genome sequencing identifies association at *ADCY7*. *Nat. Genet.* **49**, 186–192 (2017).
- Raychaudhuri, S. *et al.* A rare penetrant mutation in *CFH* confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* **43**, 1232–1236 (2011).
- Seddon, J.M. *et al.* Rare variants in *CFI*, *C3* and *C9* are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* **45**, 1366–1370 (2013).
- Fritsche, L.G. *et al.* A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat. Genet.* **48**, 134–143 (2016).
- Schlötzer-Schrehardt, U., von der Mark, K., Sakai, L.Y. & Naumann, G.O. Increased extracellular deposition of fibrillin-containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 970–984 (1997).
- Schlötzer-Schrehardt, U., Zenkel, M., Kühle, M., Sakai, L.Y. & Naumann, G.O. Role of transforming growth factor- $\beta$ 1 and its latent form binding protein in pseudoexfoliation syndrome. *Exp. Eye Res.* **73**, 765–780 (2001).
- Schlötzer-Schrehardt, U. Molecular pathology of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma—new insights from *LOXLI* gene associations. *Exp. Eye Res.* **88**, 776–785 (2009).
- Lucero, H.A. & Kagan, H.M. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2304–2316 (2006).
- Liu, X. *et al.* Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.* **36**, 178–182 (2004).
- Atienza, J.M. *et al.* Dynamic and label-free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. *Assay Drug Dev. Technol.* **4**, 597–607 (2006).
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B. & Zheng, W. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.* **2**, 363–372 (2004).
- Urcan, E. *et al.* Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent. Mater.* **26**, 51–58 (2010).

46. Okbay, A. *et al.* Genome-wide association study identifies 74 loci associated with educational attainment. *Nature* **533**, 539–542 (2016).
47. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421–427 (2014).
48. Gaulton, K.J. *et al.* Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat. Genet.* **47**, 1415–1425 (2015).
49. Maller, J.B. *et al.* Bayesian refinement of association signals for 14 loci in 3 common diseases. *Nat. Genet.* **44**, 1294–1301 (2012).
50. Liu, Y. *et al.* Serial analysis of gene expression (SAGE) in normal human trabecular meshwork. *Mol. Vis.* **17**, 885–893 (2011).
51. Wagner, A.H. *et al.* Exon-level expression profiling of ocular tissues. *Exp. Eye Res.* **111**, 105–111 (2013).
52. Wistow, G. *et al.* NEI Bank: genomics and bioinformatics resources for vision research. *Mol. Vis.* **14**, 1327–1337 (2008).
53. Bowes Rickman, C. *et al.* Defining the human macula transcriptome and candidate retinal disease genes using EyeSAGE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 2305–2316 (2006).
54. Springelkamp, H. *et al.* *ARHGEF12* influences the risk of glaucoma by increasing intraocular pressure. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2689–2699 (2015).
55. Ward, L.D. & Kellis, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* **40**, D930–D934 (2012).
56. Westra, H.J. *et al.* Systematic identification of *trans* eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat. Genet.* **45**, 1238–1243 (2013).
57. Orchard, S. *et al.* The MintAct project—IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res.* **42**, D358–D363 (2014).
58. Lee, P.H., O'Dushlaine, C., Thomas, B. & Purcell, S.M. INRICH: interval-based enrichment analysis for genome-wide association studies. *Bioinformatics* **28**, 1797–1799 (2012).
59. Barker, H.E., Cox, T.R. & Erler, J.T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 540–552 (2012).
60. Braunsman, C. *et al.* Evaluation of lamina cribrosa and peripapillary sclera stiffness in pseudoexfoliation and normal eyes by atomic force microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 2960–2967 (2012).
61. Schlötzer-Schrehardt, U.M., Dörfner, S. & Naumann, G.O. Corneal endothelial involvement in pseudoexfoliation syndrome. *Arch. Ophthalmol.* **111**, 666–674 (1993).
62. Sauna, Z.E. & Kimchi-Sarfaty, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 683–691 (2011).
63. Shabalina, S.A., Spiridonov, N.A. & Kashina, A. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2073–2094 (2013).
64. Hunt, R.C., Simhadri, V.L., Iandoli, M., Sauna, Z.E. & Kimchi-Sarfaty, C. Exposing synonymous mutations. *Trends Genet.* **30**, 308–321 (2014).
65. Zenkel, M., Kruse, F.E., Naumann, G.O. & Schlötzer-Schrehardt, U. Impaired cytoprotective mechanisms in eyes with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 5558–5566 (2007).
66. Korolchuk, V.I., Menzies, F.M. & Rubinsztein, D.C. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin–proteasome and autophagy–lysosome systems. *FEBS Lett.* **584**, 1393–1398 (2010).
67. Kraft, C., Peter, M. & Hofmann, K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* **12**, 836–841 (2010).
68. Want, A. *et al.* Autophagy and mitochondrial dysfunction in tenon fibroblasts from exfoliation glaucoma patients. *PLoS One* **11**, e0157404 (2016).
69. Schlötzer-Schrehardt, U. & Naumann, G.O. Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **141**, 921–937 (2006).
70. Kivelä, T., Hietanen, J. & Uusitalo, M. Autopsy analysis of clinically unilateral exfoliation syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 2008–2015 (1997).
71. Guan, W. *et al.* Genome-wide association study of plasma N6 polyunsaturated fatty acids within the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology consortium. *Circ Cardiovasc Genet* **7**, 321–331 (2014).
72. Lambert, J.C. *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **45**, 1452–1458 (2013).
73. Nalls, M.A. *et al.* Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **46**, 989–993 (2014).
74. Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H. Jr. & Hobbs, H.H. Sequence variations in *PCSK9*, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272 (2006).
75. Jonsson, T. *et al.* A mutation in *APP* protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–99 (2012).
76. Nioi, P. *et al.* Variant *ASGR1* associated with a reduced risk of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2131–2141 (2016).

Tin Aung<sup>1–3,192</sup>, Mineo Ozaki<sup>4,5,192</sup>, Mei Chin Lee<sup>1,6,192</sup> , Ursula Schlötzer-Schrehardt<sup>7,192</sup>, Gudmar Thorleifsson<sup>8,192</sup>, Takanori Mizoguchi<sup>9,192</sup>, Robert P Igo Jr<sup>10,192</sup>, Aravind Haripriya<sup>11,192</sup>, Susan E Williams<sup>12,192</sup>, Yury S Astakhov<sup>13,192</sup>, Andrew C Orr<sup>14,15,192</sup>, Kathryn P Burdon<sup>16,17,192</sup> , Satoko Nakano<sup>18,192</sup>, Kazuhiko Mori<sup>19,192</sup>, Khaled Abu-Amero<sup>20,21,192</sup>, Michael Hauser<sup>1,22,23,192</sup> , Zheng Li<sup>24</sup> , Gopalakrishnan Prakadeeswari<sup>25</sup>, Jessica N Cooke Bailey<sup>10</sup> , Alina Popa Cherecheanu<sup>26,27</sup>, Jae H Kang<sup>28</sup> , Sarah Nelson<sup>29</sup> , Ken Hayashi<sup>30</sup>, Shin-ichi Manabe<sup>30</sup>, Shigeyasu Kazama<sup>31</sup>, Tomasz Zarnowski<sup>32</sup>, Kenji Inoue<sup>33</sup>, Murat Irkeç<sup>34</sup>, Miguel Coca-Prados<sup>35–37</sup>, Kazuhisa Sugiyama<sup>38</sup>, Irma Järvelä<sup>39</sup>, Patricio Schlottmann<sup>40</sup>, S Fabian Lerner<sup>41</sup>, Hasnaa Lamari<sup>42</sup>, Yildirim Nilgün<sup>43</sup>, Mukharram Bikbov<sup>44</sup> , Ki Ho Park<sup>45</sup>, Soon Cheol Cha<sup>46</sup>, Kenji Yamashiro<sup>47,48</sup> , Juan C Zenteno<sup>49,50</sup>, Jost B Jonas<sup>51,52</sup> , Rajesh S Kumar<sup>53</sup>, Shamira A Perera<sup>1,2</sup>, Anita S Y Chan<sup>1,2,6</sup>, Nino Kobakhidze<sup>54</sup>, Ronnie George<sup>55</sup> , Lingam Vijaya<sup>55</sup>, Tan Do<sup>56</sup>, Deepak P Edward<sup>57,58</sup>, Lourdes de Juan Marcos<sup>59,60</sup>, Mohammad Pakravan<sup>61</sup>, Sasan Moghimi<sup>62</sup>, Ryuichi Ideta<sup>63</sup>, Daniella Bach-Holm<sup>64</sup>, Per Kappelgaard<sup>64</sup>, Barbara Wirostko<sup>65</sup>, Samuel Thomas<sup>65</sup>, Daniel Gaston<sup>15</sup>, Karen Bedard<sup>15</sup>, Wenda L Greer<sup>15</sup>, Zhenglin Yang<sup>66,67</sup>, Xueyi Chen<sup>68</sup>, Lulin Huang<sup>69,70</sup>, Jinghong Sang<sup>52</sup>, Hongyan Jia<sup>52</sup>, Liyun Jia<sup>52,71</sup>, Chunyan Qiao<sup>52</sup>, Hui Zhang<sup>52</sup>, Xuyang Liu<sup>72</sup>, Bowen Zhao<sup>52,71</sup>, Ya-Xing Wang<sup>71</sup>, Liang Xu<sup>52</sup>, Stéphanie Leruez<sup>73</sup>, Pascal Reynier<sup>74</sup>, George Chichua<sup>54</sup>, Sergo Tabagari<sup>75</sup>, Steffen Uebe<sup>76</sup>, Matthias Zenkel<sup>7</sup>, Daniel Berner<sup>7</sup>, Georg Mossböck<sup>77</sup>, Nicole Weisschuh<sup>78</sup>, Ursula Hoja<sup>7</sup>, Ulrich-Christoph Welge-Luessen<sup>7</sup>, Christian Mardin<sup>7</sup>, Panayiota Founti<sup>79</sup>, Anthi Chatzikiyriakidou<sup>80</sup>, Theofanis Pappas<sup>79</sup>, Eleftherios Anastasopoulos<sup>79</sup>, Alexandros Lambropoulos<sup>80</sup>, Arkasubhra Ghosh<sup>81</sup> , Rohit Shetty<sup>53</sup>, Natalia Porporato<sup>82</sup>, Vijayan Saravanan<sup>25</sup>, Rengaraj Venkatesh<sup>83</sup>, Chandrashekar Shivkumar<sup>84</sup>, Narendran Kalpana<sup>85</sup>, Sripriya Sarangapani<sup>86</sup>, Mozghan R Kanavi<sup>87</sup>, Afsaneh Naderi Beni<sup>61</sup>, Shahin Yazdani<sup>61</sup>, Alireza lashay<sup>62</sup>, Homa Naderifar<sup>62</sup>, Nassim Khatibi<sup>62</sup>, Antonio Fea<sup>88</sup>, Carlo Lavia<sup>88</sup>, Laura Dallorto<sup>88</sup>, Teresa Rolle<sup>88</sup>, Paolo Frezzotti<sup>89</sup>, Daniela Paoli<sup>90</sup>, Erika Salvi<sup>91</sup>, Paolo Manunta<sup>92</sup>, Yosai Mori<sup>93</sup>, Kazunori Miyata<sup>93</sup>, Tomomi Higashide<sup>38</sup>, Etsuo Chihara<sup>94</sup>, Satoshi Ishiko<sup>95</sup>, Akitoshi Yoshida<sup>96</sup>, Masahide Yanagi<sup>97</sup>, Yoshiaki Kiuchi<sup>97</sup>, Tsutomu Ohashi<sup>98</sup>, Toshiya Sakurai<sup>99</sup>, Takako Sugimoto<sup>5</sup>, Hideki Chuman<sup>5</sup>, Makoto Aihara<sup>100</sup>, Masaru Inatani<sup>101</sup>, Masahiro Miyake<sup>47</sup>, Norimoto Gotoh<sup>102</sup>, Fumihiko Matsuda<sup>102</sup>, Nagahisa Yoshimura<sup>47,103</sup>, Yoko Ikeda<sup>19</sup>, Morio Ueno<sup>19</sup>, Chie Sotozono<sup>19</sup>, Jin Wook Jeoung<sup>45</sup>, Min Sagong<sup>46</sup>, Kyu Hyung Park<sup>104</sup>, Jeeyun Ahn<sup>105</sup>, Marisa Cruz-Aguilar<sup>49</sup>,

Sidi M Ezzouhairi<sup>42</sup>, Abderrahman Rafei<sup>106</sup>, Yaan Fun Chong<sup>1</sup>, Xiao Yu Ng<sup>1</sup>, Shuang Ru Goh<sup>1</sup>, Yueming Chen<sup>1</sup>, Victor H K Yong<sup>1</sup>, Muhammad Imran Khan<sup>107</sup>, Olusola O Olawoye<sup>108,109</sup>, Adeyinka O Ashaye<sup>108,109</sup>, Idakwo Ugbede<sup>110</sup>, Adeola Onakoya<sup>111,112</sup>, Nkiru Kizor-Akaraiwe<sup>113,114</sup>, Chaiwat Teekhasaenee<sup>115</sup>, Yanin Suwan<sup>115</sup>, Wasu Supakontanasan<sup>115</sup>, Suhanya Okeke<sup>113,114</sup>, Nkechi J Uche<sup>114,116,117</sup>, Ifeoma Asimadu<sup>113</sup>, Humaira Ayub<sup>118</sup>, Farah Akhtar<sup>119</sup>, Ewa Kosior-Jarecka<sup>32</sup>, Urszula Lukasik<sup>32</sup>, Ignacio Lischinsky<sup>120</sup>, Vania Castro<sup>121</sup>, Rodolfo Perez Grossmann<sup>122</sup>, Gordana Sunaric Megevand<sup>123</sup>, Sylvain Roy<sup>123</sup>, Edward Dervan<sup>124</sup>, Eoin Silke<sup>124</sup>, Aparna Rao<sup>125</sup>, Priti Sahay<sup>125</sup>, Pablo Fornero<sup>126</sup>, Osvaldo Cuello<sup>126</sup>, Delia Sivori<sup>41</sup>, Tamara Zompa<sup>127</sup>, Richard A Mills<sup>16</sup>, Emmanuelle Souzeau<sup>16</sup>, Paul Mitchell<sup>128</sup>, Jie Jin Wang<sup>128</sup>, Alex W Hewitt<sup>17,129</sup>, Michael Coote<sup>129</sup>, Jonathan G Crowston<sup>129</sup>, Sergei Y Astakhov<sup>13</sup>, Eugeny L Akopov<sup>13</sup>, Anton Emelyanov<sup>13,130</sup>, Vera Vysochinskaya<sup>130</sup>, Gyulli Kazakbaeva<sup>44</sup> , Rinat Fayzrakhmanov<sup>44</sup>, Saleh A Al-Obeidan<sup>20</sup>, Ohoud Owaidhah<sup>57</sup>, Leyla Ali Aljasim<sup>57</sup>, Balram Chowbay<sup>131-133</sup>, Jia Nee Foo<sup>24,134</sup> , Raphael Q Soh<sup>24</sup>, Kar Seng Sim<sup>24</sup> , Zhicheng Xie<sup>24</sup>, Augustine W O Cheong<sup>24</sup>, Shi Qi Mok<sup>24</sup>, Hui Meng Soo<sup>24</sup>, Xiao Yin Chen<sup>24</sup>, Su Qin Peh<sup>24</sup>, Khai Koon Heng<sup>24</sup>, Rahat Husain<sup>2</sup>, Su-Ling Ho<sup>135</sup>, Axel M Hillmer<sup>24</sup> , Ching-Yu Cheng<sup>1-3,6</sup>, Francisco A Escudero-Domínguez<sup>59</sup>, Rogelio González-Sarmiento<sup>60,136</sup>, Frederico Martinon-Torres<sup>137,138</sup> , Antonio Salas<sup>139,140</sup>, Kessara Pathanapitooon<sup>141</sup>, Linda Hansapinyo<sup>141</sup>, Boonsong Wanichwecharugruang<sup>142</sup>, Naris Kitnarong<sup>143</sup>, Anavaj Sakuntabhai<sup>144,145</sup> , Hip X Nguyn<sup>56</sup>, Giang T T Nguyn<sup>56</sup> , Trinh V Nguyn<sup>56</sup>, Werner Zenz<sup>146</sup>, Alexander Binder<sup>146</sup>, Daniela S Klobassa<sup>146</sup>, Martin L Hibberd<sup>24,147</sup>, Sonia Davila<sup>24</sup>, Stefan Herms<sup>148-150</sup>, Markus M Nöthen<sup>148,151</sup>, Susanne Moebus<sup>152</sup>, Robyn M Rautenbach<sup>153</sup>, Ari Ziskind<sup>153</sup>, Trevor R Carmichael<sup>12</sup>, Michele Ramsay<sup>154</sup>, Lydia Álvarez<sup>35,36</sup>, Montserrat García<sup>35,36</sup>, Héctor González-Iglesias<sup>35,36</sup>, Pedro P Rodríguez-Calvo<sup>35,36</sup>, Luis Fernández-Vega Cueto<sup>35,36</sup>, Çilingir Oguz<sup>155</sup>, Nevbahar Tamcelik<sup>156</sup>, Eray Atalay<sup>1,156</sup> , Bilge Batu<sup>156</sup>, Dilek Aktas<sup>157</sup>, Burcu Kasim<sup>34</sup>, M Roy Wilson<sup>158</sup>, Anne L Coleman<sup>159</sup> , Yutao Liu<sup>160</sup>, Pratap Challa<sup>22</sup>, Leon Herndon<sup>22</sup>, Rachel W Kuchtey<sup>161</sup>, John Kuchtey<sup>161</sup>, Karen Curtin<sup>65</sup>, Craig J Chaya<sup>65</sup>, Alan Crandall<sup>65</sup>, Linda M Zangwill<sup>162</sup>, Tien Yin Wong<sup>1-3</sup>, Masakazu Nakano<sup>163</sup>, Shigeru Kinoshita<sup>19,164</sup>, Anneke I den Hollander<sup>107,165</sup>, Eija Vesti<sup>166</sup>, John H Fingert<sup>167,168</sup>, Richard K Lee<sup>169</sup>, Arthur J Sit<sup>170</sup>, Bradford J Shingleton<sup>171</sup>, Ningli Wang<sup>52,71</sup>, Daniele Cusi<sup>172</sup>, Raheel Qamar<sup>173,174</sup> , Peter Kraft<sup>175</sup>, Margaret A Pericak-Vance<sup>176</sup>, Soumya Raychaudhuri<sup>177-181</sup>, Steffen Heegaard<sup>182,183</sup>, Tero Kivelä<sup>184</sup>, André Reis<sup>75</sup> , Friedrich E Kruse<sup>7</sup>, Robert N Weinreb<sup>162</sup>, Louis R Pasquale<sup>28,185</sup>, Jonathan L Haines<sup>10,186</sup> , Unnur Thorsteinsdottir<sup>8,187</sup>, Fridbert Jonasson<sup>187,188,193</sup>, R Rand Allingham<sup>1,22,193</sup>, Dan Milea<sup>1,2,6,193</sup>, Robert Ritch<sup>189,193</sup> , Toshiaki Kubota<sup>18,193</sup> , Kei Tashiro<sup>163,193</sup>, Eranga N Vithana<sup>1,3,193</sup>, Shazia Micheal<sup>165,193</sup>, Fotis Topouzis<sup>79,193</sup>, Jamie E Craig<sup>16,193</sup>, Michael Dubina<sup>13,130,193</sup> , Periasamy Sundaresan<sup>190,193</sup>, Kari Stefansson<sup>8,187,193</sup>, Janey L Wiggs<sup>185,193</sup>, Francesca Pasutto<sup>76,193</sup> & Chiea Chuen Khor<sup>1,24,191,193</sup> 

<sup>1</sup>Singapore Eye Research Institute, Singapore. <sup>2</sup>Singapore National Eye Center, Singapore. <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore. <sup>4</sup>Ozaki Eye Hospital, Hyuga, Miyazaki, Japan. <sup>5</sup>Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan. <sup>6</sup>Academic Clinical Program for Ophthalmology and Visual Sciences, Office of Clinical and Academic Faculty Affairs, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore. <sup>7</sup>Department of Ophthalmology, Universitätsklinikum Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany. <sup>8</sup>deCODE Genetics, Reykjavik, Iceland. <sup>9</sup>Mizoguchi Eye Hospital, Sasebo, Japan. <sup>10</sup>Department of Population and Quantitative Health Sciences, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA. <sup>11</sup>Aravind Eye Hospital, Madurai, India. <sup>12</sup>Division of Ophthalmology, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa. <sup>13</sup>Department of Ophthalmology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia. <sup>14</sup>Department of Ophthalmology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. <sup>15</sup>Department of Pathology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. <sup>16</sup>Department of Ophthalmology, Flinders University, Adelaide, South Australia, Australia. <sup>17</sup>Menzies Institute for Medical Research, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia. <sup>18</sup>Department of Ophthalmology, Oita University Faculty of Medicine, Oita, Japan. <sup>19</sup>Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan. <sup>20</sup>Department of Ophthalmology, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia. <sup>21</sup>Department of Ophthalmology, College of Medicine, University of Florida, Jacksonville, Florida, USA. <sup>22</sup>Department of Ophthalmology, Duke University Eye Center, Durham, North Carolina, USA. <sup>23</sup>Department of Medicine, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA. <sup>24</sup>Genome Institute of Singapore, Singapore. <sup>25</sup>Department of Genetics, Aravind Medical Research Foundation, Madurai, India. <sup>26</sup>Carol Davila' University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania. <sup>27</sup>Department of Ophthalmology, University Emergency Hospital, Bucharest, Romania. <sup>28</sup>Channing Division of Network Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. <sup>29</sup>Department of Biostatistics, University of Washington, Seattle, Washington, USA. <sup>30</sup>Hayashi Eye Hospital, Fukuoka, Japan. <sup>31</sup>Shinjo Eye Clinic, Miyazaki, Japan. <sup>32</sup>Department of Diagnostics and Microsurgery of Glaucoma, Medical University, Lublin, Poland. <sup>33</sup>Inoue Eye Hospital, Tokyo, Japan. <sup>34</sup>Department of Ophthalmology, Hacettepe University, Faculty of Medicine, Ankara, Turkey. <sup>35</sup>Fernández-Vega University Institute and Foundation of Ophthalmological Research, University of Oviedo, Oviedo, Spain. <sup>36</sup>Fernández-Vega Ophthalmological Institute, Oviedo, Spain. <sup>37</sup>Department of Ophthalmology and Visual Science, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA. <sup>38</sup>Department of Ophthalmology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa, Japan. <sup>39</sup>Department of Medical Genetics, University of Helsinki, Helsinki, Finland. <sup>40</sup>Organización Médica de Investigación, Buenos Aires, Argentina. <sup>41</sup>Fundación para el Estudio del Glaucoma, Buenos Aires, Argentina. <sup>42</sup>Clinique Spécialisée en Ophtalmologie Mohammedia, Mohammedia, Morocco. <sup>43</sup>Department of Ophthalmology, Eskisehir Osmangazi University, Meselik, Eskisehir, Turkey. <sup>44</sup>Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia. <sup>45</sup>Department of Ophthalmology, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea. <sup>46</sup>Department of Ophthalmology, Yeungnam University College of Medicine, Daegu, Republic of Korea. <sup>47</sup>Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan. <sup>48</sup>Department of Ophthalmology, Otsu Red Cross Hospital, Otsu, Japan. <sup>49</sup>Genetics Department, Institute of Ophthalmology 'Conde de Valenciana', Mexico City, Mexico. <sup>50</sup>Biochemistry Department, Faculty of



Medicine, UNAM, Mexico City, Mexico. <sup>51</sup>Department of Ophthalmology, Medical Faculty Mannheim of the Ruprecht Karls University of Heidelberg, Mannheim, Germany. <sup>52</sup>Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology and Visual Science Key Laboratory, Beijing, China. <sup>53</sup>Narayana Nethralaya Eye Hospital, Bangalore, India. <sup>54</sup>Chichua Medical Center Mzera, LLC, Tbilisi, Georgia. <sup>55</sup>Jadhavbhai Nathamal Singhvi Department of Glaucoma, Medical Research Foundation, Chennai, India. <sup>56</sup>Vietnam National Institute of Ophthalmology, Hanoi, Vietnam. <sup>57</sup>King Khaled Eye Specialist Hospital, Riyadh, Saudi Arabia. <sup>58</sup>Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Illinois Eye and Ear Infirmary, College of Medicine, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA. <sup>59</sup>Department of Ophthalmology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain. <sup>60</sup>Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain. <sup>61</sup>Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>62</sup>Farabi Eye Hospital, Tehran University Eye Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>63</sup>Ideeta Eye Hospital, Kumamoto City, Japan. <sup>64</sup>Eye Clinic, Rigshospitalet–Glostrup, Glostrup, Denmark. <sup>65</sup>John A. Moran Eye Center, Department of Ophthalmology, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA. <sup>66</sup>Sichuan Provincial Key Laboratory for Human Disease Gene Study, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, China. <sup>67</sup>School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, China. <sup>68</sup>Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi, China. <sup>69</sup>Center for Human Molecular Biology and Genetics, Institute of Laboratory Medicine, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, China. <sup>70</sup>Sichuan Translational Research Hospital, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, China. <sup>71</sup>Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing, China. <sup>72</sup>Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen Eye Hospital, Jinan University, Shenzhen, China. <sup>73</sup>Département d'Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France. <sup>74</sup>Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France. <sup>75</sup>David Tvildiani Medical University, Tbilisi, Georgia. <sup>76</sup>Institute of Human Genetics, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany. <sup>77</sup>Department of Ophthalmology, Medical University Graz, Graz, Austria. <sup>78</sup>Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Tübingen, Germany. <sup>79</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece. <sup>80</sup>Laboratory of General Biology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece. <sup>81</sup>GROW Research Laboratory, Narayana Nethralaya Foundation, Bangalore, India. <sup>82</sup>Santa Lucia Eye Hospital from Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. <sup>83</sup>Aravind Eye Hospital, Pondicherry, India. <sup>84</sup>Aravind Eye Hospital, Tirunelveli, India. <sup>85</sup>Aravind Eye Hospital, Coimbatore, India. <sup>86</sup>Vision Research Foundation, Chennai, India. <sup>87</sup>Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>88</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Torino, Turin, Italy. <sup>89</sup>Ophthalmology Unit, Department of Medicine, Surgery and Neuroscience, University of Siena, Siena, Italy. <sup>90</sup>Department of Ophthalmology, Monfalcone Hospital, Gorizia, Italy. <sup>91</sup>Department of Health Sciences, University of Milan, Milan, Italy. <sup>92</sup>Department of Nephrology, University Vita-Salute San Raffaele, Milan, Italy. <sup>93</sup>Miyata Eye Hospital, Miyazaki, Japan. <sup>94</sup>Sensho-kai Eye Institute, Kyoto, Japan. <sup>95</sup>Department of Medicine and Engineering Combined Research Institute, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan. <sup>96</sup>Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan. <sup>97</sup>Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan. <sup>98</sup>Ohashi Eye Center, Sapporo, Japan. <sup>99</sup>Tane Memorial Eye Hospital, Osaka, Japan. <sup>100</sup>Department of Ophthalmology, University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>101</sup>Department of Ophthalmology, Faculty of Medical Science, University of Fukui, Fukui, Japan. <sup>102</sup>Center for Genomic Medicine, INSERM U852, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan. <sup>103</sup>Tazuke Kofukai Foundation, Medical Research Institute, Kitano Hospital, Osaka, Japan. <sup>104</sup>Department of Ophthalmology, Seoul National University Bundang Hospital, Gyeonggi, Republic of Korea. <sup>105</sup>Department of Ophthalmology, Seoul Metropolitan Government Seoul National University Boramae Medical Center, Seoul, Republic of Korea. <sup>106</sup>Laboratoires RAFAI, Mohammedia, Morocco. <sup>107</sup>Department of Human Genetics, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, the Netherlands. <sup>108</sup>Department of Ophthalmology, College of Medicine, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria. <sup>109</sup>Department of Ophthalmology, University College Hospital, Ibadan, Nigeria. <sup>110</sup>ECWA Eye Hospital, Kano, Nigeria. <sup>111</sup>Department of Ophthalmology, University of Lagos, Lagos, Nigeria. <sup>112</sup>Guinness Eye Centre, Lagos University Teaching Hospital, Lagos, Nigeria. <sup>113</sup>Department of Ophthalmology, ESUT Teaching Hospital Parklane, Enugu, Nigeria. <sup>114</sup>Eye Specialists Hospital, Enugu, Nigeria. <sup>115</sup>Department of Ophthalmology, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. <sup>116</sup>Department of Ophthalmology, University of Nigeria Teaching Hospital, Ituku-Ozalla, Enugu, Nigeria. <sup>117</sup>Department of Ophthalmology, College of Medicine, University of Nigeria, Nsukka, Ituku Ozalla Campus, Enugu, Nigeria. <sup>118</sup>Department of Environmental Sciences, COMSATS Institute of Information Technology, Abbottabad, Pakistan. <sup>119</sup>Pakistan Institute of Ophthalmology, Al-Shifa Trust Eye Hospital, Rawalpindi, Pakistan. <sup>120</sup>Centro Oftalmológico Lischinsky, Tucumán, Argentina. <sup>121</sup>Universidad Peruana Cayetano Heredia, Hospital Nacional Arzobispo Loayza, Lima, Peru. <sup>122</sup>Instituto de Glaucoma y Catarata, Lima, Peru. <sup>123</sup>Clinical Research Centre Adolphe de Rothschild, Société Médicale de Beaulieu, Geneva, Switzerland. <sup>124</sup>Mater Misericordiae University Hospital, Dublin, Ireland. <sup>125</sup>Shri Mithu Tulsii, LV Prasad Eye Institute, Bhubaneswar, India. <sup>126</sup>Hospital Córdoba, Córdoba, Argentina. <sup>127</sup>Centro Oftalmológico Charles, Buenos Aires, Argentina. <sup>128</sup>Centre for Vision Research, Department of Ophthalmology and Westmead Institute for Medical Research, University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia. <sup>129</sup>Centre for Eye Research Australia (CERA), University of Melbourne, Royal Victorian Eye and Ear Hospital, Melbourne, Victoria, Australia. <sup>130</sup>St. Petersburg Academic University, St. Petersburg, Russia. <sup>131</sup>Clinical Pharmacology, SingHealth, Singapore. <sup>132</sup>Clinical Pharmacology Laboratory, National Cancer Centre, Singapore. <sup>133</sup>Office of Clinical Sciences, Duke–NUS Medical School, Singapore. <sup>134</sup>Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore. <sup>135</sup>Department of Ophthalmology, Tan Tock Seng Hospital, Singapore. <sup>136</sup>Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain. <sup>137</sup>Translational Pediatrics and Infectious Diseases, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain. <sup>138</sup>GENVIP Research Group, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, Santiago de Compostela, Spain. <sup>139</sup>Unidade de Xenética, Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses, Instituto de Ciencias Forenses, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. <sup>140</sup>Instituto de Ciencias Forenses, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. <sup>141</sup>Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. <sup>142</sup>Department of Ophthalmology, Rajavithi Hospital, Bangkok, Thailand. <sup>143</sup>Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. <sup>144</sup>Institut Pasteur, Functional Genetics of Infectious Diseases Unit, Department of Genomes and Genetics, Paris, France. <sup>145</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 3012, Paris, France. <sup>146</sup>Department of General Pediatrics, Medical University of Graz, Graz, Austria. <sup>147</sup>Faculty of Infectious and Tropical Disease, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. <sup>148</sup>Department of Genomics, Life & Brain Center, University of Bonn, Bonn, Germany. <sup>149</sup>Department of Biomedicine, University of Basel, Basel, Switzerland. <sup>150</sup>Division of Medical Genetics, University Hospital Basel, Basel, Switzerland. <sup>151</sup>Institute of Human Genetics, University of Bonn, Bonn, Germany. <sup>152</sup>Institute for Medical Informatics, Biometry and Epidemiology, University Hospital of Essen, University Duisburg-Essen, Essen, Germany. <sup>153</sup>Division of Ophthalmology, Stellenbosch University and Tygerberg Hospital, Cape Town, South Africa. <sup>154</sup>Sydney Brenner Institute for Molecular Bioscience, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa. <sup>155</sup>Department of Genetics, Eskisehir Osmangazi University, Meselik, Eskisehir, Turkey. <sup>156</sup>Istanbul University Cerrahpasa Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey. <sup>157</sup>DAMAGEN Genetic Diagnostic Center, Ankara, Turkey. <sup>158</sup>School of Medicine, Wayne State University, Detroit, Michigan, USA. <sup>159</sup>Center for Community Outreach and Policy, Stein Eye Institute, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, California, USA. <sup>160</sup>Department of Cellular Biology and Anatomy, Center for Biotechnology and Genomic Medicine, James and Jean Culver Discovery Institute, Augusta University, Augusta, Georgia, USA. <sup>161</sup>Vanderbilt Eye Institute, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee, USA. <sup>162</sup>Hamilton Glaucoma Center, Department of Ophthalmology and Shiley Eye Institute, University of California, San Diego, San Diego, California, USA. <sup>163</sup>Department of Genomic Medical Sciences, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan. <sup>164</sup>Department of Frontier Medical Science and Technology for Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan. <sup>165</sup>Department of Ophthalmology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, the Netherlands. <sup>166</sup>Department of Ophthalmology, University of Turku and Turku University Hospital, Turku, Finland. <sup>167</sup>Institute for Vision Research, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA. <sup>168</sup>Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA. <sup>169</sup>Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA. <sup>170</sup>Department of Ophthalmology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA. <sup>171</sup>Ophthalmic Consultants of Boston, Boston, Massachusetts, USA. <sup>172</sup>Institute of Biomedical Technologies, Italian National Research Centre (ITB-CNR), Segrate-Milano, Italy. <sup>173</sup>Department of Biosciences, COMSATS Institute of Information Technology, Islamabad, Pakistan. <sup>174</sup>Department of Biochemistry, Al-Nafees Medical College and Hospital, Isra University, Islamabad, Pakistan. <sup>175</sup>Department of Epidemiology, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA. <sup>176</sup>John P. Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA. <sup>177</sup>Divisions of Genetics and Rheumatology, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. <sup>178</sup>Partners Center for Personalized Genetic Medicine, Boston, Massachusetts, USA. <sup>179</sup>Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA. <sup>180</sup>Institute of Inflammation and Repair, University of Manchester, Manchester, UK. <sup>181</sup>Rheumatology Unit, Department of Medicine, Karolinska Institutet and Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden. <sup>182</sup>Department of Ophthalmology, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. <sup>183</sup>Department of Pathology, Rigshospitalet, Eye Pathology Section, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. <sup>184</sup>Department of Ophthalmology,

University of Helsinki and Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland. <sup>185</sup>Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, Massachusetts, USA. <sup>186</sup>Institute of Computational Biology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA. <sup>187</sup>Faculty of Medicine, University of Iceland, Reykjavik, Iceland. <sup>188</sup>Department of Ophthalmology, Landspítali University Hospital, Reykjavik, Iceland. <sup>189</sup>Einhorn Clinical Research Center, New York Eye and Ear Infirmary of Mount Sinai, New York, New York, USA. <sup>190</sup>Dr. G.Venkataswamy Eye Research Institute, Aravind Medical Research Foundation, Aravind Eye Hospital, Madurai, India. <sup>191</sup>Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore. <sup>192</sup>These authors contributed equally to this work. <sup>193</sup>These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to T.A. ([aung.tin@singhealth.com.sg](mailto:aung.tin@singhealth.com.sg)), F.P. ([francesca.pasutto@uk-erlangen.de](mailto:francesca.pasutto@uk-erlangen.de)), J.L.W. ([janey\\_wiggs@meei.harvard.edu](mailto:janey_wiggs@meei.harvard.edu)) or C.C.K. ([khorrcc@gis.a-star.edu.sg](mailto:khorrcc@gis.a-star.edu.sg)).

## ONLINE METHODS

**Patient collections.** DNA and tissue samples from all patients with XFS and exfoliation glaucoma together with normal controls without XFS were obtained after informed written consent from each participant. All human samples were obtained in strict adherence to the tenets of the Declaration of Helsinki. All study sites obtained approval from their respective institutional review board or ethics committee. Details for each XFS case–control collection are appended in the **Supplementary Note**.

**Genotyping of samples.** For the GWAS discovery stage performed in 24 countries (considered to be from across 25 strata owing to Russia contributing two distinct collections, one from St. Petersburg and one from the Republic of Bashkortostan; **Supplementary Table 2**), genome-wide genotyping was undertaken using the Illumina OmniExpress BeadChip, as previously described<sup>14</sup>. To minimize bias between different genotyping arrays and platforms, all 9,035 XFS cases and 17,008 controls for the GWAS discovery stage were genotyped using the Illumina OmniExpress array, ensuring that the primary discovery analysis used only directly genotyped SNP markers uniformly genotyped in cases and controls. The absence of imputation in the primary discovery analysis means that issues relating to imputation uncertainty and insufficient information content for imputed SNPs with varying minor allele frequencies across the different ancestry groups were minimized<sup>77</sup>.

The replication stage included XFS collections from 18 countries (**Supplementary Table 2**). Details on the genotyping and analysis for the replication stage are appended in the **Supplementary Note**.

### Statistical analysis for the GWAS discovery stage Stringent quality control checks were performed for each SNP marker and each individual sample.

Our statistical analysis protocol for the GWAS discovery stage only included directly genotyped SNP markers genotyped by the Illumina OmniExpress BeadChip. We removed poorly performing SNP markers that showed genotyping completion rates of <95%, as well as SNPs showing significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium ( $P < 1 \times 10^{-6}$  for deviation). SNPs with a minor allele frequency of <1% were also removed from further GWAS discovery analysis. Each sample was similarly checked, and those with a poor genotyping success rate (defined as genotyping completeness < 95%), showing excess heterozygosity (defined as being >3 s.d. from the mean<sup>78,79</sup>) and having outlying genetic ancestry (defined by being more than 6 s.d. from the mean on principal-component analysis<sup>80</sup>) were excluded from further analysis.

We verified the biological relationships of all samples remaining after further exclusion of samples using the principle of variability in allele sharing. We used PLINK software (see URLs) to derive information for identify-by-state status for each sample pair comparison. For each sample pair showing evidence of cryptic relatedness ( $IBD > 0.1875$ )<sup>78</sup>, the sample with the lower genotyping completeness rate was removed from further analysis.

We performed principal-component analysis to assess the degree of genetic stratification and population substructure for all samples that underwent genome-wide genotyping, as previously described<sup>80</sup>. Principal-component analysis was performed for each country/site separately to remove samples with outlying ancestry from further analysis. Principal-component scores were then calculated from a pruned set of unlinked markers (defined by pairwise  $r^2 < 0.1$ ) for each country/site separately. These scores were used as covariates to adjust for residual population stratification. Principal-component plots were generated using the R statistical software package (see URLs).

Association between SNP genotypes and XFS disease status was measured using logistic regression for each separate country strata before meta-analysis was conducted, as described elsewhere<sup>15,81,82</sup>. For the GWAS discovery stage, association analysis was additionally adjusted for the first three principal components of genetic stratification for sample collections to minimize residual population stratification. The genome-wide association summary statistics of all SNP markers from the GWAS are appended as **Supplementary Data 2**. The genomic inflation estimate ( $\lambda_{GC}$ ) was calculated using only directly genotyped SNPs, using the median regression test statistic, which is distributed in a  $\chi^2$  manner<sup>83</sup>.  $\lambda_{GC}$  is listed for each individual GWAS discovery stratum (and also illustrated in **Supplementary Fig. 22**) as well as for the GWAS meta-analysis (**Supplementary Table 2**). In line with well-described methodologies, results for the seven genome-wide significant loci underwent double-GC correction,

which corrects for genomic inflation first at the individual population stratum and then once again during meta-analysis<sup>84,85</sup>.

Meta-analysis was performed via the inverse-variance, fixed-effects model using genomic control–corrected summary results (adjusted odds ratios and standard errors) from each separate country/site. At no point in the analysis were samples pooled within or across continental groups for association analysis, as this measure would not appropriately account for population stratification. The meta-analysis method validated strong reversal at *LOXLI* (**Supplementary Fig. 23**).

**Statistical analysis for the replication stage.** SNPs showing association with XFS surpassing  $P \leq 1 \times 10^{-4}$  in the GWAS discovery stage were brought forward to the replication stage and analyzed in a manner similar to the discovery stage (**Supplementary Note**).

**Genotype imputation.** For the five newly identified genome-wide significant loci, we sought to improve on the genetic resolution provided by the directly genotyped SNPs currently included on standard-content GWAS arrays via imputation fine-mapping using samples and SNP markers passing strict quality control checks. This would also allow for better delineation of the credible sets underlying each of the five newly identified loci<sup>48</sup>. Imputation and phasing of genotypes were carried out using IMPUTE2 software (see URLs) with the reference panel constructed from cosmopolitan population haplotypes based on data obtained from 2,535 individuals from 26 distinct populations around the world. These data are part of the 1000 Genomes Project Phase 3 (June 2014) release, as described elsewhere. To minimize the effect of imputation uncertainty, we only included imputed genotypes with an information score of  $\geq 0.95$ . Allele dosages were used for the imputed data association analyses with SNPTEST software to average across imputation uncertainty.

**Credible set analysis.** Credible sets of SNPs were defined, as previously described, as the minimum number of genetic variants that accounted for >95% of the probability of driving each locus-specific association signal<sup>48,49</sup>. For construction of credible sets, we included all genotyped variants with genotyping success rates of >95% and minor allele frequency >1%. Fine-mapping imputation variants were included using similar thresholds of minor allele frequency >1% and imputation information content >0.95 to reduce the impact of imputation quality on the credible set analysis. For the fine-mapping imputation step, allele dosages were used for the imputed data association analyses with SNPTEST software to average across imputation uncertainty.

**Statistical test for interaction with geographical latitude.** Statistical tests for interaction between genetic markers and geographical latitude were undertaken for the five newly identified loci showing genome-wide significant association with XFS. The odds ratio and standard error for the odds ratio estimate for each SNP tested were assigned a latitude band for the country (or zone, whichever was more precise) from which XFS cases and controls were drawn (**Supplementary Table 2**).

The odds ratios and standard errors used in this test had already undergone adjustment for principal-component analysis and genomic control correction during the GWAS analysis. We then conducted a trend test to assess whether the odds ratios for disease increased with increasing  $10^\circ$  increments of geographical latitude.

**Mouse model phenotypes.** For the 33 genes implicated by the seven genome-wide significant SNPs in seven distinct loci (**Supplementary Table 15**), we performed lookups in the Mouse Genome Informatics publicly available database<sup>86</sup>. The output was manually checked and curated, with the relevant references detailing the mouse models appended as footnotes, in **Supplementary Table 15**.

**Deep sequencing of *LOXLI* and *CACNA1A*.** Deep sequencing was performed on a total of 5,570 XFS cases and 6,279 controls from nine countries (**Supplementary Table 1**). Both the *LOXLI* and *CACNA1A* genetic loci (exons, introns, 5' and 3' flanking regions) spanning coordinates chr15:74,200,000 to 74,260,000 and chr19:13,307,000 to 13,745,000 were captured using the Roche NimbleGen SeqCap Easy probe kit. Enrichment and amplification of

the libraries were then carried out using well-described, routine laboratory techniques<sup>36</sup>. Sequencing was performed using 2 × 101-bp paired-end reads on the Illumina HiSeq 2500 platform. We required that >95% of the samples be covered by at least 10×<sup>87</sup>. Mean coverage for sequencing across the samples was observed to be 60×.

For the analysis of *LOXLI* p.Tyr407Phe, the initial 2,827 cases and 3,013 controls from Japan who underwent resequencing were enrolled from December 2007 to January 2015. A further 1,082 XFS cases and 2,325 controls from Japan were enrolled for the replication stage. These samples were collected between February 2015 and December 2016 and did not undergo deep sequencing of the entire *LOXLI* locus.

**Read mapping, variant detection and annotation.** All sequence reads in each individual were aligned to the human reference genome (hg19) using Burrows–Wheeler aligner software, which is well described<sup>36</sup>. Consensus genotypes were called using the GATK best-practices guidelines. Only high-quality variants assigned ‘PASS’ scores by variant quality score recalibration and individuals with variant genotype calling completeness >95% were brought forward for further statistical analysis.

**Power calculations for genetic association studies.** Power calculations for the GWAS discovery and replication stages were performed with an additive genetic model using well-described methods (see URLs) and are shown in **Supplementary Table 10**. These power calculations take into account the asymmetric number of cases and controls, as is well reported in genetic association studies<sup>82,88</sup>.

**Haplotype phasing for the *LOXLI* locus.** To ensure accurate phasing to reliably capture both common and rare haplotypes, we only included individuals with a genotype call completeness rate of 100% from both the sequencing and GWAS experiments. *LOXLI* haplotypes were phased using the BEAGLE<sup>89</sup> and PLINK<sup>90</sup> software packages, as previously described<sup>35</sup>.

**Tissue specimens for analysis of the GWAS loci.** Human donor eyes used for corneal transplantation with appropriate research consent were obtained and processed within 15 h of death. For RNA and DNA extractions, 21 donor eyes with XFS (mean age, 80.1 ± 7.9 years; 11 female, 10 male) and 41 normal, healthy, age-matched control eyes (mean age, 77.1 ± 8.1 years; 20 female, 21 male) without any known ocular disease were used. Ocular tissues were prepared under a dissecting microscope and were snap frozen in liquid nitrogen. The presence of characteristic exfoliation material deposits was assessed by macroscopic inspection of anterior segment structures and confirmed by electron microscopy analysis of small tissue sectors.

For immunostaining experiments, ocular tissue samples obtained from 10 donor eyes with XFS (mean age, 78.7 ± 9.7 years; 6 female, 4 male) and 10 normal human donor eyes (mean age, 72.3 ± 11.6 years; 5 female, 5 male) were embedded in optimal cutting temperature compound and frozen in liquid nitrogen. DNA samples obtained from ocular tissues and cells were genotyped by Sanger sequencing (**Supplementary Note**). The ethical review boards of the medical faculties of the University of Erlangen-Nuremberg, the University of Tübingen and the University of Würzburg, as well as the local ethics committee (4218-CH), approved this study.

**Quantitative real-time PCR of human eye tissues.** Ocular tissues were extracted using the Precellys 24 homogenizer and lysing kit together with the AllPrep DNA/RNA kit (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. This includes an on-column DNase I digestion step. First-strand cDNA synthesis from 0.5 µg of total RNA was performed with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in a 20 µl reaction volume. Quantitative real-time PCR was performed using the CFX Connect thermal cycler and software (Bio-Rad). PCR reactions (25 µl) were run in duplicate and contained 2 µl of first-strand cDNA, 0.4 µM of each upstream and downstream primer, and SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad). The sequences for the exon-spanning primers (Eurofins Genomics), designed using Primer3 software (see URLs), and PCR conditions are appended in **Supplementary Table 16**. For normalization of gene expression levels, mRNA ratios relative to the housekeeping gene *GAPDH* were calculated by the comparative  $C_T$  method ( $2^{-\Delta C_T}$ ). Amplification

specificity was checked using melt curve and sequence analyses on the Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems).

**Immunoblot analysis of human eye tissues.** Total protein was extracted from the iris and ciliary body tissues of six eyes with XFS and six normal eyes using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS). Protein concentrations were determined with the Micro-BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Proteins (10 µg per lane) were separated by 4–15% SDS-PAGE under reducing conditions (6% DTT) and transferred onto nitrocellulose membranes with the Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked with SuperBlock T20 (Thermo Scientific) for 30 min and incubated for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C with antibodies against POMP (ab170865, Abcam) and TMEM136 (ab182495, Abcam) diluted in 10% SuperBlock T20 in PBST. Equal loading was verified with mouse antibody to human β-actin (clone AC-15, Sigma-Aldrich) in 10% SuperBlock T20 in PBST. In negative-control experiments, the primary antibody was replaced by PBST. Immunodetection was performed with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody in 10% SuperBlock T20 in PBST and the Super Signal West Femto ECL kit (Thermo Scientific), and band intensity was analyzed by computerized densitometry.

Immunohistochemistry of human eye tissues followed routine laboratory procedures, which are described in the **Supplementary Note**.

**LOXLI constructs.** The full-length cDNA encoding LOXLI was amplified using the primers shown in **Supplementary Table 16**. The restriction enzyme sites EcoRI and SalI were added in a second amplification using a second set of primers (**Supplementary Table 17**). The LOXLI fragment (~1.7 kb) was then subcloned into a pcipuro vector encoding an HA tag. Four haplotypes, Arg141–Gly153–Tyr407 (G-G-A), Leu141–Gly153–Tyr407 (T-G-A), Arg141–Asp153–Tyr407 (G-A-A) and Arg141–Asp153–Phe407 (G-A-T), were generated and contained genetic variants in the following order: rs1048661[G>T]–rs3825942[G>A]–rs201011613[A>T]. The first haplotype generated was Arg141–Asp153–Tyr407 (G-A-A), and this served as the template plasmid for subsequent site-directed mutagenesis.

Targeted base substitution was achieved by site-directed mutagenesis using a PCR-based strategy using the Transformer site-directed mutagenesis kit (Clontech) with respective oligonucleotide primer pairs (**Supplementary Table 17**) on the *LOXLI* Arg141–Asp153–Tyr407 (G-A-A) haplotype. The accuracy of all the haplotypes constructed was confirmed by Sanger sequencing of the full-length clone. All oligonucleotide primer pairs used to create the LOXLI constructs are appended in **Supplementary Table 17**.

**Nano luciferase secretion assay for LOXLI.** The secretion assay for LOXLI with respect to the four tested haplotypes Arg141–Gly153–Tyr407 (G-G-A), Leu141–Gly153–Tyr407 (T-G-A), Arg141–Asp153–Tyr407 (G-A-A) and Arg141–Asp153–Phe407 (G-A-T) was performed using the NanoLuc luciferase assay. More details for this assay are appended in the **Supplementary Note**.

Immunoblot analysis of the different HA-tagged LOXLI haplotypes on elastin, fibronectin and collagen IV followed routine laboratory procedures, which are appended in the **Supplementary Note**.

**Spheroid cultures.** The HLEC (B-3) cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were maintained in DMEM supplemented with 20% FBS (Sigma-Aldrich) and 2 mM GLUTAMAX (Invitrogen) at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and were passaged every 2–3 d in a 1:4 ratio. The cell line was tested for mycoplasma and was found to be negative.

Nucleofected HLECs were trypsinized 48 h after nucleofection and seeded in their growth medium in low-attachment six-well plates with hydrophobic surfaces (Greiner Bio-One) at 300,000 cells per well. Cells were left to form spheroids and were collected at 72 h. The spheroids were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature and stored at 4 °C. Fixed spheroids were washed with PBST (0.1% Tween-20 in 1× PBS) and blocked in blocking buffer (3% BSA in PBS) for 1 h at room temperature. They were subsequently incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: mouse or rabbit antibody to HA (1:100 dilution; sc-7392 and sc-805, Santa Cruz Biotechnology), goat antibody to elastin (1:100 dilution; sc-17581, Santa Cruz Biotechnology), mouse antibody to fibrillin-1



(1:100 dilution; ab6328, Abcam) and rabbit antibody to collagen IV (1:100 dilution; ab6586, Abcam). All antibodies were diluted with the blocking buffer. After incubation with the primary antibody, the spheroids were washed three times with PBST and labeled with their respective secondary antibodies for 1 h at room temperature. The secondary antibodies used were anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat secondary antibody conjugated with FITC, Cy3 or Alexa Fluor 647 (1:300 dilution; Jackson Laboratories). The spheroids were stained with DAPI (1 µg/ml) and mounted on glass microscope slides using a cytocentrifuge (Thermo Fisher Scientific) and FluorSave Reagent (Merck Millipore). Immunolabeled spheroid images were acquired at the Advanced Bioimaging Core at the Academia, Singapore Health Services, with a Leica TCS SP8 confocal laser-scanning platform. *z* planes were imaged in 1-µm steps. Analysis of spheroids was performed on a maximal-projection image of five *z* planes projected onto a single image. Heat maps of respective immunofluorescent signals were generated relative to the minimum and maximum fluorescence intensity values for the same scale defined by the color range, as indicated in the figures. Each experiment was repeated independently three times, with images also acquired independently three times.

**Cell-cell adhesion assay.** HLECs nucleofected with *LOXLI* Arg141–Gly153–Tyr407 (G-G-A), Leu141–Gly153–Tyr407 (T-G-A), Arg141–Asp153–Tyr407 (G-A-A) and Arg141–Asp153–Phe407 (G-A-T) haplotype constructs were plated into 96-well plates designed for the xCELLigence RTCA SP instrument (ACEA Biosciences) at a density of 120,000 cells per well. The 96-well plates were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and monitored on the xCELLigence RTCA SP system at 15-min intervals for the first 24 h and at 30-min intervals for the subsequent 48 h. Impedance data were extracted from the RTCA software and analyzed for differences in cell–cell adhesion between the different *LOXLI* haplotypes. Triplicates were performed for HLECs nucleofected with each haplotype to allow for robust statistical evaluation of the results obtained. The readings for each variant were normalized against their respective initial readings at the first time point, and the normalized readings were subsequently compared against those for the Arg141–Asp153–Phe407 (G-A-T) haplotype. The assay shown in **Figure 1e** was repeated four independent times, with the follow-up independent experiment (shown in **Supplementary Fig. 7**) repeated seven independent times.

**Statistical procedures for biological analyses.** Statistical evaluation of expression differences between patients and controls was performed using SPSS v.20 software (IBM) with an unpaired two-tailed *t* test. *P* < 0.05 was considered

to be statistically significant. Data for adhesion and secretion assays were analyzed by an unpaired homoscedastic *t* test, and two-tailed *P* values were calculated. We considered *P* < 0.05 as statistically significant.

**Data availability.** The primary data set comprising genome-wide association summary statistics for all SNP markers reflected in the **Figure 2** Manhattan plot is appended as **Supplementary Data 2**. The data sets from secondary analysis are appended as **Supplementary Data 1** (*LOXLI* phased haplotype analysis) and **Supplementary Data 3** (INRICH analysis).

77. Barrett, J.C. *et al.* Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the *HNF4A* region. *Nat. Genet.* **41**, 1330–1334 (2009).
78. Anderson, C.A. *et al.* Data quality control in genetic case–control association studies. *Nat. Protoc.* **5**, 1564–1573 (2010).
79. Mells, G.F. *et al.* Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat. Genet.* **43**, 329–332 (2011).
80. Price, A.L. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **38**, 904–909 (2006).
81. Verhoeven, V.J. *et al.* Genome-wide meta-analyses of multiethnicity cohorts identify multiple new susceptibility loci for refractive error and myopia. *Nat. Genet.* **45**, 314–318 (2013).
82. Kiryluk, K. *et al.* Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat. Genet.* **46**, 1187–1196 (2014).
83. Bronson, P.G. *et al.* Common variants at *PVT1*, *ATG13-AMBRA1*, *AH11* and *CLEC16A* are associated with selective IgA deficiency. *Nat. Genet.* **48**, 1425–1429 (2016).
84. Okada, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**, 376–381 (2014).
85. Kooner, J.S. *et al.* Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat. Genet.* **43**, 984–989 (2011).
86. Blake, J.A., Bult, C.J., Eppig, J.T., Kadin, J.A. & Richardson, J.E. The Mouse Genome Database: integration of and access to knowledge about the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* **42**, D810–D817 (2014).
87. Foo, J.N. *et al.* Analysis of non-synonymous-coding variants of Parkinson's disease-related pathogenic and susceptibility genes in East Asian populations. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3891–3897 (2014).
88. Cheng, T.H. *et al.* Five endometrial cancer risk loci identified through genome-wide association analysis. *Nat. Genet.* **48**, 667–674 (2016).
89. Browning, B.L. & Browning, S.R. A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 210–223 (2009).
90. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).



ORIGINAL ARTICLE

# Investigation of Association between Autophagy-Related Gene Polymorphisms and Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma in a Spanish Population

Lourdes de Juan-Marcos<sup>1,2</sup>, Francisco A. Escudero-Domínguez<sup>1</sup>, Emiliano Hernández-Galilea<sup>1,2</sup>, Fernando Cruz-González<sup>1,2</sup>, Isora Follana-Neira<sup>1</sup>, and Rogelio González-Sarmiento<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>2</sup>Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain, <sup>3</sup>Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain, and <sup>4</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (BMCC), University of Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

## ABSTRACT

*Purpose:* Cellular stress conditions are important mechanisms implicated in the pathogenesis of pseudoexfoliation syndrome. One of the potential cellular responses to these stress conditions is induction of autophagy. The purpose of this study was to evaluate whether genetic variants in three critical genes of autophagy (ATG16L, ATG2B, ATG5) may be involved in the development of pseudoexfoliation syndrome (XFS) and pseudoexfoliation glaucoma (XFG) in a Spanish population. *Methods:* 108 patients (64 XFS, 44XFG) and 118 healthy controls were evaluated. The analysis of genetic polymorphisms was performed by standard TaqMan allelic discrimination technique. *Results:* No significant differences in either genotype distributions or allelic frequencies of the tested polymorphisms were found between patients with XFS/XFG and control subjects. *Conclusions:* Our results suggest that these three genes that are critical components of the autophagy pathway (ATG16L, ATG2B, ATG5) are not significant risk factors among Spanish patients with either XFS or XFG.

**Keywords:** Autophagy, genetics, glaucoma, polymorphisms, pseudoexfoliation

## INTRODUCTION

Pseudoexfoliation syndrome (XFS) is an age-dependent, generalized disorder characterized by the excessive production and pathological deposition of microfibrillar material in many ocular tissues.<sup>1</sup> This material is composed of a complex glycoprotein–proteoglycan structure bearing epitopes of the basement membrane, epitopes of the elastic fiber system, and components of elastic microfibrils.<sup>2</sup> Progressive obstruction of the trabecular meshwork by exfoliation material produced an increase in intraocular pressure. Currently, XFS represents the most common identifiable cause of secondary open-angle glaucoma, and

the prognosis of this glaucoma is worse than that of primary open-angle glaucoma.<sup>2</sup> Moreover, the development of nuclear cataract is more common in patients with XFS, and there is also an evidence for association of XFS with changes in the cornea<sup>3</sup> and retinal vein occlusion.<sup>4</sup>

XFS is not just a disease of the eye but, in addition, exfoliation material has been identified in connective tissue portions of various visceral organs (heart, lung, liver, kidney, vessel wall, and cerebral meninges).<sup>1</sup> There is a growing number of studies in which XFS is associated with cardiovascular and cerebrovascular diseases (angina, stroke, abdominal aortic aneurysm, hearing loss, Alzheimer disease, or dementia).<sup>5–7</sup>

These findings suggested that ocular XFS is part of an age-related general disorder of the extracellular matrix and that patients with XFS could suffer from increased comorbidity. For that reason, there is a long-overdue increasing interest in this syndrome and many clinical studies are conducted to clarify that question. A therapy which could prevent the formation of exfoliation material or eliminate the deposits of this material should be a prime goal.

Despite its importance, the specific pathogenesis of XFS is still not known. Most of the recent studies suggest that this disease is an elastic microfibrilopathy, but it is unclear whether pseudoexfoliation material accumulates due to excessive synthesis or inadequate breakdown or both. A common genotype of the *LOXLI* gene has been shown to be a major genetic factor associated with pseudoexfoliation syndrome.<sup>8–10</sup> However, these DNA sequence variants are also found in a significant percentage of healthy subjects; therefore, other genetic variants and external factors may predispose an individual carrying *LOXLI* risk alleles to develop XFS.

It is known that cellular stress conditions, such as oxidative stress and ischemia/hypoxia, appear to be important mechanisms implicated in the pathogenesis of XFS. Cells have mechanisms for preventing stress-induced injury or cell death and for recuperating from stress conditions by activating cytoprotective systems. Several lines of evidence suggest impaired antioxidative protection mechanisms<sup>11–13</sup> and a significant downregulation of protective genes in eyes with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma,<sup>14,15</sup> demonstrating an inadequate cytoprotective system in XFS pathobiology.

One of the potential cellular responses to oxidative damage is induction of autophagy.<sup>16,17</sup> Autophagy is an evolutionarily conserved mechanism that allows for the elimination of unwanted structures, long-lived proteins, and organelles within a complex lysosomal clearance process.<sup>18,19</sup> The importance of this protective system is highlighted by an increased number of studies showing that dysregulated autophagy plays an important role in aging and in the pathogenesis of several human diseases, including microbial infections, autoimmune disorders, cancer, inflammatory diseases, and neurodegeneration.<sup>20–22</sup>

Autophagy consists of several sequential steps, and all of these steps are highly regulated by a number of conserved autophagy-related genes (known as the ATG genes) and ubiquitin-like conjugation systems.<sup>23</sup> We hypothesized that genetic variants in critical genes of autophagy may be involved in the development of XFS. In the present study, we analyzed three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several autophagy regulator genes (*ATG16L*, *ATG2B*, *ATG5*) implicated in different

steps of autophagy to analyze the association of the ATG genes polymorphisms with XFS in a Spanish population.

## MATERIAL AND METHODS

### Subjects

In the present case-control study, we investigated a total of 226 subjects of Spanish origin, comprising 108 patients with XFS, 44 of whom had glaucoma, and 118 healthy controls. All subjects were recruited from the Department of Ophthalmology of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain). All patient and controls underwent detailed ophthalmic examination, including slit-lamp biomicroscopy, tonometry, gonioscopy, dilated pupil examination of the lens, and funduscopy.

The diagnostic criterion for XFS without glaucoma was the existence of pseudoexfoliation deposits on the anterior lens capsule or pupillary margin in either eye, with intraocular pressure (IOP) less than 21 mmHg and no clinical evidence of glaucomatous optic neuropathy. Pseudoexfoliation glaucoma (XFG) was defined if the patient had typical characteristics of XFS as well as glaucomatous optic disc changes (defined as a cup to disc ratio >0.7, notching of the neuroretinal rim, or an asymmetric cup to disc ratio >0.2) with compatible visual field defects and documented IOP  $\geq$ 22 mmHg. The control group comprised subjects without any evidence of exfoliative material in intraocular tissues, IOP less than 22 mmHg and normal-appearing optic nerve. Due to the age dependence of the XFS, only controls older than age 65 were enrolled.

The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Hospital.

### DNA Isolation and Polymorphism Genotyping

Blood samples were collected from the cases and controls after obtaining an informed consent. DNA was isolated from peripheral blood following proteinase K and phenol-chloroform standard protocols.

Three genes that encode proteins that are involved in autophagy were investigated in this study. Allelic discrimination of the polymorphism *ATG16L1* c.646 A>G (rs2241880), polymorphism *ATG2B* c.5174 C>G (rs3759601), and polymorphism *ATG5* c.574-12777 G>C (rs2245214) were performed with TaqMan probes as provided by the manufacturer with ABI assays C\_9095577\_20, C\_9690160\_10, and C\_3001905\_20, respectively (Applied Biosystems, Foster City, CA). The amplification program for



TABLE 1. Demographic characteristics of the study patients.

	Cases	Controls	P-value
Number of subjects	Total 108 XFS 64 XFG 44	118	
Age (years) mean±SD	75.6±7.4	74.5± 9.3	0.06
range	55–88	66–91	
Sex, n (%)			
Male	50 (46.3%)	46 (39%)	0.27
Female	58 (53.7%)	72 (61%)	

XFS, exfoliation syndrome XFG, exfoliation glaucoma; SD, standard deviation.

these polymorphisms had an annealing temperature of 60°C for one minute and the number of cycles was 40. To assess reproducibility, a random selected 5% of

TABLE 2. Allele and genotype association analysis for the three SNPs.

SNP	XFS/XFG (n=108)	Control (n=118)	P-value	OR (95% CI)
<b>ATG16L1 rs2241880</b>				
Allele				
G	101 (0.47)	122 (0.52)	0.29	0.82 (0.57–1.19)
A	115 (0.53)	114 (0.48)		
Genotype				
GG	25 (0.23)	35 (0.30)	0.27*	0.84 (0.47–1.51)*
GA	51 (0.47)	52 (0.44)	0.88**	1.18 (0.66–2.11) **
AA	32 (0.30)	31 (0.26)		
<b>ATG2B rs3759601</b>				
Allele				
C	70 (0.32)	92 (0.39)	0.14	0.75 (0.51–1.10)
G	146 (0.68)	144 (0.61)		
Genotype				
CC	15 (0.14)	20 (0.17)	0.52*	0.79 (0.38–1.63)*
CG	40 (0.37)	52 (0.44)	0.12**	1.51 (0.88–2.55) **
GG	53 (0.49)	46 (0.39)		
<b>ATG5 rs2245214</b>				
Allele				
C	146 (0.68)	160 (0.68)	0.96	0.99 (0.66–1.47)
G	70 (0.32)	76 (0.32)		
Genotype				
CC	46 (0.43)	56 (0.47)	0.46*	0.82 (0.48–1.39)*
CG	54 (0.50)	48 (0.41)	0.25**	0.59 (0.24–1.48) **
GG	8 (0.7)	14 (0.12)		

SNP, single nucleotide polymorphisms; XFS, exfoliation syndrome; XFG, exfoliation glaucoma; OR, odds ratio; CI, confidence interval. The asterisks (\*) indicate the OR values and *p* values derived from comparison of the specific genotype with all of the others; i.e., GG versus GA+AA at ATG16L1, CC versus CG+GG at ATG2B, CC versus CG+GG at ATG5. The asterisks (\*\*) indicate the OR values and *p* values derived from comparison of the specific genotype with all of the others; i.e., AA versus GA+GG at ATG16L1, GG versus CG+CC at ATG2B, GG versus CG+CC at ATG5.

TABLE 3. Allele and genotype association analysis between the three SNPs and XFS/XFG.

SNP	XFS (n=64)	XFG (n=44)	P-value	OR (95% CI)
<b>ATG16L1 rs2241880</b>				
Allele				
G	64 (0.50)	37 (0.42)	0.25	1.38 (0.80–2.38)
A	64 (0.50)	51 (0.58)		
Genotype				
GG	15 (0.23)	10 (0.22)	0.27*	0.84 (0.47–1.51)*
GA	34 (0.54)	17 (0.39)	0.09**	2.06 (0.89–4.76)**
AA	15 (0.23)	17 (0.39)		
<b>ATG2B rs3759601</b>				
Allele				
C	37 (0.29)	23 (0.26)	0.41	1.29 (0.70–2.39)
G	81 (0.71)	65 (0.74)		
Genotype				
CC	10 (0.16)	5 (0.11)	0.53*	1.44 (0.46–4.56)*
CG	27 (0.42)	13 (0.30)	0.08**	0.51 (0.23–1.10)**
GG	27 (0.42)	26 (0.49)		
<b>ATG5 rs2245214</b>				
Allele				
C	86 (0.67)	58 (0.66)	0.85	1.06 (0.59–1.88)
G	42 (0.33)	30 (0.34)		
Genotype				
CC	25 (0.39)	19 (0.43)	0.67*	0.84 (0.38–1.83)*
CG	36 (0.56)	20 (0.45)	0.29**	0.38 (0.09–1.70)**
GG	3 (0.05)	5 (0.07)		

SNP, single nucleotide polymorphisms; XFS, exfoliation syndrome; XFG, exfoliation glaucoma; OR, odds ratio; CI, confidence interval. The asterisks (\*) indicate the OR values and *p* values derived from comparison of the specific genotype with all of the others; i.e., GG versus GA+AA at ATG16L1, CC versus CG+GG at ATG2B, CC versus CG+GG at ATG5. The asterisks (\*\*) indicate the OR values and *p* values derived from comparison of the specific genotype with all of the others; i.e., AA versus GA+GG at ATG16L1, GG versus CG+CC at ATG2B, GG versus CG+CC at ATG5.

the samples were re-genotyped, and all of these genotypes matched with genotypes initially designated.

We have selected polymorphisms from ATG genes involved in autophagosome generation that have been previously reported in the literature. Initially, we selected non-synonym polymorphisms with a population frequency of the minor allele higher than 10% in a Caucasian population and that were located in sequences highly conserved throughout the evolution. ATG2B rs3759601 and ATG16L1 rs2241880 polymorphisms are missense mutations, whereas ATG5 rs2245214 polymorphism is intronic, but we selected this polymorphism because it was previously reported in the literature, the frequency of the minor allele was higher than 10% in Caucasians, and because this polymorphism is associated with the

lost of a recognition site for SRp40 protein that is involved in mRNA splicing.

### Statistical Analyses

SPSS software (v 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL) was used to perform statistical analysis. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated using the  $\chi^2$  test in SAS/Genetics v9.1. The comparison of allelic and genotype frequencies between cases and controls was assessed using the  $\chi^2$  test. Odds ratio and 95% confidence intervals (OR; 95% CI) were also calculated. A *p*-value <0.05 was considered as statistically significant.

## RESULTS

A total of 108 cases (64 XFS and 44 XFG) and 118 control individuals were recruited into this study. The demographic characteristics of the population studied are summarized in Table 1. Differences in mean age and sex distribution between all patients and controls were not significant.

Three SNPs in three ATG genes were analyzed for association with XFS and XFG. Analysis of the allelic and genotypic distribution of these SNPs is shown in Table 2. No significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium in XFS or in the control group was observed (*p*>0.05).

The distribution of genotypes and alleles in ATG polymorphisms was not significantly different between cases and controls (Table 2). None of the three SNPs showed a significant difference between the XFS and XFG groups in allelic or genotypic frequencies (Table 3).

## DISCUSSION

XFS occurs worldwide and its prevalence increases rapidly in individuals above 65 years old. Currently, it affects 60–70 million people.<sup>24</sup> XFS plays a role in the development of glaucoma, cataract, retinal vein occlusion, and perioperative problems during cataract surgery, but this disease is important not only as a cause of ocular pathology. In addition, there is increasing evidence for an association of XFS with cardiovascular and neurodegenerative diseases, making it a disorder of general medical importance.

Ophthalmologists have begun to recognize the potential ocular and systemic morbidities associated with XFS. Therefore, it is necessary to investigate the pathophysiology of XFS to understand and treat this disease.

The etiology of XFS is unknown, possibly being a result of environmental and genetic factors. Growth factors, particularly transforming growth factor- $\beta$ 1

(TGF- $\beta$ 1), increased cellular and oxidative stress, and an impaired cellular protection system, appear to be involved in its pathogenesis.<sup>15</sup>

TGF- $\beta$ 1 is an essential modulator of matrix formation in many fibrotic diseases. Previous studies demonstrated that TGF- $\beta$ 1 induces synthesis of extracellular matrix proteins, including fibronectin and collagens, and inhibits degradation of extracellular matrix proteins, mainly by matrix metalloproteinases (MMPs).<sup>25,26</sup> The growth factor TGF- $\beta$ 1 has been shown to be elevated in the aqueous humor and to be upregulated in anterior segment tissues of XFS patients.<sup>27</sup> Therefore, it is considered an important mediator in the fibrotic pseudoexfoliation process.

It is also known that cellular stress conditions, such as oxidative stress and ischemia/hypoxia, are other mechanisms implicated in the pathophysiology of XFS. The aqueous humor samples from XFS patients contain elevated levels of oxidative stress markers, such as ascorbic acid and glutathione.<sup>28,29</sup> A concomitant increase in endothelin-1 and homocysteine levels in the aqueous humor of pseudoexfoliation eyes may contribute to ischemic alterations and oxidative stress.<sup>30,31</sup>

In order to prevent this stress-induced injury, cells possess cytoprotective mechanisms, which have been investigated in anterior segment tissues of XFS eyes. Reduced concentration of antioxidative factors, such as 8-isoprostaglandine F2 $\alpha$  and malondialdehyde, together with a decreased activity of various antioxidative enzymes, such as catalase and glutathione peroxidase, confirm a defective protection against oxidative stress in the anterior chamber of these eyes.<sup>15,28</sup>

Autophagy is another mechanism of cell protection. It represents a fundamental cellular homeostatic process to degrade and recycle cellular proteins and damaged organelles.<sup>32</sup> Autophagy mainly consists of three steps: formation of an autophagosome with a double membrane; sequestration of cytoplasmic constituents; and fusion of the autophagosome with lysosomes, where encapsulated constituents are degraded by proteases.<sup>33</sup>

The molecular mechanism of autophagy involves several conserved autophagy-related genes (ATG) and these genes have multiple functions in various physiological situations. To date, it has been identified in approximately 30 autophagy-related genes, whose products are involved in autophagy.<sup>34</sup> The mechanisms by which the disease-associated autophagy genes affect the autophagy pathway are not yet known.

The role of autophagy in the pathogenesis of XFS has not been studied. However, there are several factors which support the notion that autophagy could associate with this disease.

Pseudoexfoliation cells show ultrastructural signs of active fibrillogenesis and metabolic activation.<sup>1</sup>

Recently, autophagy was reported to remove misfolded procollagen molecules from the endoplasmic reticulum as a means of cell protection,<sup>35</sup> and inhibition of autophagy resulted in a profibrotic phenotype with increased collagen deposition.<sup>36</sup> Therefore, autophagy could also play a role in the degradation of pseudoexfoliation material and accumulation in the extracellular space.

Moreover, autophagy occurs at basal levels in virtually all cells, but it can be upregulated by both external and intracellular factors, including hypoxia/ischemia<sup>37</sup> and oxidative stress.<sup>38</sup> There is also growing evidence which indicates that TGF- $\beta$ 1 activates autophagy.<sup>39</sup> These factors have been shown to be significantly increased in the anterior chamber of XFS eyes.

Consequently, the induction of autophagy in XFS could operate as a cytoprotective mechanism to suppress the accumulation of pseudoexfoliation material and an alteration of the autophagic process may cause an insufficient elimination of this material.

Since no other studies have investigated the association between autophagy and pseudoexfoliation, we studied the allelic and genotypic frequencies of three SNPs in three ATG genes (*ATG16L*, *ATG2B*, and *ATG5*) in patients with XFS and XFG.

The autophagy gene *ATG16L1* is a central adaptor required for the formation of a mature autophagosome. Polymorphism rs2241880 in exon 9 of *ATG16L1* gene results in the amino acid substitution Thr300Ala. This polymorphism has mainly been studied for its association with autoimmune diseases' susceptibility, and it has been revealed to play a role in Crohn's disease.<sup>40</sup> A recent study describes a functional consequence of the T300A variant in stress-induced autophagy and bacterial clearance by xenophagy.<sup>41</sup>

*ATG16L1* encodes a key protein that interacts with two other autophagy proteins, *ATG5* and *ATG12*, to form a non-covalent protein complex essential for the process of autophagy. This complex is involved in autophagosome formation, which sequesters cytoplasmic materials and fuses with lysosomes which degrade these materials, and is also necessary for proper subcellular localization of the autophagy machinery.<sup>42</sup> *ATG2B* is recruited to the autophagosome formation site later than *ATG5*.<sup>43</sup>

Therefore, an alteration in this autophagic process affects the autophagy machinery. It might result in accumulation of protein aggregates and consequently an insufficient degradation of PEX material. However, no significant differences were found in the genotype distributions or allelic frequencies of the studied polymorphisms between patients and control subjects. The results also found no significant difference between XFS and XFG patients.

To our knowledge, the present study is the first report looking for a possible association between

autophagy gene polymorphisms and XFS. Based on the results of this study, none of the investigated polymorphisms in *ATG16L*, *ATG2B*, and *ATG5* are major contributors to the risk of pseudoexfoliation syndrome in a Spanish population, but this does not exclude a role of autophagy in the development or progression of this disorder. Additional molecular and functional studies will be necessary to determine the contribution of the autophagy in this disease. Furthermore, other autophagy-related genes could be studied for their role in XFS pathogenesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff at the University Hospital of Salamanca and Molecular Medicine Unit for their technical assistance

## DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article.

## REFERENCES

- Schlötzer-Schrehardt UM, Koca MR, Naumann GO, et al. Pseudoexfoliation syndrome: Ocular manifestation of a systemic disorder? *Arch Ophthalmol*. 1992;110:1752–1756.
- Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome. *Surv Ophthalmol*. 2001;45:265–315.
- de Juan-Marcos L, Cabrillo-Estévez L, Escudero-Domínguez F, et al. Morphometric changes of corneal endothelial cells in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2013;88:439–444.
- Ritch R, Prata TS, de Moraes CG, et al. Association of exfoliation syndrome and central retinal vein occlusion: An ultrastructural analysis. *Acta Ophthalmol*. 2010;88:91–95.
- Kan E, Yilmaz A, Demirağ MD, et al. Is pseudoexfoliation syndrome a risk factor for cerebrovascular disease? *Semin Ophthalmol*. 2015;9:1–4.
- Ritch R. Ocular and systemic manifestations of exfoliation syndrome. *J Glaucoma* 2014;23:S1–8.
- Holló G. Exfoliation syndrome and systemic cardiovascular diseases. *J Glaucoma* 2014;23:9–11.
- Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, et al. Common sequence variants in the *LOXL1* gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 2007;317:1397–1400.
- Wolf C, Gramer E, Müller-Myhsok B. Lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in German patients with normal tension glaucoma, pigmentary glaucoma and exfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 2010;19:136–141.
- de Juan-Marcos L, Escudero-Domínguez FA, Hernández-Galilea E, et al. Association of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma in a Spanish population. *Ophthalmic Genet*. 2014;3:1–6.
- Gartaganis SP, Patsoukis NE, Nikolopoulos DK, et al. Evidence for oxidative stress in lens epithelial cells in pseudoexfoliation syndrome. *Eye (Lond)*. 2007;21:1406–1411.

12. Yilmaz A, Adiguzel U, Tamer L, et al. Serum oxidant/antioxidant balance in exfoliation syndrome. *Clin Exp Ophthalmol*. 2005;33:63–66.
13. Yagci R, Gurel A, Ersoz I, et al. Oxidative stress and protein oxidation in pseudoexfoliation syndrome. *Curr Eye Res*. 2006;31:1029–1032.
14. Zenkel M, Kruse FE, Junemann AG. Deficiency of the extracellular chaperone clusterin in eyes with pseudoexfoliation syndrome may be implicated in the aggregation and deposition of pseudoexfoliative material. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:1982–1990.
15. Zenkel M, Kruse FE, Naumann GO. Impaired cytoprotective mechanisms in eyes with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:5558–5566.
16. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:152–162.
17. Moore MN. Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally induced oxidative stress. *Autophagy* 2008;4:254–256.
18. Klionsky DJ. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:931–937.
19. Baehrecke EH. Autophagy: Dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:505–510.
20. Brain O, Cooney R, Simmons A, et al. Functional consequences of mutations in the autophagy genes in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:778–781.
21. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368:651–662.
22. An CH, Kim MS, Yoo NJ. Mutational and expressional analyses of ATG5, an autophagy-related gene, in gastrointestinal cancers. *Pathol Res Pract*. 2011;207:433–437.
23. Mizushima N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev*. 2007;21:2861–2873.
24. Ritch R, Schlotzer-Schrehardt U, Konstas AG. Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome? *Prog Retin Eye Res*. 2003;22:253–275.
25. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000;14:2123–2133.
26. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274:21491–21494.
27. Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, Küchle M, et al. Role of transforming growth factor-beta1 and its latent form-binding protein in pseudoexfoliation syndrome. *Exp Eye Res*. 2001;73:765–780.
28. Koliakos GG, Konstas AGP, Schlötzer-Schrehardt U, et al. 8-isoprostaglandin F2A and ascorbic acid concentration in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:353–356.
29. Gartaganis SP, Georgakopoulos CD, Patsoukis NE, et al. Glutathione and lipid peroxide changes in pseudoexfoliation syndrome. *Curr Eye Res*. 2005;30:647–651.
30. Koliakos GG, Konstas AGP, Schlötzer-Schrehardt U, et al. Endothelin-1 concentration is increased in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol*. 2004;88:523–527.
31. Bleich S, Roedl J, von Ahlsen N, et al. Elevated homocysteine levels in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2004;138:162–164.
32. Levine B, Klionsky, DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6:463–477.
33. Mizushima N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev*. 2007;21:2861–2873.
34. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*. 2003;5:539–545.
35. Ishida Y, Nagata K. Autophagy eliminates a specific species of misfolded procollagen and plays a protective role in cell survival against ER stress. *Autophagy* 2009;5:1217–1219.
36. Kim SI, Na HJ, Ding Y, et al. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1. *J Biol Chem*. 2012;287:11677–11688.
37. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40:294–309.
38. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 2007;26:1749–1760.
39. Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, et al. Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*. 2009;69:8844–8852.
40. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39:207–211.
41. Murthy A, Li Y, Peng I, et al. A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* 2014;506:456–462.
42. Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, et al. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5. *J Biol Chem*. 2002;277:18619–18625.
43. Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, et al. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell*. 2012; 23:896–909.



RESEARCH REPORT

## Association of Lysyl Oxidase-Like I Gene Polymorphisms in Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma in a Spanish Population

Lourdes de Juan-Marcos<sup>1,2</sup>, Francisco A. Escudero-Domínguez<sup>1</sup>,  
Emiliano Hernández-Galilea<sup>1,2</sup>, Lucía Cabrillo-Estévez<sup>1</sup>, Fernando Cruz-González<sup>1,2</sup>,  
Clara Cieza-Borrella<sup>3</sup>, Mercedes Sánchez-Barba<sup>4</sup>, and Rogelio González-Sarmiento<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, University Hospital of Salamanca, <sup>2</sup>Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), <sup>3</sup>Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, <sup>4</sup>Department of Medicine, University of Salamanca, and <sup>5</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (BMCC), University of Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

### ABSTRACT

**Purpose:** To evaluate the association of the lysyl oxidase-like 1 (LOXL1) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a Spanish population with pseudoexfoliation syndrome (XFS) and pseudoexfoliation glaucoma (XFG).

**Materials and methods:** The present case-control study included 100 Spanish patients (60 patients with XFS and 40 patients with XFG) and 90 control subjects. Genotypes of the three single nucleotide polymorphisms of LOXL1 (rs1048661, rs3825942, and rs2165241) were analyzed with direct sequencing.

**Results:** The G allele and the GG genotype of SNP rs3825942 were detected at a statistically higher frequency in pseudoexfoliation patients than in control subjects ( $p = 3.36 \times 10^{-5}$ , OR = 5.71, 95% CI: 2.30–14.18;  $p = 3.38 \times 10^{-5}$ , OR = 6.91, 95% CI: 2.51–19.03 respectively). The T allele and the TT genotype of SNP rs2165241 presented at significantly higher frequencies in pseudoexfoliation patients than in controls ( $p = 2.50 \times 10^{-4}$ , OR = 2.18, 95% CI: 1.43–3.33;  $p = 1.21 \times 10^{-2}$ , OR = 2.13, 95% CI: 1.75–3.85 respectively). No significant association between XFS/XFG and the rs1048661 was observed. The GGT haplotype composed of all three risk alleles was determined to be significantly associated with pseudoexfoliation. The genotypic and allelic distributions of the three SNPs were similar between XFS and XFG.

**Conclusions:** This is the first study associating two SNPs of LOXL1 (rs3825942 and rs2165241) and XFS/XFG in a Spanish population, confirming findings in patients from Europe. However rs1048661 SNP did not show an association with XFS.

**Keywords:** Genetics, glaucoma, LOXL1, polymorphisms, pseudoexfoliation

### INTRODUCTION

Pseudoexfoliation syndrome (XFS) is a generalized disease of the extracellular matrix characterized by the excessive production and pathological deposition of microfibrillar material throughout the eye, particularly on the anterior lens surface and in the pupillary

border of the iris. This material is composed of a complex glycoprotein–proteoglycan structure bearing epitopes of the basement membrane, epitopes of elastic fiber system, and components of elastic microfibrils.<sup>1</sup> Progressive pathological accumulation of exfoliation material appears to cause obstruction of the trabecular meshwork and subsequent elevation in

---

Received 20 December 2013; revised 2 March 2014; accepted 11 April 2014; published online 3 June 2014

Correspondence: Lourdes de Juan Marcos, Department of Ophthalmology, University Hospital of Salamanca, Paseo de San Vicente, 58-182, 37007 Salamanca, Spain. E-mail: mloujm@gmail.com

Rogelio González Sarmiento, Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. E-mail: gonzalez@usal.es

intraocular pressure. XFS is the most common identifiable cause of secondary open-angle glaucoma.<sup>2</sup> About 25% of the patients with pseudoexfoliation have elevated intraocular pressure (IOP), and one-third of them have glaucoma.<sup>3</sup>

The specific cause of the production of pseudoexfoliation material and its precise composition are still unknown, but according to studies worldwide, genetic factors may play an important role in the pathogenesis of XFS.<sup>4-6</sup> A simple inheritance model is not evident, suggesting that this disease is the result of a complex pattern with multiple contributing genetic and/or environmental factors.

In 2007 a genome-wide association study in the Scandinavian population identified three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *lysyl oxidase-like 1* (*LOXL1*) gene on chromosome 15q24.1 that were strongly associated with XFS phenotype.<sup>7</sup> The SNPs comprised two non-synonymous coding SNPs, rs1048661 (R141L) and rs3825942 (G153D), located in exon 1 of *LOXL1* and one intronic SNP, rs2165241 located in intron 1. *LOXL1* is a member of the lysyl oxidase family of enzymes that catalyze the cross-linking of collagen and elastin through oxidative deamination of lysine side chains. The product of *LOXL1* is a protein responsible for the synthesis, maintenance and remodelling of elastin fibers, the major constituent of intraocular pseudoexfoliation material.<sup>8</sup> In fact, *LOXL1* was identified as a component of this material on the lens capsule surface, and is localized around fibrous protein aggregates.<sup>9</sup> It is conceivable that sequence variation in *LOXL1* may be implicated in the synthesis and accumulation of the aberrant fibrillar aggregates in the ocular tissues, but the precise functional significance of *LOXL1* gene polymorphisms in XFS is still unclear.

The association between XFS and the *LOXL1* SNPs has been studied in Caucasian populations in North America,<sup>10,11</sup> Europe<sup>12-15</sup>, Australia,<sup>16</sup> and in other ethnic groups, including Indian,<sup>17</sup> Japanese,<sup>18</sup> Chinese,<sup>19</sup> Korean<sup>20</sup> and black South Africans.<sup>21</sup> These studies confirmed genetic susceptibility of *LOXL1* polymorphisms to pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and verified the *LOXL1* gene as a main genetic risk factor for this condition worldwide accounting for almost all pseudoexfoliation cases. The potential role of these SNPs has not yet been determined in Spanish individuals. Therefore, the purpose of this study was to analyze the association of the *LOXL1* polymorphisms with XFS in a Spanish population.

## MATERIALS AND METHODS

One hundred cases of XFS with or without glaucoma and 90 healthy controls of Spanish origin were

recruited from the Department of Ophthalmology of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain). All subjects underwent detailed ophthalmic examination, including slit-lamp biomicroscopy, tonometry, gonioscopy, dilated pupil examination of the lens and funduscopy.

The diagnostic criterion for XFS without glaucoma was the existence of pseudoexfoliation material on the anterior lens capsule or on the pupil margin in either eye, with intraocular pressure (IOP) less than 21 mmHg and no clinical evidence of glaucomatous optic neuropathy. Pseudoexfoliation glaucoma (XFG) was defined if the patient had typical characteristics of XFS and glaucomatous optic neuropathy (defined as a cup to disc ratio >0.7, notching of the neuroretinal rim, or an asymmetric cup to disc ratio >0.2) with compatible glaucomatous visual field loss and documented IOP  $\geq$ 22 mmHg. The control group comprised patients without any evidence of exfoliation deposits in intraocular tissues, IOP in the normal range (<21 mmHg) and normal appearing optic nerve. Due to the age-dependence of the XFS, only controls older than age 65 were enrolled.

The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Hospital.

Blood samples were collected from the cases and controls after obtaining an informed consent form. DNA was isolated from peripheral blood following proteinase K and phenol-chloroform standard protocols.

The analysis of rs3825942 and rs2165241 *LOXL1* polymorphisms was carried out by allelic discrimination by real time PCR using the TaqMan probes C\_27506631\_10 and C\_43559411\_10 respectively (Applied Biosystems) and the mixture TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix No AmpErase<sup>®</sup> UNG (Applied Biosystems) containing the DNA polymerase. The amplification program for both polymorphisms had an annealing temperature of 60°C for 1 minute and the number of cycles was 40.

We studied *LOXL1* rs1048661 polymorphism by RFLP-PCR using primer forward: 5'-AAGGCC AGCATGGACAAAGCTAGA-3' and primer reverse: 5'-ACGACCAGGGTTTCGTGTACTAC-3'. The program used for the amplification consisted of 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing of primers at 60°C for 2 minutes and primer extension at 72°C for 2 minutes. The PCR product was digested with the restriction enzyme SmaI (Fermentas, Burlington, Canada) for 16 hours at 30°C. As a result, we obtained three different patterns for the three possible genotypes: for G/G genotype, fragments of 226 bp, 194 bp, 201 bp and 130; for G/T genotype, fragments of 395 bp, 226 bp, 194 bp, 201 bp and 130 bp; and for T/T genotype, fragments of 395 bp, 226 bp and 130 bp.

SPSS software (v 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL) was used to perform the statistical analysis. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated using the  $\chi^2$  test in SAS/Genetics v9.1. Haplotype association analysis was assessed with Haploview v4.0 (Daly Lab, Broad Institute, Cambridge, MA). The comparison of allelic and genotype frequencies between cases and controls were assessed using the  $\chi^2$  test. Odds ratio and 95% confidence intervals (OR; 95% CI) were also calculated. A *p* value <0.05 was considered as statistically significant.

**RESULTS**

A total of 100 cases (60 XFS and 40 XFG) and 90 control individuals were recruited into this study. The demographic characteristics of the population studied are summarized in Table 1.

The allelic and genotypic distributions of the candidate SNPs are shown in Table 2. The genotype frequencies of the three LOXL1 SNPs in controls were in HWE. SNP rs2165241 and rs1048661 followed the HWE in cases. However, the genotypic distributions of the SNPs rs3825942 deviated from the HWE in patients (*p* = 0.002).

There were significant differences in the allelic and genotypic distributions between cases and control subjects for rs3825942 and rs2165241.

The G allele of SNP rs3825942 was detected at a statistically higher frequency in pseudoexfoliation patients than in control subjects (*p* =  $3.36 \times 10^{-5}$ , OR = 5.71, 95% CI: 2.30–14.18). The GG genotype was significantly more frequent in the patient group than in the control group (*p* =  $3.38 \times 10^{-5}$ , OR = 6.91, 95% CI: 2.51–19.03).

The T allele and the TT genotype of SNP rs2165241 presented at significantly higher frequencies in pseudoexfoliation patients than in controls (*p* =  $2.50 \times 10^{-4}$ , OR = 2.18, 95% CI: 1.43–3.33; *p* =  $1.21 \times 10^{-2}$ , OR = 2.13, 95% CI: 1.75–3.85 respectively).

In this population, there was no statistically significant difference in the allele and genotype

frequencies between patients and controls for SNP rs1048661 (*p* = 0.19 and *p* = 0.51 respectively).

None of the three SNPs showed a significant difference between the XFS and XFG groups in allelic or genotypic frequencies (Table 3).

Pairwise linkage disequilibrium (LD) analysis showed that SNPs rs1048661 and rs2165241 were in strong LD (*D'* = 0.96), SNPs rs3825942 and rs2165241 were also in LD (*D'* = 0.94), but rs3825942 and rs1048661 were not in LD.

The most common haplotype (GGT) defined by three SNPs (rs1048661-rs3825942-rs2165241) had a significantly higher frequency in patients than in controls, whereas the GAC haplotype was significantly associated with XFS as a protective haplotype in the Spanish population. The estimated haplotype frequencies are summarized in Table 4.

**DISCUSSION**

LOXL1 has been identified as a major contributor and principal genetic risk factor for XFS throughout the

TABLE 2. Allele and genotype association analysis for the three SNPs of LOXL1.

SNP	XFS/XFG (n=100)	Controls (n=90)	$\chi^2$	<i>p</i> Value	OR (95%CI)
<i>rs1048661</i>					
Allele					
G	155 (0.77)	129 (0.72)	1.7	0.19	1.36 (0.85–2.16)
T	45 (0.23)	51 (0.28)			
Genotype					
GG	57 (0.57)	47 (0.52)	0.44*	0.51*	1.21 (0.68–2.15)*
GT	41 (0.41)	35 (0.39)			
TT	2 (0.02)	8 (0.09)			
<i>rs3825942</i>					
Allele					
G	194 (0.97)	153 (0.85)	17.20	$3.36 \times 10^{-5}$	5.71 (2.30–14.18)
A	6 (0.03)	27 (0.15)			
Genotype					
GG	95 (0.95)	66 (0.73)	17.19*	$3.38 \times 10^{-5}$ *	6.91 (2.51–19.03)*
GA	4 (0.04)	21 (0.24)			
AA	1 (0.01)	3 (0.03)			
<i>rs2165241</i>					
Allele					
C	59 (0.29)	86 (0.48)	13.41	$2.50 \times 10^{-4}$	2.18 (1.43–3.33)
T	141 (0.71)	94 (0.52)			
Genotype					
CC	8 (0.08)	24 (0.26)	6.29*	$1.21 \times 10^{-2}$ *	2.21 (1.75–3.85)*
CT	43 (0.43)	38 (0.43)			
TT	49 (0.49)	28 (0.31)			

SNP, single nucleotide polymorphisms; XFS, Exfoliation syndrome; XFG, Exfoliation glaucoma; OR, odds ratio; CI, confidence interval. The asterisks (\*) indicate the OR values and *p* values derived from comparison of the specific genotype with all of the others, i.e. GG versus GT+TT at rs1048661, GG versus GA + AA at rs3825942, TT versus CT + CC at rs2165241.

TABLE 1. Demographic characteristics of the study patients.

	Cases	Controls	<i>p</i> Value
Number of subjects	Total	100	90
	XFS	60	
	XFG	40	
Age (years)	mean ± SD	74.6 ± 7.5	76.5 ± 8.2
	range	55–88	66–90
Sex, <i>n</i> (%)	Male	47 (47%)	52 (57.7%)
	Female	53 (53%)	38 (42.2%)

XFS, Exfoliation syndrome; XFG, Exfoliation glaucoma; SD, Standard deviation.

population examined. The present study has also demonstrated a strong association between *LOXL1* SNPs and pseudoexfoliation in a Spanish population. This is in agreement with previous genetic studies, although the allelic and genotypic distributions of the three SNPs were found to be different among patients with diverse ethnic origins. The reasons for these differences are still poorly understood, and other genetic factors, molecular mechanisms or

TABLE 3. Allele and genotype association analysis between the *LOXL1* SNPs and XFS/XFG.

SNP	XFS (n = 60)	XFG (n = 40)	$\chi^2$	p Value	OR (95%CI)
<i>rs1048661</i>					
Allele					
G	91 (0.76)	64 (0.80)	0.48	0.49	0.78 (0.39–1.56)
T	29 (0.24)	16 (0.20)			
Genotype					
GG	33 (0.55)	24 (0.60)	0.24*	0.62*	0.81 (0.36–1.83)*
GT	25 (0.42)	16 (0.40)			
TT	2 (0.02)	0 (0.00)			
<i>rs3825942</i>					
Allele					
G	117 (0.97)	75 (0.96)	0.29	0.59	1.56 (0.31–7.93)
A	3 (0.03)	3 (0.4)			
Genotype					
GG	58 (0.97)	37 (0.93)	0.87*	0.35*	2.35 (0.37–14.74)*
GA	1 (0.01)	3 (0.07)			
AA	1 (0.01)	0 (0.00)			
<i>rs2165241</i>					
Allele					
C	79 (0.66)	62 (0.77)	3.14	0.07	0.56 (0.29–1.07)
T	41 (0.34)	18 (0.23)			
Genotype					
CC	25 (0.08)	24 (0.60)	3.22*	0.07*	0.48 (0.21–1.07)*
CT	29 (0.43)	14 (0.35)			
TT	6 (0.49)	2 (0.05)			

SNP, single nucleotide polymorphisms; XFS, Exfoliation syndrome; XFG, Exfoliation glaucoma; OR, odds ratio; CI, confidence interval. The asterisks (\*) indicate the OR values and p values derived from comparison of the specific genotype with all of the others, i.e. GG versus GT+TT at rs1048661, GG versus GA + AA at rs3825942, TT versus CT + CC at rs2165241.

environmental conditions might be involved in the development of this disorder.

The risk for disease in the Spanish population is associated strongly with the G allele and GG genotype of rs3825942 and the T allele and TT genotype of rs2165241 as in previous reports of Caucasian patients.<sup>10–16</sup> However, studies from East Asian populations, including Japanese, Chinese and Korean populations, found that the allelic and genotypic distributions of rs2165241 were different from that in the Caucasian population.<sup>18–20</sup> These studies reported that the C allele and CC genotype of rs2165241 were associated with XFS. Nevertheless, the allelic and genotypic distribution of rs3825942 had a similar pattern in all populations, including Caucasians and Asians. Conversely, studies in a black South African population revealed that the A allele and AA genotype of rs3825942 conferred the greatest risk for XFS in this population.<sup>21</sup>

No association was observed for rs1048661 with the disorder in Spanish patients. However, the G allele and GG genotype of this SNP were associated with XFS or XFG in various European and North American populations.<sup>10,13,14</sup> On the other hand, the opposite T allele and TT genotype were associated with this disorder in the Japanese and Chinese populations.<sup>18,19</sup>

Therefore, the functional significance of the disease-associated SNPs is not well understood, because some populations have shown an inverse relationship between reported risk alleles. In a meta-analysis of the association of the three SNPs with XFS,<sup>22</sup> rs3825942 was the most common disease-associated polymorphism across different geographical populations. Consequently, it may play a role in the pathogenesis of XFS, but the biological effect of the rs3825942 missense change has not been determined. The risk alleles of rs3825942 have no effect on *LOXL1* expression levels, although protein prediction programs, such as “Polyphen” or “SIFT,” suggest that they could have a functional impact. Sequence modifications in the *LOXL1* propeptide caused by this SNP may lead to abnormal cross-linking, insolubilization and aggregation of

TABLE 4. Haplotype analysis for the three SNPs of *LOXL1* in patients with XFS/XFG and control subjects.

rs1048661	Haplotype rs3825942	rs2165241	Proportion		p Value	OR (95%CI)
			XFS/XFG	Control		
G	G	T	40.4	28.5	0.008	1.70 (1.15–2.51)
G	G	C	21.1	22.4	0.733	0.92 (0.59–1.44)
T	G	C	18	18.9	0.809	0.94 (0.59–1.51)
T	G	T	16.2	10.5	0.076	1.64 (0.950–2.85)
G	A	C	2.6	10.1	0.002	0.24 (0.09–0.63)
G	A	T	1.3	4.4	0.063	0.29 (0.08–1.07)
T	A	C	0.4	4.8	0.02	0.09 (0.011–0.68)
T	A	T	–	0.4	–	–

XFS, Exfoliation syndrome; XFG, Exfoliation glaucoma; OR, odds ratio; CI, confidence interval



elastic matrix proteins into mature PEX fibrils.<sup>23</sup> In addition, *LOXL1* SNPs do not appear to be associated with other types of glaucoma. Previous studies have not shown any strong genetic association between the *LOXL1* gene polymorphisms and primary open-angle glaucoma,<sup>24</sup> primary angle-closure glaucoma<sup>25</sup> and pigmentary glaucoma.<sup>26</sup> Therefore, it is likely that these SNPs are exclusively associated with the presence of pseudoexfoliation material in these patients.

The GGT haplotype was strongly associated with XFS/XFG, conferring a 1.7-fold increase in the risk of the disease and this result is in agreement with previous studies in other Caucasian populations.<sup>11,14,27,28</sup> Nevertheless, the TGC was the major risk haplotype for pseudoexfoliation in East Asian populations.<sup>18–20</sup> In our study, the GAC haplotype revealed a protective effect.

The mechanism by which pseudoexfoliation syndrome results in pseudoexfoliation glaucoma is not clear. We studied the allelic and genotypic frequencies of the three *LOXL1* SNPs in XFS and XFG patients, but we found no significant difference. This is in agreement with earlier studies.<sup>14,18,27,28</sup> Therefore, *LOXL1* is more likely a contributing factor to develop the disease, rather than a factor for progression. It is not known if other genes may increase susceptibility for conversion from pseudoexfoliation syndrome to glaucoma.

To the best of our knowledge, this is the first study showing an association of *LOXL1* SNPs and XFS/XFG in a Spanish population. However, these DNA sequence variants are also found in a significant percentage of control subjects, therefore, other genetic variants, stress conditions or external factors, either independently or in direct interaction with *LOXL1*, may predispose an individual carrying *LOXL1* risk alleles to develop XFS and XFG. For that reason, the association between pseudoexfoliation and the *LOXL1* SNPs are not strong enough to validate a screening test for this disorder. The study of yet unknown genetic and non-genetic factors contributing to this complex disease is required to establish what role these SNPs play in the development of pseudoexfoliation syndrome. Other proteins that participate in the maintenance of elastic fibers and composition of the extracellular matrix are candidates for additional genetic investigations. Identification of genetic component of pseudoexfoliation syndrome could aid the development of new therapeutic strategies for the disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the staff at the University Hospital of Salamanca and Molecular Medicine Unit for their technical assistance.

## DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## FUNDING

The study was supported by FIS project PI10/00219 to RG-S and FIS project PI12/00939 to EH-G.

## REFERENCES

- Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome. *Surv Ophthalmol* 2001;45:265–315.
- Ritch R, Schlotzer-Schrehardt UM, Konstas AG. Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome? *Prog Retin Eye Res* 2003;22:253–275.
- Grodum K, Heijl A, Bengtsson B. Risk of glaucoma in ocular hypertension with and without pseudoexfoliation. *Ophthalmology* 2005;112:386–390.
- Allingham RR, Loftsdottir M, Gottfredsdottir MS, et al. Pseudoexfoliation syndrome in Icelandic families. *Br J Ophthalmol* 2001;85:702–707.
- Orr AC, Robitaille JM, Price PA, et al. Exfoliation syndrome: clinical and genetic features. *Ophthalmic Genet* 2001;22:171–185.
- Damji KF, Bains HS, Stefansson E, et al. Is pseudoexfoliation syndrome inherited? A review of genetic and nongenetic factors and a new observation. *Ophthalmic Genet* 1998;19:175–185.
- Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, et al. Common sequence variants in the *LOXL1* gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 2007;317:1397–1400.
- Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2304–2316.
- Creasey R, Sharma S, Gibson CT, et al. Atomic force microscopy-based antibody recognition imaging of proteins in the pathological deposits in pseudoexfoliation syndrome. *Ultramicroscopy* 2011;111:1055–1061.
- Challa P, Schmidt S, Liu Y, et al. Analysis of *LOXL1* polymorphisms in a United States population with pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:146–149.
- Fan BJ, Pasquale LR, Rhee D, et al. *LOXL1* promoter haplotypes are associated with exfoliation syndrome in a U.S. Caucasian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:2372–2378.
- Pasutto F, Krumbiegel M, Mardin CY, et al. Association of *LOXL1* common sequence variants in German and Italian patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1459–1463.
- Mossböck G, Renner W, Faschinger C, et al. Lysyl oxidase-like 1 (*LOXL1*) gene polymorphisms and exfoliation glaucoma in a Central European population. *Mol Vis* 2008;14:857–861.
- Lemmelä S, Forsman E, Onkamo P, et al. Association of *LOXL1* gene with Finnish exfoliation syndrome patients. *J Hum Genet* 2009;54:289–297.
- Kasım B, İrkeç M, Alikashiçoğlu M, et al. Association of *LOXL1* gene polymorphisms with exfoliation syndrome/glaucoma and primary open angle glaucoma in a Turkish population. *Mol Vis* 2013;19:114–120.

16. Hewitt AW, Sharma S, Burdon KP, et al. Ancestral LOXL1 variants are associated with pseudoexfoliation in Caucasian Australians but with markedly lower penetrance than in Nordic people. *Hum Mol Genet* 2008;17:710–716.
17. Ramprasad VL, George R, Soumitra N, et al. Association of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the LOXL1 gene with pseudoexfoliation syndrome in India. *Mol Vis* 2008;14:318–322.
18. Tanito M, Minami M, Akahori M, et al. LOXL1 variants in elderly Japanese patients with exfoliation syndrome/glaucoma, primary open-angle glaucoma, normal tension glaucoma, and cataract. *Mol Vis* 2008;14:1898–1905.
19. Chen L, Jia L, Wang N, et al. Evaluation of LOXL1 polymorphisms in exfoliation syndrome in a Chinese population. *Mol Vis* 2009; 15:2349–2357.
20. Park do Y, Won HH, Cho HK, et al. Evaluation of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in pseudoexfoliation syndrome in a Korean population. *Mol Vis* 2013;19:448–453.
21. Rautenbach RM, Barden S, Harvey J, Ziskind A. An investigation into LOXL1 variants in black South African individuals with exfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 2011;129:206–210.
22. Chen H, Chen LJ, Zhang M, et al. Ethnicity-based subgroup meta-analysis of the association of LOXL1 polymorphisms with glaucoma. *Mol Vis* 2010;16:167–177.
23. Schlötzer-Schrehardt U, Pasutto F, Sommer P, et al. Genotype-correlated expression of lysyl oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and normal patients. *Am J Pathol* 2008; 173:1724–1735.
24. Liu Y, Schmidt S, Qin X, et al. Lack of association between LOXL1 variants and primary open-angle glaucoma in three different populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3465–3468.
25. Chakrabarti S, Rao KN, Kaur I, et al. The LOXL1 gene variations are not associated with primary open-angle and primary angle-closure glaucomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2343–2347.
26. Rao KN, Ritch R, Dorairaj SK, et al. Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma-associated LOXL1 variations are not involved in pigment dispersion syndrome and pigmentary glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:1254–1262.
27. Jaimes M, Rivera-Parra D, Miranda-Duarte A, et al. Prevalence of high-risk alleles in the LOXL1 gene and its association with pseudoexfoliation syndrome and exfoliation glaucoma in a Latin American population. *Ophthalmic Genet* 2012;33:12–17.
28. Aragon-Martin JA, Ritch R, Liebmann J, et al. Evaluation of LOXL1 gene polymorphisms in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:533–541.