



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Tesi di dottorato in Salute dell'uomo – XXXI Ciclo

**Effetti dell'acquisizione del fenotipo senescente sulle cellule
staminali dell'epitelio pigmentato retinico**

Relatore: Prof. Cesare Mariotti

Dottorando: Dott. Michele Nicolai

Indice

INTRODUZIONE

Epidemiologia e fattori di rischio.....	pag. 3
Senescenza e AMD.....	pag. 18
Patogenesi di AMD.....	pag. 28
Classificazione di AMD.....	pag. 36

RICERCA PERSONALE

Scopo dello studio.....	pag. 40
Materiali e metodi.....	pag. 41
Risultati.....	pag. 44
Discussione.....	pag.48

Epidemiologia e fattori di rischio

La degenerazione maculare legata all'età (Age-related Macular Degeneration, AMD) rappresenta la principale causa di grave perdita dell'acuità visiva e di cecità legale nella popolazione occidentale di età superiore ai 65 anni. Costituisce una patologia cronica a carattere degenerativo, progressivo e bilaterale, che interessa la macula, ovvero la regione centrale della retina deputata alla visione distinta. In Italia si calcola che ne sia affetto circa un milione di persone, delle quali 200.000-300.000 sono affette da una forma avanzata (neovascolare o atrofica). L'AMD rappresenta una malattia di grande rilevanza socio-sanitaria e in progressivo aumento, la cui causa principale è l'invecchiamento. Il rapporto dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) del 2015 sulla situazione dell'anzianità mondiale ha stimato un drammatico ed esponenziale invecchiamento globale della popolazione: oggi il 12% (900 milioni) della popolazione planetaria ha più di 60 anni e si prevede che salirà al 21% (2,4 miliardi) nel 2050 [1]. In linea con queste previsioni, una recente meta-analisi ha stimato che nel mondo ci saranno 196 milioni di persone affette da AMD nel 2020, che raggiungeranno i 288 milioni nel 2040, con un incremento esponenziale soprattutto nella popolazione asiatica [2].

PREVALENZA DI AMD

Per quanto riguarda la prevalenza di tutte le forme di AMD, la maggior parte degli studi dimostra come questa aumenti in modo significativo con l'avanzare dell'età. Si stima che la prevalenza dell'AMD possa variare dall'1,2% al 30% della popolazione al di sopra dei 55 anni d'età [3-5]. L'ampio range di queste stime è dovuto principalmente all'eterogeneità nelle definizioni di AMD e nei sistemi di classificazione finora utilizzati e riportati in letteratura, e alle differenze di età, di distribuzione geografica e di fattori genetici nelle popolazioni sotto studio. Un'analisi congiunta dei dati provenienti dai tre maggiori studi epidemiologici sull'AMD (Beaver Dam Eye Study, Blue Mountains Eye Study, Rotterdam Study), condotti in diversi continenti su un'ampia popolazione, mostra che la prevalenza di questa patologia aumenta esponenzialmente con l'età: è rara prima dei 65 anni (0,2% della popolazione) ed arriva ad

interessare il 13% di coloro che hanno almeno 85 anni d'età [6]. Negli USA colpisce più di 8 milioni di individui e la forma avanzata di AMD interessa più di 1,75 milioni di persone: di questi ultimi il 90% dei pazienti è affetto da una forma neovascolare dovuta allo sviluppo di neovasi di origine coroideale [7]. In Europa ogni anno vengono diagnosticati oltre 500.000 nuovi casi e circa 2,5 milioni di pazienti oltre i 65 anni d'età vive con forme avanzate di AMD: di questi oltre 1 milione ha una grave compromissione visiva secondaria ad AMD bilaterale [8, 9].

Esistono delle diversità nella prevalenza delle forme di AMD iniziali e avanzate in base alle etnie [10]. Tutte le etnie considerate (caucasici, ispanici, asiatici, africani, inuit)

mostrano una forte associazione età-dipendente nello sviluppo di AMD: si ha un incremento esponenziale nei caucasici, un forte aumento negli asiatici, un moderato aumento negli ispanici ed un lieve aumento negli africani. In particolare, nei soggetti al di sotto dei 75 anni d'età gli ispanici hanno una prevalenza superiore di forme precoci di AMD rispetto alle altre etnie. Invece, nei soggetti al di sopra dei 75 anni d'età, la prevalenza sia di forme precoci sia di forme avanzate di AMD è superiore nei caucasici. Gli africani hanno la più bassa prevalenza sia di forme precoci che avanzate di AMD rispetto alle altre etnie (Figura 1). Infine, gli asiatici hanno la più alta prevalenza mondiale di vasculopatia coroideale polipoide (circa il 22,3-24,5% delle forme neovascolari di AMD) [11-13]. Le forme neovascolari pure di AMD sembrano avere una prevalenza superiore rispetto alle forme atrofiche pure (vedi Figura 2) [6].

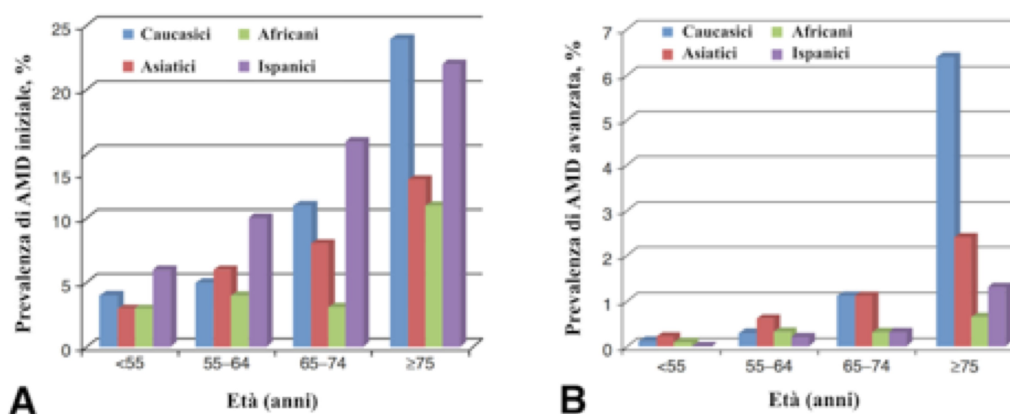


Figura 1 Prevalenza delle forme iniziali e avanzate di AMD nelle diverse razze e gruppi etnici.

A) La prevalenza di AMD iniziale è maggiore negli ispanici per i soggetti al di sotto dei 75 anni d'età e nei caucasici per i soggetti al di sopra dei 75 anni d'età. B) La prevalenza di AMD

avanzata aumenta in maniera esponenziale nei caucasici e a seguire negli asiatici.

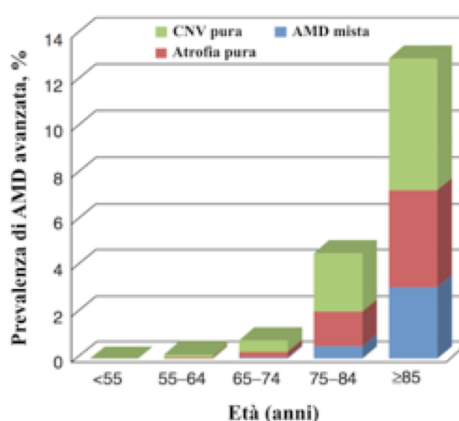


Figura 2 Prevalenza delle diverse forme avanzate di AMD nei tre continenti: USA, Europa e Australia.

Le forme neovascolari (CNV) compaiono più precocemente rispetto alle forme esclusivamente atrofiche. Le forme miste compaiono in età più avanzata. Per quanto riguarda l'Italia, finora sono stati condotti pochi studi sulla situazione epidemiologica dell'AMD. Tra questi, lo studio più recente e rilevante è sicuramente il PAMDI (Prevalence of Age-related Macular Degeneration in Italy) [14]. Questo studio, condotto tra la popolazione residente nel Nord-Est Italia al fine di indagare la prevalenza nella popolazione italiana ed analizzarne le differenze fra le comunità urbane e rurali, ha selezionato 1.162 soggetti della popolazione di Padova, divisi a loro volta in due gruppi (rurale ed urbano). È stato stimato che globalmente l'AMD interessa il 62,7% dei soggetti: il 48,3% presentava drusen intermedie, il 10,4% drusen di grandi dimensioni, e il 4,1% forme avanzate di AMD. In linea con gli altri studi epidemiologici citati, l'età si è confermata fattore di rischio importante per l'insorgenza e la progressione dell'AMD ed è stato osservato che la popolazione rurale ha un maggiore rischio di sviluppare drusen di grandi dimensioni rispetto alla popolazione urbana.

INCIDENZA DI AMD

I numerosi studi epidemiologici sono concordi nell'affermare che con l'avanzare dell'età

aumenta l'incidenza delle varie forme di AMD. Il rischio a 10 anni di sviluppare AMD è pari all'11,1% nell'Hisayama Study, 12,1% nel Beaver Dam Eye Study (1992, USA), 13,9% nel Barbados Eye Study, 14,1% nel Blue Mountains Eye Study (1995, Australia), 16,7% nel Rotterdam Study (1995, Europa) e 23,7% nel Copenhagen City Eye Study (1986, Europa). Le differenti incidenze in questi studi risentono in gran parte dell'eterogeneità nel disegno degli studi, nella durata del follow-up e nella presenza o meno dei fattori di rischio. Non ci sono differenze di incidenza fra maschi e femmine. Analizzando i diversi sottotipi di AMD avanzata, l'incidenza di neovascolarizzazione coroideale pura e di atrofia geografica pura salgono vertiginosamente dopo i 75 anni d'età in maniera simile, mentre le forme miste aumentano dopo gli 80 anni d'età (vedi Figura 3).

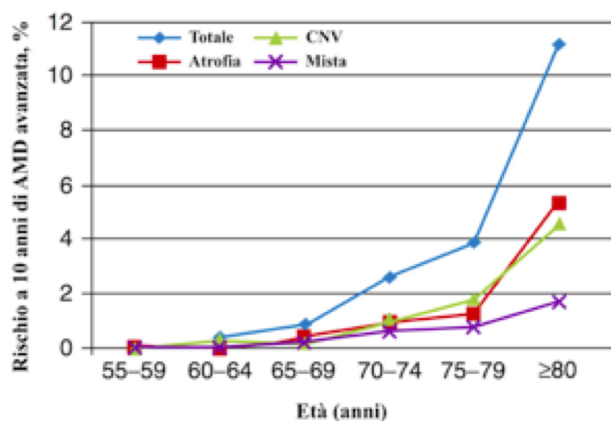


Figura 3 Rischio a 10 anni di sviluppare i diversi sottotipi di AMD avanzata con l'invecchiamento.

STORIA NATURALE DI AMD

Esistono diversi studi clinici che analizzano il decorso naturale delle alterazioni precoci e tardive in AMD. 15-20 Tutti concordano nell'affermare che le drusen di grandi dimensioni (soft) e le anomalie pigmentarie sono le alterazioni del fondo oculare che più significativamente aumentano il rischio di sviluppare forme tardive di AMD: si stima un rischio tra l'1,3% e il 6,0%

per anno. In contrasto, i soggetti che presentano solamente drusen di piccole dimensioni (drupeletes o hard drusen) hanno un rischio nullo di sviluppare AMD a 5 anni.³ Un'area di grandi dimensioni che presenti qualsiasi sottotipo di drusen associato ad anomalie pigmentarie comporta il più grosso rischio di sviluppare forme avanzate di AMD. I depositi drusenoidi sottoretinici (definiti anche pseudodrusen reticolari) rappresentano un importante fattore di rischio indipendente di progressione verso forme avanzate di AMD.

Essendo l'AMD una patologia bilaterale, qual'è il rischio per il secondo occhio dopo che l'occhio controlaterale ha sviluppato una forma avanzata di AMD? Il rischio a 5 anni di sviluppare forme avanzate di AMD anche nel secondo occhio è pari al 30-40%.³⁻⁵ I fattori di rischio sono i medesimi: vaste aree occupate da drusen, confluenza di drusen, anomalie pigmentarie e/o depositi drusenoidi sottoretinici. Secondo il Beaver Dam Study, i pazienti con atrofia geografica nel primo occhio hanno un rischio maggiore di sviluppare forme avanzate di AMD nel secondo occhio rispetto ai pazienti che presentano forme precoci bilateralmente.³ Il sottotipo di AMD del secondo occhio solitamente corrisponde a quello dell'occhio adelfo, nonostante si possa sviluppare un sottotipo diverso. Inoltre, lo sviluppo di atrofia geografica in occhi con iniziale neovascolarizzazione è piuttosto frequente, e viceversa.²¹⁻²³ Questo evidenzia come i fattori di rischio e i processi patogenetici per questi diversi fenotipi possono sovrapporsi considerevolmente fra loro.

FATTORI DI RISCHIO DI AMD

La patogenesi di AMD è di accertata natura multi-fattoriale. Alla base vi sarebbe una complessa interazione tra fattori metabolici, funzionali, genetici e ambientali, che può essere ritenuta responsabile di quei cambiamenti cronici che coinvolgono le strutture della regione maculare e che contribuiscono all'insorgenza ed alla progressione della malattia.

I principali fattori di rischio dell'AMD possono essere classificati come:

- fattori demografici;
- fattori comportamentali;
- fattori correlati a patologie sistemiche;
- fattori genetici.

◎ FATTORI DI RISCHIO DEMOGRAFICI (non modificabili)

▶ Età

Come abbiamo già evidenziato negli studi epidemiologici sinora citati, l'età avanzata rappresenta il principale fattore correlato all'insorgenza della patologia: il rischio di insorgenza di AMD incrementa con l'avanzare dell'età.

▶ Etnia

I vari studi epidemiologici mostrano che la prevalenza dell'AMD varia considerevolmente tra gruppi etnici differenti, come già riportato nel precedente paragrafo. Il Baltimore Eye Survey (1991, USA) ha dimostrato che nonostante le drusen siano comuni sia nei neri che nei bianchi sopra i 40 anni, le forme più avanzate di AMD hanno una maggiore prevalenza nei bianchi di età superiore ai 70 anni. La razza bianca ha una prevalenza di cecità bilaterale del 30% rispetto allo 0% dei neri.

Nel Salisbury Eye Evaluation Study (2000, USA) le drusen di piccole dimensioni sono state identificate nel 56% dei soggetti di età superiore ai 65 anni di entrambi i gruppi (1.854 di etnia bianca e 666 etnia nera), mentre le drusen di maggiori dimensioni sono risultate più comuni nei soggetti bianchi (16% vs 11% dei neri) così come lo sono state le drusen confluenti e le aree di iperpigmentazione. L'AMD neovascolare era presente nell'1,7% dei bianchi rispetto all'1,1% dei partecipanti di etnia nera, mentre l'atrofia geografica era più comune nei bianchi rispetto ai neri (1,8% vs 0,3%).

In conclusione, dalla maggior parte degli studi epidemiologici sinora condotti risulta che le forme neovascolari hanno maggiore incidenza e prevalenza nell'etnia bianca rispetto a quella nera. È stato ipotizzato che le differenze etniche nella prevalenza dell'AMD avanzata siano dovute ad un possibile effetto protettivo della pigmentazione iridea nei soggetti di razza nera. La melanina agendo da "scavenger" di radicali liberi potrebbe proteggere l'epitelio pigmentato retinico, la membrana di Bruch e la coroide dai cambiamenti degenerativi che predispongono il paziente alla neovascolarizzazione coroideale.

▶ Sesso

In alcuni studi epidemiologici è emersa una prevalenza della patologia lievemente maggiore nelle donne (1,9%) rispetto agli uomini (1,3%), peraltro interamente attribuibile all'età superiore raggiunta dal sesso femminile. Infatti, confrontando le due categorie per medesima classe di età non emergono differenze in termini di percentuali di uomini e donne affette dalla malattia. Inoltre, da una recente meta-analisi risulta che non vi è un'associazione significativa tra il sesso femminile e l'insorgenza di AMD avanzata. Tuttavia, è stato ipotizzato un effetto protettivo degli estrogeni nelle donne in età post-menopausale sul rischio di sviluppare AMD neovascolare, anche se questo non è stato ancora dimostrato con certezza. Infine, sembrerebbe esistere una significativa riduzione del rischio di insorgenza di AMD precoce in rapporto al maggior numero di anni intercorsi tra menarca e menopausa.

◎ FATTORI DI RISCHIO COMPORTAMENTALI (modificabili)

▶ Fumo

Il fumo di tabacco è il principale fattore di rischio per l'AMD prevenibile.²⁴ Il fumo è considerato un fattore rilevante nella patogenesi dell'AMD a causa dei suoi effetti ossidativi dannosi per la retina, la riduzione del flusso sanguigno coroideale, la promozione di ischemia, di ipossia e di micro-infarti retinici, e lo stimolo alla neovascolarizzazione coroideale (effetto diretto della nicotina nel modello murino), nonché a causa della riduzione dei carotenoidi protettivi per la retina. Il fumo ed il numero di pacchetti di sigarette fumate ogni anno si associano significativamente ad un aumentato rischio di AMD. I fumatori attuali hanno un rischio maggiore di AMD (con incidenza triplicata) rispetto agli ex-fumatori. La cessazione del fumo riduce l'incidenza di AMD in modo non lineare anche nell'anziano (Muenster Aging and Retina Study): coloro che hanno smesso di fumare da più di 20 anni hanno un rischio di sviluppare AMD sovrapponibile ai non fumatori. Infine, anche l'esposizione al fumo passivo si associa ad un incrementato rischio di AMD rispetto ai non fumatori.

▶ Consumo di alcolici

L'elevato consumo di alcol (più di tre bicchieri al giorno) si associa ad un rischio aumentato di AMD rispetto al basso consumo. Tutti gli studi sono piuttosto uniformi nell'affermare che i forti bevitori abituali di superalcolici che consumino cinque o più bicchieri di alcol al giorno hanno

un rischio elevato di AMD rispetto ai non bevitori. L'alcol infatti è una sostanza che, in eccessive quantità, può comportarsi da neurotossina e provocare un danno ossidativo cerebrale e quindi anche retinico. L'alcol modifica i meccanismi che proteggono dallo stress ossidativo e riduce l'assorbimento degli antiossidanti alimentari. Al contrario, un consumo moderato di alcol (uno o due bicchieri al giorno) causa effetti protettivi, come la riduzione dell'aggregazione piastrinica, l'abbassamento dei livelli sierici del fibrinogeno, la riduzione dei livelli sierici della proteina C e l'aumento dei livelli di HDL (High Density Lipoprotein), che conferiscono protezione nei confronti dell'AMD.

► Dieta

Molteplici studi nel corso dei decenni hanno valutato l'importanza dell'apporto di sostanze anti-ossidanti con la dieta nella prevenzione e riduzione di velocità di progressione dell'AMD (in particolare lo studio SALANDRA ha evidenziato la scarsa incidenza di AMD nell'omonima comunità rurale e isolata del Sud Italia).²⁵ La percentuale di prevalenza dell'AMD in pazienti con basso consumo di antiossidanti è circa il doppio di quella osservata in pazienti con alto consumo di antiossidanti (AREDS Study Research Group). Infatti si è visto che gli antiossidanti, come la vitamina A, C, E ed i carotenoidi (α -carotene, β -carotene, luteina e zeaxantina), svolgono un grande valore protettivo nell'AMD per le loro funzioni biologiche e per la loro localizzazione nella retina. In particolare, la luteina e la zeaxantina sono contenute nel pigmento maculare ed una loro carenza (dovuta a diete povere di vegetali a foglia verde e frutta) si associa ad un aumentato rischio di sviluppare AMD. Il selenio, lo zinco e il rame sono dei minerali che contribuiscono ad assicurare l'efficienza di complessi enzimatici essenziali nell'ambito delle difese contro lo stress ossidativo.

Il consumo di pesce e di cibi ricchi in acidi grassi polinsaturi omega 3 (PolyUnsaturated Fatty Acids, PUFA) può associarsi a riduzione del rischio di insorgenza di AMD. In particolare, i PUFA (docosahexaenoic acid, DHA; eicosapentaenoic acid, EPA) hanno dimostrato attività antiangiogeniche, anti-vasoproliferative e neuroprotettive sui fattori e processi implicati nella patogenesi dell'AMD.

Infine, attualmente tra le molecole antiossidanti "promettenti", di sempre maggiore interesse scientifico per la prevenzione dell'AMD sono la crocetina (carotenoide contenuto nello zafferano), la curcumina, il resveratrolo, e le vitamine B9 (acido folico), B12 (cianocobalamina) e

B6 (piridoxina).

► **Obesità**

L'indice di massa corporea (BMI index) è stato identificato come fattore di rischio modificabile associato con la progressione dell'AMD avanzata. Una riduzione del rapporto circonferenza torace/vita si associa a un rischio inferiore di sviluppare AMD, soprattutto in coloro che erano inizialmente obesi.

► **Attività fisica**

I soggetti con stile di vita attivo (definito come regolare svolgimento di attività fisica più di tre volte a settimana) hanno un minor rischio di insorgenza di AMD neovascolare rispetto ai soggetti sedentari.

► **Esposizione alla luce solare**

Non vi è un parere unanime riguardo l'associazione tra l'esposizione alla luce solare e l'AMD. L'esposizione alla luce ambientale avrebbe una scarsa influenza sull'incidenza e sulla progressione dell'AMD. Individui con un'esposizione prolungata alla luce solare estiva per più di cinque ore al giorno avrebbero invece un maggiore rischio di aumento della pigmentazione retinica e di sviluppo di AMD rispetto ai soggetti che si espongono per meno di due ore.

► **Attività lavorativa**

Nonostante non esistano ancora studi epidemiologici al riguardo, nella nostra esperienza abbiamo osservato un'incidenza maggiore di AMD nei soggetti che hanno svolto per anni un'attività lavorativa in cui veniva richiesta la visione da vicino per molte ore giornaliere (come le sarte, le insegnanti, gli orologiai, gli artigiani, etc.) e nei soggetti abituati a lettura prolungata nelle ore serali. Sappiamo che esiste un ciclo circadiano nel metabolismo dei dischi dei segmenti esterni dei fotorecettori (in particolare nei coni). Per questo ipotizziamo la possibilità che un'applicazione costante e continua della visione da vicino soprattutto nelle ore serali (quindi meno fisiologiche) determini un aumentato turnover del metabolismo dei coni, un maggiore consumo dei dischi ("discopatia da consumo") e quindi un maggiore stress ossidativo rispetto ai soggetti meno abituati ad utilizzare la visione centrale soprattutto nelle

ore serali e notturne.

A sostegno di questa ipotesi, è di possibile riscontro l'assenza di segni di AMD nell'occhio ambliope di soggetti che hanno sviluppato la patologia in quello controlaterale.

◎ FATTORI DI RISCHIO CORRELATI A PATOLOGIE SISTEMICHE

▶ Diabete

L'iperglicemia altera la normale struttura e funzione della circolazione coroideale, dell'epitelio pigmentato retinico e della membrana di Bruch. Sulla base di ciò, alcuni studi hanno ipotizzato una possibile associazione tra diabete e aumento del rischio di AMD, che tuttavia non è risultata significativa.

▶ Ipertensione arteriosa

I pazienti con ipertensione arteriosa non controllata (valori di pressione arteriosa sistemica ≥ 160 mmHg o valori di pressione diastolica ≥ 95 mmHg in corso di terapia anti-ipertensiva) hanno una più alta incidenza di alterazioni dell'epitelio pigmentato retinico e di AMD avanzata. È stato infatti dimostrato che l'ipertensione arteriosa è in grado di ridurre il flusso coroideale, il che contribuirebbe alla progressione dell'AMD ed allo sviluppo di neovascolarizzazione coroideale.

▶ Dislipidemia

I lipidi sierici, attraverso la promozione dell'arteriosclerosi nei vasi sanguigni coroideali, possono essere correlati con l'aumentato rischio di sviluppare AMD.²⁶ Il rischio di sviluppare AMD essudativa aumenta di circa 4 volte per valori elevati di colesterolemia. In particolare questo si osserva in caso di alti livelli plasmatici di colesterolo HDL, che è un importante transporter della luteina/zeaxantina.

Pazienti con placche aterosclerotiche carotidiche hanno un aumentato rischio di AMD avanzata rispetto a quelli senza placche. Inoltre individui con arteriosclerosi subclinica (ispessimento dell'intima carotidea, calcificazioni aortiche) presentano un aumentato rischio di AMD.

► Sindrome metabolica

Una recente analisi del Blue Mountains Eye Study ha evidenziato come la sindrome metabolica (associata in particolare ad obesità, iperglicemia e ipertrigliceridemia) predisponga ad una progressione verso forme avanzate di AMD a 10 anni.²⁷

◎ FATTORI DI RISCHIO GENETICI (non modificabili)

Numerosi studi condotti su gemelli, su famiglie affette dalla malattia, e su gruppi di popolazioni, hanno dimostrato l'importanza del fattore genetico nella predisposizione all'AMD.²⁸⁻³⁷ Potrebbe essere ipotizzabile riconoscere l'AMD come un complesso disordine genetico in cui uno o più geni concorrano a determinare la suscettibilità individuale per lo sviluppo della malattia. Studi di linkage e di associazione hanno individuato diverse regioni cromosomiche che si pensa contengano loci di suscettibilità. Tra questi, i geni del Fattore H del complemento (CFH) e ARMS2/HTRA1 sono coinvolti in più del 50% dei casi di AMD.³³

Si è ipotizzato anche che una sottostante risposta infiammatoria possa essere la causa dell'AMD. In particolare, la disfunzione della via alternativa della cascata del complemento potrebbe causare cambiamenti infiammatori nella retina. Questa ipotesi è stata supportata dal riscontro di fattori del complemento all'interno delle drusen, dall'aumento dell'attivazione dei fattori alternativi del complemento nel siero dei pazienti con AMD, e da varianti specifiche nei geni del fattore del complemento che conferiscono una suscettibilità maggiore per l'AMD.

I polimorfismi sono variazioni nucleotidiche del DNA (e quindi nei geni) che causano solo cambiamenti nelle proprietà delle proteine corrispondenti. Nell'AMD i polimorfismi che attualmente risultano avere Odds Ratio più rilevanti in senso predisponente o protettivo coinvolgono i seguenti geni:

- ARMS2/HTRA1 (High Temperature Requirement A protein / Age-Related Maculopathy Susceptibility 2; cromosoma 10q26) è un locus genetico strettamente associato con il rischio di sviluppare l'AMD. Il polimorfismo rs10490924 del gene ARMS2, ove presente nelle varianti TT e GT è correlato ad un elevato rischio di sviluppare AMD in forma avanzata. La proteina del gene HTRA1 (la serin proteasi 1 HTRA), presente anche nelle drusen, è un inibitore del TGF- β , regolatore dell'angiogenesi. Il polimorfismo rs11200638 induce un'espressione

triplicata di HTRA1 nell'EPR che indebolisce la membrana di Bruch e promuove lo sviluppo di neovasi.

- CFH (Complement Factor H; cromosoma 1q31) è un gene che contiene le informazioni per la produzione della proteina del complemento H. Tale proteina è coinvolta in specifici processi immunologici ed infiammatori. I polimorfismi rs1061170, rs1410996 ed rs403846, ove presenti nelle varianti CC o CT, CC o CT e GA o AA rispettivamente, sono correlati ad un maggiore rischio di sviluppare AMD in forma avanzata.

- C3 (Complement component 3; cromosoma 19p13) è un gene che contiene le informazioni necessarie per la produzione della proteina del complemento 3. Anch'essa, come il CFH, è implicata nei processi immunologici ed infiammatori. Il polimorfismo rs2230199, ove presente nelle varianti GG o GC, si correla ad un maggiore rischio di sviluppare AMD in forma avanzata.

- C2/CFB (Complement Component 2 e Complement factor B; cromosoma 6p21) è un gene che contiene le informazioni necessarie per la produzione della componente 2 della via classica del complemento e del fattore B della via alternativa. I polimorfismi rs9332739 di C2 (nelle varianti GC e CC) e rs641153 di CFB (nelle varianti GA ed AA) si associano ad una riduzione del rischio complessivo di sviluppare AMD in forma avanzata.

- TLR3 (recettore Toll-like 3; cromosoma 4) è un gene che codifica l'omonimo recettore presente nelle membrane intracellulari, come reticolo endoplasmatico ed endosomi, il quale gioca un ruolo fondamentale nel riconoscimento del patogeno e nell'attivazione della risposta immunitaria innata. La sua attivazione induce l'apoptosi cellulare mediante la produzione di interferone. Alcuni autori hanno ipotizzato che una sottostante infezione batterica o virale scateni la cascata infiammatoria oculare promuovendo così la progressione dell'AMD. Il polimorfismo rs3775291 conferisce una protezione contro l'atrofia geografica.³⁸

- TIMP3 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 3; cromosoma 22q12) è un gene che codifica per una metalloproteinasi coinvolta nella degradazione della matrice extra-cellulare. Il polimorfismo rs9621532 si associa ad un aumentato rischio di AMD.

In un prossimo futuro, il progresso della ricerca genetica nell'AMD potrebbe aiutarci non solo a comprendere meglio il ruolo specifico che i fattori genetici giocano nella complessa patofisiologia dell'AMD, nella loro interazione con gli altri fattori eziologici (di natura demografica, comportamentale, oculare e correlati ad altre patologie sistemiche) e nella

risposta alle diverse terapie, ma anche a trovare soluzioni innovative nella prevenzione e nel trattamento [39].

Riferimenti bibliografici:

1. OCSE. Ageing: Debate the Issues, OCSE Insights, OCSE Publishing, Paris, 2015.
2. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014 Feb; 2(2):106-16.
3. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2002; 109(10):1767–1779.
4. Mitchell P, Wang JJ, Foran S, Smith W. Five-year incidence of age-related maculopathy lesions: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2002; 109(6):1092–1097.
5. Klaver CC, Assink JJ, van Leeuwen R et al. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(10):2237–2241.
6. Smith W, Assink J, Klein R et al. Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. 2001; 108(4):697–704.
7. Friedman DS, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2006; 122(4):564-72.
8. August CA, Vingerling JR, De Jong TVM, et al. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch Ophthalmol* 2006; 124(4):529-35.
9. Bonastre J, Le Pen C, Anderson P, et al. The epidemiology, economics and quality of life burden of age-related macular degeneration in France, Germany, Italy and the United Kingdom. *Eur J Health Econ*. 2002; 3(2):94-102.
10. Reibaldi M, Longo A, Pulvirenti A, Avitabile T, Russo A, Cillino S, Mariotti C, Casuccio A. Geo-Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration: New Clues Into the Pathogenesis. *Am J Ophthalmol* 2016; 161:78–93.
11. Oshima Y, Ishibashi T, Murata T, Tahara Y, Kiyohara Y, Kubota T. Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population: the Hisayama Study. *Br J Ophthalmol*. 2001; 85(10):1153–1157.
12. Nirmalan PK, Katz J, Robin AL et al. Prevalence of vitreoretinal disorders in a rural population of southern India: the Aravind Comprehensive Eye Study. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122(4):581–586.
13. Gupta SK, Murthy GV, Morrison N et al. Prevalence of early and late age-related macular degeneration in a rural population in northern India: the INDEYE feasibility study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(3):1007–1011.
14. Piermarocchi S, Segato T, Scopa P, et al. The Prevalence of Age-related Macular Degeneration in Italy (PAMDI) Study: Report 1. *Ophthalmic Epidemiol*. 2011; 18(3):129-36.
15. Leske MC, Wu SY, Hennis A et al. Nine-year incidence of age-related macular degeneration in the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology*. 2006; 113(1):29–35.
16. Varma R, Foong AW, Lai MY, Choudhury F, Klein R, Azen SP. Four-year incidence and progression of age-related macular degeneration: the Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol*. 2010; 149(5):741–751.
17. Yasuda M, Kiyohara Y, Hata Y et al. Nine-year incidence and risk factors for age-related macular degeneration in a defined Japanese population the Hisayama study. *Ophthalmology*. 2009; 116(11):2135–2140.
18. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2007; 114(2):253–262.
19. Wang JJ, Rochtchina E, Lee AJ et al. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2007; 114(1):92–98.
20. Buch H, Nielsen NV, Vinding T, Jensen GB, Prause JU, la Cour M. 14-year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology*. 2005; 112(5):787–798.
21. Sunness JS. Choroidal neovascularisation and atrophy. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90(4):398–399.
22. Sunness JS, Gonzalez-Baron J, Bressler NM, Hawkins B, Applegate CA. The development of choroidal neovascularization in eyes with the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 1999; 106(5):910–919.
23. Sunness JS, Margalit E, Srikumaran D et al. The long-term natural history of geographic atrophy from age-related macular degeneration: enlargement of atrophy and implications for interventional clinical trials. *Ophthalmology*. 2007; 114(2):271–277.
24. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, et al. Smoking and age related macular degeneration: the

- number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90:75–80.
25. Pagliarini S, Moramarco A, Wormald RP, et al. Age-related macular disease in rural southern Italy. *Arch Ophthalmol*. 1997 May; 115(5):616-22.
 26. Klein R, Myers CE, Buitendijk GH, Rochtchina E, et al. Lipids, Lipid Genes and Incident Age-Related Macular Degeneration: The Three Continent Age-Related Macular Degeneration Consortium. *Am J Ophthalmol*. 2014 Sep; 158(3):513–524.
 27. Maralani HG, Tai BC, Wong TY, Tai ES, Li J, Wang JJ, Mitchell P. Metabolic syndrome and risk of age-related macular degeneration. *Retina*. 2015 Mar; 35(3):459-66.
 28. Zanke B, et al. A genetic approach to stratification of risk for age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol*. 2010; 45(1):22-7.
 29. Yu Y, et al. Prospective Assessment of Genetic Effects on Progression to Different Stages of Age-related Macular Degeneration Using Multi-state Markov Models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Mar; 53(3):1548-56.
 30. Swaroop A, et al. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009; 10:19-43.
 31. Sobrin L, et al. ARMS2/HTRA1 locus can confer differential susceptibility to the advanced subtypes of age related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2011; 151(2):345-52.
 32. Seddon JM, et al. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using demographic, environmental, genetic, and ocular factors. *Ophthalmology*. 2011; 118(11):2203-11.
 33. Raychaudhuri S, et al. A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2011; 43(12):1232-6.
 34. Mares JA, et al. Healthy lifestyles related to subsequent prevalence of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2011; 129(4):470-80.
 35. Klein ML, et al. Risk assessment model for development of advanced age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2011; 129(12):1543-50.
 36. Hageman GS, et al. Clinical validation of a genetic model to estimate the risk of developing choroidal neovascular age-related macular degeneration. *Hum Genomics*. 2011; 5(5):420-40.
 37. Francis PJ, Klein ML. Update on the role of genetics in the onset of age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2011; 5:1127-33.
 38. Zhou P, Fan L, Yu KD, Zhao MW, Li XX. Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *FASEB J*. 2011 Oct; 25(10):3489-95.
 39. Gibson J, Cree A, Collins A, Lotery A, Ennis S. Determination of a gene and environment risk model for age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2010; 94:1382-87.

SENESCENZA E AMD

L'invecchiamento (o senescenza) è definibile come il progressivo accumulo di cambiamenti nel tempo che "si associano a" o che sono "responsabili di" una maggiore suscettibilità a malattia e morte con l'avanzare dell'età. L'occhio non fa eccezione ai processi di invecchiamento, a cominciare dalla cataratta che, assieme alla degenerazione retinica, è di comune riscontro nella popolazione anziana.

La retina è particolarmente suscettibile ai processi di invecchiamento, in quanto:

- è costituita per la maggior parte da cellule non più in grado di dividersi;
- è costituita da cellule, come i fotorecettori e l'epitelio pigmentato retinico, altamente attive dal punto di vista metabolico;
- è altamente ossigenata ed esposta a lunghezze d'onda corte della luce visibile, il che contribuisce a provocare un danno ossidativo;
- l'epitelio pigmentato retinico accumula fotosensibilizzanti tossici come la lipofusina.

Il culmine di queste alterazioni età-dipendenti si raggiunge con la disfunzione retinica, lo sviluppo di AMD e la perdita visiva.

● Senescenza della neuro-retina

Lo spessore retinico diminuisce con l'invecchiamento (in media di circa 0,53 μm all'anno) [1-3]. In particolare, nella regione maculare lo spessore retinico diminuisce di 0,26-0,46 μm all'anno mentre il volume maculare di 0,01 mm^3 all'anno [2]. Lo spessore medio di $426 \pm 34,2$ μm nei soggetti giovani (sotto i 22 anni d'età) si riduce a $261 \pm 18,9$ μm nei soggetti anziani (sopra i 66 anni d'età) [3]. Inoltre, lo strato delle fibre nervose diminuisce drammaticamente e in maniera non uniforme attorno al disco ottico, riguardando soprattutto il settore superiore, con un declino medio pari a 2,4 μm per ogni decade di età [1,4]. Questa diminuzione si correla ad una riduzione media delle cellule gangliari: dalle circa 400/ mm^2 nei soggetti giovani (sotto i 22 anni d'età) alle circa 250/ mm^2 negli anziani (sopra i 65 anni d'età) [3]. Inoltre, con l'invecchiamento si ha un significativo decremento anche della densità dei fotorecettori: i bastoncelli appaiono più vulnerabili rispetto ai coni e la perdita è più pronunciata nella periferia retinica rispetto alla regione maculare [5,6]. In macula la densità dei bastoncelli decresce fino al 30% con l'avanzare

dell'età, mentre la densità dei coni può rimanere sostanzialmente invariata a meno che non si sviluppi l'AMD. In corso di AMD iniziale, i bastoncelli parafoveali sono i primi ad andare incontro a degenerazione e la loro perdita risulta superiore a quella dei coni in corrispondenza delle medesime aree. Comunque, quando si perdono i bastoncelli anche i coni degenerano in seguito a cambiamenti strutturali e biochimici del micro-ambiente, a tal punto che la disfunzione dei primi può servire come biomarker di rischio per la disfunzione dei secondi. Con l'avanzare dell'età si osserva, infine, una riduzione nella densità dei capillari, nelle connessioni intercellulari, nei corpi sinaptici e nel contenuto proteico della retina sensoriale, che determina un rimodellamento della retina [1,7]. È stato ipotizzato che l'invecchiamento si accompagni ad un'attivazione di un set di geni coinvolti nella risposta infiammatoria locale.⁸ In particolare si è osservato nei modelli animali un deterioramento della funzione della barriera emato-retinica correlato ad un'attivazione del complemento, un upregulation dell'espressione delle chemochine, un'attivazione della microglia ed un aumento di linfociti T attivi e di cellule monocitarie attive [8,9]. Tutto ciò contribuisce a creare uno stato di infiammazione cronica di basso grado (definito "para-infiammazione" o "inflammaging") stimolata da fattori endogeni di stress. Nonostante lo scopo di questa para-infiammazione sia quello di mantenere il più possibile l'omeostasi funzionale della retina, essa può alla lunga cronicizzarsi e convertirsi in uno stato infiammatorio conclamato qualora lo stress tessutale o il malfunzionamento persistano per un periodo di tempo prolungato, come avviene nella retina invecchiata [10]. La para-infiammazione cronica contribuisce alla patogenesi ed alla progressione di molte patologie retiniche, compresa l'AMD. In particolare, studi più recenti hanno sempre più evidenziato un coinvolgimento della microglia nella patogenesi dell'AMD [11-13]. Con la senescenza, la microglia riduce le sue capacità dinamiche (motilità, branching, lunghezza dei processi, etc.) e diventa meno responsiva agli stimoli esterni ed alle alterazioni età-correlate.¹² Più in generale, il suo ruolo nel mantenimento dell'omeostasi retinica può risultare seriamente alterato con l'avanzare dell'età [13]. Nell'AMD la distribuzione della microglia cambia radicalmente. La microglia attivata migra negli strati retinici esterni fino agli spazi sottoretinici e, in alcuni casi, crea contatti con i depositi drusenoidi vicini [14,15]. In alcuni modelli sperimentali in vivo e in vitro, la microglia sembra essere responsabile delle precoci alterazioni delle cellule dell'EPR e sembra essere la promotrice degli stimoli proinfiammatori e pro-angiogenici [14]. Quindi, la traslazione della microglia agli strati retinici esterni potrebbe essere l'evento determinante per

l'instaurazione del processo infiammatorio cronico correlato alla progressione dell'AMD [16].

● **Senescenza dell'EPR**

Le cellule dell'EPR sono particolarmente predisposte all'invecchiamento, non essendo in grado di dividersi ed essendo esposte ad elevati livelli di stress ossidativo durante il corso della vita. Con l'avanzare dell'età i prodotti di scarto vengono accumulati come granuli di lipofuscina nel citoplasma medio e basale delle cellule dell'EPR. Questi granuli (di circa 1 μm di diametro) possono arrivare ad occupare fino al 19% del volume citoplasmatico in un soggetto ottantenne. Nonostante la precisa origine e la complessa composizione della lipofuscina non siano ancora del tutto chiarite, è stato dimostrato che A2E (N-retinylidene-Nretinyl-ethanolamine, componente retinoide) costituisce uno dei componenti fluorofori principali. L'accumulo di lipofuscina è maggiore al polo posteriore retinico, essendo direttamente correlato con la densità dei bastoncelli (che ne costituiscono il substrato primario). La lipofuscina è un potente generatore foto-inducibile di un range di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS), che comprendono l'anione super-ossido, l'ossigeno singoletto, il perossido d'idrogeno e i perossidi lipidici, e la sua fotoreattività aumenta con l'invecchiamento. Con l'età diminuiscono i melanosomi delle cellule dell'EPR mentre aumentano i complessi pigmentati, il che ridurrebbe l'assorbimento della luce e/o dei componenti tossici e ioni metallici. Il fallito sequestro del ferro libero porterebbe alla generazione dei ROS aumentando il potenziale danno ossidativo. Inoltre, i melanosomi tendono ad unirsi con la lipofuscina generando i complessi di melano-lipofuscina. Nonostante le cellule dell'EPR di per sé mostrino una maggiore resistenza allo stress ossidativo rispetto ad altre cellule del corpo umano ed una vigorosa risposta adattativa, il punto debole di questa tolleranza ossidativa sembra essere rappresentato dai mitocondri [17,18]. Con l'avanzare dell'età, si assiste ad una crescente disfunzione dei mitocondri conseguente al danno del DNA mitocondriale (mtDNA) per l'aumentato stress ossidativo e per la sua ridotta capacità di ripararsi [19-21]. Inoltre A2E, che si localizza anche nelle membrane mitocondriali, e la disfunzione mitocondriale indeboliscono in maniera sinergica la fagocitosi da parte delle cellule dell'EPR [22,23]. La disfunzione mitocondriale determina una ridotta produzione di ATP, un aumento del rilascio di ROS, una disregolazione nel flusso degli ioni calcio, ed un rilascio sub-letale del citocromo C, e sembra svolgere un ruolo di primo piano non solo nella patogenesi

dell'AMD ma anche in numerose altre patologie croniche e neurodegenerative [24].

Inoltre, il sistema lisosomiale nelle cellule dell'EPR è altamente attivo nel degradare il carico giornaliero dei segmenti esterni dei fotorecettori ingeriti e, come ovvio, la maggiore attività lisosomiale si concentra nella regione maculare [25,26]. Nonostante non sia ancora ben chiarito se con l'invecchiamento diminuisca l'attività lisosomiale, è dimostrato un aumento della fosfatasi acida e della catepsina D correlato ad un aumento del numero di lisosomi associati coi granuli di lipofuscina e coi complessi pigmentati [26,27]. Più in generale, la disregolazione dei sistemi lisosomiale e autofagosomico, intrinsecamente uniti e dipendenti fra loro, è parte fondamentale del processo di invecchiamento retinico [28-30]. Infine, la capacità anti-ossidante dell'EPR diminuisce con l'invecchiamento. In particolare, si riduce la presenza di carotenoidi e di vitamina E a livello maculare, e diminuisce la capacità delle Heat Shock Proteins (HSPs, le quali, in risposta allo stress, svolgono una funzione simile ai chaperones molecolari prevenendo l'accumulo di aggregati cellulari di proteine denaturate e favorendo il corretto ripiegamento delle proteine nascenti e mal piegate) di proteggere le proteine dal danno ossidativo [31-34]. Livelli aumentati di HSPs si trovano nelle retine con AMD, a dimostrazione dell'elevato livello di stress tessutale. L'autofagia è il principale meccanismo proteolitico per eliminare i componenti danneggiati in risposta alle modificazioni dell'AMD. L'inibizione dei proteosomi porta ad accumulo perinucleare di proteine di membrana associate ai lisosomi (LAMP-2), di HSP70 e di coniugati proteinaubiquitina nelle cellule dell'EPR. I depositi laminari basali si accumulano tra la membrana citoplasmatica dell'EPR e la lamina basale dell'EPR. Sono quasi invisibili clinicamente. Consistono di materiale della membrana basale e collagene. Lo spessore di questi depositi si correla con il grado di degenerazione dell'EPR, di atrofia dei fotorecettori e di perdita visiva. Sono depositi elastici che persistono perfino nelle aree di atrofia geografica e cicatrici disciformi. Inizialmente possono essere anche il risultato dei tentativi di sopravvivenza dell'EPR sotto stress ossidativo. Man mano che aumenta lo spessore di questi depositi, si separa la superficie basale dell'EPR dalla sua originaria membrana basale e dal rifornimento del sangue coroideale, diminuendo così la permeabilità della membrana di Bruch. Più tardivamente, le cellule dell'EPR raggiungono un punto critico in cui, diventando iperpigmentate, ingrandite e smussate, e perdendo i loro microvilli, non sono più in grado di supportare i fotorecettori. Infine, questi depositi perdono il loro ancoraggio alla membrana basale e alle cellule adiacenti spargendosi nello spazio sottoretinico o intraretinico.

● Senescenza della membrana di Bruch

Con l'avanzare dell'età lo spessore e la fibrosità della membrana di Bruch aumentano e le proiezioni intercapillari si dilatano [35,36]. Questo determina una riduzione della conduttività idraulica attraverso la membrana di Bruch, con un declino esponenziale dopo la quinta decade di vita e più rapido nella regione maculare rispetto alla periferia [37]. Marshall et al hanno dimostrato una correlazione inversamente proporzionale tra la riduzione della conduttività idraulica e l'accumulo di detriti (proteine ad alto peso molecolare ma soprattutto lipidi) nella membrana di Bruch [37-40]. La conseguente diminuzione del flusso di molecole tra la circolazione coroideale e i fotorecettori può portare, nei casi più severi, ad atrofia cellulare [41]. Già dopo i 30 anni d'età la concentrazione delle metalloproteinasi (soprattutto MMP-2 e MMP-9) aumenta nel tentativo di mantenere invariato lo spessore della membrana di Bruch durante i processi d'invecchiamento [42]. Tuttavia, l'aumento degli aggregati che derivano dalla polimerizzazione dei pro-enzimi di MMP-2 e MMP-9 può determinare una maggiore aggregazione tra le molecole ad alto peso molecolare all'interno della membrana, una riduzione delle forme attive delle metalloproteinasi e quindi anche una riduzione del turn-over della matrice extra-cellulare [43,44]. Inoltre, la formazione di questi complessi macromolecolari riduce anatomicamente lo spazio disponibile per il passaggio di acqua attraverso la membrana stessa [45,46]. Modelli sperimentali hanno dimostrato che il punto di maggiore resistenza alla conduttività idraulica corrisponde alla giunzione tra lo strato di collagene interno e lo strato di fibre elastiche [40]. Nell'AMD è stato confermato un aumento significativo dei complessi ad alto peso molecolare, una riduzione della concentrazione di enzimi attivi MMP-2 e MMP-9, ed un aumento delle TIMP-3 nella membrana di Bruch rispetto alla popolazione anziana di controllo [40,45]. Con l'avanzare dell'età la membrana di Bruch diventa sempre più una barriera lipofila. Inoltre, con l'invecchiamento la membrana di Bruch diventa più fragile per la calcificazione, la perdita dello strato di fibre elastiche e la formazione di cross-linking del collagene accelerata dalla presenza dei prodotti di glicosilazione avanzata (advanced glycation-end products, AGE) [35,47]. Gli AGE che si accumulano nella membrana di Bruch sono in grado anche di alterare severamente il metabolismo cellulare dell'EPR ostacolando la produzione di ATP, aumentando lo stress ossidativo, inibendo l'espressione di geni anti-angiogenici e anti-infiammatori, alterando l'attività lisosomiale e l'accumulo intracellulare di lipofuscina, e aumentando

l'espressione del VEGF [48-50]. Tipicamente, i detriti si accumulano tra la lamina basale dell'EPR e lo strato di collagene interno della membrana di Bruch sotto forma di depositi lineari basali. Questi sono costituiti dai corpi membranosi rilasciati dalla membrana plasmatica basale dell'EPR che non sono in grado di penetrare nello strato di collagene interno (che è lo strato con maggiore resistenza alla conduttività idraulica). Hanno un alto contenuto lipidico. Si accumulano maggiormente al di sotto della fovea dove si ha la più alta concentrazione di coni. Man mano che aumentano di dimensione diventano visibili oftalmoscopicamente e prendono il nome di drusen.

◎ **Senescenza della coroide e AMD**

L'integrità anatomica della coroide è vitale per l'EPR ed essenziale per la rimozione delle scorie del ciclo visivo, soprattutto nella regione maculare. Ad oggi, il ruolo della coroide nella patogenesi dell'AMD appare ancora non chiaro e controverso. Avendo la regione maculare un'abbondante circolazione coroideale e un'elevata tensione di ossigeno, i lipidi polinsaturi che riccamente costituiscono i segmenti esterni dei fotorecettori e l'EPR sono maggiormente predisposti ad andare incontro a processi ossidativi.

Lo spessore della coroide si riduce progressivamente con l'invecchiamento: 15,6 μm per ogni decade di vita [52]. In alcuni soggetti non miopi, con l'età lo spessore della coroide si riduce in maniera più pronunciata determinando un'atrofia coroideale con diffusa perdita dei vasi di medio calibro e una riduzione della pigmentazione e della densità dei vasi di calibro maggiore, soprattutto al polo posteriore. Questa nuova entità clinica è stata recentemente descritta da Spaide e denominata "atrofia coroideale legata all'età" (Age-Related Choroidal Atrophy, ARCA). Può portare ad un'atrofia secondaria dell'EPR (in diagnosi differenziale con l'atrofia geografica che si sviluppa nell'AMD) [53]. Nonostante l'ARCA e l'atrofia geografica possano manifestarsi insieme, queste due distinte entità cliniche non sono necessariamente associate fra loro. Inoltre, l'associazione tra la riduzione dello spessore coroideale e l'AMD è controversa: alcuni studi evidenziano una riduzione del diametro e della densità dei vasi della coriocapillare soprattutto negli stadi avanzati della patologia, [54,55] mentre altri non mostrano cambiamenti significativi [54,55]. Il ridotto spessore della coroide sembra essere correlato ad una maggiore presenza di depositi drusenoidi sottoretinici [56,57]. Più in generale, non è stata dimostrata

alcuna correlazione tra la riduzione dello spessore della coroide e la perdita della sua funzione [58]. A tal proposito, però, le più recenti metodiche di imaging che consentono di studiare il flusso coroideale in vivo (Doppler OCT, Phase-variance OCT, Angio OCT) potrebbero fornirci in futuro maggiori informazioni funzionali sull'emodinamica dei singoli vasi della coroide e quindi anche sul ruolo della coroide nella patogenesi dell'AMD [52]. Con l'avanzare dell'età aumentano i depositi di MAC (Membrane Attack Complex) nella membrana di Bruch e nella coriicapillare [59]. Questo determina, soprattutto nei soggetti con genotipo CFH ad alto rischio, una perdita delle cellule endoteliali della coriicapillare e la formazione di vasi fantasmi [60]. Coleman et al hanno dimostrato la presenza di ischemia coroideale, primariamente localizzata nello strato di Sattler, in quasi tutti i casi di AMD secca [61]. Infine, dalla coroide si generano i neovasi che differenziano la forma neovascolare di AMD dalle altre forme.

● **Associazione tra invecchiamento e AMD**

Il più grande fattore di rischio per sviluppare l'AMD è l'invecchiamento stesso. Di per sé l'invecchiamento biologico non è una patologia, ma piuttosto determina un progressivo aumento della suscettibilità a sviluppare malattie. In particolare, la perdita della funzione mitocondriale, l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), il crescente danno ossidativo, l'accumulo di lipofuscina, l'alterata risposta immunitaria e i cambiamenti della membrana di Bruch rendono la retina più suscettibile ai fattori ambientali come il fumo di sigaretta e la luce. L'invecchiamento e l'AMD creano così un circolo vizioso dove uno alimenta l'altro. La lipofuscina, altamente fotoreattiva, si osserva nelle drusen e nelle aree (hot spots all'autofluorescenza) ad alto rischio di progressione per AMD. Il distacco dell'EPR avviene come conseguenza diretta dell'accumulo di lipidi nella membrana di Bruch, il che impedisce il passaggio di liquidi al di fuori della retina. Inoltre, l'aumentata concentrazione di lipidi, la calcificazione ed i cambiamenti nell'integrità strutturale della senescente membrana di Bruch predispongono questa regione all'invasione di macrofagi e neovasi. Oltre all'invecchiamento, la predisposizione genetica e l'alimentazione sono i fattori determinanti per l'insorgenza di AMD. Modelli sperimentali animali hanno dimostrato che manipolazioni genetiche o dietetiche provocano una patologia AMD-like nei topi anziani ma non in quelli giovani [62,63].

Riferimenti bibliografici:

1. Alamouti B, Funk J. Retinal thickness decreases with age: an OCT study. *Br J Ophthalmol*. 2003; 87(7):899–901.
2. Eriksson U, Alm A. Macular thickness decreases with age in normal eyes: a study on the macular thickness map protocol in the Stratus OCT. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93(11):1448–1452.
3. Cavallotti C, et al. Age-related changes in the human retina. *Can J Ophthalmol*. 2004; 39(1):61–68.
4. Feuer WJ, et al. Topographic differences in the age-related changes in the retinal nerve fiber layer of normal eyes measured by Stratus optical coherence tomography. *J Glaucoma*. 2010; 20(3):133–138.
5. Gao H, Hollyfield JG. Ageing of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(1):1–17.
6. Curcio CA, et al. Ageing of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993; 34(12):3278–3296.
7. Terzibasi E, et al. Age-dependent remodelling of retinal circuitry. *Neurobiol Ageing*. 2009; 30(5):819–828.
8. Chen M, et al. Immune activation in retinal ageing: a gene expression study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(11):5888–96.
9. Chan-Ling T, et al. Inflammation and breakdown of the blood-retinal barrier during “physiological ageing” in the rat retina: a model for CNS ageing. *Microcirculation*. 2007; 14(1):63–76.
10. Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the ageing retina. *Prog Retin Eye Res*. 2009; 28(5):348–368.
11. Harry GJ. Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther*. 2013; 139:313-326.
12. Damani MR, Zhao L, Fontainhas AM, Amaral J, Fariss RN, Wong WT. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell*. 2011; 10:263-276.
13. Karlstetter M, Langmann T. Microglia in the aging retina. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 801:207-212.
14. Ma W, Zhao L, et al. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One*. 2009; 4:7945.
15. Ma W, Zhao L, Wong WT. Microglia in the outer retina and their relevance to pathogenesis of age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 723:37-42.
16. Vecino E, et al. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. 2016 Mar; 51:1-40.
17. Jarrett SG, Albon J, Boulton M. The contribution of DNA repair and antioxidants in determining cell typespecific resistance to oxidative stress. *Free Radic Res*. 2006; 40(11):1155–1165.
18. Crawford DR, et al. Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Perspect*. 1994; 102 Suppl 10:25–28.
19. Jarrett S, Lewin AS, Boulton ME. The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders. *Ophthalmic Res*. 2010; 44:179–190.
20. Karunadharma PP, et al. Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(11):5470–79.
21. Udar N, et al. Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50(6):2966–2974.
22. Schutt F, et al. Accumulation of A2-E in mitochondrial membranes of cultured RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007; 245(3):391–398.
23. Vives-Bauza C, et al. The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem*. 2008; 283(36):24770–80.
24. Reeve AK, Krishnan KJ, Turnbull D. Mitochondrial DNA mutations in disease, ageing, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1147:21–29.
25. Hayasaka S. Ageing changes in lipofuscin, lysosomes and melanin in the macular area of human retina and choroid. *Jpn J Ophthalmol*. 1989; 33(1):36–42.
26. Boulton M, et al. Regional variation and age-related changes of lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol*. 1994; 78(2):125–129.
27. Ogawa T, et al. Changes in the spatial expression of genes with ageing in the mouse RPE/choroid. *Mol Vis*. 2005; 11: 380–386.
28. Cuervo AM, et al. Autophagy and ageing: the importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy*. 2005; 1(3): 131–140.

29. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol.* 2007; 211(2):134–143.
30. Boulton M, et al. The formation of autofluorescent granules in cultured human RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30(1):82–89.
31. Friedrichson T, Kalbach HL, et al. Vitamin E in macular and peripheral tissues of the human eye. *Curr Eye Res.* 1995; 14(8):693–701.
32. Castorina C, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymatic systems in rat retina as a function of age. *Neurochem Res.* 1992; 17(6):599–604.
33. Liao JH, Lee JS, Chiou SH. C-terminal lysine truncation increases thermostability and enhances chaperone-like function of porcine alphaB-crystallin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297(2):309–316.
34. Organisciak D, et al. Genetic, age and light mediated effects on crystallin protein expression in the retina. *Photochem Photobiol.* 2006; 82(4):1088–1096.
35. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Jan; 29(1):1-18.
36. Grindle CF, Marshall J. Ageing changes in Bruch's membrane and their functional implications. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1978; 98(1):172–175.
37. Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36(7):1290–1297.
38. Starita C, Hussain AA, Pagliarini S, Marshall J. Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease. *Exp Eye Res.* 1996; 62(5):565–572.
39. Hussain AA, Rowe L, Marshall J. Age-related alterations in the diffusional transport of aminoacids across the human Bruch's-choroid complex. *J Opt Soc Am A.* 2002; 19(1):166–172.
40. Marshall J. The 2014 Bowman Lecture-Bowman's and Bruch's: a tale of two membranes during the laser revolution. *Eye (Lond).* 2015 Jan; 29(1):46-64.
41. Marshall J et al. Ageing and Bruch's membrane. In: Marmor MF, Wolfensberger TJ (eds) *The retinal pigment epithelium.* Oxford University Press, New York/ Oxford. 1998; pp 669–692.
42. Guo L, Hussain AA, Limb GA, Marshall J. Age-dependent variation in metalloproteinase activity of isolated human Bruch's membrane and choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40(11):2676–2682.
43. Kumar A, El-Osta A, Hussain AA, Marshall J. Increased sequestration of matrix metalloproteinases in ageing human Bruch's membrane: implications for ECM turnover. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(5):2664-70.
44. Hussain AA, Lee Y, Marshall J. High molecular-weight gelatinase species of human Bruch's membrane: compositional analyses and age-related changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(5):2363–2371.
45. Hussain AA, Lee Y, Zhang JJ, Marshall J. Disturbed matrix metalloproteinase activity of Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(7):4459–4466.
46. Ahir A, Guo L, et al. Expression of metalloproteinases from human retinal pigment epithelial cells and their effects on the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 43(2): 458–465.
47. Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, Papavassiliou AG. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2014 Sep; 42:85-102.
48. Glenn JV, Stitt AW. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1790:1109-1116.
49. Hoffmann S, et al. Advanced glycation end products induce choroidal endothelial cell proliferation, matrix metalloproteinase-2 and VEGF upregulation in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002; 240:996-1002.
50. Shamsi FA, Boulton M. Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:3041-3046.
51. Mrejen S, Spaide RF. Optical coherence tomography: imaging of the choroid and beyond. *Surv Ophthalmol.* 2013 Sep-Oct; 58(5):387-429.
52. Margolis R, Spaide RF. A pilot study of enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in normal eyes. *Am J Ophthalmol.* 2009; 147:811-5.
53. Spaide RF. Age-related choroidal atrophy. *Am J Ophthalmol.* 2009; 147:801-10.
54. McLeod DS, Grebe R, Bhutto I, et al. Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:4982-91.
55. Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br J Ophthalmol.* 1976; 60:324-41.

56. Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, et al. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35:2857-64.
57. Jonas JB, Forster TM, Steinmetz P, Schlichtenbrede FC, Harder BC. Choroidal thickness in age-related macular degeneration. *Retina.* 2014 Jun; 34(6):1149-55.
58. Switzer DW Jr, Mendonca LS, Saito M, et al. Segregation of ophthalmoscopic characteristics according to choroidal thickness in patients with early age-related macular degeneration. *Retina.* 2012; 32:1265-71.
59. Sogawa K, Nagaoka T, Takahashi A, et al. Relationship between choroidal thickness and choroidal circulation in healthy young subjects. *Am J Ophthalmol.* 2012; 153:1129-32.
60. Whitmore SS, Sohn EH, et al. Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: implications for pathophysiology and therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2015 Mar; 45:1-29.
61. Coleman DJ, Silverman RH, Rondeau MJ, et al. Age-related macular degeneration: choroidal ischaemia? *Br J Ophthalmol.* 2013; 97:1020–1023.
62. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 2003 Nov; 9(11):1390-7.
63. Malek G, Johnson LV, Mace BE, Saloupis P, et al. Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Aug 16; 102(33):11900-5.

PATOGENESI DELL'AMD

La patogenesi dell'AMD è multifattoriale. Sono infatti numerosi i fattori genetici, ambientali e demografici che vi concorrono e che conferiscono al soggetto un aumentato rischio di sviluppare la patologia. Le più recenti teorie chiamano in causa:

- un crescente stress ossidativo a livello delle cellule dell'EPR (con successivo danno mitocondriale) e della coriocalpillare;
- un insulto infiammatorio cronico alla membrana di Bruch, in cui gli inflammasomi giocano un ruolo fondamentale;
- un'alterata diffusione di nutrienti e ossigeno dovuto alla deposizione di matrice extra-cellulare abnorme, all'accumulo di lipidi ed agli infiltrati cellulari.

L'epitelio pigmentato retinico in corso di AMD

Le cellule dell'EPR infarcite di lipofuscina col tempo vengono fagocitate dalle cellule vicine. Solitamente il fondo oculare mantiene un normale aspetto durante questo processo, ma negli occhi più anziani il numero di cellule perse può essere tale da divenire visibile come un diffuso chiazzeamento di piccoli aggregati di pigmento o come un pattern microreticolare di piccole linee, più evidente all'esame fluorangiografico. La progressione dell'AMD è strettamente legata al grado di anomalie pigmentarie visibili nel fondo oculare, le quali si possono avere anche in assenza di tipiche drusen [1,2].

● Anomalie pigmentarie dell'EPR

La lipofuscina e i granuli di melanolipofuscina si accumulano nelle cellule dell'EPR, che si ingrandiscono e perdono la loro forma regolare. La superficie esterna o basale perde le sue interdigitazioni (con una conseguente riduzione dell'area di superficie) e aumenta la separazione dalla membrana basale con l'ispessimento dei depositi laminari basali e l'accumulo di detriti membranosi. In alcuni casi le cellule vanno incontro a degenerazione lipoidale [3].

Col tempo, le cellule diventano iperpigmentate per l'accumulo di materiale fagocitato, si arrotondano fino a che rimangono solo pochi microvilli apicali tozzi e perdono così la loro

capacità fagocitaria. La lipofuscina viene impacchettata all'interno di grandi cellule dell'EPR danneggiate oppure di corpi legati alla membrana e si disperdono.

Le anomalie pigmentarie che ne conseguono possono essere classificate in biomicroscopia come "aumentata pigmentazione" (o iperpigmentazione) e come "depigmentazione" (o ipopigmentazione) [4]. L'iperpigmentazione focale si correla istologicamente ad aree localizzate di ipertrofia delle cellule dell'EPR. Le cellule iperpigmentate si possono associare in aggregati (clumps; clumping dell'EPR) e localizzare nello spazio sotto l'EPR, nello spazio sottoretinico o migrare fino allo strato nucleare interno. Con l'avvento degli OCT di nuova generazione (Spectral Domain OCT ed UltraHigh Resolution OCT) è stato possibile visualizzare e studiare questi depositi iperpigmentati in vivo, i quali appaiono come aree con iperreflettività moderata o intensa corrispondenti all'iperpigmentazione in biomicroscopia [5-7].

Comunemente depositi iperpigmentati intraretinici si accumulano al di sopra delle drusen fino a migrare talvolta anche negli strati retinici più interni rispetto allo strato nucleare esterno.

L'ipopigmentazione focale si correla con cellule dell'EPR depigmentate o con pigmentazioni attenuate che circondano le cellule iperpigmentate [8]. Allo Spectral Domain OCT queste aree mostrano un segnale di riflettività attenuato da parte dello strato dell'EPR.

La cascata di eventi che porta alle anomalie pigmentarie ed, in ultimo, all'atrofia sembra essere sempre la stessa indipendentemente dalla causa. Quando una cellula dell'EPR muore i prodotti vengono fagocitati dalle cellule vicine. Queste cellule a loro volta si infarciscono di lipofuscina e si arrotondano perdendo la loro capacità di fagocitare. Mentre le cellule vengono smaltite, quelle vicine migrano e aumentano la propria area di superficie in un tentativo di mantenere integra la barriera emato-retinica esterna. Questo determina cellule assottigliate e ipopigmentate adiacenti alle aree di iperpigmentazione focale. Infine, queste cellule non riescono più ad allungarsi per riempire gli spazi vuoti ed inizia l'atrofia dell'EPR. In conclusione, l'iperpigmentazione precede l'ipopigmentazione, che a sua volta è il preludio allo sviluppo di atrofia [9].

Un'altra condizione in cui le anomalie pigmentarie precedono l'atrofia è il distacco dell'EPR di tipo drusenoide di lunga data (long-standing). Comunque, l'atrofia insorge solamente dopo che la popolazione cellulare è già esaurita. Nei soggetti più giovani con iperpigmentazione focale correlata a drusen o nei pazienti con pattern dystrophies dell'EPR, le aree di EPR depigmentato possono rimanere presenti per molti anni senza progredire in atrofia.

Il progressivo sconvolgimento dell'EPR si accompagna a perdita dei fotorecettori con una riduzione del numero di nuclei nello strato nucleare esterno. I segmenti interni tendono a diventare più corti ed assumere una forma bulbosa, mentre i segmenti esterni accumulano detriti membranosi nella loro parte apicale.

Con la senescenza, la ialinizzazione e l'aumentata densità della membrana di Bruch si estendono nei pilastri inter-capillari fino a circondare la coriocapillare. I capillari della coroide, già separati dall'allargamento dei pilastri intercapillari, si riducono ulteriormente e perdono le loro fenestrazioni. Macrofagi, cellule giganti, fibroblasti e sporadici linfociti vanno ad occupare gli spazi lasciati vuoti dai capillari della coroide lungo la superficie esterna della membrana di Bruch [10]. Segmenti di membrana iniziano ad assottigliarsi e processi cellulari iniziano a scindere ed avvolgere piccoli frammenti di membrane [11]. I capillari della coroide nelle vicinanze mostrano segni di attivazione e si formano neovasi inizialmente confinati nella coroide [12]. Questa reazione infiammatoria cronica di basso grado (o para-infiammazione), che in parte si sviluppa in risposta ai detriti membranosi rilasciati dall'EPR, si localizza spesso nella coroide vicino ai punti di rottura della membrana di Bruch, e sembra essere il collegamento nella cascata di eventi che portano alla formazione di neovascolarizzazione coroideale [13]. Per questo motivo la ricerca di meccanismi che riducano la componente infiammatoria sono in corso di studio per interferire con le vie patogenetiche di AMD avanzata (atrofiche e neovascolari).

● **Transdifferenziazione dell'EPR**

Viene definita "transdifferenziazione" la trasformazione di cellule appartenenti ad uno dei tre foglietti embrionali in cellule di un altro foglietto embrionale. Come recentemente proposto, la transdifferenziazione può essere un processo importante nella patogenesi dell'AMD [14-16]. La transizione dell'EPR da cellule epiteliali a cellule mesenchimali in risposta allo stress ossidativo è ben evidenziabile nella perdita della polarità, nell'aumentata capacità migratoria, nell'invasività, nell'elevata resistenza all'apoptosi e nell'aumentata produzione di componenti della matrice extracellulare [17]. Quando il processo di transizione è completo la membrana basale si degrada e la nuova cellula mesenchimale migra via dallo strato di origine. Esistono numerose pathways di apparente transdifferenziazione: "sloughed/intraretinal", "dissociated/subducted", "entombed/melanotiche".¹⁸ Tra queste, la transdifferenziazione

“sloughed/intraretinal” ha un significato prognostico per la progressione verso atrofia geografica e CNV [19]. Nell'atrofia geografica sono predominanti le morfologie shedding (sparse), sloughed (mutate) e dissociated (dissociate). Nell'AMD le cellule dell'EPR danneggiate possono seguire due principali pathways di morte apparente:

- 1) morte per apoptosi (shedding; aggregazione di granuli);
- 2) migrazione anteriore intraretinica (sloughed).

Gli strati si disgregano, le cellule vanno incontro ad un processo di subduzione e lasciano l'area atrofica. Numerose cellule EPR-derivate possono sopravvivere negli occhi con AMD avanzata:

- subducted: originano dall'EPR dissociato presente nelle aree atrofiche; contengono granuli di EPR e si disperdono lungo la membrana di Bruch; sono comuni nell'atrofia geografica e nelle atrofie con depositi laminari basali (BLamD).
- cellule melanotiche: contribuiscono alla pigmentazione nera nelle cicatrici disciformi.
- entubulated: si trovano nel lume delle tubulazioni retiniche esterne.

Numerose cellule derivate dall'EPR sopravvivono alle fasi avanzate di AMD (dissociated ed entombed).

AMD e infiammazione

L'AMD è una delle patologie retiniche in cui l'infiammazione è più fortemente implicata nella Patogenesi [20]. I cambiamenti degenerativi delle cellule dell'EPR attivano un circolo vizioso che promuove lo sviluppo di un'infiammazione cronica nella retina e coroide. I cambiamenti età-correlati del sistema immunitario contribuiscono poi a questo processo distruttivo alterando le funzioni delle cellule immunitarie. L'aumentato stress ossidativo, la ridotta proteostasi e l'aumento della disfunzionalità sono solo alcuni dei fattori di stress che possono indurre infiammazioni nelle cellule dell'EPR senescente [21-24]. La contemporanea attenuazione dei meccanismi protettivi, come le risposte anti-ossidanti ed i sistemi di riparo del DNA, amplificano ulteriormente gli effetti distruttivi e promuovono la conversione di quella che dovrebbe essere una risposta protettiva in un processo patologico cronico e deleterio.

Elevati processi ossidativi, autofagia stressata, aumentata exocitosi e transitosi nelle cellule dell'EPR si associano alla formazione di drusen tra l'EPR e la membrana di Bruch. Inoltre,

evidenze scientifiche suggeriscono che un'inflammatione cronica di basso livello e l'attivazione del sistema del complemento giocano un ruolo primario nella formazione delle drusen. Il materiale drusenoidale isolato svolge da solo un ruolo pro-infiammatorio attraverso l'attivazione di numerose pathways, tra cui quelle degli inflammasomi.

I recettori dell'immunità umorale vengono attualmente definiti Pattern-Recognition Receptors (PRRs) cioè recettori di riconoscimento di modelli/schemi/situazioni allo scopo di identificare caratteristiche tipiche dei microbi. Sono espressi dalle cellule della "prima linea" di difesa contro le infezioni (macrofagi, monociti, cellule dendritiche, neutrofili) ma anche cellule del sistema immunitario adattativo. Comprendono i Toll-like Receptors (TLRs) e le lectine (CTLs) che analizzano l'ambiente extracellulare e il compartimento endosomico per individuare gli "schemi molecolari" associati alla presenza di patogeni (PAMPs). Esistono anche PRR intracellulari che individuano segnali anomali citoplasmatici consistenti in acidi nucleici anomali liberi (Alu RNA) ed iniziano una segnalazione comune che ha come evento finale l'attivazione dei fattori trascrizionali NFκB e AP-1. Questi fattori a loro volta aumentano la trascrizione dei geni di numerose citochine infiammatorie e dei fattori trascrizionali che stimolano la produzione di interferoni con il fine di produrre una risposta infiammatoria e antivirale. Un tipo particolare di PRRs intracellulari sono i NLR (NOD-like Receptors) che riconoscono i PAMPs e i segnali di pericolo derivanti dall'ospite (i cosiddetti Danger Associated Molecular Patterns). Questi si assemblano in complessi ad alto peso molecolare detti inflammasomi che controllano la maturazione e la secrezione di interleuchine come IL-18 e IL-1β, le quali innescano a loro volta la risposta infiammatoria al danno e infezione. I NLRs comprendono 22 geni umani divisi in tre distinte sottofamiglie: i NOD, i NLRP e IPAF. Gli inflammasomi si assemblano per autooligomerizzazione delle proteine NLRP1, NLRP3, IPAF e AIM, e reclutano le pro-caspasi-1 attivandole mediante autocatalisi proteolitica. A loro volta, le caspasi-1 attivano le citochine infiammatorie come IL-1β e IL-18 che vengono inizialmente sintetizzate come zimogeni inattivi. Quindi gli stimoli infiammatori iniziali inducono l'espressione delle forme inattive di alcune citochine infiammatorie, ma la loro maturazione e secrezione sono controllate dall'inflammasoma.

Nei pazienti con AMD è stata descritta per la prima volta nel 2012 una continua e sistemica attivazione degli inflammasomi che è tossica per l'EPR [25-27]. In tutti gli studi finora pubblicati, NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain-containing protein 3) è il recettore

maggiormente coinvolto nella patogenesi e può essere attivato da diversi agenti: lipofuscina, componenti delle drusen (A2E e fibrille di β -amiloide), iperaccumulo di ferro, Alu RNA, sistema del complemento, raggi UV-B, fumo, ATP extracellulare e ialuronato liberati dalle cellule danneggiate. Una volta attivate dalle caspasi-1, l'IL-1 β promuoverebbe la produzione di VEGF favorendo così le neovascolarizzazioni, mentre l'IL-18, essendo inversamente correlata con la quantità secreta di VEGF, risulterebbe protettiva nei confronti delle forme neovascolari e dannosa per le forme atrofiche [28]. Tuttavia, ulteriori studi dovranno confermare queste prime osservazioni.

Riferimenti bibliografici:

1. Curcio CA, Millican CL. Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 1999; 117:329–39.
2. Zarbin MA. Age-related macular degeneration: review of pathogenesis. *Eur J Ophthalmol.* 1998; 8:199–206.
3. El Baba F, Green WR, Fleischmann J, et al. Clinicopathologic correlation of lipidization and detachment of the retinal pigment epithelium. *Am J Ophthalmol.* 1986; 101:576–83.
4. Bird AC, Bressler NB, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 1995; 39:367–74.
5. Shuman SG, et al. Photoreceptor layer thinning over drusen in eyes with age-related macular degeneration imaged in vivo with spectral-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2009; 116: 488–96.
6. Pieroni CG, Witkin AJ, Ko TH, et al. Ultrahigh resolution optical coherence tomography in non-exudative age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90:191–7.
7. Ho J, Witkin AJ, Liu J, et al. Documentation of intraretinal retinal pigment epithelium migration via high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2011; 118:687–93.
8. Bressler NM, Silva JC, Bressler SB, et al. Clinicopathologic correlation of drusen and retinal pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration. *Retina.* 1994; 14:130–42.
9. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth M. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye.* 1988; 2:552–77.
10. Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH. Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1985; 223:69–76.
11. Löffler KU, et al. Basal linear deposit in the human macula. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1986; 224:493– 501.
12. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth MC. Morphology of early choroidal neovascularisation in age-related macular degeneration. *Eye.* 1997; 11:515–22.
13. Killingsworth MC, Sarks JP, Sarks SH. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye.* 1990; 4:613–21.
14. Grisanti S, Guidry C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:391–405.
15. Lopez PF, et al. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:855–868.
16. Guidry C, Medeiros NE, Curcio CA. Phenotypic variation of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:267–273.
17. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15:178–196.
18. Zanzottera EC, Messinger JD, Ach T, Smith RT, Curcio CA. Subducted and Melanotic cells in advanced age-related macular degeneration are derived from retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56:3269–3278.
19. Zanzottera EC, Messinger JD, Ach T, Smith RT, Freund KB, Curcio CA. The Project MACULA retinal pigment epithelium grading system for histology and optical coherence tomography in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56: 3253–3268.
20. Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, et al. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2016 May; 73(9):1765-86.
21. Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med.* 2012; 33:399–417.
22. Ambati J, et al. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13:438–451.
23. Viiri J, Amadio M, Marchesi N, Hyttinen JM, et al. Autophagy activation clears ELAVL1/HuR-mediated accumulation of SQSTM1/p62 during proteasomal inhibition in human retinal pigment epithelial cells. *PLoS One.* 2013; 8:e69563.
24. Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy.* 2014; 10:1989–2005.
25. Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, Dridi S, et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-

- related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell*. 2012; 149:847–859.
25. Doyle SL, Campbell M, Ozaki E, et al. NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components. *Nat Med*. 2012; 18:791–798.
26. Kauppinen A, Niskanen H, et al. Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cellsimplications for age-related macular degeneration (AMD). *Immunol Lett*. 2012; 147:29–33.

CLASSIFICAZIONE AMD

Nella classificazione dell'AMD la coerenza nella terminologia e la precisa (e la più possibilmente semplice) distinzione dei diversi quadri clinici sono requisiti più che mai indispensabili per stabilire la corretta prognosi e per guidare l'oftalmologo nella scelta di trattamenti profilattici o terapeutici adeguati. In letteratura sono state proposte numerose classificazioni dell'AMD. Una delle più conosciute è quella dell'Age-Related Eye Disease Study (AREDS), basata a sua volta sulla classificazione del Wisconsin Eye Disease Study Group, che ad oggi costituisce la classificazione maggiormente utilizzata negli studi clinici ed epidemiologici [1,2]. Essa comprende 4 categorie:

- Categoria 1 o assente: poche o piccolissime drusen con diametro $< 63 \mu\text{m}$.
- Categoria 2 o forma iniziale (Early AMD): poche drusen di dimensioni intermedie (diametro $63\div 125 \mu\text{m}$).
- Categoria 3 o forma intermedia: numerose drusen di dimensioni intermedie con almeno una di grosse dimensioni (diametro $> 125 \mu\text{m}$) oppure atrofia geografica dell'EPR non coinvolgente il centro della fovea in uno o entrambi gli occhi.
- Categoria 4 o forma avanzata (Late AMD): forma atrofica (atrofia geografica centrale) dell'EPR o della coriocapillare coinvolgente il centro della fovea, oppure neovascolarizzazione coroideale, oppure perdita visiva dovuta ad AMD in almeno un occhio.

Più recentemente è stata proposta una nuova classificazione clinica che, assieme alle dimensioni delle drusen, tiene conto anche della presenza concomitante delle anomalie pigmentarie dell'EPR [3]. Clinicamente, le dimensioni delle drusen si possono confrontare con il calibro delle vene situate al bordo del disco ottico (approssimativamente pari a $125 \mu\text{m}$). Sulla base delle loro dimensioni, quindi, le drusen si possono suddividere in:

- drupeletes (small drusen): diametro $< 63 \mu\text{m}$ (metà del calibro delle vene al bordo del disco ottico);
- drusen intermedie (medium): diametro $\geq 63 \mu\text{m}$ e $< 125 \mu\text{m}$;
- grandi drusen (large): diametro $\geq 125 \mu\text{m}$.

Le anomalie pigmentarie dell'EPR sono frequentemente associate alle drusen in tutte le forme di AMD. Si definiscono come aree di iperpigmentazione o ipopigmentazione (focali o diffuse)

presenti entro 2 diametri papillari (3000 µm) dal centro della macula in occhi con drusen ≥ 63 µm di diametro, e non dovute ad altre cause. Queste anomalie pigmentarie associate alle dimensioni delle drusen rappresentano un fattore di rischio aggiuntivo per la progressione di AMD avanzata a 5 anni. In particolare, questo rischio sale al 47,3% in caso di concomitanti large drusen e anomalie pigmentarie bilaterali. Un'iperpigmentazione focale può essere visibile oftalmoscopicamente come conseguenza di:

- un aumentato contenuto intra-cellulare di melanina oppure di materiale fagocitato dalla perdita delle cellule adiacenti;
- una proliferazione delle cellule dell'EPR;
- una migrazione di cellule contenenti pigmento (cellule dell'EPR oppure macrofagi che hanno fagocitato melanina) nella retina neuro-sensoriale.

Focali aree di ipopigmentazione possono formarsi anche indipendentemente dalla presenza di drusen per la focale perdita dell'EPR o per il ridotto numero di granuli intra-cellulari di melanina.

La presenza di aree di iperpigmentazione focale costituisce un forte fattore di rischio associato allo sviluppo di neovascolarizzazione coroideale, mentre la presenza di aree di

ipopigmentazione focale si associa più frequentemente allo sviluppo di atrofia geografica.

L'International Age Related Macular Degeneration Epidemiological Study [4] ha suddiviso invece l'AMD in due forme:

- AMD secca (dry) o atrofia geografica;
- AMD umida (wet o neovascolare o essudativa o disciforme).

Tuttavia molti pazienti vanno incontro a processi essudativi senza necessariamente manifestare la presenza di neovasi. Per questo motivo, Lawrence Yannuzzi ha proposto una suddivisione dell'AMD in tre grandi gruppi:

- 1) AMD atrofica (né essudativa né neovascolare), che comprende la distrofia drusenoide (denominazione usata comunemente quando le drusen rappresentano la lesione predominante), le anomalie pigmentarie e tutte le forme di atrofia dell'EPR e della coroide.
- 2) AMD essudativa, che comprende i distacchi dell'EPR (sierosi avascolari e di tipo drusenoide) e i distacchi neurosensoriali pseudovitelliformi (associati alle drusen cuticulari o ai depositi drusenoidi sottoretinici).

3) AMD neovascolare, che comprende tutte le condizioni legate all'insorgenza di proliferazione di neovasi retinici e coroideali [5]. Le drusen possono ovviamente associarsi a qualsiasi forma di AMD.

Riferimenti bibliografici:

1. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006; 113:260–6.
2. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS report no. 17. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123:1484 –98.
3. Ferris FL III, Wilkinson CP, Bird A, et al. Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2013; 120:844–851.
4. International ARM Epidemiological Study Group. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 1995; 39:367–74.
5. Yannuzzi L. *The Retinal Atlas*. 2010, Elsevier Limited.

SCOPO DELLO STUDIO

Molti studi negli ultimi anni hanno dimostrato l'importanza delle cellule mesenchimali staminali e del loro utilizzo nella medicina rigenerativa allo scopo di sviluppare nuove terapie nel trattamento di patologie che comportano la perdita parziale o totale della funzionalità di un organo o di un tessuto. Le cellule staminali isolate da tessuti adulti potrebbero essere utilizzate a tale scopo, in quanto sono ad alto potenziale proliferativo, differenziativo ed a basso rischio di trasformazione neoplastica.

Ciò rappresenta una promessa per fornire soluzioni terapeutiche alle tante gravi patologie che ancora non hanno trovato adeguate risposte, includendo la degenerazione maculare età correlata. Tale patologia comporta danni all'Epitelio Retinico Pigmentato (EPR), tessuto non proliferante nell'adulto, con morte delle cellule mature dell'EPR che comporta determinano la perdita della vista totale o parziale in modo permanente.

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio, hanno portato all'isolamento, alla caratterizzazione e al differenziamento di cellule staminali mesenchimali isolate dall'Epitelio Retinico Pigmentato RPESCS).

Tali cellule però, *in vivo*, in corso di AMD, non sono in grado di differenziare in cellule mature dell'EPR e riparare o ridurre il danno nell'EPR stesso. Questo probabilmente è dovuto alle alterazioni delle capacità proliferative e differenziative delle cellule mesenchimali staminali età/correlate, in conseguenza della risposta delle cellule dell'organismo dell'instaurarsi di un ambiente pro-infiammatorio cronico che caratterizza il soggetto anziano.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indurre le cellule staminali mesenchimali isolate dall'epitelio retinico pigmentato in senescenza replicativa. Caratterizzare l'effettiva acquisizione del fenotipo senescente in tali cellule quali: lunghezza dei telomeri, capacità replicativa, espressione della beta-galattosidasi come marker di senescenza ed analizzare le alterazioni morfologiche.

Confrontando cellule RPESCs giovani (passaggio3) con le stesse a passaggio 16 (senescenti), in base alla capacità di esprimere marker di senescenza, di staminalità, EPR tessuto/specifici e di acquisizione del fenotipo pro-infiammatorio cronico età/correlato ci consente di determinare il grado di alterazione delle capacità proliferative e differenziative.

Questo studio può migliorare la conoscenza dei meccanismi molecolari che comportano un alterazione delle capacità proliferative e differenziative delle RPESCs autologhe e identificare la risposta di tali cellule in un microambiente caratterizzato da uno stato pro-infiammatorio cronico.

Materiali e Metodi

COLTURA DELLE RPESCs.

Le cellule mesenchimali staminali dell'epitelio retinico pigmentato (RPESCs), sono state isolate, caratterizzate e mantenute in coltura come già descritto nel nostro precedente lavoro [25]. Le cellule RPESCs sono state mantenute in coltura utilizzando l'RPE medium [MEM-alpha modificato aggiungendo L-glutamina 2mM, penicillina/streptomicina (1:100), 1% di Sodio Piruvato, 10 % di siero fetale bovino], con utilizzo di Taurina, idrocortisone, triiodotironina e N1 supplement (tutto ottenuta dalla Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Le cellule sono state incubate a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni.

La senescenza replicativa è stata indotta coltivando le cellule dal passaggio 3 (RPESCs giovani) al passaggio 18 (RPESCs senescenti). Le cellule vitali e le cellule morte sono state contate ad ogni passaggio analizzandole con il colorante trypan blue ed utilizzando il contatore automatico (tutto Thermo Fisher, Milano, Italia). Il valore di Population doublings (PD), come indice di proliferazione, è stato ottenuto tramite la seguente formula: $PDs: \ln(\text{collected cell number}/\text{seeded cell number})$.

ANALISI DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI.

La lunghezza dei telomeri è stata identificata utilizzando il Relative Human Telomere Length quantification qPCR assay kit (Sciencell Research Laboratories, San Diego, California) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA SA- β -GALATTOSIDASI (SA- β -GAL).

L'espressione del marker senescenza/associato SA- β -GAL è stato effettuato utilizzando il Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Leiden The Netherlands), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

SAGGIO DELL'IMMUNOFLUORESCENZA PER LA PHALLOIDIN

Il saggio per la Phalloidin Red è stato effettuato su cellule RPESCs ai primi passaggi (passaggio 3), ai passaggi intermedi (passaggio 11 e 13) e sulle cellule senescenti (passaggio 16). Le cellule sono state fissate su vetrino utilizzando la PFA al 4% per 30 minuti, il blocco dei siti aspecifici è stato fatto utilizzando la BSA (Bovine Serum Albumine) al 4% in PBS per 30 minuti ed in fine permeabilizzate in PBS contenente Tryton X100 allo 0,2% per 10 minuti (tutti i reagenti ottenuti dalla Sigma-Aldrich). Di seguito la colorazione con TRIC-labeled phalloidin (Sigma Aldrich) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. I nuclei delle cellule sono stati evidenziati utilizzando l'Hoechst solution (Molecular Probe, Thermo Fisher) per 10 minuti. I vetrini sono stati montati con il copri oggetto utilizzando il Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

SAGGIO ELISA PER IDENTIFICARE LA CONCENTRAZIONE DELLE CITOCHINE PRO-ANTI

INFIAMMATORIE.

La concentrazione delle citochine pro- anti- infiammatorie e dei fattori di crescita relativi al fenotipo senescente secretorio (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, INF- γ , TNF- α TGF β -) è stata misurata nel soprannatante utilizzando uno specifico kit della ditta Qiagen seguendo il protocollo fornito dalla ditta stessa (Multi-Analyte ELISArray kit, Qiagen, Vienna Austria). La densità ottica a 450 nm è stata determinata utilizzando il Multiscan Go (Thermo Fisher). La concentrazione delle citochine è stata identificata in pg/ml per comparazione con l'assorbanza ottenuta dagli standard. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE.

L'RNA totale è stato isolato dai pellet cellulari utilizzando il kit Perfect Pure RNA Cell and Tissue (5 Prime, Hamburg Germany). La concentrazione e il grado di purezza dell'RNA è stato determinato utilizzando il NanoDrop One Spectrophotometer (Nano Drop Technologies inc., Wilmington DE, USA). L'RNA estratto è stato conservato a -80°C fino al suo utilizzo. Circa 300 ng dell'RNA è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando il Go Script Reverse Transcription System (Promega, Milano, Italia).

SAGGIO DELLA REAL TIME PCR QUANTITATIVA (Q-RT-PCR).

La Real time PCR, per identificare il grado di espressione di geni specifici, è stata allestita utilizzando il Master Cycle (Eppendorf, Hamburg, Germany) e la EVA Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Milano, Italia), seguendo il protocollo definito dalla ditta produttrice. Tutti i campioni sono stati testati in triplicato e il risultato validato confrontando l'espressione dei geni di interesse con quella dei geni di riferimento quali β -actin e RPL0. Tutte le sequenze dei primers utilizzati sono riportati nei lavori Mariotti C 2015 e Amadori S 2010.

Il livello di espressione genica è stato riportato utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = Ct$ (gene di interesse) - Ct (β -actin o/e RPL0) e $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct$ (RPESCs senescenti) - ΔCt (RPESCs giovani). I valori di espressione genica relativa sono stati riportati come media +/- la deviazione standard di tre indipendenti esperimenti.

PCR ARRAY.

I PCR Arrays (consentono di analizzare simultaneamente l'espressione di oltre 90 geni coinvolti in specifici processi cellulari. Su ciascun pozzetto della piastra da 96 geni, sono presenti ("spottati") i primers specifici per un determinato gene del pathway di interesse.

Dopo aver retro trascritto 1 μ g di RNA totale in cDNA utilizzando "RT² First Strand Kit" (QIAGEN), esso viene aggiunto alla RT² qPCR Master Mixes (SA-BIOSCENCES), e distribuita sulla 96 wells della Human Senescence RT² Profiler™ PCR Array (SA-BIOSCENCES), seguendo il protocollo della ditta fornitrice. Abbiamo utilizzato l'Array per l'espressione di mRNA relativi a circa 84 geni correlati con la senescenza La quantità del trascritto del gene di interesse è normalizzata rispetto alla quantità del trascritto di un gene housekeeping, GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi o RPLP0 (ribosomal protein, large, P0). Al termine della reazione di Real Time PCR, cambiamenti nell'espressione relativa dei geni sono stati analizzati tramite l'equazione $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = Ct$ (gene di interesse) - Ct (β -actin o/e RPL0) e $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct$ (RPESCs senescenti) - ΔCt (RPESCs giovani).

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE ED ANALISI DEL LORO LIVELLO DI ESPRESSIONE TRAMITE WESTERN BLOT.

Le proteine sono state estratte da pellets cellulari di circa 1×10^6 cellule/campione, utilizzando il RIPA Buffer con aggiunta degli inibitori delle proteasi (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA). I campioni sono stati lisati nello specifico buffer per 45 minuti a 4°C , poi centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C . Il sovranatante contenente le proteine è stato conservato a -20°C . Utilizzando il sistema Mini Gel della Thermo Fisher, i campioni sono stati denaturati, caricati su gel ed è stata effettuata la corsa elettroforetica, il successivo trasferimento delle proteine su membrana di cellulosa e il blocco dei siti aspecifici seguendo il protocollo della ditta produttrice. La membrana è poi incubata con gli anticorpi primari e secondari (anti-p21, anti-p53, anti-GAPDH e goat-anti-mouse, forniti dalla Santa Cruz Biotechnology). La rilevazione delle specifiche bande sulla membrana è stata effettuata con il Clarity Western ECL substrate Kit (Bio-Rad). Il segnale è stato identificato e quantizzato utilizzando l'Alliance Mini (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK), utilizzando il GAPDH come segnale di controllo ed analizzando i livelli di espressione tramite il Software UVITEC. L'intensità della è stata comparata con il controllo negativo e le variazioni di espressione riportate in percentuale.

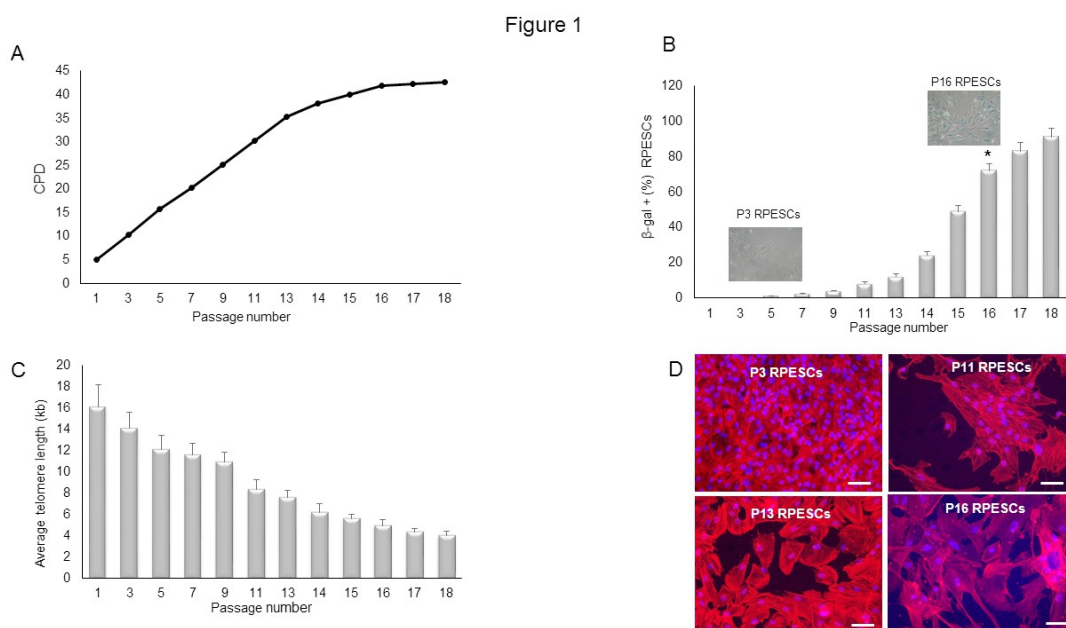
ANALISI STATISTICA.

Il risultati sono espressi sempre come media \pm deviazione standard di tre indipendenti esperimenti. Il paired-sample t-test è stato identificato come test statistico e il software SPSS 20.0 è stato utilizzato per tutte le analisi. I valori di $P \leq 0.05$ sono stati considerati come significativi.

RISULTATI

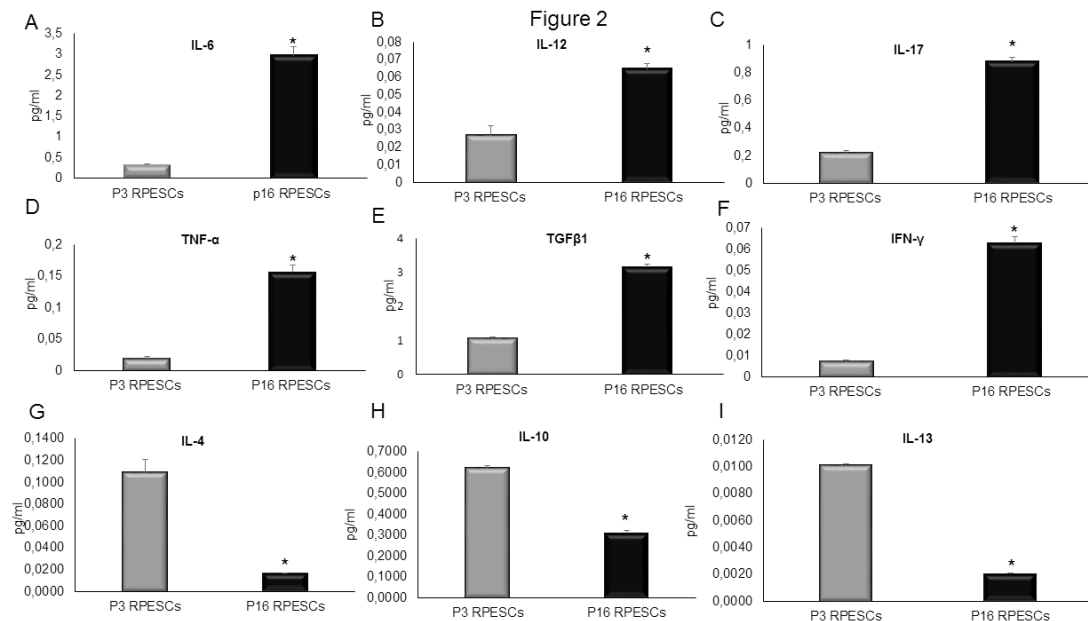
Senescenza replicativa delle cellule mesenchimali dell'EPR umano (RPESCs)

Le RPESC sono state isolate, caratterizzate e coltivate come descritto in un precedente lavoro del nostro gruppo [25]. Le cellule sono state isolate da un occhio sano da un donatore di 21 anni. Tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando 3 diversi lotti di cellule a crescita esponenziale al terzo passaggio (confluenza circa il 75%) in cui è stata indotta la senescenza. La senescenza replicativa è stata documentata al sedicesimo passaggio (P16) dalla proliferazione arrestata, dall'aumento dell'attività β -galattosidasi (SA β -gal) e dalla riduzione della lunghezza dei telomeri. In particolare, il tasso di proliferazione delle RPESC è aumentato bruscamente da P2 a P11 e si è stabilizzato a P13; la crescita si è fermata al P18 (Figura 1 A). Come illustrato nella Figura 1 B, la proporzione di cellule β -gal-positive è aumentata significativamente ($P < 0,05$) da $6 \pm 0,04\%$ nelle cellule giovani (P3-P6) a $80 \pm 12,1\%$ nelle cellule senescenti (P15-P18). La lunghezza dei telomeri è diminuita da 14 kb a P3 a 4 kb a P16 (Figura 1 C). La colorazione TRIC-phalloidin ha dimostrato che le RPESC senescenti avevano una morfologia più piatta e allargata rispetto alle cellule giovani (Figura 1 D).



Acquisizione del fenotipo secretorio delle RPESC senescenti

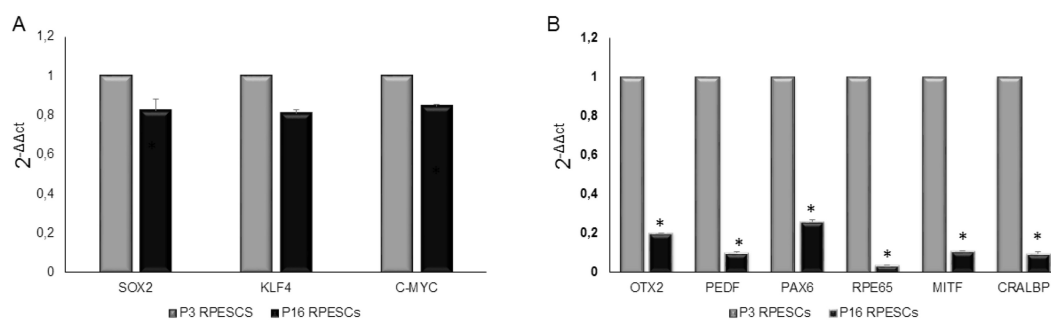
L'acquisizione di SASP da RPESC senescente è stata determinata analizzando un gruppo di molecole proinfiammatorie: interleuchina (IL)-6, interferone (INF) - γ , TNF- α , IL-12 e fattore di crescita trasformante β (TGF β)1 - nelle RPESC giovani (P3) e senescenti (P16). L'analisi è stata estesa mediante determinazione dei livelli delle molecole anti-infiammatorie IL-4, IL-10 e IL-13. I risultati di ELISA hanno indicato che le RPESC senescenti secernono livelli più elevati di IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α , TGF β 1 e INF- γ rispetto alle giovani RPESC (Figura 2 AF), riflettendo uno stato proinfiammatorio e acquisizione di SASP. Hanno anche secreto livelli più bassi di diverse molecole anti-infiammatorie, tra cui IL-4, IL-10 e IL-13, rispetto ai giovani RPESC (Figura 2 G-I).



Espressione di staminalità, riprogrammazione e geni specifici per RPE in RPESC giovani e senescenti

Nel nostro studio abbiamo studiato l'espressione di geni specifici per RPE (OTX2, PEDF, PAX6, RPE65, MITF e CRALBP), staminalità e riprogrammazione (SOX2, KLF4 e c-MYC) nelle RPESC giovani e senescenti mediante qRT-PCR. Come mostrato nella Figura 3A, i due gruppi di cellule hanno mostrato livelli di espressione simili di SOX2, KLF4 e c-MYC, mentre i RPESC senescenti hanno mostrato una riduzione dell'espressione di OTX2, PEDF, PAX6, RPE65,

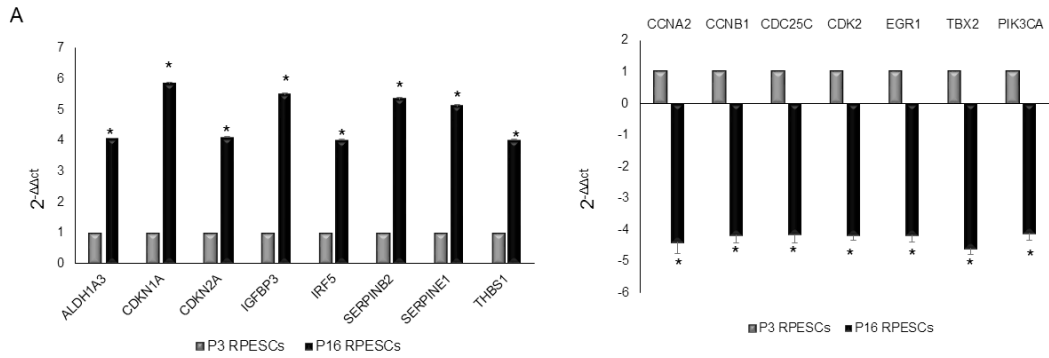
MITF e CRALBP (Figura 3B).



Determinazione dei livelli di mRNA di geni associati alla senescenza in RPESC giovani e senescenti con PCR Array

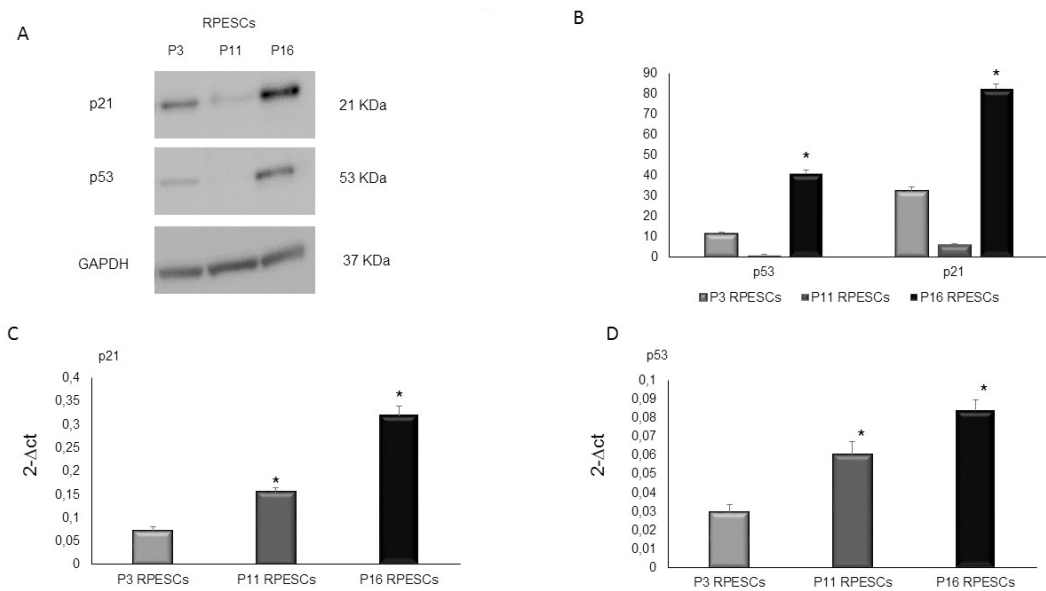
L'espressione dei geni associati alla senescenza in RPESC senescenti e giovani è stata misurata analizzando i loro livelli di mRNA utilizzando Cellular Senescence RT2 Profiler PCR Array (PAHS, Qiagen). La gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e la proteina ribosomale, grande, P0 (RPLP0) sono stati usati come controlli interni per normalizzare i livelli di espressione genica.

Quindici geni correlati alla senescenza cellulare umana erano espressi quattro volte di più nelle RPESC senescenti rispetto a quelle giovani: 8 geni, ALDH1A3 (aldeide deidrogenasi 1 membro della famiglia A3), CDKN1A (inibitore della chinasi dipendente dalla ciclina 1A, p21), CDKN2A (inibitore della chinasi ciclina-dipendente 2A, P16INK4), IGFBP3 (proteina legante il fattore di crescita insulino-simile 3), IRF5 (fattore regolante interferone 5), SERPINB2 (membro 2 della famiglia Serpin, PAI2), SERPINE1 (membro 1 della famiglia serpin, PAI1) e THBS1 (trombospondina 1), erano sovraregolati (Figura 4A), mentre 7 geni, CCNA2 (ciclina A2), CCNB1 (ciclina B1), CDC25C (ciclo di divisione cellulare 25C), CDK2 (chinasi ciclina-dipendente 2), EGR1 (Early growth response 1), TXB2 (T-box 2) e PIK3CA (fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato 3-kinasi subunità alfa catalitica), erano sottoregolati (Figura 4B).



Espressione della proteina p21 e p53 in RPESC giovani e senescenti

L'analisi Western blot ha dimostrato che le proteine p21 e p53 erano significativamente sovraregolate in senescenza rispetto alle RPESC giovani (Figura 5A) e che nelle cellule a passaggio intermedio (P11) erano sottoregolate rispetto a RPESC sia giovani che senescenti. I risultati dell'analisi densitometrica e della normalizzazione all'espressione di GAPDH (Figura 5B) sono stati confermati mediante PCR real time, che ha dimostrato che l'mRNA di p21 e p53 era sovraregolato in senescenza (P16) rispetto alle RPESC giovani (P3) (Figura 5 C e D). Al contrario, le RPESC al P11 hanno mostrato un maggiore mRNA di p21 e p53 e livelli proteici inferiori rispetto ai giovani RPESC (P3).



DISCUSSIONE

L'infiammazione legata all'età è un importante fattore di rischio nel processo di invecchiamento. L'AMD è una causa molto comune e irreversibile di perdita visiva grave negli anziani nei paesi sviluppati [1]. Ha un'eziologia multifattoriale, in cui l'età avanzata e la predisposizione genetica sono i fattori di rischio più forti [2,3]. Sebbene i meccanismi coinvolti nella sua patogenesi non siano chiari, sono stati segnalati processi infiammatori che svolgono un ruolo chiave nel suo sviluppo e nella progressione, come nel caso di altre patologie legate all'età [4]. Dati recenti hanno fornito supporto all'ipotesi che le cellule senescenti si accumulino nell'epitelio pigmentato del primate [5]. Le cellule senescenti si accumulano con l'invecchiamento nei tessuti e negli organi umani, favorendo lo sviluppo e la progressione delle patologie dell'invecchiamento; l'esposizione delle cellule a stress ricorrenti o cronici, incluso lo stress ossidativo, può anche determinare il loro accumulo [6, 7]. Il nostro gruppo ha recentemente caratterizzato una popolazione simile a cellule staminali derivata dall'RPE umano [8] come RPESC (cellule progenitrici RPE). In particolare, le MSC entrano in senescenza replicativa dopo un numero limitato di divisioni cellulari, un fatto che deve essere considerato in esperimenti che coinvolgono colture cellulari, specialmente nelle indagini sugli approcci di medicina rigenerativa. Gli effetti dell'invecchiamento, della senescenza e dello stress ossidativo possono indurre la perdita della differenziazione e del potenziale proliferativo nelle MSC adulte, compresi le RPESC [8]. Le cellule senescenti acquisiscono il SASP e rilasciano varie proteine, incluse le molecole proinfiammatorie, contribuendo così alle ARD e alla morbilità associata [9]. Sebbene le RPESCs umani siano state identificate come una popolazione di cellule staminali, non sono in grado di differenziarsi in cellule RPE mature, sostituendo quelle perse a causa di AMD. Nel nostro studio precedente abbiamo isolato, coltivato e caratterizzato RPESCs dal RPE umano e studiato il loro potenziale di differenziazione [10]. Nel presente lavoro, l'induzione della senescenza replicativa in RPESC ha portato a riduzione del potenziale di differenziazione proliferativa e multilineare, acquisizione di SASP e rilascio di proteine infiammatorie che potrebbero essere coinvolte nello sviluppo e nella progressione dell'AMD. Le RPESC senescenti mostravano un accorciamento della lunghezza dei telomeri e una caratteristica morfologia ampia e appiattita. Queste cellule hanno anche acquisito la colorazione per SA β -gal

e hanno mostrato sovraregolazione della proteina p21 e p53 rispetto alle giovani RPESC. Le protein p21 e p53 sono componenti fondamentali del meccanismo di senescenza, in quanto svolgono un ruolo fondamentale come regolatori delle funzioni delle cellule staminali [11]. Le RPESC senescenti esprimevano livelli più alti di quei mRNA associati ai geni della senescenza rispetto alle loro controparti giovani. Questi geni, che includono CDKN1A (p21), IGFBP3, SERPINE1 e SERPINB2, sono stati implicati nel mantenimento dei meccanismi di senescenza cellulare replicativa e indotta da stress [12, 13]. Inoltre, SERPINE1 (PAI1) è responsabile della diminuzione della degradazione della matrice extracellulare (ECM) attraverso l'inibizione dell'attivazione della metalloproteasi, un meccanismo che può essere coinvolto nell'accumulo di ECM nel RPE dei pazienti affetti da AMD [14]. L'arresto irreversibile della crescita delle RPESC senescente è stato confermato dalla riduzione dell'espressione dei geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, inclusi CCNA2, CCNB1 e CDK2 [39, 40]. È stato riportato che i fattori di trascrizione SOX2, KLF4 e c-MYC svolgono un ruolo regolatore nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali. È interessante notare che questi geni specifici delle cellule staminali hanno mostrato un livello di espressione simile in RPESCs giovani e senescenti, mentre i geni specifici per RPE (RPE65, MITF, OTX2, PAX6, CRALBP e PEDF) erano sottoregolati in RPESC senescenti. Questi dati suggeriscono che nonostante la loro perdita di potenziale di differenziazione durante la senescenza, la capacità di riprogrammazione di queste cellule è preservata. Le cellule senescenti sono metabolicamente attive e rilasciano alte concentrazioni di citochine proinfiammatorie, chemochine, fattori di crescita e proteasi nel mezzo di coltura [15]. Le RPESCs senescenti (P16) secernono concentrazioni più alte di IL-6, IL-12, IL-17, INF- γ , TNF- α e TGF β 1 rispetto alle RPESC giovani. IFN- γ , TNF- α e IL-17 sono coinvolti nelle vie di risposta infiammatoria Th1 e Th17 [16]. Un recente studio del compartimento delle cellule T CD4 + nei pazienti con AMD ha scoperto che queste cellule svolgono un ruolo proinfiammatorio IFN- γ - e IL-17-dipendente [17]. È probabile che tali citochine proinfiammatorie svolgano un ruolo chiave nella patogenesi dell'AMD e il loro effetto potrebbe essere rafforzato da RPESC senescenti. È interessante notare che le citochine proinfiammatorie possono indurre l'attivazione della risposta allo stress antiossidante nelle cellule mature di RPE, come riportato in uno studio in cui sono state attivate vie antiossidanti protettive in cellule RPE mature trattate con agenti ossidanti e coltivate con terreno condizionato con cellule mononucleate di sangue periferico o con IFN- γ / TNF- α [18]. Inoltre, le citochine proinfiammatorie derivate da cellule T

erano in grado di indurre nelle cellule mature di RPE la produzione e la secrezione di più chemochine, che possono influenzare l'omeostasi immunitaria nella retina [19]. Infatti, vi sono prove crescenti di un ruolo del sistema immunitario adattativo nella patogenesi dell'AMD neovascolare. Diversi studi hanno affrontato il ruolo cruciale dei macrofagi nello sviluppo della neovascolarizzazione coroideale [20, 21, 22] e dei cambiamenti atrofici nella retina AMD [23], ed è inoltre stata descritta un'associazione tra AMD e attività sistemica dei leucociti [24]. Singh e collaboratori hanno dimostrato che il decremento correlato all'età nella frequenza Th1 osservato nei controlli sani è assente nei pazienti affetti da AMD, poiché la percentuale di cellule T CD4 + che esprimono CCR6 era significativamente ridotta nei pazienti con AMD non essudativa ed essudativa [25]. Ci sono anche evidenze che l'espressione di CCR2 nei monociti circolanti possa avere un ruolo nello sviluppo dell'AMD neovascolare [26]. Inoltre, sono stati descritti una differenziazione e un invecchiamento delle cellule T significativamente accelerati nel compartimento delle cellule T CD8 + dei pazienti con AMD neovascolare [27]. Per quanto riguarda il fenotipo pro / antinfiammatorio di RPESC senescenti, il presente studio ha rilevato una significativa sottoregolazione delle citochine anti-infiammatorie IL-4, IL-10 e IL-13 in queste cellule. Un'aumentata o analoga espressione di queste citochine è stata riportata nel siero e nell'umore acqueo di pazienti con AMD rispetto ai controlli [28, 29], probabilmente a causa dell'acquisizione da parte di RPESC senescenti di uno specifico fenotipo associato alla senescenza proinfiammatoria e alla downregulation di citochine anti-infiammatorie in vitro. Questo studio è preliminare e come tale soffre di alcune limitazioni. La senescenza replicativa è stata indotta in vitro in RPESC isolate dall'occhio di un singolo giovane donatore sano. Ci si aspetta che l'esame di campioni da pazienti affetti da AMD invecchiata e soggetti sani fornisca informazioni sullo stato proinfiammatorio senescente di RPESC negli anziani e sul loro ruolo nella patogenesi della malattia. Sarebbe anche interessante studiare gli effetti degli agenti ossidanti su RPESC giovani e senescenti dal RPE maturo in termini di induzione dell'apoptosi o attivazione di vie anti-ossidanti anti-infiammatorie. Complessivamente, i risultati attuali indicano che i RPC possono subire una senescenza replicativa, che influisce sulla loro capacità di proliferazione e differenziazione. Inoltre, gli RPESC senescenti hanno acquisito il SASP, che probabilmente altera il microambiente infiammatorio del RPE durante lo sviluppo e la progressione di AMD. Una maggiore comprensione del ruolo di RPESCs nella patogenesi di AMD è necessaria per trovare i mezzi per controllare la malattia e modulare la sua

progressione.

Riferimenti bibliografici:

1. Reibaldi M, Longo A, Pulvirenti A, Avitabile T, Russo A, Cillino S, Mariotti C, Casuccio A. Geo-Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration: New Clues into the Pathogenesis. *Am J Ophthalmol*. 2016; 161:78-93
2. [DeAngelis MM](#), [Owen LA](#), [Morrison MA](#), [Morgan DJ](#), [Li M](#), [Shakoor A](#), [Vitale A](#), [Iyengar S](#), [Stambolian D](#), [Kim IK](#), [Farrer LA](#). Genetics of age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet*. 2017; 26(R1):R45-R50. [3] [Al-Zamil WM](#), [Yassin SA](#). Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging*. 2017; 12:1313-1330.
4. Nowak JZ. AMD--the retinal disease with an unprecised etiopathogenesis: in search of effective therapeutics. *Acta Pol Pharm*. 2014; 71:900-16.
5. Mishima K, [Handa JT](#), [Aotaki-Keen A](#), [Lutty GA](#), [Morse LS](#), [Hjelmeland LM](#). Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:1590-1593.
6. [Childs BG](#), [Durik M](#), [Baker DJ](#), [van Deursen JM](#). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. 2015; 21:1424-35.
7. [Naylor RM](#), [Baker DJ](#), [van Deursen JM](#). Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin Pharmacol Ther*. 2013; 93:105-116.
8. [Denu RA](#), [Hematti P](#). Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; Epub 2016 Jun 16.
9. [He S](#), [Sharpless NE](#). Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017; 169:1000-1011.
10. [Mariotti C](#), [Lazzarini R](#), [Nicolai M](#), [Saitta A](#), [Orsini E](#), [Orciani M](#), [Di Primio R](#). Comparative study between amniotic-fluid mesenchymal stem cells and retinal pigmented epithelium (RPE) stem cells ability to differentiate towards RPE cells. *Cell Tissue Res*. 2015; 362:21-31.
11. [Zon LI](#). Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*. 2008; 453:306-313
12. [Elzi DJ](#), [Lai Y](#), [Song M](#), [Hakala K](#), [Weintraub ST](#), [Shiio Y](#). Plasminogen activator inhibitor 1--insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:12052-12057.
13. [Zhu Y](#), [Tchkonia T](#), [Pirtskhalava T](#), [Gower AC](#), [Ding H](#), [Giorgadze N](#), [Palmer AK](#), [Ikeno Y](#), [Hubbard GB](#), [Lenburg M](#), [O'Hara SP](#), [LaRusso NF](#), [Miller JD](#), [Roos CM](#), [Verzosa GC](#), [LeBrasseur NK](#), [Wren JD](#), [Farr JN](#), [Khosla S](#), [Stout MB](#), [McGowan SJ](#), [Fuhrmann-Stroissnigg H](#), [Gurkar AU](#), [Zhao J](#), [Colangelo D](#), [Dorronsoro A](#), [Ling YY](#), [Barghouthy AS](#), [Navarro DC](#), [Sano T](#), [Robbins PD](#), [Niedernhofer LJ](#), [Kirkland JL](#). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*. 2015; 14:644-58.
14. [Kim J](#), [Kim Y](#), [Choi H](#), [Kwon A](#), [Jekarl DW](#), [Lee S](#), [Jang W](#), [Chae H](#), [Kim JR](#), [Kim JM](#), [Kim M](#). Ubiquitin C decrement plays a pivotal role in replicative senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Death Dis*. 2018; 9:139.
15. [Rodier F](#). Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Methods Mol Biol*. 2013; 965:165-73.
16. [Leung S](#), [Liu X](#), [Fang L](#), [Chen X](#), [Guo T](#), [Zhang J](#). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol*. 2010; 7:182-189.
17. Chen J, [Wang W](#), [Li Q](#). Increased Th1/Th17 Responses Contribute to Low-Grade Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 44:357-367.
18. [Juel HB](#), [Faber C](#), [Svendsen SG](#), [Vallejo AN](#), [Nissen MH](#). Inflammatory cytokines protect retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death. *PLoS One*. 2013. 8(5):e64619.
19. [Juel HB](#), [Faber C](#), [Udsen MS](#), [Folkersen L](#), [Nissen MH](#). Chemokine expression in retinal

- pigment epithelial ARPE-19 cells in response to coculture with activated T cells. 2012. [Invest Ophthalmol Vis Sci](#). 53:8472-80.
20. Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, et al. The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol*. 2003. 74: 25–32.
21. McLeod DS, Bhutto I, Edwards MM, Silver RE, Seddon JM, Luty GA. Distribution and Quantification of Choroidal Macrophages in Human Eyes With Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016. 57: 5843–55.
22. Camelo et al. Thinning of the RPE and choroid associated with T lymphocyte recruitment in aged and light-challenged mice. *Mol Vis*. 2015. 21:1051-9.
23. Sennlaub et al. CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol Med*. 2013. 5:1775-93.
24. Subhi Y, Lykke Sørensen T. New neovascular age-related macular degeneration is associated with systemic leucocyte activity. *Acta Ophthalmol*. 2017. 95: 472–80.
25. Singh et al. Systemic frequencies of T helper 1 and T helper 17 cells in patients with age-related macular degeneration: A case-control study. *Sci Rep*. 2017. 7:605.
26. Subhi et al. Altered proportion of CCR2+ and CX3CR1+ circulating monocytes in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Clin Exp Ophthalmol*. 2018 Jan 23.
27. Subhi et al. T-cell differentiation and CD56+ levels in polypoidal choroidal vasculopathy and neovascular age-related macular degeneration. *Aging (Albany NY)*. 2017. 9:2436-2452.
28. [Nassar K](#), [Grisanti S](#), [Elfar E](#), [Lüke J](#), [Lüke M](#), [Grisanti S](#). Serum cytokines as biomarkers for age-related macular degeneration. [Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol](#). 2015. 253:699-704.
29. [Spindler J](#), [Zandi S](#), [Pfister IB](#), [Gerhardt C](#), [Garweg JG](#). Cytokine profiles in the aqueous humor and serum of patients with dry and treated wet age-related macular degeneration. [PLoS One](#). 2018. 13(8):e0203337.