



Università di Pisa

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area
Critica
Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle nuove Tecnologie in Medicina
e Chirurgia**

Scuola di Specializzazione in Farmacologia

Direttore:

Chiar.mo Professore G.U. Corsini

**Farmacogenetica dei farmaci anti-VEGF in
pazienti affetti da maculopatia degenerativa
legata all'età**

Relatore

Dott. Guido Bocci

Candidata

Dott.ssa Bastianina Canu

Anno Accademico 2012-2013

Sommario

RIASSUNTO.....	3
INTRODUZIONE.....	5
PAZIENTI E METODI.....	54
ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	66
RISULTATI	67
DISCUSSIONE.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	76
RINGRAZIAMENTI	87

RIASSUNTO

La degenerazione maculare senile (DMS) è diventata la maggiore causa di ipovisione negli individui al di sopra dei 65 anni nei Paesi industrializzati. Dal punto di vista clinico, caratteristica è la comparsa delle drusen, accumuli di materiale ialino, che si evolvono nella forma essudativa-emorragica (umida) e atrofica (secca). La forma umida è caratterizzata dalla proliferazione di nuovi vasi nella membrana sottoretinica, promossa da numerosi regolatori proangiogenici fra i quali gioca un ruolo determinante il fattore di crescita dell'endotelio vascolare VEGF-A.

Obiettivi dello studio: Lo scopo del presente studio è di analizzare, per la prima volta, tra i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) del VEGF-A e la risposta precoce al trattamento con Ranibizumab intravitreale nella Degenerazione Maculare Senile di tipo essudativo.

Pazienti e metodi: Studio di coorte prospettico. 64 pazienti con Degenerazione Maculare Senile essudativa naive da trattare con Ranibizumab intravitreale sono stati arruolati. Le caratteristiche della CNV sono state analizzate con fluoroangiografia e lo spessore foveale è stato misurato attraverso tomografia ottica computerizzata (OCT). L'acuità visiva è stata quantificata con la carta ETDRS. I pazienti sono stati sottoposti ad una loading phase di 3 iniezioni mensili di Ranibizumab, un anticorpo monoclonale anti-VEGF-A. Gli SNPs analizzati sono: -2578A/C e -1154G/A. È stato eseguito un prelievo di 5 ml di sangue intero dal quale è stato estratto il DNA genomico utilizzando QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Sono stati analizzati 2 polimorfismi a singolo nucleotide presenti sul gene del VEGF-A, che sembrerebbero essere responsabili della variabile produzione della sua proteina. I polimorfismi presi in esame sono: -2578 A/C e -1154 A/G; è stata eseguita la discriminazione allelica in Real-Time PCR su piattaforma Taqman. I risultati ottenuti sono stati analizzati usando il software GraphPad Prism (versione 5.0; GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA). L'equilibrio di Hardy-Weinberg e il test di linkage disequilibrium tra i loci è stato calcolato usando PHASE e Arlequin version 3.1.

Risultati: I 2 polimorfismi del gene del VEGF-A sono in equilibrio di Hardy-Weinberg con valori di $\chi^2 < 3,81$ e di $P > 0,05$. Il campione totale ha evidenziato un incremento medio di 6.02 ± 11.11 lettere ETDRS ($P < 0.001$). Ranibizumab è risultato essere

significativamente più efficace nei pazienti portatori dell'allele del VEGF-A-2578C (da +6.26 a +7.44 lettere EDTRS; $p < 0.05$), mentre i pazienti portatori del genotipo del VEGF-A -2578AA hanno riscontrato una perdita di acuità visiva (-1.778 lettere ETDRS; $p = 0.0192$).

Conclusioni: Questo studio suggerisce che lo SNP del VEGF-A -2578A/C può rappresentare un importante predittore molecolare del risultato funzionale precoce dopo terapia con Ranibizumab nella Degenerazione Maculare Senile essudativa.

INTRODUZIONE

La retina è una membrana sottile (circa 0,4 mm) e trasparente che riveste la superficie interna del globo oculare ed è suddivisa in due zone: un'area centrale ellissoidale di colore giallastro, detta macula lutea con una depressione centrale, rotonda e non molto profonda detta fovea, contenente circa 6,5 milioni di cellule specializzate, i coni, essenziali per la visione diurna e dei colori, e un'area media e periferica che, essendo ricca di bastoncelli, permette la visione crepuscolare e notturna, fornendo una immagine monocromatica nera, bianca e con qualche sfumatura di grigio (**Figura 1**).

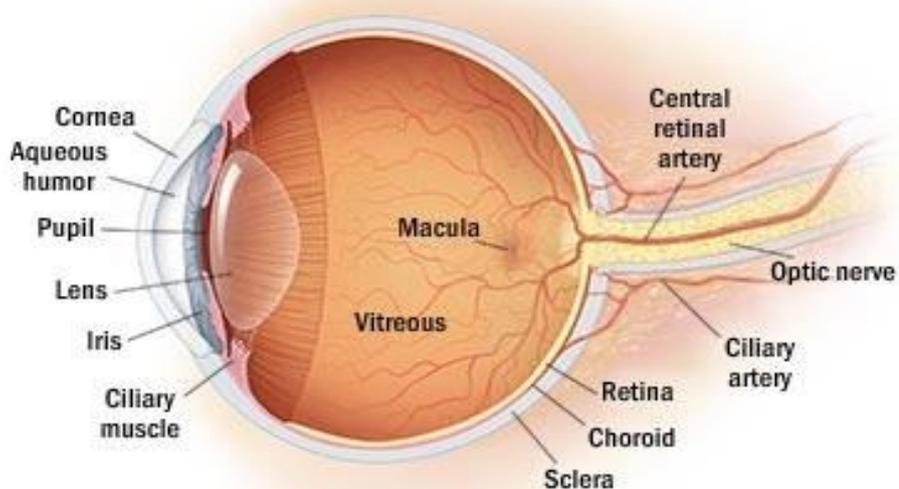


Figura 1. Anatomia dell'occhio.

La luce, passando attraverso la retina, incontra i fotorecettori, i quali sono rivolti verso l'interno dell'occhio e non verso l'esterno. In questo modo viene evitato il fenomeno della riflessione interna all'occhio stesso della luce. Essa attraversa gli strati di cellule retiniche, per essere poi assorbita dai pigmenti fotosensibili (iodopsina nei coni e rodopsina nei bastoncelli), dando origine ad una reazione chimica che converte il segnale luminoso in impulso nervoso elettrico. Questo, percorrendo il nervo ottico, giunge al centro visivo del cervello che lo elabora come immagine. Il punto attraverso il quale il nervo ottico esce dall'occhio rappresenta la "macchia cieca", una zona priva sia di

bastoncelli che di con. Normalmente il rapido movimento degli occhi e l'elaborazione del cervello, permettono all'individuo di compensare questa assenza di informazioni e di non notare la macchia cieca (**Figura 2**)

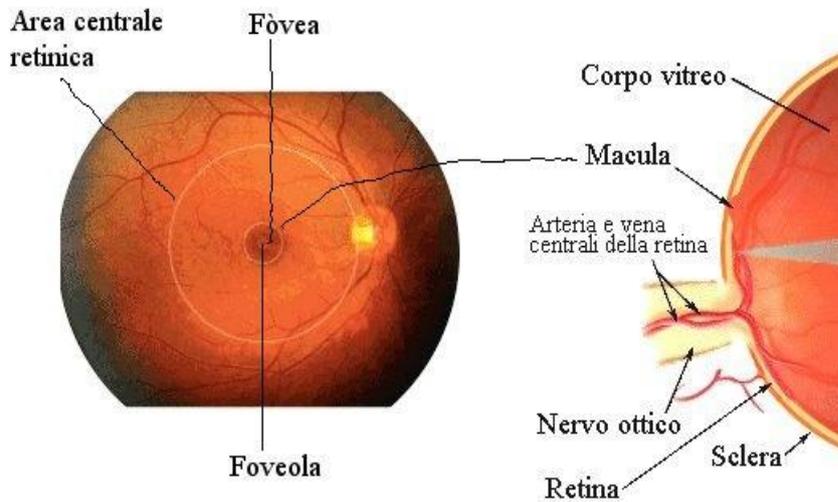


Figura 2. Particolare: la macula si trova al centro della retina, evidenziata dal cerchio giallo; la fovea si presenta come una depressione centrale poco profonda.

La parte più interna della retina si trova a contatto con il corpo vitreo, mentre lo strato più esterno di essa è composto dall'epitelio retinico pigmentato (EPR), dalla membrana di Bruch e dalla coriocapillare (dall'interno verso l'esterno). Tali strutture formano il complesso di Ruysch che riveste un ruolo fondamentale per la corretta funzione dell'occhio, permettendo la visione notturna e diurna (**Figura 3**).

L'**epitelio retinico pigmentato** (EPR) è un monostrato di cellule cuboidali composte da numerosi melanosomi. Svolge diverse funzioni, ma le due più importanti sono:

- rigenerazione del pigmento visivo rodopsina.

La luce viene assorbita da questo pigmento permettendo la conversione del retinale tutto-trans in 11 cis-retinale, fondamentale per il funzionamento dei cono e dei bastoncelli. In tal modo viene generato il segnale visivo.

- fagocitosi essenziale per il rinnovo dei fotorecettori.

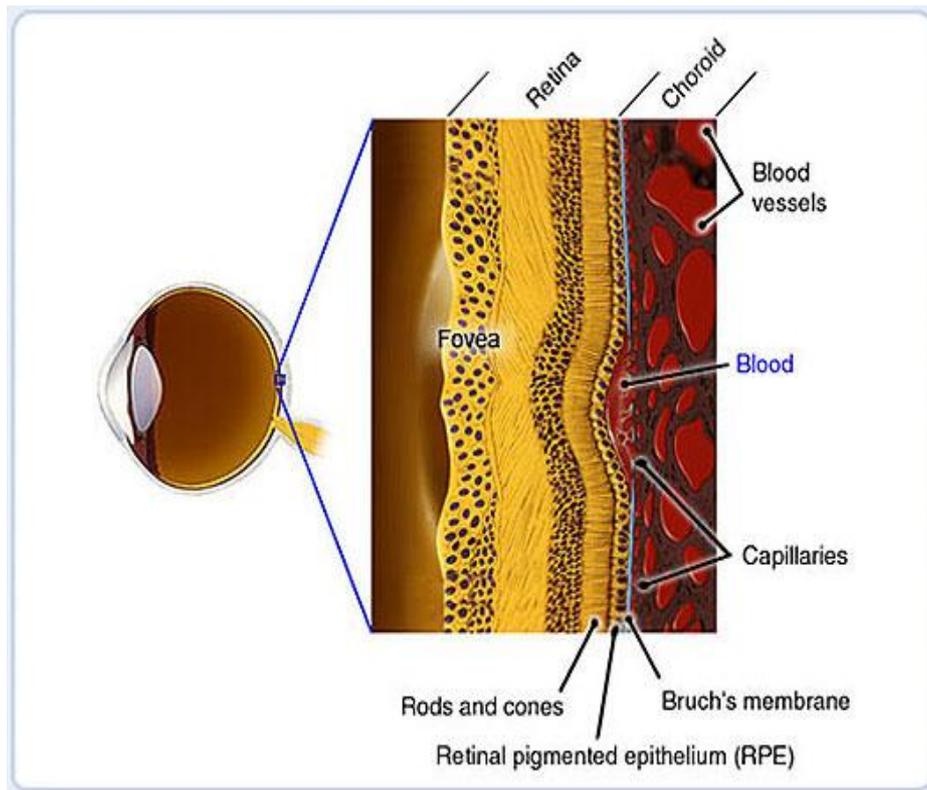


Figura 3. *Complesso di Ruysch, composto dall'epitelio retinico pigmentato (EPR), dalla membrana di Bruch e dalla coriocapillare*

La **membrana di Bruch** si estende dietro l'epitelio retinico pigmentato e presenta due strati di collagene che racchiudono centralmente uno strato di elastina. È soggetta a cambiamenti intorno alla quarta decade di vita quando, tra la membrana basale dell'epitelio retinico e lo strato di collagene più interno della membrana, si assiste alla formazione delle *drusen*, accumuli di materiale anomalo di aspetto ialino. Queste sono visibili, esaminando il *fundus* dell'occhio, sia all'interno della regione foveale sia attorno alla fovea stessa. Tali depositi causano la progressiva perdita della funzione visiva centrale, determinando una delle patologie più comuni negli individui dei Paesi industrializzati al di sopra dei 65 anni: la degenerazione maculare senile (DMS) (Klein, Mauldin et al. 1994; Friedman, O'Colmain et al. 2004).

Grazie ad esami oftalmoscopici (Jager, Mieler et al. 2008), le *drusen* sono state distinte in base alle loro dimensioni in:

- piccole, quando presentano un diametro inferiore a 63 μm ;
- medie, con un diametro compreso tra 63 μm e 124 μm ;

- grandi, con dimensioni maggiori a 124 μm .

È stato preso in considerazione anche l'aspetto dei loro margini definendo una classificazione diversa in:

- *hard drusen*, piccole chiazze bianco giallastre dai limiti netti, associate ad alterazioni dell'epitelio retinico pigmentato, generalmente innocue; i pazienti, infatti, mantengono una soddisfacente funzionalità visiva;
- *soft drusen*, dai margini sfumati tendenti alla confluenza e a formare quindi un distacco "drusenoide" dell'epitelio retinico pigmentato.

Con l'avanzare dell'età, la deposizione di composti come lipidi, collagene e detriti causa la calcificazione e l'ispessimento della membrana di Bruch, con conseguente drastica riduzione del trasporto di fluidi e nutrienti attraverso la membrana e infiammazione cronica locale promossa dall'invasione da parte di cellule dendritiche, che rilasciano citochine, fattori angiogenici e altre cellule proprie dell'infiammazione.

La **coriocapillare**, presente nella parte più esterna della retina, rifornisce i fotorecettori dell'ossigeno, fondamentale per il loro funzionamento, grazie alle grandi fenestrate presenti sulla parete dei vasi che guardano la membrana di Bruch. Con l'avanzare dell'età lo spessore della coroide si riduce della metà, viene meno la fenestrazione, con conseguente drastica diminuzione del trasporto di macromolecole e di ossigeno. L'ipossia che ne consegue, incrementa ancora di più la secrezione di fattori angiogenici, ma soprattutto del *Vascular Endothelial Growth Factor* VEGF-A, causando lo sviluppo di membrane neovascolari coroidali.

Classificazione della degenerazione maculare senile

In letteratura sono state proposte numerose classificazioni della degenerazione maculare senile. Quella più comunemente utilizzata negli studi epidemiologici e clinici, è la classificazione AREDS (*Age-Related Eye Disease Study*), a sua volta basata sulla classificazione proposta dal *Wisconsin Eye Disease Study Group*. L'AREDS è uno studio multicentrico e randomizzato promosso dal *National Institute of Health* (NIH) degli Stati Uniti che ha classificato 3640 pazienti, di età compresa tra 55 e 80 anni, nelle seguenti categorie, a seconda della gravità della patologia (Jager, Mieler et al. 2008) (Coleman, Chan *et al.* 2008) (**Figura 4 e 5**):

- categoria 1 o assente, in cui si osservano poche e piccolissime *drusen* con diametro inferiore a 63 μm ;

- categoria 2 o forma iniziale (*early age-related macular degeneration*), dove caratteristica è la presenza di poche *drusen* di medie dimensioni dal diametro compreso tra 63 e 124 μm , e di anomalie nell'epitelio retinico pigmentato, quali ipopigmentazione o iperpigmentazione, che causano una lieve perdita del visus. In questo caso si consiglia di eliminare i fattori di rischio, come il fumo di sigaretta, e di introdurre una corretta alimentazione ricca di carotenoidi e vitamine A, C ed E. (Klein, Cruickshanks et al. ; Klein, Cruickshanks et al. 2010)
- categoria 3 o forma intermedia (*intermediate age-related macular degeneration*), in cui le *drusen*, di medie dimensioni, sono numerose ed almeno una di essa è molto grande (diametro maggiore o uguale a 125 μm). Può essere presente anche un'atrofia geografica in uno o entrambi gli occhi che non si estende al centro della macula e non coinvolge il centro della fovea. Anche in questo caso non si ricorre a cure farmacologiche, ma alla correzione dello stile di vita e delle abitudini alimentari.
- categoria 4 o avanzata non vascolare (*advanced non neovascular age-related macular degeneration*), nella quale, al centro della macula, sono facilmente visibili sia le *drusen* che l'atrofia geografica centrale, che coinvolge l'epitelio retinico pigmentato e la coriocapillare con perdita del visus in mesi o anni.
- categoria 5 o avanzata vascolare (*advanced neovascular age-related macular degeneration*), nella quale si osserva la formazione di nuovi vasi con grave perdita del visus in pochi giorni o settimane a causa di frequenti fenomeni emorragici e/o essudativi che portano alla formazione di tessuto cicatriziale nella zona della macula.

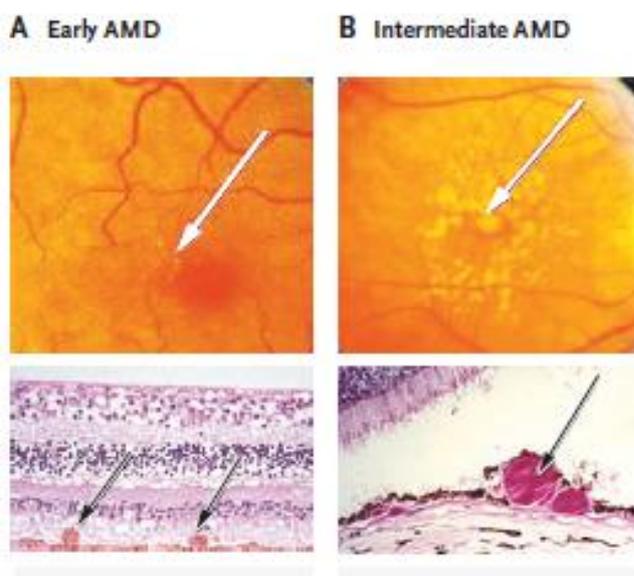


Figura 4. Classificazione clinica della degenerazione maculare senile. Nella parte superiore della figura è mostrata una fotografia del fundus dell'occhio; le frecce bianche indicano poche drusen (pannello A), che crescono di numero man mano che la malattia progredisce (pannello B). Nella parte inferiore della figura, le frecce nere indicano una fotografia istopatologia.

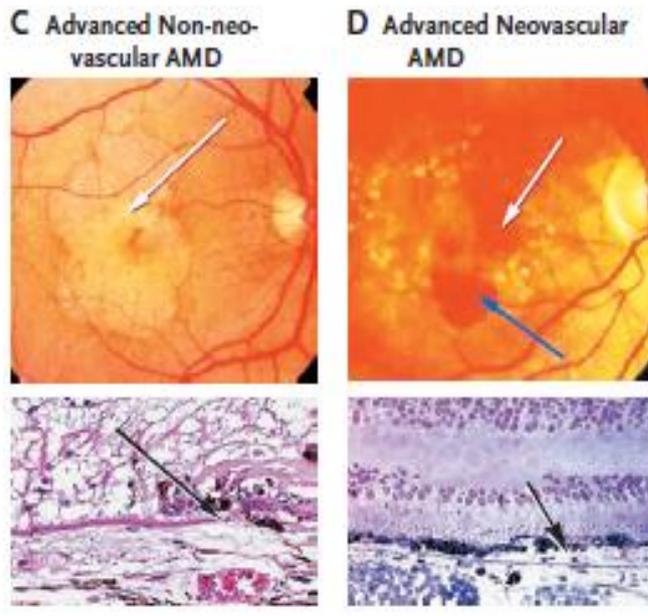


Figura 5. Classificazione clinica della degenerazione maculare senile. Nella parte superiore del pannello C, la freccia bianca indica l'atrofia geografica nel fundus dell'occhio, mentre quella nera in basso, mostra la rottura della membrana di Bruch; nel pannello D, la freccia blu mostra la progressione della malattia con formazione di nuovi vasi.

La classificazione universalmente riconosciuta, invece, è quella dell'*International Age Related Macular Degeneration Epidemiological Study Group*, che ha suddiviso la patologia in due fasi (Bird, Bressler et al. 1995):

- una fase precoce definita maculopatia legata all'età (*Age-Related Maculopathy*) nella quale sono visibili le *drusen* e le alterazioni dell'epitelio retinico pigmentato (quali aumento della pigmentazione nella retina associata a depigmentazione o ipopigmentazione dell'epitelio retinico);
- una fase tardiva o avanzata definita degenerazione maculare legata all'età (*Age-Related Macular Degeneration*).

A sua volta la fase avanzata è divisa in due distinte categorie:

- **maculopatia atrofica, non essudativa o forma secca.**

Si riscontra in questa forma una iniziale irregolarità dell'epitelio retinico pigmentato e della membrana di Bruch associate ad *hard drusen* maculari che consentono al paziente di mantenere una buona acuità visiva. Alcuni sintomi tipici sono l'offuscamento della vista, il decremento nella sensibilità visiva, necessitando così di una luce più intensa o di un ingrandimento ulteriore per riuscire a leggere piccole lettere. Nella forma più avanzata della maculopatia non essudativa, si osserva un'atrofia geografica nell'area parafoveale con una confluenza di cellule morte dell'epitelio retinico pigmentato (EPR).

Conseguentemente i fotorecettori sottostanti, dipendendo metabolicamente da esso, si atrofizzano e si accumulano. L'atrofia geografica, in questo caso, è visibile sia oftalmoscopicamente che angiograficamente in quanto l'irregolarità interessa progressivamente anche la coriocalpillare (in condizioni normali i vasi della coroide non sono visibili). Infatti, il successivo accumulo di detriti extracellulari quali lipidi e collagene, può portare all'indebolimento e alla rottura della membrana dei vasi con conseguente modifica nel trasporto di soluti e incapacità di smaltimento dei prodotti di scarto della retina. L'atrofia geografica è accompagnata da una riduzione dell'acuità visiva e della sensibilità retinale in un ambiente buio. Di solito sono coinvolti entrambi gli occhi, e nel 20% dei casi si assiste alla completa perdita della visione centrale e periferica a causa della presenza di uno scotoma centrale (ossia una zona cieca sull'asse visivo) come conseguenza di un'atrofia della retina foveale, che si sviluppa in molti mesi o anni (Ambati, Ambati et al. 2003; Jager, Mieler et al. 2008).

- **maculopatia neovascolare essudativa-emorragica o forma umida.**

Al microscopio, le cellule dell'epitelio retinico pigmentato presentano ipotrofia, ipertrofia, ipopigmentazione, iperpigmentazione e perdita dei margini. L'evento più critico è sicuramente la formazione di nuovi vasi nella coriocalpillare che, a causa di difetti nella membrana di Bruch, crescono al di sotto dell'epitelio retinico. I vasi neoformati sono particolarmente deboli per cui si rompono facilmente provocando fenomeni essudativi (per la perdita di siero) e/o emorragici (per la perdita di sangue) di varia entità, con conseguente distacco dell'epitelio retinico pigmentato e della retina neurosensoriale. Questo evento comporta il malfunzionamento dei fotorecettori con la comparsa del primo sintomo evidente della maculopatia neovascolare, la metamorfopsia, ovvero la distorsione dell'immagine. La lenta e progressiva involuzione della componente vascolare culmina con la formazione, a livello foveale, di una cicatrice fibrosa biancastra di forma circolare che distrugge la retina centrale, provocando la perdita permanente della visione centrale. Anche a livello sotto e intraretinico può svilupparsi una cicatrice a causa dell'alterata permeabilità dei vasi che, nei casi molto gravi, si può estendere oltre la macula, danneggiando anche la funzione visiva periferica. La grave perdita della funzionalità visiva avviene nel giro di poche settimane o mesi, se il paziente non viene tempestivamente trattato. Nel 15% dei casi, i

pazienti entro l'anno sviluppano la degenerazione maculare di tipo umido anche nell'occhio controlaterale (Jager, Mieler et al. 2008).

Epidemiologia della degenerazione maculare senile.

L'incidenza e la progressione di tutte le forme di degenerazione maculare senile aumentano in modo significativo con l'età, sia a causa dell'invecchiamento dell'epitelio retinico pigmentato, della retina e della membrana di Bruch, sia per lo stile di vita, il tipo di dieta e per il corredo genetico. Negli anni Novanta sono stati condotti tre grandi studi epidemiologici in Australia, in Olanda e negli Stati Uniti.

Il *Blue Mountains Eye Study* è stato condotto da Mitchell *et al.* (Mitchell, Smith *et al.* 1995) tra il 1992 e il 1993 su 3654 Australiani (1582 donne e 2072 uomini) di età compresa fra i 49 e gli 85 anni (135 dei quali al di sopra di 85 anni). La degenerazione maculare senile è stata riscontrata nell'1,9% della popolazione presa in esame e varia dallo 0% negli individui al di sotto dei 55 anni, al 18,5% per gli individui al di sopra degli 85 anni. La degenerazione maculare di tipo neovascolare è la lesione più comune, essendo stata riscontrata in entrambi gli occhi nell'1,3% di questa comunità; l'atrofia geografica, invece, si presenta in almeno un occhio nello 0,7% della popolazione.

In Olanda, nel *Rotterdam Study* (Vingerling, Dielemans et al. 1995), i pazienti arruolati sono stati 6251, tra 55 e 98 anni. La forma atrofica o neovascolare della degenerazione maculare è stata riscontrata in 104 pazienti (pari all'1,7%) ed in particolare l'atrofia geografica è presente nello 0,1% dei pazienti di età compresa tra 55 e 64 anni, contro il 3,7% di coloro i quali hanno un'età maggiore a 85 anni. Invece la forma neovascolare varia dallo 0,1% (individui fra 55 e 64 anni) al 7,4% dei pazienti dagli 85 anni in su.

Negli USA, Klein *et al.* (Klein, Klein et al. 1992), nel biennio 1988/1990, hanno analizzato le fotografie del *fundus* dell'occhio di 4771 pazienti fra 43 e 86 anni, utilizzando come sistema classificativo il *Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System*. La prevalenza, in almeno un occhio, della degenerazione maculare di tipo essudativo è dell'1,6%, contro lo 0,6% dell'atrofia geografica. In particolare queste caratteristiche sono più frequenti nelle donne al di sopra dei 75 anni rispetto agli uomini (6,7% contro 2,6%) e la gravità correla con l'avanzare dell'età.

Recentemente l'*Eye Disease Prevalence Research Group* (Friedman, O'Colmain *et al.* 2004) ha raggruppato i dati ottenuti da diversi gruppi di studio, ottenendo importanti risultati sull'incidenza della patologia nella razza Caucasica e negli individui dalla

carnagione scura. In dettaglio, nella popolazione Caucasica, l'incidenza della degenerazione maculare è direttamente proporzionale all'aumento dell'età: infatti nelle donne fra 50 e 54 anni, la prevalenza è dello 0,2% (negli uomini è 0,34%) contro il 16,39% delle donne con più di 80 anni (negli uomini è dell'11,9%). Negli individui di carnagione scura, invece, la patologia è meno frequente in quanto la prevalenza nelle donne di età maggiore a 80 anni è del 2,44%, mentre negli uomini è dell'1,56%. Dai dati riportati, la prevalenza nelle donne è maggiore rispetto agli uomini, anche se le differenze non sono risultate statisticamente significative.

Nel 2006, l'*European Eye Study* (EUREYE) (Augood, Vingerling *et al.* 2006), ha stimato la prevalenza della maculopatia legata all'età in 4753 partecipanti, provenienti da sette Paesi Europei comprendenti Norvegia, Estonia, Irlanda del Nord, Francia, Italia, Grecia e Spagna. L'atrofia geografica è presente nell'1,2% della popolazione, mentre la degenerazione di tipo neovascolare nel 2,3%.

Il *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) (Klein, Chou *et al.* ; Klein, Chou *et al.* 2011) tra il 2005 e il 2008, ha stimato la prevalenza della degenerazione maculare legata all'età nella popolazione bianca non Ispanica, nera non Ispanica, Messicana Americana e in altri gruppi etnici. A questo scopo Klein *et al.* (2011) hanno arruolato 5553 pazienti dai 40 anni in su. In tutti i gruppi etnici, la presenza delle lesioni proprie della degenerazione maculare è tipica del 6,5% (95% CI, 5,5-7,6) dei pazienti al di sopra dei 60 anni. Considerando l'intera popolazione americana, è stato stimato che 7,2 milioni presentano lesioni maculari iniziali, che in 0,89 milioni di individui evolvono verso la fase più avanzata della patologia.

Diagnostica della degenerazione maculare senile.

I testi clinico-strumentali presi in considerazione sono stati i seguenti:

- Esame dell'acuità visiva e della funzione visiva. Le tavole ottotipiche ETDRS (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*) rappresentano il *gold standard* per lo studio della funzione della macula, permettendo un esame più preciso dell'acuità visiva per lontano. Queste presentano in ogni riga, un identico numero e complessità di lettere. Inoltre, lo spazio tra ogni lettera è uguale ad una lettera e lo spazio fra le righe è uguale alle dimensioni della lettera della riga inferiore. Ogni riga è costruita in modo tale da avere lo stesso punteggio di difficoltà.

Oltre a questo, deve essere sempre effettuato anche un esame dell'acuità visiva per vicino.

- Test di Amsler.

Introdotta nella pratica clinica negli anni '40, è rappresentata da una griglia composta da linee verticali e orizzontali, utile per determinare piccole alterazioni retiniche causate ad esempio dalla degenerazione. È un test soggettivo, facile da utilizzare ma che richiede elevata collaborazione da parte del paziente, poiché è sufficiente perdere la fissazione della griglia per invalidarlo. In questo modo, è facilmente visibile la presenza di scotomi pre-esistenti e le eventuali distorsioni, rotture, od ondulazioni della griglia, indicano che il paziente è affetto dalla patologia. La griglia di Amsler presenta molti falsi positivi e falsi negativi, e si spera possa essere sostituita da metodiche più affidabili.

- Esame biomicroscopico della macula.

Si tratta di una osservazione diretta del fondo oculare, previa midriasi farmacologica, attraverso l'uso di particolari lenti, per valutare la presenza di *drusen*, alterazioni delle cellule dell'epitelio retinico, emorragie e cicatrici fibrose. In questo modo si valuta se il paziente è affetto dalla degenerazione maculare atrofica o essudativa. Al fine di valutare il passaggio dalla forma iniziale a quella evoluta, la biomicroscopia è di per se sufficiente, ma la fotografia a colori della macula, consente un più preciso confronto nel tempo.

- Angiografia con fluoresceina (FAG).

L'angiografia retinica con fluoresceina, essendo utilizzata in tutti gli studi clinici, rappresenta il *gold standard* per la diagnosi della degenerazione maculare senile nella forma avanzata. Questa indagine usa la fluoresceina sodica, un colorante giallo, iniettato per via endovenosa, che viene eccitato da lunghezze d'onda tra 465 ed 490 nm (luce blu) ed emette tra 520 e 530 nm (luce giallo-verde). La sostanza viene iniettata, opportunamente diluita, in una vena periferica dell'avambraccio del paziente, e circolando, raggiunge la retina in pochi secondi. Normalmente la fluoresceina rimarrebbe confinata nel lume dei capillari. Quando si verifica una rottura della barriera emato-retinica interna dei vasi coroideali, la fluoresceina diffonde liberamente in quanto non si lega alle componenti vasali. In questo modo viene assorbita per il 75% dalla

melanina e dalla xantofillina, i pigmenti dell'epitelio retinico pigmentato, che, eccitati, emettono ad una lunghezza d'onda intorno a 530 nm. Questa viene rilevata da uno strumento con elevata sensibilità, con realizzazione di fotografie del fondo oculare grazie alle quali è possibile identificare la presenza dei nuovi vasi tipici della patologia in esame, che si proiettano dalla coroide verso la retina.

- Angiografia con verde di indocianina (*Indocyanine Green Angiography, ICGA*).

Tale tecnica diagnostica, simile alla FAG, utilizza un colorante privo di effetti collaterali, l'indocianina, che presenta un picco di eccitazione tra 790 e 805 nm, ed un picco di emissione a 835 nm vicino all'infrarosso. A differenza della fluoresceina, l'indocianina presenta una scarsa tendenza alla diffusione extravasale grazie alla sua capacità di legarsi alle proteine plasmatiche (principalmente albumina). Per questo viene utilizzata per studiare i vasi profondi poiché riesce a penetrare l'epitelio retinico pigmentato e la coroide, permettendo di valutare la gravità della malattia anche nel caso in cui c'è una neovascolarizzazione coroidale ricoperta da emorragia o essudati (di tipo occulto). Solitamente viene confrontata con la FAG nel caso in cui ci siano dubbi diagnostici.

- Autofluorescenza.

Tecnica recente che consente di acquisire immagini della retina utilizzando filtri particolari senza l'uso di coloranti. Utilizzata *in vivo* per valutare l'attività metabolica dell'epitelio retinico pigmentato.

- Tomografia a coerenza ottica (*Optical Coherence Tomography, OCT*).

L'utilizzo della tomografia a coerenza ottica in oftalmologia ha avuto inizio a metà degli anni Novanta. È una tecnica non invasiva che, previa dilatazione della pupilla, fornisce immagini ad alta risoluzione di sezioni della retina umana *in vivo*, permettendo di valutare lo spessore e quindi la morfologia della retina e dei diversi strati retinici. Un diodo superluminescente emette un fascio di lunghezza d'onda di 820/870 nm (vicino all'infrarosso) che intercetta la retina, non richiedendo così alcun contatto fisico con il tessuto esaminato. Lo strumento costruisce un'immagine in sezione del tessuto retinico utilizzando una scala in falsi colori che va dal blu e nero, per le zone a minima riflettività ottica, al rosso e bianco, per le zone molto riflettenti. Si ha così la possibilità di effettuare una dettagliata osservazione del polo posteriore dell'occhio, permettendo

un'analisi qualitativa della morfologia della retina, documentando la presenza di accumulo di liquido intra o sottoretinico che causano sollevamenti del neuroepitelio e distacco dell'epitelio retinico pigmentato, ed un'analisi quantitativa dello spessore della retina stessa. Lo strumento in dotazione, che ha sostituito il modello Stratus OCT, è il Topcon 3D OCT-1000, che permette di ottenere immagini tridimensionali del polo posteriore dell'occhio in tempi nettamente più brevi rispetto agli altri modelli di OCT, con vantaggi sia per l'operatore che per il paziente.

- Microperimetria MP1.

È stata introdotta per lo studio della degenerazione maculare senile poiché, quando si sviluppa lo scotoma centrale e, in generale, quando si ha l'aumento della gravità della malattia, si verifica un peggioramento del pattern di fissazione retinica foveale ed il deterioramento della sensibilità retinica. Ciò comporta lo sviluppo di un'area retinica eccentrica, indispensabile per le attività visive quotidiane.

La microperimetria MP1, combinando in un unico strumento la retinografia (*fundus photography*) con la perimetria computerizzata, consente di effettuare una misurazione della sensibilità luminosa di un definito punto retinico mediante un sistema di visualizzazione oftalmoscopico diretto della retina. Nell'ambito della degenerazione maculare senile, la valutazione microperimetrica ci permette di:

- 1) definire con assoluta precisione topografica la sede della fissazione (definita come prevalentemente centrale, scarsamente centrale o prevalentemente eccentrica) e la sua stabilità (che può essere stabile, relativamente instabile o instabile);
- 2) valutare la dimensione, la sede e la profondità dello scotoma;
- 3) effettuare una correlazione esatta tra difetto anatomico e sensibilità retinica della regione maculare punto per punto. In particolare quest'ultima correlazione ci permette di creare una mappa di sensibilità della retina verificando la capacità o meno del paziente di vedere gli stimoli luminosi di differenti intensità in varie posizioni della regione retinica esaminata. In questo modo si può monitorare non solo la patologia ma anche gli effetti funzionali delle terapie anti-VEGF.

Fattori genetici di rischio.

La degenerazione maculare senile è considerata una patologia multifattoriale, in cui la suscettibilità dell'individuo è determinata dall'interazione tra fattori ambientali e fattori genetici. In particolare, negli ultimi 15 anni, l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sullo studio della componente genetica della degenerazione maculare senile, il quale non si è rivelato semplice a causa della natura della patologia. L'avanzare dell'età è strettamente correlato con l'aumento dell'incidenza, della prevalenza e della progressione della degenerazione. Sfortunatamente questo non aiuta i ricercatori in quanto solo una generazione con un range di età appropriato è disponibile per lo studio, i genitori dei pazienti sono deceduti, mentre i loro figli sono troppo giovani per esserne affetti. L'eterogeneità fenotipica della patologia all'interno della stessa generazione rappresenta una ulteriore sfida per gli studiosi.

Studi di aggregazione familiare, studi sui gemelli ed infine analisi di segregazione hanno permesso l'identificazione della modalità di trasmissione della patologia e l'ereditabilità; gli ulteriori studi di linkage e di associazione hanno permesso di individuare i geni coinvolti nella degenerazione maculare senile.

Studi sui gemelli.

Gli studi sulle coppie di gemelli monozigotici (MZ), geneticamente identici, e dizigotici (DZ), con il 50% circa di genoma uguale, hanno permesso di evidenziare le modalità di trasmissione della degenerazione maculare, quanto il genotipo influenza il fenotipo e quanto i fattori ambientali contribuiscono allo sviluppo della patologia. Studi su una piccola popolazione di gemelli sono stati condotti all'inizio degli anni Novanta da diversi gruppi di ricerca. Klein *et al.* (Klein, Mauldin et al. 1994) hanno portato avanti uno studio su 9 gemelli monozigotici; la patologia era stata diagnosticata ad almeno un gemello. I risultati sono stati significativi in quanto la concordanza per la patologia è stata riscontrata in 8 coppie di gemelli su 9. Anche Meyers *et al.* (Meyers, Greene et al. 1995) hanno trovato il 100% di concordanza in 25 gemelli monozigoti (MZ) e il 42% di concordanza in 12 gemelli dizigoti (DZ). Gottfredsdottir *et al.* (Gottfredsdottir, Sverrisson et al. 1999) nel 1999 hanno arruolato un gruppo di 50 gemelli monozigoti in Islanda riportando il 90% di concordanza.

Recentemente sono stati riportati i risultati di due grandi studi.

Seddon e colleghi nel 2005 (Seddon, Cote et al. 2005) hanno arruolato negli USA 840 gemelli anziani maschi, inclusi 210 coppie di monozigoti, 181 coppie di dizigoti e 58 figli unici. Fra questi 268 gemelli mostravano segni iniziali di maculopatia, mentre 106 manifestavano una patologia più avanzata. Lo studio sottolinea come la componente genetica riesce a spiegare il 46-71% dei vari stadi della degenerazione maculare senile. Lo stato avanzato della patologia può avere una ereditabilità piuttosto alta, unita a fattori ambientali unici che giocano un ruolo altresì importante.

Lo studio di Hammond *et al.* (Hammond, Webster et al. 2002) è stato condotto nel 2002 in Inghilterra su 506 coppie di gemelle femmine di razza Caucasica. In particolare, 226 monozigotiche con un'età compresa tra 51 e 75 anni, e 280 dizigotiche, tra 49 e 79 anni, cresciute nel medesimo ambiente ed esposte agli stessi potenziali fattori di rischio, come il fumo e l'ipertensione. La prevalenza della maculopatia legata all'età è del 14,6% (95% CI, 12,4%-16,8%). Inoltre, fra le gemelle monozigoti la concordanza è molto più elevata rispetto alle coppie di dizigoti (0,37 contro 0,19), permettendo di affermare che la componente genetica gioca un ruolo fondamentale nella patologia. In più, studiando la presenza di fenotipi caratteristici della maculopatia, Hammond *et al.* (2002) hanno stimato che le *soft drusen* di grandi dimensioni (diametro $\geq 125 \mu\text{m}$) sono molto più facilmente ereditabili di quelle piccole, con una percentuale del 57%, mentre le *hard drusen* in quantità uguale o maggiore a 20 si ereditano nell'81% dei casi. Questi risultati hanno confermato che la degenerazione maculare senile ha un'ereditabilità del 45% (95% CI, 35%-53%).

Studi di aggregazione familiare.

Gli studi di aggregazione familiare mirano a paragonare il numero di affetti da degenerazione maculare senile nei parenti dei casi con quello dei parenti dei controlli. Klaver *et al.* (Klaver, Wolfs et al. 1998) hanno studiato le fotografie del *fundus* dell'occhio dei fratelli e dei figli di 87 casi affetti da degenerazione maculare avanzata (DMS), ovvero neovascolare, paragonandoli ai fratelli e ai figli di 135 controlli. Hanno ottenuto un valore di OR (rischio relativo) per la forma iniziale della degenerazione maculare di 4,8 per i fratelli dei casi contro i controlli, e un OR=6,6 per i figli dei casi contro i controlli.

Nel 1997, Seddon ed il suo gruppo di lavoro (Seddon, Ajani et al. 1997) hanno analizzato i parenti di primo grado, per lo più fratelli di 119 casi affetti dalla patologia

in esame e 72 controlli, dimostrando come la prevalenza della patologia è significativamente alta nei fra i parenti dei casi rispetto ai parenti dei controlli (23,7% contro 11,6%) con un rischio relativo pari a $OR=2,4$. Tra i parenti dei casi con degenerazione maculare di tipo umido l'OR è addirittura pari a 3,1.

Tutti questi studi sottolineano come il ruolo dei fattori genetici e l'esposizione a fattori ambientali particolari, portano allo sviluppo della degenerazione maculare.

Analisi di segregazione.

Questo tipo di analisi fa luce sulla modalità di trasmissione della patologia, comparando il pattern di trasmissione nelle famiglie a quello di una varietà di modelli genetici e non. I risultati vengono valutati per determinare quale modello si adatta meglio a spiegare l'andamento della patologia. Heiba *et al* nel *Beaver Dam Eye Study* del 1994 (Heiba, Elston *et al.* 1994) hanno arruolato 1285 pazienti da 564 sibship ("Sibship" è un termine usato in epidemiologia e sanità pubblica per fare riferimento al gruppo o al numero di bambini prodotto da una coppia di genitori. Così i fratelli costituiscono un "sibship"). Usando i valori ottenuti dell'analisi di segregazione, sono giunti alla conclusione che il numero di geni che predispone allo sviluppo della degenerazione maculare senile è piccolo ed, inoltre, un singolo *locus* agisce come maggiore determinante.

Studi di linkage.

Negli ultimi anni i ricercatori hanno condotto studi di *linkage* per identificare come segregano le regioni genomiche, contenenti loci di suscettibilità per la degenerazione maculare, e se lo fanno indipendentemente alla gravità della patologia.

Diversi gruppi hanno portato avanti studi *genome-wide* evidenziando che le regioni cromosomiche maggiormente interessate sono la 1q25, la 1q31 e la 10q26. A conferma di ciò una recente meta-analisi è stata condotta sull'intero genoma da Fisher *et al.* (Fisher, Abecasis *et al.* 2005), concludendo che nelle regioni cromosomiche 1q e 10q si trovano regioni di *linkage* strettamente connesse alla degenerazione maculare.

Studi di associazione.

Agli studi di *linkage* sono stati poi associate analisi di associazione per valutare se alleli specifici ricorrono con maggior frequenza tra gli individui affetti rispetto ai controlli. Un valore positivo indica che l'allele interessato è l'allele che causa la patologia, o che

l'allele di interesse è in *linkage disequilibrium* con un allele che causa la patologia. Il *linkage disequilibrium* è una correlazione tra alleli vicini che riflette un aplotipo discendente da cromosomi ancestrali (Reich, Cargill et al. 2001).

Mentre gli studi di *linkage* individuano marcatori genetici che segregano con la malattia, le analisi di associazione identificano specifici alleli di marcatori genetici che o causano la patologia o sono in *linkage disequilibrium* con gli alleli coinvolti nella patologia.

Alcuni studi più recenti sono basati sulla popolazione e coinvolgono un gruppo di casi, non imparentati fra loro, affetti dalla degenerazione maculare, e un gruppo di controlli, per evidenziare se lo *status* della patologia è associato con l'evento di uno specifico marcatore allelico o genotipico. Altri ricercatori, invece, conducono studi di associazione sulle famiglie esaminando come segregano gli alleli.

I geni maggiormente associati alla patologia sono mostrati nella **Tabella 1**.

Tabella 1. Geni candidati per la degenerazione maculare senile.

Sito	Loci	Autori
Cromosoma 1q	CFH (1q32)	(Edwards, Ritter <i>et al.</i> 2005),(Klein, Zeiss <i>et al.</i> 2005), (Haines, Hauser <i>et al.</i> 2005),(Hageman, Anderson <i>et al.</i> 2005),(Zarepari, Branham <i>et al.</i> 2005),(Souied, Leveziel <i>et al.</i> 2005),(Simonelli, Frisso <i>et al.</i> 2006)
Cromosoma 9q	TLR4 (9q32-33)	(Blander and Medzhitov 2004),(Zarepari, Buraczynska <i>et al.</i> 2005)
Cromosoma 10q	HTRA1 (10q26) ARMS2 (10q26)	(Katta, Kaur <i>et al.</i> 2009),(Fritsche, Loenhardt <i>et al.</i> 2008),(Rivera, Fisher <i>et al.</i> 2005)
Cromosoma 19q	ApoE (19q13)	(Klaver, Kliffen <i>et al.</i> 1998),(Laws, Hone <i>et al.</i> 2003),(Schmidt, Klaver <i>et al.</i> 2002),(Simonelli, Margaglione <i>et al.</i> 2001)
Cromosoma 6p	CFB (6p21) C2 (6p21) C3 (6p21) VEGF (6p21)	(Gold, Merriam <i>et al.</i> 2006),(Spencer, Hauser <i>et al.</i> 2007),(Despriet, van Duijn <i>et al.</i> 2009),(McKay, Dasari <i>et al.</i>), (Katta, Kaur <i>et al.</i> 2009),(Fritsche, Loenhardt <i>et al.</i> 2008),(Rivera, Fisher <i>et al.</i> 2005),(Senger, Galli <i>et al.</i> 1983),(Ferrara and Henzel 1989),(Perrin, Konopatskaya <i>et al.</i> 2005)

Il sistema del complemento

Anderson *et al.* (Anderson, Mullins *et al.* 2002) hanno sottolineato il ruolo fondamentale dell'epitelio retinico pigmentato (EPR) nella formazione delle *drusen*, studiando i campioni di uno o entrambi gli occhi di 400 donatori (*“le drusen sono la manifestazione secondaria di una patologia primaria delle cellule “compromesse” dell'epitelio retinico che può essere genetica o acquisita”*). La mancanza di uno strato cellulare retinico funzionale comporta l'accumulo di detriti cellulari composti da proteine, immunoglobuline ma anche di lipidi, colesterolo e apolipoproteine B ed E. Inoltre gli studi istologici hanno evidenziato la massiccia presenza di mRNA di componenti del complemento sia nelle *drusen* che nell'interfaccia epitelio retinico-coroide.

Il sistema del complemento fa parte dei meccanismi dell'immunità innata ed è essenziale per l'organismo in quanto lo protegge contro gli agenti infettivi, rimuovendo particelle estranee e cellule morte, reclutando e attivando i mediatori dell'infiammazione.

Esistono tre vie di attivazione del complemento:

- a) via classica o innata, attivata in seguito al legame degli anticorpi circolanti a patogeni o ad altri antigeni non-self;
- b) via lectinica, attivata quando la proteina plasmatica lectina legante il mannosio, si lega ai residui terminali di mannosio presenti sulle glicoproteine della superficie batterica;
- c) via alternativa, sempre attiva a bassi livelli e amplificata dalla presenza di patogeni, detriti cellulare e aggregati macromolecolari.

Le tre vie portano all'attivazione di un unico fattore C3 che scatena la formazione di complessi terminali come C5b-9 che promuovono la lisi del target cellulare, grazie al complesso citolitico MAC che forma dei pori nel doppio strato lipidico. Il complemento deve essere strettamente regolato da proteine regolatrici circolanti che prevengono l'involontario danno causato dalla sua attivazione.

Una proteina regolatrice fondamentale, il cui ruolo nella patogenesi è stato confermato nel 2005, è il **Fattore H del Complemento (CFH)** localizzato sul cromosoma 1 (**1q32**), il cui gene codifica per un singolo polipeptide di 1213 aminoacidi (aa). La catena polipeptidica è divisa in 20 subunità uguali terminanti con una breve sequenza consenso ripetuta (SCR). La regione N-terminale è coinvolta in diverse attività regolatrici, mentre

la C-terminale sembra essere implicata nel legame con la superficie delle cellule e nel riconoscimento tra self e non-self. In questa regione si trovano, infatti, le SCR7 e SCR19-20 che, come dimostrato nel 2010 dal gruppo di studio di Donoso *et al.* (Donoso, Vrabec *et al.* ; Donoso, Vrabec *et al.* 2010), giocano un ruolo centrale nell'attivazione del complemento sulla membrana cellulare. Nello studio, infatti, viene usato un frammento ricombinante del Fattore H 19-20, che, se da un lato scatena la lisi degli eritrociti non-self, dall'altro protegge gli eritrociti propri dell'ospite (Ferrara, Merriam *et al.* 2008).

Il Fattore H del Complemento (CFH) svolge il ruolo fondamentale di inibitore della via alternativa del complemento inibendo l'idrolisi della componente C3 nei frammenti C3a e C3b e competendo con il Fattore B del Complemento (CFB) per la formazione del C3Bb (detto anche C3 convertasi), un potente amplificatore della cascata. Il Fattore H consente alle cellule di resistere al danno causato dall'attivazione del complemento in quanto riesce a legare molecole polianioniche come l'acido sialico e l'eparina. Poiché nelle *drusen* e nella membrana di Bruch degli individui affetti da degenerazione maculare è stata riscontrata la presenza di vari componenti della cascata del complemento, inclusi quelli della via alternativa come il complesso C5b-9 (Johnson, Leitner *et al.* 2001), si è giunti alla conclusione che la compromissione dell'attività inibitrice del complemento, promossa dal CFH, o l'attivazione inappropriata della via alternativa del complemento, contribuiscono allo sviluppo di un processo infiammatorio anomalo che culmina nella patologia presa in esame (Sivaprasad and Chong 2006; Scholl, Charbel Issa *et al.* 2008).

I recenti sviluppi nella tecnologia della genotipizzazione hanno permesso di sviluppare un metodo di studio definito GWAS (*Genome-Wide Association Study*) che nel 2005 ha consentito, a tre gruppi di lavoro indipendenti, di confermare i risultati precedentemente ottenuti da studi istologici ed immunoistochimici sulla composizione delle *drusen*. Edwards AO *et al.* (Edwards, Ritter *et al.* 2005), Hageman GS *et al.* (Hageman, Anderson *et al.* 2005) ed Haines JL *et al.* (Haines, Hauser *et al.* 2005) hanno concluso che il gene che risulta essere maggiormente implicato nella patologia è il Fattore H del Complemento (CFH) sul cromosoma 1q32.

Sono stati presi in considerazione diversi polimorfismi del gene CFH, fra cui **rs800292 (Ile62Val)** che vede la sostituzione, sul residuo 62, dell'aminoacido Isoleucina con una Valina e determina tre possibili genotipi, AA, AG e GG (mutante recessivo), ed il

polimorfismo presente su una regione non codificante sull'introne 14, **rs1410996 (Intron14)**, che determina i genotipi AA, AG, GG (mutante recessivo). Sebbene non siano stati approfonditi gli studi sui cambiamenti strutturali che essi possono provocare sul gene, è stato accertato da Bergeron *et al.* (Bergeron-Sawitzke, Gold *et al.* 2009) che, la presenza del genotipo mutante recessivo GG incrementa il rischio di sviluppare la patologia (con un odds ratio rispettivamente pari a OR=3,7 e OR=6,6).

I risultati maggiormente significativi sono stati ottenuti tra il 2005 e il 2006 da diversi gruppi di lavoro indipendenti, prendendo in considerazione lo SNP **rs1061170 (Tyr402His)**, presente sulla sequenza consenso SCR7 del gene CFH. In posizione amminoacidica 402, la sostituzione di un aminoacido neutro come la Tirosina in un altro con carica positiva, l'Istidina, causa una transizione da T a C in posizione nucleotidica 1277 sul dominio CFH che contiene siti di legame per glicosamminoglicani come l'eparina e per la proteina C-reattiva, determinando tre possibili genotipi TT, TC e CC (omozigote recessivo). Gli studi sono stati condotti dai seguenti gruppi di ricerca:

- **Edwards *et al.*** (Edwards, Ritter *et al.* 2005) esaminando due popolazioni, una composta da 224 casi con *drusen* e anomalie maculari e 134 controlli, l'altra, definita campione di replicazione, composta da 176 casi e 68 controlli, sono giunti alla conclusione che la presenza di almeno un allele C incrementa il rischio relativo di sviluppare la patologia di un valore pari a 2,7.

- **Klein *et al.*** (Klein, Zeiss *et al.* 2005) hanno preso in esame una popolazione composta da 96 casi con grandi *drusen* ed evidente atrofia geografica o degenerazione maculare di tipo neovascolare, e 50 controlli sani o con piccole *drusen*, già reclutati nello studio AREDS (*Age Related Eye Disease Study*).

- **Haines *et al.*** (Haines, Hauser *et al.* 2005) hanno condotto uno studio esaminando due popolazioni diverse. La prima, formata da 182 famiglie (71 dei quali fratelli discordanti) e la seconda composta da 495 casi affetti da degenerazione maculare e da 185 controlli. La genotipizzazione del T1277C indica, nella prima popolazione una significativa trasmissione nelle famiglie ($P=0,019$), mentre nella seconda una maggiore frequenza nei casi rispetto ai controlli ($P=0,00006$). L'odds ratio negli affetti dalla patologia eterozigoti CT è pari a 2,45 (95%, CI 1,41-4,25), mentre per gli omozigoti CC è pari a 3,33 (95%, CI 1,79-6,20). Quando l'analisi viene ristretta solo a quei pazienti con degenerazione neovascolare l'OR aumenta raggiungendo valori pari a 3,45 per gli eterozigoti (95%, CI 1,72-6,29) e a 5,57 per gli omozigoti CC (95%, CI 2,52-12,27).

• **Hageman et al.** (Hageman, Anderson et al. 2005) hanno arruolato due gruppi indipendenti di casi e di controlli. I casi provenienti dall'Università dell'Iowa sono 404, non imparentati tra loro e con degenerazione maculare documentata, mentre i controlli sono 131. I casi non imparentati arruolati dall'Università della Columbia sono invece 550 ed i controlli, ai quali non è stata riscontrata nessuna patologia maculare e neanche una storia familiare di degenerazione, sono 275. Per determinare quali varianti del Fattore H del Complemento (CFH) sono associate con la patologia, sono stati studiati i 22 esoni codificanti e la loro sequenza intronica di 50/100 bp a fianco. È stata dimostrata una forte associazione fra 8 SNPs del gene CFH, in particolare fra la variante Ile62Val e Tyr402His. I valori di OR ottenuti per la variante Tyr402His nel gruppo dell'Iowa e della Columbia sono stati rispettivamente di 2,82 e 2,25. Analizzando gli aplotipi è stata riscontrata la presenza nel 50% dei casi dell'aplotipo CT, presente invece nel 29% dei controlli (OR=2,46). Gli omozigoti per questo aplotipo sono presenti nel 24,2% dei casi e nell'8,3% dei controlli con OR=3,51.

• **Zarepari et al.** (Zarepari, Branham et al. 2005) sono riusciti ad arruolare nel *Kellogg Eye Center* in Michigan 616 casi e 275 controlli. La maggior parte dei pazienti affetti presenta una degenerazione maculare avanzata con neovascolarizzazione coroidale e/o atrofia geografica. Zarepari e i colleghi (2005) hanno riscontrato l'elevata frequenza dell'allele recessivo C nei pazienti affetti rispetto ai controlli (0,61 contro 0,34); ciò comporta, come dimostra il valore di odds ratio, OR, un incremento pari a 4,36 (95%, CI 3,13-6,08) del rischio di sviluppo della patologia negli individui con almeno una copia dell'allele C, mentre negli omozigoti CC l'incremento è di 5,52 (95%, CI 3,54-8,59). Gli individui omozigoti per l'allele C sono molto più comuni nei casi che nei controlli, in particolare sono presenti nel 38% dei pazienti con atrofia geografica, nel 33% di coloro i quali presentano neovascolarizzazione e nel 33% degli individui con grandi *hard drusen*.

• **Souied et al.** (Souied, Leveziel et al. 2005) hanno reclutato in Francia 141 pazienti affetti da degenerazione di tipo essudativa unilaterale o bilaterale non imparentati, 81 dei quali con un caso in famiglia (genitori, fratelli o figli) e 91 controlli sani. Poiché il polimorfismo Y402H contribuisce sia alla degenerazione maculare di tipo familiare che a quella sporadica, le analisi statistiche sono state condotte sia sui pazienti con almeno un altro caso in famiglia sia nei pazienti senza storia familiare. La distribuzione genotipica dello SNP Y402H è significativamente diversa fra i casi e i controlli: rispetto

agli omozigoti TT, gli omozigoti recessivi CC (OR=6,9, 95%, CI 3,1-15,6) e gli eterozigoti CT (OR=3,0, 95%, CI 1,6-5,6) rischiano maggiormente di sviluppare la patologia. Hanno dimostrato, inoltre, come la frequenza dell'allele C recessivo nei casi affetti da degenerazione di tipo essudativo, è significativamente più alta rispetto ai controlli.

• **Simonelli *et al.*** (Simonelli, Frisso *et al.* 2006) nel 2006 hanno arruolato un gruppo di 104 pazienti affetti da degenerazione maculare senile, dei quali 54 con neovascolarizzazione coroidale, e 131 controlli non imparentati tra loro senza patologie oculari. Nella popolazione italiana gli omozigoti CC sono più frequenti nei casi che nei controlli (37,7% contro 16,0%); l'odds ratio per gli omozigoti CC è pari a OR=3,9 (95%, CI 1,9-8,2), confermando sia che il genotipo omozigote recessivo aumenta del 28% il rischio di sviluppo della patologia, sia che non può essere correlato con la gravità del fenotipo.

Il rischio associato alla variante Y402H (genotipo CC) suggerisce il ruolo biologico dell'allele C. Si è detto che la variante Y402H è localizzata sulla SCR7 legante sia l'eparina che la proteina C-reattiva (CRP), una molecola pro-infiammatoria che permette l'attivazione della via classica del complemento e, tramite il legame con il CFH, evita la deposizione del complesso citolitico MAC. Paragonando questa variante con Y402Y (genotipo TT), Yu *et al.* (Yu, Wiita *et al.* 2007) sono giunti alla conclusione che non si hanno significative differenze nella loro secrezione proteica o nell'interazione con l'eparano, ma si ha una significativa riduzione del legame tra il Fattore H del Complemento (CFH) e la proteina C-reattiva (CRP). Quindi i cambiamenti in questo codone possono incidere parzialmente sulla regolazione del processo infiammatorio nella retina. Il suo danneggiamento conduce ad una eccessiva liberazione di frammenti di taglio come C3a e C5a, e nella formazione del complesso C5b9. Questi tre componenti sono in grado di attivare le cellule endoteliali rilasciando fattori di crescita come il *Vascular Endothelial Growth Factor* VEGF. È stato inoltre osservato da Edwards *et al.* (Edwards, Ritter *et al.* 2005) che sia il Fattore H del Complemento (CFH) sia la proteina C-reattiva, si trovano sullo strato superficiale dell'arteria intima (è la parete che si trova nella parte più interna, a contatto con la membrana basale dell'endotelio su cui scorre il sangue), suggerendo che il CFH protegge la parete arteriale dell'ospite da una eccessiva attivazione del complemento. Hanno quindi ipotizzato che i cambiamenti allele-specifici nei siti di legame per

l'eparina e la proteina C-reattiva possono alterare la capacità del Fattore H del Complemento di sopprimere i danni correlati al complemento nella parete arteriosa, causando lacerazioni nei vasi e conseguenti cambiamenti neovascolari/essudativi come quelli visti nella degenerazione maculare neovascolare. Infatti, come dimostrano gli studi di Haines *et al.* (2005), il rischio associato all'allele C è più pronunciato quando l'analisi è ristretta solo agli individui affetti da degenerazione di tipo umido. La maggior parte degli studi conferma questa associazione nella popolazione Caucasica; tuttavia la frequenza dello SNP rs1061170 (Y402H) è più bassa nella popolazione Africana e Asiatica. Xu *et al.* (Xu, Guan et al. 2008) hanno calcolato che la frequenza dell'allele C nella popolazione settentrionale Cinese presa in esame è pari al 10,3% nei casi e ad 8,0% nei controlli; essa è molto bassa se paragonata alla popolazione Caucasica in cui la frequenza dell'allele recessivo è compresa tra 61-94% nei casi e tra 34-46% nei controlli. La degenerazione maculare di tipo umido, quindi, non risulta essere una delle patologie più frequenti fra gli Asiatici (Gotoh, Yamada et al. 2006; Okamoto, Umeda et al. 2006).

All'estremità 3' del Fattore H del Complemento (CFH), si trovano due geni, CFHR1 e CFHR3, il cui ruolo nella cascata del complemento non è molto chiaro. Nel 2008, Spencer *et al.* (Spencer, Hauser et al. 2008) hanno studiato, in una popolazione di razza Caucasica composta da 780 casi affetti da degenerazione maculare e 265 controlli, la delezione di una regione di 84000 bp che rimuove i suddetti geni e segrega con uno degli aplotipi protettivi del Fattore H del Complemento. L'omozigotità per la delezione dei geni CFHR1 e CFHR3 sembrerebbe conferire una protezione agli individui, diminuendo di fatto il rischio di sviluppare la patologia. Non sembrerebbe essere puramente statistica l'associazione tra l'assenza delle proteine CFHR1 e CFHR3 nel siero degli individui omozigoti per la delezione, e l'ipotesi che le proteine CFHR1 e CFHR3 possano competere con il Fattore H del Complemento (CFH) per il legame con la componente C3, interferendo così con la normale regolazione del sistema del complemento. Nonostante nel 47% degli individui omozigoti per la delezione, è presente l'aplotipo protettivo, sono stati scoperti altri aplotipi protettivi che non portano questa delezione. Questo suggerisce che altre varianti in questa regione devono essere scoperte e che ulteriori studi sono necessari per verificare l'effettiva protezione garantita dalla rimozione di questi geni.

CFB e C2

I ricercatori si sono chiesti se altri geni, coinvolti nella cascata alterativa del complemento, potevano incrementare il rischio di sviluppare la patologia. Effettivamente il problema è stato analizzato da Gold *et al.* (Gold, Merriam *et al.* 2006), i quali hanno trovato una interazione tra il Fattore H del Complemento (CFH) ed i geni che codificano per il **Fattore B del Complemento (CFB)** e la **Componente C2**, localizzati sul cromosoma **6p21** nella regione in cui si trova il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe III.

Gold *et al.* (2006) hanno studiato la variazione genetica in due gruppi indipendenti di individui affetti da degenerazione maculare senile e di individui sani. Il gruppo, composto da 350 casi e 114 controlli non imparentati, è stato arruolato dalla *University of Iowa*, mentre quello formato da 548 affetti e 275 controlli non imparentati, proviene dalla *Columbia University*.

Sono stati presi in esame i seguenti polimorfismi a singolo nucleotide nel Fattore B del Complemento:

- **rs4151667**, in cui la sostituzione dell'aminoacido Leucina con una Istidina, determina una transizione da T ad A in posizione aminoacidica 9 (**Leu9His** o **L9H**) determinando tre possibili genotipi TT, TA e AA (omozigote recessivo)
- **rs4151659**, dove la sostituzione dell'acido Glutammico con una Lisina, determina una transizione da A a G in posizione aminoacidica 565 (**Glu565Lys**) determinando tre possibili genotipi AA, AG e GG (omozigote recessivo)
- **rs2072633**, (**Introne 17**) che determina i genotipi TT, TC e CC
- **rs641153**, in cui la sostituzione dell'Arginina con una Glutammina, determina una transizione da G ad A in posizione aminoacidica 32 (**Arg32Gln** o **R32Q**) determinando tre possibili genotipi GG, GA e AA (omozigote recessivo)

I polimorfismi a singolo nucleotide del Fattore del Complemento C2 studiati sono stati:

- **rs9332739**, in posizione aminoacidica 318, l'Asparagina viene sostituita da un acido Glutammico (**Asp318Glu** o **E318D**), determinando una transizione da G a C e quindi tre possibili genotipi GG, GC e CC
- **rs547154**, (**Introne 10**) determinante i genotipi AA, AC e CC

I due geni, trovandosi ad una distanza di 500 bp sullo stesso cromosoma, sono strettamente correlati sia dal punto di vista strutturale che funzionale. Infatti le regioni CFB/C2 sono in forte *linkage disequilibrium* ed in particolare L9H del Fattore B del

Complemento (CFB), che in posizione aminoacidica 9 presenta una Leucina al posto di una Istidina, è strettamente correlato con lo SNP del gene C2 E318D, che in posizione 318 ha sostituito l'Asparagina con l'acido Glutammico. Inoltre R32Q del CFB è in *linkage disequilibrium* con lo SNP intronico del C2, rs547154.

La forte associazione tra i due geni, tuttavia, non ha consentito di determinare completamente quali SNPs sono delle varianti funzionali, ma ha comunque permesso ai ricercatori di stabilire la loro natura altamente protettiva nei confronti della degenerazione maculare senile, anche se l'effetto di un gene risulta indipendente dall'azione dell'altro. Vengono definiti protettivi in quanto gli alleli recessivi di questi polimorfismi sono più frequenti nei controlli rispetto ai casi, mentre, probabilmente, gli alleli dominanti agiscono come alleli di rischio per lo sviluppo della patologia. Gold *et al.* (2006) analizzando le due popolazioni, hanno stimato che il 56% dei controlli sani presenta gli alleli protettivi del Fattore H del Complemento e del C2/Fattore B, mentre il 74% dei casi, risultano affetti dalla patologia proprio per l'assenza di questi.

Il Fattore B del Complemento (CFB) fa parte della via alternativa di attivazione del complemento, la cui attivazione è promossa dal taglio del C3b legato al CFB che porta alla formazione del complesso C3b-Bb, ovvero della C3 convertasi. Questo complesso è stabilizzato dalla properdina, mentre la sua dissociazione è accelerata da proteine fondamentali come il CFH, il maggiore inibitore della via alternativa del complemento. La Componente C2 del Complemento, invece, attiva la via classica della cascata. Sia il CFB che il C2 sono espressi nella retina neurale, nell'epitelio retinico pigmentato e nella coroide. La ridotta attività del Fattore B, infatti, previene l'attivazione del complemento, che di norma porterebbe alla formazione delle *drusen* e alla progressione della patologia (Spencer, Hauser et al. 2007).

Componente C3 del Complemento

L'influenza della via del complemento sulla degenerazione maculare è stata ulteriormente avvalorata quando nella retina neurale, nella coroide, nell'epitelio retinico e nelle *drusen* sono stati trovati i trascritti della maggiore componente del complemento, il C3. La sua attivazione è promossa da tutte e tre i pathway (classica, alternativa o della lectina), causando il taglio del C3 in due frammenti: l'anafilotossina C3a e il frammento maggiore C3b. È quest'ultimo che, legando componenti estranee all'organismo, forma un complesso con il Fattore B che taglia il frammento C5 (C3bBb, C5 convertasi). La

risposta del complemento viene amplificata e culmina nella formazione di pori nelle membrane cellulari grazie ai complessi citolitici MAC.

Il Fattore C3 si trova sul cromosoma **19p13.3-13.2**, il cui gene, composto da 41 esoni, codifica per 1663 aminoacidi che formano 13 domini funzionali. Esso è biologicamente inattivo, ma il cambio conformazionale causato dal taglio, gli permette di esporre un dominio intramolecolare contenente tioestere. Questo consente al Fattore C3 di legare i patogeni, danneggiando così la loro membrana. Nello studio condotto da Despriet *et al.* nel 2009 (Despriet, van Duijn et al. 2009), sono stati arruolati 357 pazienti Caucasici affetti da degenerazione maculare non imparentati e 173 controlli. Gli SNPs presi in esame, che sono localizzati sul dominio contenente tioestere, sono stati i seguenti:

- **rs171094**, sulla regione del promotore del C3 che è correlato ai genotipi GG, GA e AA
- **rs2230199**, la sostituzione in posizione 102 di una Glicina con una Arginina (**Gly102Arg** o **R102G**), causa la variazione da C a G e la presenza dei genotipi CC, CG, GG
- **rs1047286**, la presenza di individui con genotipo omozigote recessivo TT, è causata da una sostituzione in posizione 314 di una Prolina con una Leucina (**Pro314Leu** o **P314L**), che determina una variazione da C a T (genotipi CC, CT e TT)

Fra questi, solo le varianti R102G e P314L, sono correlate ad un elevato rischio di sviluppare la patologia sia nello stadio iniziale che in quello avanzato. Il cambiamento dell'aminoacido può alterare la configurazione del dominio, favorendo la deposizione dei fattori del complemento con formazione delle *drusen*. Tale gene, infatti, risulta mutato in altre patologie, quali quelle renali, che coinvolgono i tessuti epiteliali simili alla membrana di Bruch, portando alla formazione di accumuli di materiale simili alle *drusen*. Per valutare l'associazione tra la componente C3 e la degenerazione maculare senile, Despriet (2009), ha condotto una meta-analisi sui genotipi R102G e P314L, ottenendo un OR di 1,6 per il primo allele, ed un OR di 1,5 per il secondo.

Un altro studio, condotto da McKay *et al.* (McKay, Dasari et al. ; McKay, Dasari et al. 2010) sullo SNP rs2230199 (R102G), mostra come in una popolazione Irlandese composta da 437 casi e 436 controlli, l'allele recessivo G contribuisce allo sviluppo della patologia con un valore di OR=1,55 (95%, CI 1,15-2,08) per gli eterozigoti GC, mentre il valore aumenta se consideriamo gli omozigoti recessivi GG (OR=1,91, 95%, CI 1,11-3,30).

Se confrontato con altri geni come Y402H nel CFH, il locus C3 ha un piccolo ma significativo ruolo nell'eziologia della degenerazione maculare senile.

HTRA1 e ARMS2

Studi di *linkage* hanno identificato che il locus **10q26** sul cromosoma 10, contribuisce alla patogenesi, avvalorando maggiormente l'ipotesi che la degenerazione maculare non è causata da mutazioni in singoli geni, bensì dall'interazione fra diversi loci di suscettibilità. Questa regione contiene tre geni attentamente studiati dai ricercatori perché altamente associati con il rischio di sviluppo della patologia: **PLEKHA1** (*Pleckstrin Homology Domain-containing Protein Family A member 1*), **LOC387715**, successivamente rinominato **ARMS2** (*Age Related Maculopathy Susceptibility gene 2*) e **HtrA1** (*High Temperature Requirement Factor A-1*).

Il gene HtrA1, che occupa una regione di 53,366 basi sul cromosoma 10q26, è una delle tre proteine appartenenti alla famiglia di proteasi serina HtrA espresse sia nella retina umana che in quella murina e nell'epitelio retinico pigmentato (EPR). È stato visto come la sua espressione nei fibroblasti umani aumenta con l'età. La sua attività principale è la regolazione della degradazione dei proteoglicani della matrice extracellulare: permettendo l'ingresso di enzimi, come collagenasi e metalloproteasi, facilita la degradazione della matrice. Così la sovraespressione del gene altera l'integrità della membrana di Bruch, permettendo l'invasione da parte dei nuovi capillari coroidei nella matrice extracellulare, come accade nella degenerazione maculare di tipo umido.

Oltre ad essere una proteina secretoria, HtrA1 riesce a legare e ad inibire il *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β), un importante regolatore della deposizione della matrice extracellulare e dell'angiogenesi (Tong, Liao et al. ; Tong, Liao et al. 2010). Tra il 2006 ed il 2008, sono stati condotti diversi studi per dimostrare l'associazione tra i polimorfismi del gene HtrA1 e la patologia in esame. In particolare, uno SNP nella regione del promotore di HtrA1, è altamente associato con lo sviluppo della patologia nella popolazione Caucasica degli USA, in quella Europea di Francia e Regno Unito, nella popolazione Asiatica di Cina, Giappone e India: **rs11200638** che determina un cambiamento di base da G ad A e, conseguentemente, i genotipi GG, GA e AA (omozigote recessivo mutante).

L'altro gene di suscettibilità è LOC387715/ARMS2 codifica per una proteina di 107 aminoacidi con 9 siti di fosforilazione ed una massa molecolare di 12 kDa. I suoi

trascritti sono espressi nella retina ed in una varietà di altri tessuti e linee cellulari. Katta *et al.* (Katta, Kaur *et al.* 2009) hanno localizzato la proteina ARMS2 nella regione ricca di mitocondri dei segmenti interni di coni e bastoncelli.

Recentemente Fritsche *et al.* (Fritsche, Loenhardt *et al.* 2008) hanno studiato un polimorfismo nella regione 3'-UTR del gene ARMS2, che combina una delezione con una inserzione: la delezione di 443 bp, rimuove la sequenza segnale di poliadenilazione, mentre l'inserzione, introduce un elemento di 54 bp ricco di AU che influenza fortemente l'mRNA (del443ins). Questo particolare elemento è significativamente associato con la degenerazione maculare, infatti i soggetti omozigoti per la variante (del443ins) non esprimono la proteina ARMS2, causando una instabilità dell'mRNA.

Poiché il gene ARMS2 si trova al centro dei due geni PLEKHA1 e HtrA-1, sono stati presi in esame tre polimorfismi:

- **rs10490923**, in cui la sostituzione dell'Arginina in posizione 3 con una Istidina (**Arg3His**), causa la variazione da G a C e, conseguentemente, i seguenti genotipi: GG, GC e CC (omozigote recessivo mutato)
- **rs2736911**, (**Arg38Ter**), in posizione 38, la variazione della base da C a T determina i genotipi CC, CT e TT (omozigote recessivo mutato)
- **rs10490924**, in cui la sostituzione dell'Alanina in posizione 69 con una Serina (**Ala69Ser**), causa una variazione di base da G a T, determinando i genotipi GG, GT e TT (omozigote recessivo mutato)

Nello studio di Katta *et al.* (Katta, Kaur *et al.* 2009) è stato confermato che il polimorfismo di ARMS2 **Ala69Ser**, **rs10490924**, trovandosi al centro dei due geni PLEKHA1 e HtrA-1, risulta in completo *linkage disequilibrium* con lo SNP **rs11200638** del gene HtrA-1. Questa forte associazione comporterebbe una variazione nella conformazione o nella interazione della proteina che coinvolge i mitocondri, alterandone la loro funzione.

Così nel 2005, Rivera *et al.* (Rivera, Fisher *et al.* 2005), dopo aver arruolato in Germania una popolazione composta da 1166 casi affetti da degenerazione maculare e 945 controlli, hanno riscontrato che la frequenza dell'allele di rischio T di rs10490924 è significativamente più alta nei pazienti affetti da degenerazione maculare senile. Infatti viene riportato un valore di odds ratio per gli individui omozigoti recessivi TT di OR=7,61, che suggerisce una elevata probabilità di sviluppo della patologia (il valore di OR per gli individui eterozigoti GT è molto più basso e pari a OR=2,82).

ApoE

Klaver *et al.* (Klaver, Kliffen *et al.* 1998) nel 1998 ipotizzarono il possibile coinvolgimento nella degenerazione maculare senile del gene **ApoE**, già associato all'Alzheimer (AD), una malattia neurodegenerativa. Infatti, sia nelle placche causate dall'AD, sia nelle *drusen* durante le fasi iniziali della degenerazione maculare, sia nell'occhio affetto da danno retinico, è stata rilevata la presenza dell'amiloide β . Tale ipotesi è stata successivamente confermata dagli studi effettuati da Anderson *et al.* (Anderson, Mullins *et al.* 2002). L'Apolipoproteina E, prodotta dagli astrociti, cellule fondamentali del Sistema Nervoso Centrale, è un importante regolatore della *clearance* e del trasporto del colesterolo e dei lipidi, ridistribuendoli per il mantenimento e l'eventuale riparo della membrana cellulare neuronale. È ovvio che, una mutazione nel gene e/o nel suo recettore, portano all'accumulo di materiale proteico e lipidico, tipico dei depositi nella membrana di Bruch. Il gene, localizzato sul cromosoma **19q13**, è altamente polimorfico, con quasi 21 SNPs conosciuti, ma tre alleli sono maggiormente coinvolti nella degenerazione maculare senile (Laws, Hone *et al.* 2003):

- **ApoE ϵ 2, (Cys112,Cys158)**
- **ApoE ϵ 3, (Cys112,Arg158)**
- **ApoE ϵ 4, (Arg112,Arg158)**

L'allele ϵ 3 è considerato ancestrale, mentre gli altri due sono delle varianti.

Diversi studi di associazione genica hanno attribuito all'allele ϵ 4, o ad un allele in *linkage disequilibrium* con esso, un effetto protettivo associato quindi ad un ridotto rischio di sviluppare la forma umida della degenerazione maculare, caratterizzata dalla presenza di *soft drusen*. Al contrario, l'allele ϵ 2 è stato rilevato nei soggetti affetti dalla patologia, rivestendo così un ruolo nel rischio di evoluzione della degenerazione (Simonelli, Margaglione *et al.* 2001; Schmidt, Klaver *et al.* 2002). Non sono stati riscontrati effetti rilevanti sulla patologia determinati dall'allele ϵ 3.

TLR4

I Toll Like Receptors TLR sono dei recettori per il riconoscimento dei profili (PRR) coinvolti nell'immunità innata. Nell'uomo esistono undici recettori TLR (TLR1-TLR11), caratterizzati da motivi ripetuti di Leucina e da sequenze ricche di Cisteina sulla porzione extracellulare, mentre nella regione intracellulare si trova un dominio

conservato che consente la trasduzione del segnale. Partecipano al riconoscimento di molecole espresse da agenti virali e batterici come il lipopolisaccaride ed RNA a singola e a doppia elica. Una volta legato il bersaglio, producono un segnale che scatena una cascata di fattori trascrizionali che culmina nel rilascio di citochine infiammatorie. In particolare il gene TLR4 è localizzato sul cromosoma **9q32-33**, un *locus* di suscettibilità per lo sviluppo della degenerazione maculare senile. Oltre a svolgere un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria, regola anche il flusso verso l'esterno di colesterolo. Recenti studi (Blander and Medzhitov 2004) hanno dimostrato come il TLR4 partecipa attivamente alla fagocitosi dei segmenti esterni dei fotorecettori, funzione fondamentale che, se danneggiata, può causare lo sviluppo della patologia in esame. Zarepari *et al.* (Zarepari, Buraczynska *et al.* 2005) hanno arruolato 667 pazienti Caucasiche affetti da degenerazione maculare senile e 439 controlli non imparentati fra loro. Sono stati presi in esame due polimorfismi **rs4986790** (**Asp299Gly**), e **T399I**. Le analisi mostrano come i pazienti portatori dell'allele mutato G, sul residuo 299 mostrano un rischio maggiore di sviluppare la patologia (OR=2,65), rispetto ai pazienti portatori dell'allele ancestrale A, anche se non è stata trovata correlazione con il secondo SNP.

Ruolo del VEGF nell'angiogenesi e nella maculopatia.

La retina, consumando grandi quantità di ossigeno, è il tessuto neuronale con il più elevato metabolismo. Pertanto, per sopperire a queste esigenze nutrizionali, essa è vascolarizzata da due sistemi circolatori indipendenti: la coroide e i vasi retinici.

Il sistema retinico rifornisce di ossigeno e di nutrienti i 2/3 della retina interna ed è composto da vasi che penetrano così in fondo, che sono visibili attraverso la pupilla. La parte più esterna della retina, invece, non è vascolarizzata, ma riceve i nutrienti necessari e l'ossigeno attraverso il sistema circolatorio della coroide, molto più difficile da visualizzare perché è parzialmente oscurato dal pigmento dell'epitelio retinico (EPR). Negli adulti sani, la vascolarizzazione o angiogenesi è quiescente eccetto durante le fasi di cicatrizzazione delle ferite, la crescita dei capelli e, nelle donne, durante il ciclo mestruale.

Al contrario, nella degenerazione maculare di tipo umido, la neovascolarizzazione coroidale (CNV), è il fenomeno più evidente. Essa è caratterizzata dalla formazione di nuovi capillari, necessari per il rifornimento di sostanze nutritive, a partire dai vasi sanguigni pre-esistenti al di sotto della retina e attraverso l'epitelio retinico pigmentato e la membrana di Bruch. L'angiogenesi è determinata, in realtà, da una complessa cascata di eventi: l'iniziale vasodilatazione dei vasi preesistenti è accompagnata dall'aumento della permeabilità vascolare, che permette alle proteine plasmatiche di formare una matrice provvisoria di supporto, e dall'attivazione delle molecole della matrice extracellulare (ECM) circostante. Queste possono direttamente stimolare o inibire le cellule endoteliali (EC) coinvolte nell'angiogenesi, grazie al legame con le integrine e con i recettori eterodimerici superficiali, che una volta attivati, possono upregolare o downregolare diverse vie di segnali intracellulari. Il rimodellamento della matrice extracellulare altera il segnale mediato dall'integrina in alcuni tipi di cellule endoteliali promuovendone la migrazione attraverso la membrana di Bruch degradata e la successiva proliferazione e stabilizzazione dei nuovi vasi, grazie ai periciti e alle cellule muscolari lisce. I periciti, in particolare, permettono la stabilizzazione della nuova rete vascolare; dopo aver creato una membrana basale, viene inibita la proliferazione e stimolata la formazione di giunzioni, in modo da garantire un supporto alla parete dei nuovi vasi. Questi solitamente sanguinano, perché molto deboli, formando dense ferite maculari con accumulo di siero e/o sangue al di sotto dell'epitelio retinico pigmentato che si distacca (viene definito PED, cioè distacco dell'epitelio pigmentato). Infine, per

ragioni ancora sconosciute, diventano fibrotiche con formazione di una cicatrice disciforme che compromette definitivamente la capacità visiva dell'individuo (Campochiaro, Soloway et al. 1999). La membrana di Bruch, a causa dell'accumulo di detriti cellulari, risulta alterata (Zarbin 2004) sia nella composizione, con un aumento del contenuto proteico e lipidico, sia nella sua permeabilità, con un decremento della diffusione dei prodotti di scarto, come i detriti citoplasmatici derivanti dall'epitelio retinico, e di ormoni e nutrienti, come ossigeno e vitamina A, verso l'epitelio retinico. Inoltre i macrofagi, reclutati dalle cellule dendritiche coroidali attivate, digeriscono la membrana di Bruch, e, grazie al richiamo delle citochine, permettono la formazione dei nuovi vasi attraverso essa, fino a raggiungere l'epitelio retinico e lo spazio sottoretinico. A conferma di ciò, Sarks e colleghi (Sarks, Tang et al. 2006), hanno osservato che i nuovi capillari si trovano solo al di sotto delle regioni assottigliate e danneggiate della membrana di Bruch. La riduzione della membrana spesso inizia sotto le *hard drusen* più piccole, probabilmente perché i fattori angiogenici diffondono nella coriocapillare più velocemente attraverso questi siti piuttosto che attraverso le aree vicine contenenti una quantità elevata di detriti membranosi.

In realtà la neovascolarizzazione è un processo multistep strettamente regolato da complessi sistemi che garantiscono l'equilibrio fra segnali inibitori e stimolatori. I regolatori positivi dell'angiogenesi comprendono il *Vascular Endothelial Growth Factor* VEGF-A, il *Fibroblast Growth Factor* FGF ed il *Transforming Growth Factors* TGF- α e TGF- β . I regolatori negativi, che inibiscono la crescita dei vasi, sono angiostatina, endostatina ed il PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*). Lo stress metabolico e l'ipossia, perturbano il normale equilibrio tra i fattori, promuovendo o la sovraespressione dei segnali pro-angiogenici oppure il decremento dei fattori anti-angiogenici (Kvanta, Algvere et al. 1996; Frank 1997; Witmer, Vrensen et al. 2003). Molti esperimenti condotti su ratti e scimmie, nei quali la neovascolarizzazione coroidea veniva stimolata dalla fotocoagulazione, hanno confermato, dopo pochi giorni dal trattamento, l'incremento dell'RNA messaggero del VEGF-A nell'epitelio retinico e nelle cellule endoteliali vascolari coroidali. Al contrario, Ohno-Matsui *et al.* (Ohno-Matsui, Morita et al. 2001) hanno dimostrato in modelli murini che l'incremento del PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*), una proteina di 50 kDa, nelle cellule dell'epitelio retinico induce ad una regressione della neovascolarizzazione.

Anche gli studi condotti su pazienti affetti da degenerazione maculare senile di tipo umido, confermano che il fattore di crescita delle cellule endoteliali è il principale o forse l'esclusivo fattore implicato nella formazione della neovascolarizzazione, in quanto si riscontrano elevate concentrazioni di VEGF e VEGFR nei nuovi vasi e nei tessuti circostanti comprendenti le cellule dell'epitelio retinico (Kvanta, Algvere et al. 1996; Kliffen, Sharma et al. 1997), il vitreo e il plasma (Wells, Murthy et al. 1996) (Lip, Blann et al. 2001); al contrario, la concentrazione del fattore PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*) diminuisce come hanno dimostrato Bhutto e colleghi (Bhutto, McLeod et al. 2006).

Inoltre in condizioni fisiologiche e patofisiologiche, l'ipossia dei tessuti causa la sovraespressione del fattore pro-angiogenico VEGF-A, mediata da una famiglia di regolatori della trascrizione che prendono il nome di *Hypoxia-Inducible Factors* (HIFs). Infatti in campioni di neovascolarizzazione, è stata rilevata da Sheridan *et al.* (Sheridan, Pate et al. 2009) la presenza dei fattori HIF-1 α ed HIF-2 α .

La neovascolarizzazione coroidale (CNV) legata alla degenerazione maculare senile, è stata classificata clinicamente, tramite angiografia con fluoresceina (FAG), in quattro tipi:

- i. Neovascolarizzazione classica, nella quale è visibile un'area di iperfluorescenza uniforme, con margini ipofluorescenti durante le fasi iniziali;
- ii. Neovascolarizzazione prevalentemente classica, dove la componente classica occupa il 50% o più dell'intera lesione neovascolare;
- iii. Neovascolarizzazione minimamente classica, dove la componente classica occupa meno del 50% del complesso neovascolare;
- iv. Neovascolarizzazione occulta senza componente classica che include in realtà due tipi di vascolarizzazione. La prima è caratterizzata dall'irregolare distacco fibrovascolare dell'epitelio retinico che appare tramite fluoroangiografia come una iperfluorescenza a macchie; nella seconda, un'area indefinita con una perdita di colorante nella fase tardiva da una sede indeterminata che non corrisponde alla neovascolarizzazione classica e/o distacco fibrovascolare dell'epitelio retinico pigmentato.

Sebbene non esistano due modelli di crescita dei nuovi vasi uguali tra loro, sono comunque stati descritti tre pattern di crescita (Grossniklaus and Green 2004):

- i. Tipo 1, caratterizzato dalla crescita dei vasi tra l'epitelio retinico e la membrana di Bruch, clinicamente definibile come neovascolarizzazione occulta senza componente classica
- ii. Tipo 2, dove la crescita si osserva tra la retina e l'epitelio retinico, clinicamente definibile come neovascolarizzazione classica
- iii. Tipo 3, che si presenta come una combinazione fra le prime due, definita clinicamente come prevalentemente o minimamente classica.

È quindi il VEGF-A che gioca un ruolo chiave nello sviluppo della neovascolarizzazione. Il VEGF-A, conosciuto semplicemente come VEGF, è stato descritto per la prima volta da Senger *et al.* nel 1983 (Senger, Galli et al. 1983) come *Vasopermeability Factor* VPF; nel 1989 Ferrara ed Henzel (Ferrara and Henzel 1989) invece ne hanno determinato la sequenza. Esso appartiene ad una famiglia di geni comprendente PIGF (*Placental Growth Factor*) che causa l'aumento della permeabilità, della proliferazione, della chemiotassi e dell'angiogenesi in diverse patologie, VEGF-B, è in fase di studio il suo ruolo nella progressione dei tumori non-angiogenici, VEGF-C e VEGF-D, implicati nell'angiogenesi e nella linfoangiogenesi del cancro, ed infine VEGF-E.

Il VEGF-A, membro maggiormente studiato, è una proteina glicosilata dimerica di 36-46 kDA. Il gene è localizzato sul cromosoma **6p21.3** ed è codificato da 8 esoni separati da 7 introni. Nell'uomo, lo splicing alternativo di questi esoni genera 9 isoforme che sono definite in base al numero di aminoacidi dopo la sequenza segnale di splicing: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b} (una isoforma inibitoria endogena che si lega al recettore VEGFR-2 con attività simile al VEGF₁₆₅, ma non ne causano l'attivazione), VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ (Bhisitkul 2006).

Le quattro isoforme predominanti nella patologia della degenerazione maculare sono 121, 165, 189, 206 (le altre hanno un'attività biologica diversa) contenenti una sequenza consenso segnale che serve per la secrezione. L'isoforma VEGF₁₆₅ e quelle più lunghe sono composte da due domini:

1. un dominio di legame al VEGF-recettore, presente in tutte le isoforme del VEGF;
2. un dominio di legame con l'eparina, che è assente nelle forme più corte.

È la tipologia del dominio di legame che rende le isoforme più o meno solubili, permettendo una ulteriore classificazione (**Figura 6**):

- le isoforme lunghe, come VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆, si legano alla matrice extracellulare (ECM), grazie al dominio di legame contenente eparina ed eparan-solfato con tratti di residui basici. Queste molecole possono subire il taglio proteolitico da parte della plasmina, che le rende diffusibili come frammenti bioattivi;
- l'isoforma di intermedia grandezza VEGF₁₆₅ esiste sia legata alla matrice extracellulare che nella forma solubile. L'estremità C-terminale può subire un taglio proteolitico da parte di diverse metalloproteinasi della matrice (MMPs), specialmente dalla MMP-3, generando il frammento VEGF₁₁₃, simile ai frammenti bioattivi generati dalla plasmina;
- VEGF₁₂₁, al contrario, è una proteina acida che diffonde liberamente.

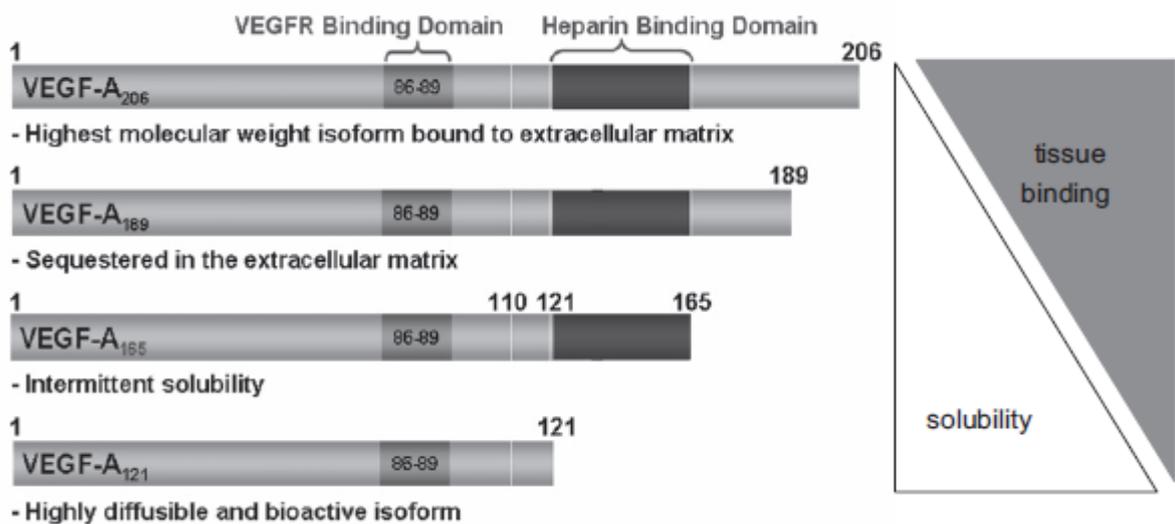


Figura 6. Isoforme del VEGF.

Bates *et al.* nel 2002 (Bates, Cui et al. 2002) hanno dimostrato l'esistenza di una famiglia alternativa di isoforme del fattore di crescita, denominata VEGF_{xxx}b. Lo splicing di un sito distale sull'esone 8 produce proteine che hanno la stessa lunghezza delle isoforme citate prima, ma una differente sequenza aminoacida C-terminale, che non permette loro né di stimolare l'angiogenesi né di inibire la vasodilatazione.

I membri della famiglia del VEGF legano con diversa affinità tre recettori tirosin-chinasici (RTKs), i quali sono strutturalmente simili ai recettori che legano il fattore anti-angiogenico PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*). Tali recettori contengono sette domini immunoglobulinici extracellulari, un singolo dominio transmembrana idrofobico, ed un dominio tirosin-chinasico intracellulare conservato. I recettori tirosin-chinasici RTKs sono i seguenti:

- a) **VEGFR-1 (Flt-1)**, identificato nel 1992 da Ferrara in collaborazione con Lewis Williams (Ferrara ; Ferrara 2010), la cui funzione è ancora argomento di studio e discussione. Ciò è dovuto al fatto che la sua attività può essere diversa in base allo stadio di sviluppo dell'animale e al tipo cellulare. Witmer *et al.* (Witmer, Vrensen *et al.* 2003) e Parenti *et al.* (Parenti, Brogelli *et al.* 2002) hanno dimostrato che il VEGFR-1 viene espresso maggiormente nei periciti e nelle cellule muscolari lisce dei vasi negli individui adulti, anche se gioca un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale nelle cellule endoteliali. La sua sovraespressione è regolata da meccanismi che dipendono dal fattore HIF-1 α . Dei 7 domini extracellulari immunoglobulinici, il secondo è fondamentale in quanto permette il legame con il VEGF con affinità elevata, anche se l'attività chinasi del recettore è minore rispetto al VEGFR-2. Si può così affermare che la risposta angiogenica maggiore si ha grazie a recettore 2 (Ferrara, Gerber *et al.* 2003), (Davis-Smyth, Chen *et al.* 1996). *In vitro*, la forma solubile del VEGFR-1 (sVEGFR-1), derivante da uno splicing alternativo, è, al contrario, inibitrice dell'attività del VEGF. Per questo motivo, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali microvascolari e delle cellule endoteliali della vena ombelicale viene inibita. La presenza del recettore solubile è fondamentale nella placenta durante la gravidanza, dove regola negativamente i livelli di VEGF-A;
- b) **VEGFR-2 (o Kinase Domain Region, KDR, Flk-1)**, è considerato il più importante mediatore degli effetti mitogenici e angiogenici del VEGF. Il suo ruolo chiave nello sviluppo dell'angiogenesi è stato dimostrato in topi deficitari dell'Flk-1, i quali non sono capaci di sviluppare ed organizzare i vasi sanguigni. Nelle cellule sane, invece, il recettore è sottoposto alla dimerizzazione e alla fosforilazione dei suoi residui tirosinici, generando il segnale mitogenico e chemiotattico. Inoltre VEGFR-2 induce la fosforilazione di diverse proteine presenti nelle cellule endoteliali e l'attivazione di pathway che permettono la loro crescita. I mutanti del fattore VEGF che legano solo il VEGFR-2, mantengono la capacità di stimolare la crescita delle cellule endoteliali e di aumentare la permeabilità vascolare, mentre i mutanti del VEGF che riescono a legare il recettore VEGFR-1 perdono queste capacità;
- c) **VEGFR-3 (Flt-4)**, nonostante sia un membro della stessa famiglia dei recettori tirosin chinasi, non è un recettore per VEGF-A, legando invece il VEGFC e VGFD.

Polimorfismi del VEGF-A correlati alla degenerazione maculare senile.

I polimorfismi sono delle varianti alleliche presenti in almeno l'1% della popolazione, causati da sostituzioni di singole basi, da delezioni, da inserzioni e da traslocazioni. Il tipo più comune è il polimorfismo a singolo nucleotide SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), ovvero la sostituzione di una singola base in una particolare posizione nella sequenza del DNA. Si trovano da un minimo di 1 ad un massimo di 3 SNPs ogni 10000 basi, per cui nel genoma umano si contano quasi 10 milioni di polimorfismi, 2,8 milioni dei quali sono stati identificati. Quando si trovano nelle regioni regolatrici o codificanti, rivestono un importante significato biologico, alterando in maniera più o meno grave la struttura e la funzione della proteina (Strachan and Read 1999; Strachan and Read 1999).

Nella degenerazione maculare senile, il gene VEGF-A ed i suoi polimorfismi sono stati oggetto, negli ultimi 20 anni, di accurate ricerche.

Esso appartiene alla famiglia del gene VEGF e contiene 9 esoni sottoposti ad uno splicing alternativo che dà vita a diverse isoforme del gene, delle quali la più importante e abbondante nell'occhio è VEGF₁₆₅. Questa corrisponde ad un polipeptide di 23 kDa che costituisce un monomero della forma omodimerica umana del VEGF-A.

Subendo un ulteriore splicing, si può trovare nella isoforme "a" o "b"; in particolare il VEGF_{165a} presenta importanti proprietà angiogeniche, mentre la forma alternativa ha proprietà anti-angiogeniche. La differenza fra esse riguarda la presenza dell'esone 8 oppure dell'esone 9 nella regione carbossi-terminale. L'equilibrio fra queste due forme è fondamentale per mantenere l'omeostasi vascolare. Perrin *et al.* (Perrin, Konopatskaya et al. 2005) hanno infatti dimostrato che nei pazienti affetti da retinopatia diabetica si misura un aumento nel vitreo della concentrazione del VEGF_{165a} rispetto all'isoforma VEGF_{165b}. In generale, comunque, si ha un incremento dei valori di VEGF₁₆₅ negli individui affetti da degenerazione maculare senile, sebbene le due isoforme non siano state quantificate (Kliffen, Sharma *et al.* 1997).

Sono stati studiati molti polimorfismi del gene del VEGF, ma i dati ottenuti risultano spesso controversi. L'attenzione dei ricercatori si è spesso focalizzata sul promotore del VEGF e sulla regione non tradotta 5'-UTR dell'esone 1. Churchill *et al.* nel 2006 (Churchill, Carter et al. 2006), arruolando 45 pazienti affetti da degenerazione maculare tra 51 e 94 anni, e 94 controlli, hanno studiato quali SNPs sono associati con la forma neovascolare della patologia.

In particolare 8 SNPs scelti si trovano sul promotore fra i nucleotidi -460 e -116: **rs2010963, G-634C** (che determina i genotipi GG, GC e quello mutato CC) sulla regione non tradotta 5'-UTR dell'esone, e 5 SNPs intronici che ricoprono l'intero gene VEGF. Solo lo SNP G-634C è risultato fortemente associato con il rischio di sviluppare la degenerazione maculare. In particolare il genotipo CC favorisce l'insorgenza della patologia ed è presente nel 17,8% dei casi (8/45) e nell'1,1% dei controlli (1/94) con un OR=18,24 (95%, CI 2,25-148,25). Inoltre il genotipo CC del -674 è significativamente associato con la patologia (OR=2,4, 95%, CI 1,09-5,26), mentre l'allele T è maggiormente presente nel gruppo dei controlli (OR=0,42, 95%, CI 0,19-0,92).

Nel Rotterdam Study del 2008 (Boekhoorn, Isaacs et al. 2008) sono stati arruolati 4228 individui con un'età media di 67 anni, per verificare la presenza di tre polimorfismi a singolo nucleotide sul gene del VEGF:

- **rs699947, A-2578C**, in cui la sostituzione determina tre genotipi: AA, AC e CC omozigote recessivo mutato
- **rs1570360, G-1154A**, che determina tre genotipi GG, GA e l'omozigote recessivo mutato AA
- **rs2010963, G-634C**, che determina i genotipi GG, GC e quello mutato CC

I primi due sono localizzati sul promotore del gene, mentre, sulla regione non tradotta al 5' (5'-UTR), si trova G-634C. Questi SNPs sono stati associati alla produzione del VEGF e alla presenza di diverse patologie quali retinopatia diabetica, Alzheimer e cancro. Dopo un follow-up di 7,4 anni, la percentuale dei pazienti con una avanzata degenerazione maculare senile è 2,1%: 35 casi con degenerazione di tipo secca e 54 di tipo umida. Tutti i genotipi sono in equilibrio di Hardy-Weinberg ed inoltre gli SNPs sono in *linkage disequilibrium*. Lo studio di popolazione non ha tuttavia mostrato nessuna associazione statisticamente significativa fra un genotipo e l'insorgenza della degenerazione maculare di tipo umido.

L'analisi condotta da Janik-Papis *et al.* (Janik-Papis, Zaras et al. 2009) su una popolazione di 401 individui dei quali 265 con la degenerazione maculare (in particolare 88 casi con la forma secca e 177 con quella umida) e 136 controlli, ha messo in luce importanti risultati. I polimorfismi presi in esame sono stati solo due: **rs833061, C-1498T** (determinante tre genotipi: CC, CT e TT, omozigote recessivo mutato) e **G-634C** (correlato ai tre genotipi GG, GC e all'omozigote recessivo mutato CC). Dopo aver diviso la popolazione in gruppi in base al genotipo, hanno valutato che esiste una

debole associazione fra il genotipo CT (C-1498T) e la degenerazione maculare senile (OR=2,90, 95%, CI 1,89-4,48). Quindi l'allele C è correlato con l'insorgenza della patologia, al contrario l'allele T sembrerebbe avere un effetto protettivo nei confronti della patologia in esame. In particolare, il genotipo CT (C-1498T) è stato direttamente associato con lo sviluppo della forma secca della degenerazione maculare (OR=3,77), mentre il genotipo TT abbassa notevolmente il rischio di insorgenza della patologia (OR=0,19). Quindi l'allele C favorisce la forma secca della degenerazione maculare senile, mentre l'allele T protegge l'individuo. La forma secca della degenerazione è stata associata anche al genotipo CC del polimorfismo G-634C (OR=3,68), mentre l'allele G protegge l'individuo.

Un'altra associazione, anche se debole, è stata riscontrata tra la forma neovascolare della degenerazione maculare senile ed il genotipo CT del polimorfismo (C-1498T) con un valore di odd ratio OR=2,63, per cui l'allele C favorisce l'insorgenza della patologia, mentre l'allele T la contrasta. Janik-Papis *et al.* (2009) hanno anche studiato l'interazione fra i due polimorfismi che possono produrre aplotipi che modulano la comparsa della degenerazione nella forma secca e umida. Per la forma secca, il genotipo CT/GG con un OR=2,08 manifesta la malattia, mentre il genotipo TT/GG protegge il soggetto (OR=0,18). Nel caso della forma umida, la sua insorgenza è favorita dalla presenza del genotipo CT/GG (OR=2,61) e, al contrario, l'effetto protettivo è garantito dalla combinazione genotipica TT/GG (OR=0,25).

Lin e colleghi (Lin, Wan et al. 2008), hanno preso in esame altri polimorfismi del gene del VEGF:

- **A-2578C, rs699947**, presente sul promotore
- **C-1498T, rs833061**, presente anch'esso sul promotore
- **G-634C, rs2010963**, situato nella regione non tradotta 5'-UTR
- **C+674T, rs1413711**, posizionato nell'introne 1
- **C+936T, rs3025039**, situato nella regione non tradotta 3'-UTR

La popolazione presa in esame è composta da 104 pazienti affetti da degenerazione maculare di tipo secca e 84 di tipo umida, per un totale di 190 casi, e da 180 controlli, tutti con una età superiore a 60 anni. I primi quattro SNPs risultano in forte *linkage disequilibrium* fra loro mentre il C+936T segrega indipendentemente dagli altri. Una differenza statisticamente significativa è stata calcolata solo tra pazienti affetti dalla degenerazione di tipo neovascolare ed i controlli: l'allele T mutato è più frequente nei

casi (30%) rispetto ai controlli (14%) con un OR=2,61 (95%, CI 1,68-4,07). Tale differenza non è stata rilevata nei pazienti affetti dalla forma secca della degenerazione. Recentemente lo studio di Immonen *et al.* (Immonen, Seitsonen et al. ; Immonen, Seitsonen et al. 2010) su 162 pazienti con degenerazione di tipo umido trattati con terapia fotodinamica con verteporfina PDT e 85 controlli, ha confermato l'associazione fra il polimorfismo **A-2578C, rs699947** e l'insorgenza della patologia. In particolare, i pazienti portatori del genotipo CC mutato non rispondono bene alla terapia fotodinamica con verteporfina PDT, forse a causa dell'elevata produzione del VEGF determinata dall'allele C.

Terapia della degenerazione maculare senile.

Nel 1959 Friedrich Vogel coniò il termine “farmacogenetica” per identificare lo studio della variabilità di risposta ad un farmaco dovuta ad una combinazione di fattori costituzionali e ambientali e di fattori genetici ereditari negli individui (Wolf, Smith et al. 2000). La variabilità individuale nella risposta ad un farmaco e le reazioni avverse che il farmaco produce, rappresentano un problema già noto da tempo per la medicina. Basti pensare all’esito terapeutico di una determinata dose di farmaco, che difficilmente può essere previsto nel singolo paziente con certezza. Infatti, le conseguenze cliniche di tale variabilità, sono rappresentate o dal miglioramento del paziente senza effetti collaterali, o in alcuni casi, alla sospensione del trattamento a causa delle gravi reazioni avverse che il paziente riporta.

Una influenza genica particolare è rappresentata dai polimorfismi, variazioni nella sequenza del DNA, presenti in almeno l’1% della popolazione. Un polimorfismo nei geni che influenzano la risposta al farmaco può dar luogo a trasportatori modificati (definiti “*drug transporters*”) che influenzano la biodisponibilità del farmaco, e a recettori e canali ionici con diversa affinità per il farmaco, modificando la farmacodinamica e quindi la risposta farmacologica dell’individuo.

È per questo motivo che la farmacogenetica e la più recente farmacogenomica, sono delle scienze emergenti, in quanto hanno sviluppato delle terapie personalizzate basate sul genotipo di ogni paziente, con un aumento dell’efficacia del farmaco e minori effetti collaterali. Recentemente, sono stati condotti alcuni studi su piccola scala che sembrano associare la risposta al farmaco con il genotipo dei pazienti in due grandi patologie oculari: il glaucoma e la degenerazione maculare senile (Shastri ; Shastri 2010).

La terapia della forma neovascolare della degenerazione maculare legata all’età ha avuto come obiettivo la distruzione dei vasi sottoretinici neoformati. La **fotocoagulazione con il laser argon diretto** è stata negli anni ’80 e ’90 la metodica d’elezione della forma neovascolare della degenerazione, la cui efficacia è stata confermata da uno studio multicentrico, il *Macular Photocoagulation Study* (MPS). Lo studio dimostrava che la terapia fotocoagulativa diretta dell’area neovascolare delle neovascolarizzazioni classiche, identificata per mezzo della fluoroangiografia, si associava ad una minore perdita visiva a due anni rispetto alla storia naturale della malattia (MPS 1991). Tuttavia migliori risultati si ottenevano quando i neovasi erano abbastanza lontani dal centro della macula, 200 µm (neovascolarizzazione coroidea

extrafoveale). La terapia era riservata ai soli casi di neovascolarizzazione extrafoveale, dove l'area scotoma tosa, conseguente alla necrosi tissutale laser-mediata, rimaneva al di fuori dell'area visiva centrale. Tuttavia, la terapia non ha trovato largo uso in quanto le recidive sono state molto frequenti, pari a circa il 50% nei successivi tre anni, per cui è stato necessario ripetere il trattamento laser. Nell'area trattata, si ha un ampliamento cicatriziale che, se si estende all'area in prossimità della fovea, richiede l'interruzione della terapia (MPS 1994). Nel 2000, la *Food and Drug Administration* (FDA) e la *European Medicines Agency* (EMA) hanno introdotto la terapia fotodinamica con verteporfina (Visudyne®, QLT Therapeutics, Inc., Vancouver, British Columbia, Canada, and Novartis Ophthalmic, Bulach, Switzerland) nelle forme di neovascolarizzazioni subfoveali classiche ed in seguito anche nelle occulte. Iniettato per via endovenosa, è un farmaco fotosensibile che si concentra nei vasi sottoretinici. La successiva illuminazione con un laser rosso non termico ad una lunghezza d'onda di 689 nm per 83 secondi, causa l'attivazione della verteporfina e la produzione di radicali liberi dell'ossigeno che provocano trombosi dei neovasi senza danneggiare il tessuto retinico sano. Poiché la verteporfina rimane in circolo nelle 24 ore successive all'iniezione e viene eliminata nei 4-5 giorni successivi, viene chiesto al paziente di non esporsi alla luce solare (Jager, Mieler *et al.* 2008). L'analisi dei dati ha dimostrato che la percentuale di pazienti che vanno incontro a grave perdita visiva è minore rispetto al gruppo di controllo trattato con placebo (47% contro 62%) (Meads and Hyde 2004).

Le ricerche sulla cura delle degenerazione maculare senile hanno fatto dei notevoli passi avanti dopo che il VEGF-A è stato riconosciuto come il principale fattore che porta alla formazione dei nuovi vasi sottoretinici. A partire dal 2004, infatti, sono state introdotte le terapie anti-VEGF che prevedono l'uso di anticorpi monoclonali (mAb) per inibire il fattore di crescita vascolare, contrastando la crescita neovascolare e preservando la capacità visiva dei soggetti trattati (Ferrara, Mass *et al.* 2007). Così la società Eyetech ha messo a punto un anti-VEGF per il trattamento della neovascolarizzazione della retinopatia diabetica e della degenerazione maculare senile, il **Pegaptanib sodico** (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals, Inc., New York, NY e Pfizer Inc., New York, NY), immesso nel mercato statunitense nel 2004 ed in quello europeo nel 2006. Il Pegaptanib è un aptamero (dal latino *aptus*, attaccare, e dal greco *meros*, parte o regione) a filamento singolo di acido ribonucleico formato da 28 nucleotidi e legato a due molecole di 20 kDa di glicole polietilenico (PEG) (Sivaprasad 2008). Questa

struttura conferisce una elevata specificità e affinità verso l'isoforma 165 del VEGF extravascolare (maggiormente responsabile della vascolarizzazione patologica), ma nessuna affinità verso il VEGF₁₂₁ (più implicata nella vascolarizzazione fisiologica). In particolare, il legame avviene fra la cisteina 137 del VEGF₁₆₅ e l'uridina-14 dell'aptamero₁₄, impedendone il legame con il suo recettore. Lo scheletro dell'RNA è modificato in modo tale da non permettere la sua degradazione da parte delle endonucleasi endogene dell'individuo (Waheed and Miller 2004), mentre il glicole polietilenico aumenta l'emivita del farmaco nel vitreo fino a 10 giorni (Gragoudas, Adamis et al. 2004). Iniettato in camera vitreale ogni 6 settimane (0,3 mg), impedisce l'interazione fra il VEGF ed i recettori presenti sulle cellule endoteliali, ostacolando così gli effetti angiogenici e l'aumento della permeabilità vasale senza bloccare gli effetti fisiologici del VEGF nell'occhio come in altri distretti.

Studi clinici su Pegaptanib. Lo studio randomizzato, multicentrico, di fase III V.I.S.I.O.N. (*VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization*) è stato condotto nel 2005 su 1186 pazienti (età media di 77 anni) con una degenerazione maculare e neovascolarizzazione coroidale, per analizzare l'efficacia del farmaco a diverse dosi (D'Amico, Masonson et al. 2006). Di questi, 890 sono stati trattati con una iniezione intravitreale di Pegaptanib (0,1 mg, 0,3 mg e 3 mg ogni 6 settimane per un anno), in anestesia topica e in condizioni di asepsi chirurgica, mentre 298 hanno ricevuto una iniezione di placebo. È stato identificato il dosaggio ottimale di 0,3 mg di farmaco. A distanza di un anno, il 70% dei pazienti trattati contro il 55% del placebo ha registrato una perdita del visus minore a 15 linee, mentre il 6% ha acquistato un visus maggiore di 15 lettere (contro il 2%). Dopo il secondo anno di trattamento, il 54% dei pazienti, ai quali è stata somministrata una dose di 0,3 mg di farmaco, ha perso meno di 15 lettere, contro il 45% dei pazienti trattati col placebo. Solo tre eventi avversi (1% dei pazienti) sono stati registrati: endoftalmite, distacco della retina e cataratta. A distanza di due anni dal trattamento, quindi, l'efficacia della terapia con Pegaptanib, garantisce il miglioramento dell'acuità visiva ed inoltre previene la perdita della vista (Gragoudas, Adamis et al. 2004; D'Amico, Masonson et al. 2006).

Il **Bevacizumab (Avastin®, Roche)** è un anticorpo monoclonale umanizzato prodotto nelle cellule ovariche di criceto cinese, usato per via endovenosa nel trattamento del

cancro colon-rettale e del carcinoma mammario metastatico, in associazione con la chemioterapia standard. Grazie alla sua elevata affinità per tutte le isoforme del VEGF-A, impedisce il legame di quest'ultimo con i recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 sulle cellule endoteliali (Bashshur, Bazarbachi et al. 2006). Proprio per la sua capacità di ridurre l'angiogenesi e l'elevata permeabilità vascolare, la Commissione Tecnico-Scientifica (CTS) dell'AIFA con la legge 648/96, ha inserito il Bevacizumab come farmaco usato nel trattamento della degenerazione maculare essudativa e per la neovascolarizzazione intraoculare. In questo modo l'impiego del Bevacizumab è a carico del Sistema Sanitario Nazionale (www.ema.europa.eu).

Studi clinici su Bevacizumab. Avery *et al.* (Avery, Pieramici et al. 2006) hanno condotto uno studio retrospettivo su 79 soggetti, i quali hanno ricevuto una dose mensile di 1,25 mg di Bevacizumab intravitreale per 4-15 settimane. Il grado di spessore della retina in 51 pazienti, durante l'ottava settimana di trattamento, diminuiva di 84 µm rispetto allo stadio iniziale. Bashshur *et al.* (Bashshur, Bazarbachi *et al.* 2006) hanno somministrato una dose doppia di farmaco, pari a 2,5 mg, nel vitreo di 17 pazienti con degenerazione maculare e neovascolarizzazione coroidea. Dopo 4 settimane di intervallo, sono somministrate altre due dosi di farmaco. Già alla quarta settimana si notano risultati positivi sia per quanto riguarda l'acuità visiva che per la densità centrale retinica (CRT). Dopo 12 settimane, il 76% degli occhi, cioè 13/17 pazienti, hanno mostrato un totale riassorbimento del fluido sottoretinico ed il 24%, ovvero 4/17 hanno evidenziato un miglioramento dell'acuità visiva. Inoltre in nessun paziente sono stati rilevati effetti avversi sistemici od oculari a causa della doppia dose del farmaco.

Farmacogenetica del Bevacizumab. Diversi studi suggeriscono che la variante genetica del Fattore H del Complemento Y402H gioca un ruolo fondamentale nella forma umida della degenerazione maculare senile, influenzando sia la tipologia che la grandezza dei nuovi vasi che si formano. Lo studio condotto nel 2007 da Brantley *et al.* (Brantley, Fang et al. 2007) su 86 pazienti affetti da degenerazione maculare senile di tipo umido, trattati solo con Bevacizumab, ha cercato la possibile associazione tra il polimorfismo Y402H (genotipi TT, TC e CC, T allele ancestrale, C allele mutato) e lo SNP Ala69Ser del gene LOC387715/ARMS2 (genotipi GG, GT e TT, G allele

ancestrale, T allele mutato). Ad ogni paziente è stata somministrata una dose intravitreale di 1,25 mg di Bevacizumab quando sono comparsi i primi complessi neovascolari; iniezioni si susseguono ad intervalli di 6 settimane fino a quando non è presente alcuna evidente neovascolarizzazione corioidea. I pazienti hanno ricevuto mediamente 2,8 iniezioni e sono stati arruolati per un periodo di circa 9 mesi. Il genotipo omozigote recessivo CC del gene Fattore H del Complemento è presente nel 22,1% dei pazienti e la frequenza dell'allele C è riscontrata nel 55,2% della popolazione arruolata. Solo il 10,5% dei pazienti con genotipo CC, trattati con Bevacizumab, mostra un miglioramento dell'acuità visiva, se paragonato al 53,7% dei pazienti con genotipo TC e TT ($P=0,004$). Il miglioramento dell'acuità visiva dopo il trattamento è maggiore nei pazienti con genotipo TC o TT rispetto ai portatori del genotipo mutato CC ($P=0,016$). Ciò forse è dovuto al fatto che i pazienti omozigoti CC presentano una importante alterazione della risposta infiammatoria a causa dell'elevata concentrazione di diverse proteine del Fattore H del Complemento; questa situazione richiede, così, una quantità di iniezioni intravitreali di Bevacizumab maggiore per poter assistere ad un miglioramento dell'acuità visiva.

Per quanto riguarda il polimorfismo Ala69Ser, la frequenza dell'allele di rischio T nella popolazione presa in esame è del 39,5% e quindi quella del genotipo TT è del 17,4%. Gli individui con questo genotipo mostrano una lesione maggiore rispetto agli altri, il che suggerisce che l'allele T possa svolgere un ruolo importante nei cambiamenti metabolici e anatomici che portano allo sviluppo della neovascolarizzazione tipica della degenerazione maculare di tipo umido. Tuttavia non è stata trovata nessuna differenza statisticamente significativa tra il genotipo LOC387715/ARMS2 e la risposta al trattamento con bevacizumab.

La *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato, nel luglio del 2006, l'utilizzo negli Stati Uniti di un nuovo farmaco, il **Ranibizumab (Lucentis®, Genetech, Inc.)**; in Europa, l'EMA, ha concesso l'autorizzazione dal gennaio 2007. È un frammento di anticorpo umanizzato (Fab) dal peso molecolare di 48 kDa, derivante dall'intero anticorpo monoclonale murino dal quale era stato sviluppato il Bevacizumab, prodotto dal vettore di espressione *Escherichia Coli*. È capace di legarsi al VEGF₁₆₅, al VEGF₁₂₁ e al VEGF₁₁₀, teoricamente a tutte le isoforme del VEGF-A, impedendo l'interazione con i recettori al fine di contrastare gli effetti negativi della neovascolarizzazione nelle membrane coroidali (Bhisitkul 2006), (Ferrara, Gerber *et al.* 2003). Il sito di legame è

14 volte più affine per il VEGF-A di quello del Bevacizumab (Ferrara, Damico et al. 2006). L'intenzione iniziale dei ricercatori dei laboratori Genetech, consisteva nell'utilizzo intravitale del Bevacizumab, cioè dell'intero anticorpo monoclonale dal peso di 149 kDa. L'idea fu abbandonata quando si dimostrò l'assenza di penetrazione nella retina di un altro anticorpo della stessa misura (Polak and Behar-Cohen 2008). Inoltre, lo studio di Mordenti *et al.* (Mordenti, Cuthbertson et al. 1999) dimostrò che, iniettando nel vitreo della scimmia Rhesus il Bevacizumab, la penetrazione intraretinica dell'anticorpo era molto debole con una lunga permanenza nel sito di inoculo (emivita nel vitreo di 5,6 giorni contro 3,2 giorni del Ranibizumab). Al contrario, il Ranibizumab ha una emivita sistemica più breve (15 ore contro 21 giorni per l'anticorpo completo), e si adatta bene all'ambiente intraoculare, penetrando fino alla coriocalpillare (Rosenfeld, Schwartz et al. 2005). L'emivita così breve del Ranibizumab è associata anche alla minore tossicità, presumibilmente perché, essendo deficitario del frammento Fc, l'anticorpo non riuscirebbe a causare infiammazione nell'occhio (Steinbrook 2006). Il farmaco viene quindi iniettato per via intravitale per massimizzare l'effetto inibitorio del VEGF nella retina, mentre non ha nessun effetto sul VEGF sistemico (Polak and Behar-Cohen 2008). Viene eliminato dai compartimenti oculari o distribuendosi nella camera anteriore o nella retina.

L'iniezione di 0,5 mg di Ranibizumab viene effettuata in sala operatoria, anche se l'ospedalizzazione non è necessaria. Il paziente deve essere anestetizzato usando alcune gocce di cloridrato 0,5% di proparacaina, cloridrato 0,5% di tetracaina e antibiotico. Sebbene alcuni specialisti non praticano anestesia sottocongiuntivale, è consigliata l'iniezione sotto la congiuntiva nel quadrante superotemporale, 3,5-4 mm posteriormente al limbus attraverso la sclera nella cavità vitreale dietro il cristallino dell'occhio. Dopo 4 minuti, si pone uno speculum nell'occhio per consentire alla palpebra di rimanere aperta e si fanno cadere alcune gocce di povidone-iodio 5% nella congiuntiva. La dose di 0,5 mg di Ranibizumab viene iniettata usando un ago di 30 gauge in una siringa da tuberculina di 1 mm; subito dopo si appoggia un tampone di cotone sterile per prevenire la fuoriuscita del farmaco attraverso il sito di inoculo. Infine si irrorà l'occhio per rimuovere qualsiasi residuo di povidone-iodio e si istruisce il paziente ad usare le gocce di antibiotico. Queste devono essere usate due volte al giorno, subito dopo l'iniezione e quattro volte al giorno nei tre giorni successivi. Il

paziente viene visitato un mese dopo l'iniezione per valutare la presenza eventuale di nuove emorragie e di fluido sotto la retina.

La seconda dose di farmaco si inietta dopo un mese, per un totale di tre trattamenti. Se l'occhio è stabile, può essere presa in considerazione l'idea di terminare il trattamento, visitando il paziente a distanza di 3-4 mesi per verificare se si ripresentano sintomi tardivi della degenerazione (Folk and Stone ; Folk and Stone 2010).

Studi clinici su Ranibizumab. Tra marzo e dicembre del 2003, è stato condotto uno studio multicentrico, a doppio cieco, di fase III, denominato MARINA, della durata di due anni (Rosenfeld, Brown et al. 2006). Sono stati arruolati, 716 pazienti con una neovascolarizzazione coroidale minimamente classica od occulta con lo scopo di studiare l'efficacia e la sicurezza delle iniezioni intravitreali ripetute di Ranibizumab. L'end-point primario era rappresentato dal numero dei pazienti che avevano perso meno di 15 lettere di acuità visiva, valutato con le tavole ETDRS ad una distanza di 2 metri. I pazienti hanno ricevuto una iniezione mensile di 0,3 mg o 0,5 mg di Ranibizumab o placebo, per un totale di 24 iniezioni. Dopo 12 mesi, il 94,5% dei pazienti trattati con una dose di 0,3 mg Ranibizumab ed il 94,6% con una dose di 0,5 mg, hanno perso meno di 15 lettere, rispetto al 62,2% dei pazienti che hanno ricevuto placebo. Dopo 24 mesi, i benefici sono stati mantenuti; infatti il 92,0% dei pazienti trattati con 0,3 mg di farmaco e il 90,0% trattati con una dose di 0,5 mg, hanno raggiunto l'end point prefissato contro il 52,9% del gruppo placebo. Durante lo studio solo l'1% (5 casi) ha sviluppato una presunta endoftalmite e l'1,3% (6 casi) l'uveite, dimostrando così che il Ranibizumab previene la perdita della visione e migliora l'acuità visiva nei pazienti con degenerazione maculare legata all'età di tipo essudativa, associata a neovascolarizzazione.

Lo studio ANCHOR è stato condotto su 423 soggetti provenienti da USA, Europa e Australia con una neovascolarizzazione coroidale prevalentemente classica. Essi hanno ricevuto uno dei seguenti trattamenti: a) terapia fotodinamica con verteporfina con una iniezione oculare di placebo; b) una iniezione oculare mensile di Ranibizumab, 0,3 mg, con una terapia fotodinamica fittizia; c) una iniezione oculare mensile di 0,5 mg di Ranibizumab, con una terapia fotodinamica fittizia (Ferrara, Damico *et al.* 2006). Il 94,3% dei pazienti trattati con una dose di 0,3 mg di Ranibizumab e il 96,4% di coloro i quali sono stati trattati con 0,5 mg dello stesso farmaco, hanno perso meno di 15 lettere

contro il 64,3% dei pazienti trattati con verteporfina. L'acuità visiva è migliorata di 15 lettere, nel 35,7% dei pazienti del gruppo b) e nel 40,3% dei pazienti del gruppo c), contro il 5,6% del gruppo trattato con una iniezione di placebo intraoculare (Brown, Michels et al. 2009).

Lo studio PIER condotto su 184 pazienti con degenerazione maculare di tipo umido, prevede l'iniezione intravitreale di una dose di 0,3 mg o 0,5 mg di Ranibizumab, o un placebo, ogni mese per i primi 3 mesi ed ogni 3 mesi per i due anni successivi. Sono stati registrati risultati positivi già dopo 3 mesi dalla prima iniezione, in particolare: per la dose di 0,3 mg si è riscontrato un miglioramento di 2,9 lettere ETDRS mentre per quella di 0,5 mg di 4,3 lettere, rispetto alla perdita di 8,7 lettere dei pazienti del gruppo di controllo. Dopo un anno, i pazienti trattati con Ranibizumab hanno perso 1,6 lettere per la dose 0,3 mg e 0,2 lettere per la dose 0,5, valori molto bassi se paragonati alla perdita di 16,3 lettere dei pazienti del gruppo di controllo (Abraham, Yue et al. ; Abraham, Yue et al. 2010).

Farmacogenetica di Ranibizumab. Sono pochi gli studi atti a determinare se i genotipi del Fattore H del Complemento (CFH) hanno un effetto farmacogenetico sul trattamento con Ranibizumab della degenerazione maculare senile (DMS) di tipo neovascolare. Recentemente Lee e colleghi (Lee, Raya et al. 2009) hanno condotto uno studio retrospettivo arruolando 156 pazienti di razza Caucasica affetti da degenerazione maculare senile di tipo umido. Ad ognuno di loro è stata iniettata una dose intravitreale di Ranibizumab di 0,5 mg e sono stati seguiti per 9 mesi, ripetendo il trattamento quando si ripresentano i fenomeni emorragici nella macula o il versamento di fluidi intraretinici o sottoretinali, dopo esame con tomografia a coerenza ottica. Il polimorfismo Y402H del Fattore H del Complemento determina tre possibili genotipi: l'ancestrale TT, presente nel 24% della popolazione analizzata, TC nel 45% ed infine il genotipo omozigote recessivo mutato CC nel 31%. In totale, quindi, la prevalenza dell'allele di rischio C nella popolazione studiata da Lee *et al.* (2009) è del 54%. Gli effetti del genotipo sul trattamento con Ranibizumab, sono stati analizzati considerando il miglioramento dell'acuità visiva dopo 6 e dopo 9 mesi. Quando si prende in considerazione il numero delle iniezioni dopo un periodo di 9 mesi, è stato osservato che, rispetto agli omozigoti TT, i pazienti portatori del genotipo eterozigote CT richiedono nel 25% dei casi ($P=0,12$) una ulteriore dose di farmaco. Questo trend viene

confermato dall'analisi dei pazienti con genotipi mutato recessivo CC, dei quali il 37% richiede una ulteriore iniezione di Ranibizumab ($P=0,04$). Questi risultati suggeriscono che gli effetti del farmaco dipendono da un particolare assetto genico, che influenza i livelli di infiammazione e favorisce lo sviluppo di nuovi vasi tipici della degenerazione maculare senile di tipo umido.

PAZIENTI E METODI

Razionale dello studio

- 1) Nei paesi industrializzati è stato riscontrato un aumento dell'incidenza della degenerazione maculare senile di tipo umido o di tipo atrofico nella popolazione al di sopra dei 65 anni. La degenerazione maculare senile di tipo umido causa una progressiva perdita della funzione visiva centrale dovuta al danno dei fotorecettori, allo sviluppo di una vascolarizzazione coroidea (CNV) e manifestazioni correlate come emorragia subretinale, distacco dell'epitelio retinico pigmentato (EPR) e cicatrice disciforme fibrovascolare.
- 2) L'angiogenesi, ovvero lo sviluppo di nuovi capillari, è stato dimostrato che riveste un ruolo centrale nella patogenesi della degenerazione maculare di tipo umido. Il processo coinvolge la migrazione, la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali, così come la maturazione vascolare ed il rimodellamento dei vasi. Nonostante l'angiogenesi rappresenti un processo di naturale crescita e sviluppo di nuovi capillari, può anche rivelarsi distruttivo quando va ad interferire con le caratteristiche anatomiche e funzionali del segmento posteriore dell'occhio (Nowak 2006).
- 3) È stato dimostrato che il VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) è fortemente implicato nei processi di neoangiogenesi retinica connessa alla degenerazione maculare senile di tipo umido poiché: a) è altamente selettivo per le cellule epiteliali; b) la sua elevata diffusibilità gli permette di raggiungere il suo target; c) induce una iperpermeabilità vascolare, creando l'ambiente adatto per la crescita delle cellule endoteliali; d) promuove la degradazione della matrice extracellulare permettendo la migrazione delle cellule endoteliali (Bressler 2009).
- 4) È stato dimostrato che alcuni polimorfismi del VEGF sono associati con la forma neovascolare della degenerazione maculare senile ed in generale con diverse patologie nelle quali l'angiogenesi gioca un ruolo fondamentale. Gli SNPs del VEGF presi in esame sono: -2578 A/C e -1154 G/A.
- 5) La recente introduzione nella terapia dei pazienti con degenerazione maculare senile di tipo umido sia del trattamento fotodinamico che dei farmaci antiangiogenici, inibitori del VEGF, ha portato al miglioramento dei pazienti affetti da questa patologia. Uno dei farmaci usati è Pegaptanib sodico (Macugen®; Eyetech Pharmaceuticals, Inc, New

York, NY) che lega con elevatissima specificità l'isoforma VEGF₁₆₅, impedendone l'attacco con il recettore del VEGF.

- 6) Il farmaco di elezione, studiato specificamente per trattare la degenerazione maculare senile di tipo umido, approvato dalla *Food and Drug Administration* è rappresentato dal frammento anticorpale umanizzato Ranibizumab (Lucentis®) perché riconosce, lega e inibisce tutte le isoforme del VEGF, incluse le forme VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ e VEGF₁₁₀.

OBIETTIVI

Lo studio è stato condotto secondo gli standard internazionali di *Good Clinical Practice* in accordo con l'ultima revisione della Dichiarazione di Helsinki e con la normativa locale.

Gli scopi del seguente studio sono i seguenti:

- Valutare e comparare i polimorfismi del gene del VEGF nei pazienti affetti da degenerazione maculare senile di tipo umido.
- Studiare la correlazione tra l'assetto genotipico dei pazienti (polimorfismi genici del VEGF) ed efficacia/tollerabilità del trattamento col farmaco antiangiogenico Ranibizumab (Lucentis®).

Gli obiettivi dello studio sono stati raggiunti grazie a:

- Esami routinari per la valutazione dell'efficacia e della tollerabilità ai trattamenti con Lucentis®
- Tecniche di biologia molecolare per le analisi genetiche
- Analisi statistica univariata e multivariata dei risultati ottenuti

SELEZIONE DEI PAZIENTI

Tra il 2010 e il 2011, 64 pazienti hanno dato il loro consenso informato scritto per partecipare al seguente studio dopo l'approvazione da parte del Comitato Etico (EudraCT Number 2007-004487-53).

Criteri di inclusione

- Pazienti con diagnosi di neovascolarizzazione coroideale subfoveale (CNV) attiva, diagnosticata con fluoroangiografia tradizionale e/o con verde di indocianina e tomografia ottica a coerenza (OCT) ;
- Pazienti con assenza di patologie retino-coroideali associate alla CNV, quali strie angioidi, elevata miopia (errore di refrazione superiore a -6,00 diottrie), corioretinopatia sierosa centrale o presunta istoplasmosi oculare;
- Disponibilità ad eseguire il Follow-up;
- Pazienti con età superiore a 50 anni;
- Adeguata funzionalità renale: creatininemia < 1,25·VN (valori normali);
- Adeguata funzionalità epatica: bilirubinemia < 1,5 mg/dl, fosfatasi alcalina, SGOT ed SGPT < 2,5·VN;
- Adeguata funzionalità midollare: emoglobina > 10 g/dl, neutrofili > 2,0·10⁹/L, piastrine > 150·10⁹/L;
- Consenso informato scritto.

Criteri di esclusione

- Età inferiore a 50 anni;
- Gravidanza o allattamento in corso;
- Precedenti trattamenti per la DMS (bevacizumab, pegaptanib sodico e terapia fotodinamica (PDT));
- DMS siero-emorragica (DMS essudativa nella quale almeno il 50% delle lesioni emorragiche è definita tale secondo l'SST (inserire la biblio num 23 del paper)
- Distacco dell'epitelio pigmentato retinico;
- CNV extrafoveale;
- Vasculopatia polipoide idiopatica della coroide e proliferazione angiomatosa retinica;

- Patologie concomitanti che potrebbero interferire con il follow-up (tra cui il glaucoma e la retinopatia diabetica);
- Danni strutturali permanenti alla fovea centrale come la fibrosi sottoretinica evidenziata con esame angiografico e l'interruzione della giunzione segmento interno (SI)/segmento esterno (SE) dei fotorecettori diagnosticata attraverso tomografia ottica a coerenza (OCT);
- Spessore foveale $\geq 225\mu\text{m}$;
- Impossibilità di eseguire un follow-up.

DISEGNO DELLO STUDIO

Piano di trattamento

I pazienti eleggibili per lo studio sono stati candidati a ricevere tre iniezioni intravitreali consecutive di Ranibizumab di 0,5 mg/0,05ml a intervalli mensili (basale, mese 1 e 2). L'intervallo di tempo tra la diagnosi e la prima iniezione è stata inferiore ad una settimana per tutti i casi.

I prelievi

Prelievi di sangue intero sono stati effettuati con provette contenenti eparina/EDTA per un totale di 3 ml durante la prima visita per le analisi genetiche successive.

VALUTAZIONI PRE-TRATTAMENTO, DURANTE TRATTAMENTO

Valutazione pre-trattamento

Dopo l'arruolamento i pazienti sono stati sottoposti a visite oculistiche comprensive di:

- Esame obiettivo del segmento anteriore e posteriore;
- Tonometria;
- Misurazione dell'acuità visiva per lontano e per vicino eseguita tramite tavole ETDRS;
- Test di Amsler;
- Angiografia oculare con fluoresceina e verde di indocianina;

- Tomografia a coerenza ottica;
- Microperimetria.

Valutazione durante il trattamento

Le visite di controllo sono state programmate a 3 ± 1 e 28 ± 2 giorni dopo ogni iniezione. Al 3° giorno successivo ad ogni iniezione sono stati effettuati l'esame con la lampada a fessura e l'esame biomicroscopico del fundus oculare in modo da poter determinare qualsiasi segno precoce di infezioni. Le misurazioni di miglior acuità visiva corretta (BCVA), OCT e l'angiografia oculare con fluoresceina e verde di indocianina sono state effettuate al 28° giorno successivo ad ogni iniezione.

Valutazioni farmacogenetiche

Estrazione del DNA da sangue periferico con Kit Qiagen

Il DNA genomico è stato estratto dai campioni di sangue intero prelevato dai pazienti usando il Kit QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN).

Il Kit contiene:

- n° 250 colonnine di estrazione del DNA (QIAamp spin columns).
Il principio sul quale si basa l'estrazione del DNA, dipende dalla proprietà del DNA di legarsi a supporti inerti rappresentati dal filtro di silica-gel contenuto nella colonnina, eliminando l'eluato contenente le proteine, grazie a lavaggi con tamponi adeguati.
- n° 750 tubi da 2 ml.
- 54 ml di buffer AL (conservato a temperatura ambiente, 15-25 °C) necessario per lisare le cellule del sangue. Necessita di una delicata agitazione prima dell'uso.
- 95 ml di buffer AW1 concentrato (conservato a temperatura ambiente, 15-25 °C). Prima dell'uso necessita della diluizione con l'aggiunta di 125 ml di etanolo assoluto, fino a raggiungere un volume finale di 220 ml.
- 66 ml di buffer AW2 concentrato (conservato a temperatura ambiente, 15-25 °C). Prima dell'uso, bisogna risospenderlo in 160 ml di etanolo assoluto, fino al raggiungimento di un volume finale pari a 226 ml.
- 60 ml di buffer AE (10mM TrisCl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) che permette il distacco del DNA del campione dal filtro della colonnina alla eppendorf.
- 1 vial di QIAGEN Proteasi (conservata a 2-8 °C o a -20°C) da risospendere in 5,5 ml di solvente Protease Solvent (acqua nucleasi-free contenente 0,04% di azoturo di sodio). É

un enzima ad ampio spettro utilizzato per digerire le proteine cellulari, in particolare le nucleasi.

Sono stati incubati 200 μ l di sangue intero periferico in una eppendorf autoclavata assieme a 20 μ l di Qiagen Proteasi e 200 μ l di buffer AL. Messi nel vortex per 15 secondi, vengono incubati per 10 minuti a 56 °C, in modo da attivare la proteasi.

Sono stati aggiunti 200 μ l di etanolo assoluto, con ulteriore passaggio nel vortex per circa 15 secondi. Il composto è stato trasferito in una colonnina da estrazione del DNA (QIAamp Spin Column) fornita dal kit e centrifugato a 8000 rpm per 1 minuto. Il DNA contenuto nel campione si lega al filtro presente in essa, mentre per eliminare le proteine, si eseguono dei lavaggi con tamponi precedentemente diluiti. Il primo lavaggio si effettua aggiungendo 500 μ l di buffer AW1, con successiva centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto. Eliminato l'eluato, si ripete la procedura aggiungendo 500 μ l di buffer AW2, centrifugando per 3 minuti a 14000 rpm.

Scartato il filtrato, si trasferisce la QIAamp Spin Column in una eppendorf, aggiungendo 200 μ l di buffer AE per 5 minuti a temperatura ambiente. In questo modo il DNA adsorbito alla membrana della colonna viene eluato nella eppendorf dopo una centrifugata a 8000 rpm per 1 minuto.

La concentrazione del DNA (ng/ μ l) in 1 μ l di campione è stata effettuata misurando l'assorbanza o densità ottica (OD) dell'acido nucleico, utilizzando il Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, adatto per microvolumi di campione fino a 1 mL. Lo strumento sfrutta la tensione superficiale dei liquidi, permettendo il pipettamento di 1 μ l di campione direttamente sulla superficie di misura rappresentata da un cavo di fibre ottiche. Un secondo cavo, presente sul braccio dello strumento, viene messo a contatto con il campione caricato in modo tale che esso funga da ponte fra le due estremità. La sorgente luminosa è costituita da una lampada xenon, che attraversa il campione e viene analizzata dallo spettrofotometro, collegato ad un software che ci mostra per ogni campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/ μ l. È necessario tarare lo strumento prima di procedere con le letture dei campioni, usando 1 μ L di buffer, poiché il DNA è stato eluito in questo tampone. Il NanoDrop™ 1000 permette la lettura dell'assorbanza a diverse lunghezze d'onda:

- 230 nm, la lunghezza d'onda di assorbimento tipica dei carboidrati e dei fenoli;
- 260 nm, lunghezza d'onda propria degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici;
- 280 nm, lunghezza d'onda di assorbimento delle proteine.

Oltre alla quantificazione del DNA, è importante valutare l'indice di purezza di ogni campione (IP), in funzione della contaminazione da parte di proteine o carboidrati complessi. Se il rapporto tra A_{260}/A_{280} è compreso tra 1,7 e 2, ed il rapporto tra A_{260}/A_{230} è compreso tra 1,7 e 2,2, allora il campione è stato estratto correttamente.

I campioni, dopo le analisi di estrazione e quantificazione del DNA, sono mantenuti in eppendorf autoclavate a -80°C .

Analisi genetica con PCR *Real Time*.

La PCR *Real Time*, denominata anche PCR quantitativa in tempo reale, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea del DNA già nelle prime fasi della reazione. Questo rappresenta un grande vantaggio rispetto alla PCR tradizionale o “*end point*”. Per capire perché questa è fortemente limitante, bisogna precisare che nella PCR si possono osservare tre fasi:

- esponenziale, durante la quale, ad ogni ciclo, il prodotto (**P**) si accumula in modo esponenziale (**n**) ed è fortemente dipendente dal numero di copie di template (**T**) di partenza, secondo la formula:

$$P=(2)^n \cdot T$$

durante questa fase di amplificazione si può osservare una elevatissima precisione ed efficienza;

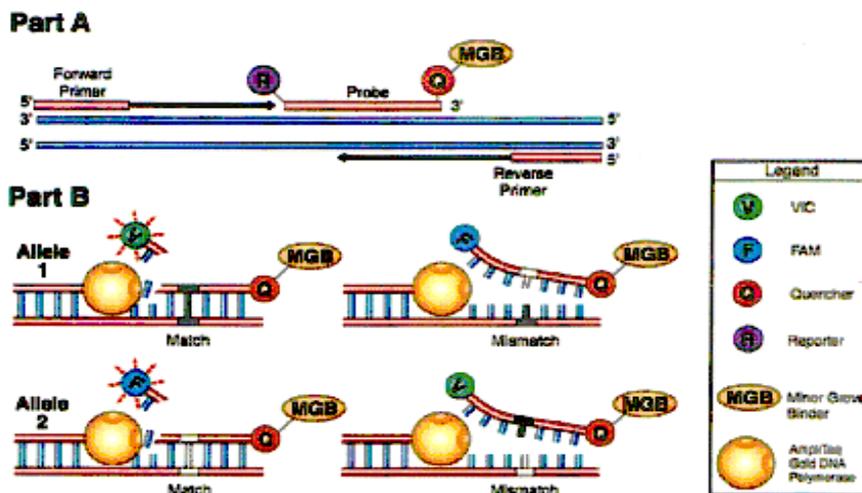
- lineare, nella quale i componenti della reazione sono stati consumati per cui la reazione adesso procede più lentamente; inoltre i prodotti di PCR non vengono più duplicati ad ogni ciclo;
- plateau, dove la reazione non procede, infatti non si osserva più incremento nei prodotti di PCR che, anzi, iniziano ad essere degradati.

Nella PCR *Real Time*, al contrario, il numero dei cicli necessario per raggiungere una certa quantità di amplificato è proporzionale alla quantità di target iniziale, permettendo altresì la quantificazione del DNA in modo accurato e veloce in tempo reale, durante **la fase esponenziale** della reazione, quando l'efficienza della amplificazione è minimamente influenzata dalle variabili della reazione. Questo è permesso dalla fluorescenza che viene emessa durante l'amplificazione e che viene generata dall'uso di sonde ad ibridazione specifiche per il frammento di interesse e marcate con molecole fluorescenti.

Nel saggio Taqman (*Fluorogenic 5' Nuclease Assay*), viene usata la sonda di tipo Taqman, un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio compresa tra il primer senso e antisenso del gene da amplificare. Essa presenta all'estremità 5' un fluorocromo "Reporter" (R) ad alta energia che emette fluorescenza, e all'estremità 3' una molecola "Quencher" (Q) a bassa energia. La funzione di quest'ultimo fluorocromo è quella di spegnere la fluorescenza del "Reporter". Infatti, se la molecola "Quencher" è troppo vicina al "Reporter", Q assorbe tutti i fotoni ed impedisce ad R di emettere fluorescenza.

Nel corso di ogni ciclo di PCR, si assiste alla fase di "annealing" nella quale, sia i primers che la sonda, si legano al template. Durante la fase di "estensione" del filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, viene usata una polimerasi di tipo I, la Taq polimerasi, alla quale non è stata eliminata la sua attività esonucleasica 5'-3'. Durante la duplicazione, quindi, l'enzima incontra un piccolo frammento di DNA, ovvero la sonda Taqman, che presenta l'estremità 5' libera. La polimerasi rompe e digerisce il frammento a partire da questa estremità, causando il distacco del "Reporter". In questo modo il fluoroforo va in soluzione, non subisce inibizione da parte del "Quecher" in quanto la distanza è troppo elevata, ed emette fluorescenza rilevata da un detector. In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione. Se la sonda è intatta, al contrario, Q spegne la fluorescenza di R perché la loro distanza è molto ravvicinata (**Figura 7**).

Figura 7. Meccanismo di azione della PCR Real Time



Confrontando la fluorescenza dei campioni rispetto ad uno standard di riferimento, si può risalire al numero di copie del frammento di partenza. Tuttavia non è possibile risalire alla quantità di DNA durante i primi cicli poiché la fluorescenza che viene emessa è troppo bassa, ma è comunque possibile misurarla all'interno della fase di crescita esponenziale. Per ogni campione si otterrà un grafico con la sua curva di amplificazione, e tale curva salirà tanto prima quanto maggiore è la quantità di template di partenza (**Figura 8**).

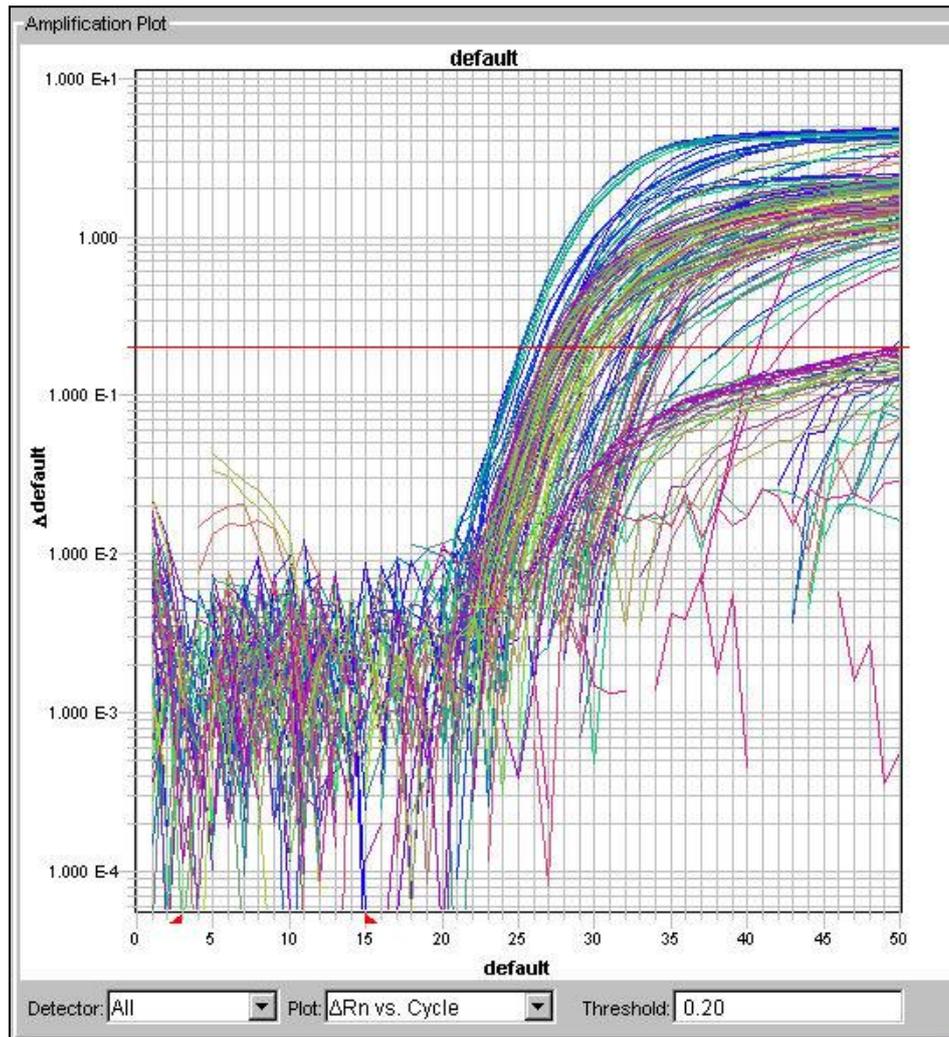


Figura 8. Curve di amplificazione. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente è indicato dalla linea soglia in rosso; il ciclo nel quale il campione supera questo livello è definito ciclo della soglia (C_T).

Per tale analisi genotipica, sono necessarie due sonde marcate diversamente che identificano le due varianti alleliche; misurando la fluorescenza, ottenuta con il

Fluorogenic 5' nuclease assay Taqman®, è stato possibile stabilire se un soggetto è eterozigote od omozigote per uno dei due alleli.

Protocollo di esecuzione di SNP Genotyping

Per preparare i componenti di una reazione, si seguono le indicazioni riportate nella **Tabella 2**. Infatti Applied Biosystems 7300 e 7500 Real-Time PCR System e ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System, prevedono l'uso di piastre di reazione di 96 pozzetti standard per eseguire le reazioni di amplificazione, in un volume finale di campione di 25 µl.

Tabella 2. Linee guida per la reazione di PCR.

Componenti della reazione	Volume/Pozzetto (5 µL volume di reazione)	Volume/Pozzetto (25 µL volume di reazione)	Concentrazione finale
TaqMan® Universal PCR Master Mix	2.5	12.5	1X
20X, 40X*, 80X* TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix	0.25	1.25	1X
DNA genomico diluito in dH ₂ O ¹	2.25	11.25	--
Totale	5	25	--

* Le miscele degli assay 40X e 80X TaqMan® devono essere diluite fino a raggiungere una concentrazione di 20X. Questa è la soluzione di lavoro ottenuta diluendo gli assay con il tampone TE, costituito da Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, a pH 8,0 e da acqua DNase-free.

¹ 1-20 ng di DNA genomico.

Al termine dei cicli programmati, lo strumento ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) misura la fluorescenza che si è sviluppata permettendo di stabilire il contenuto allelico di ogni campione presente sulla piastra (**Figura 9**).

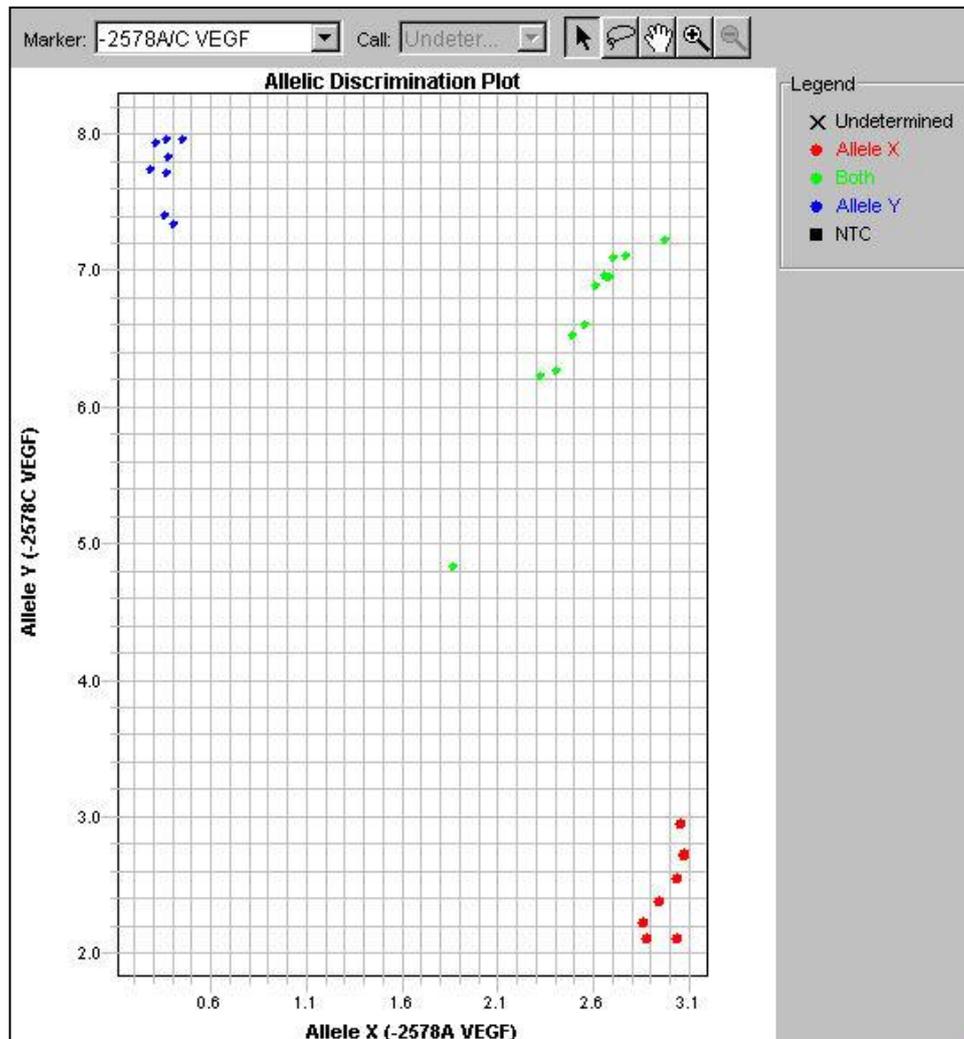


Figura 9. Plot di discriminazione allelica

In questo studio le sonde specifiche per gli alleli utilizzate sono state:

- **rs699947 -2578 VEGF A/C**

TGCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA[A/C]GATCTGGGTGGATAATCAGACT
GAC

Allele ancestrale A Allele mutato C

- **rs1570360 -1154 VEGF G/A**

GAGCCCGGGCCCGAGCCGCGTGTGGA[A/G]GGGCTGAGGCTCGCCTGTCCCC
GCC

Allele ancestrale G Allele mutato A

Il criterio di selezione di questi due SNP locati nella regione promotore del VEGF-A è basato sull'esistente correlazione tra i genotipi del VEGF-A e l'espressione genica del VEGF (Boekhoorn, Isaacs et al. 2008). Inoltre, Immonen e colleghi hanno scoperto che lo SNP rs699947 (-2578A/C) è stato un forte determinante dell'esito anatomico dopo PDT (Immonen, Seitsonen et al.). In un altro studio farmaco genetico, lo SNP VEGF-A rs699947 (-2578A/C) è stato associato a cambiamenti di visione a 1 mese dopo l'iniezione intravitreale di bevacizumab (Imai, Mori et al.). L' rs1570360 (-1154G / A) è stato analizzato per una possibile associazione con la risposta a bevacizumab intravitreale (Wickremasinghe, Guymer et al.), anche se Churchill et al. hanno mostrato una significativa indipendente associazione di rs1570360 (-1154G/A) e la retinopatia diabetica proliferativa (Churchill, Carter et al. 2008).

ANALISI STATISTICA DEI DATI

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica usando il software Graphpad Prism versione 5.0 (Graphpad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA). Il livello di significatività dei dati è stato fissato per valori di $P < 0,05$. L'equilibrio di Hardy-Weinberg e il test di *linkage disequilibrium* tra i loci è stato calcolato usando PHASE e Arlequin versione 3.1 (Swiss Institute of Bioinformatics, Bein, Switzerland). La relazione tra gli outcome funzionali come la BVCA e i genotipi sono stati valutati attraverso il test non parametrico di Kruskal-Wallis. E' stata utilizzata la correzione di Bonferroni per test multipli, e un valore di p a due code $< 0,025$ ($= 0,05/2$ SNPs) è stato considerato statisticamente significativo.

SAMPLE SIZE

Ipotizzando un effetto del polimorfismo -2578A/C del VEGF-A sull'outcome visivo nel trattamento con ranibizumab, la dimensione del campione è stata calcolata in modo da ottenere un miglioramento dell'acuità visiva dell' 80% con-2578CC VEGF-A rispetto al genotipo 2578AA-VEGF-A. Per rilevare una differenza significativa ($p = 0,05$) tra genotipi omozigoti del gene VEGF-A, è stato calcolato che un campione minimo di 46 occhi era necessario per avere la potenza statistica desiderata dell' 80%. Al contrario, per l'rs1570360, la dimensione minima necessaria del campione calcolata è risultata di 72 occhi. Il calcolo della dimensione del campione è stata effettuata con il software statistico libero G * Power 3 (Institut für Experimentelle Psychologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Germany) (Faul, Erdfelder et al. 2007).

RISULTATI

Sessantaquattro pazienti (64 occhi) di età media 76 anni (range 57-89) con degenerazione maculare senile di tipo umido sono stati arruolati tra il 2010 ed il 2011 nel presente studio. La degenerazione maculare senile è stata valutata tramite fluorangiografia con fluoresceina e con verde di indocianina e con tomografia a coerenza ottica (OCT). I pazienti hanno ricevuto una prima iniezione di 0,5 mg di Ranibizumab (Lucentis®), qualche giorno dopo l'arruolamento. Dopo un trattamento con 3 iniezioni di ranibizumab, è stata valutata nei 64 pazienti la risposta alla terapia con agenti anti-VEGF sia sul piano funzionale, sia sul piano anatomico. La distinzione risulta necessaria, in quanto non sempre si registra una concordanza tra le modificazioni anatomiche e visive ottenute dopo la loading-phase del trattamento, ovvero dopo il primo ciclo di trattamento con 3 iniezioni di Ranibizumab.

Le caratteristiche dei pazienti e la caratterizzazione dei fenotipi della DMS sono schematizzate nella **Tabella 3**. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i genotipi del VEGF-A e l'età dei pazienti affetti da DMS.

Demographic/clinical characteristics	VEGF -2578A/C			VEGF -1154G/A		
	AA	AC	CC	GG	AG	AA
Number of patients, n (%)	9 (14.06)	31 (48.44)	24 (37.50)	6 (9.38)	26 (40.62)	32 (50.00)
Mean age (years)	78.07	78.18	78.27	78.75	77.96	78.27
Male, n (%)	3 (8.57)	17 (48.57)	15 (42.86)	2 (5.71)	13 (37.14)	20 (57.15)
Female, n (%)	6 (20.69)	14 (48.28)	9 (31.03)	4 (13.79)	13 (44.83)	12 (41.38)
Mean age male (years)	76.81	78.00	78.26	77.69	77.82	78.26
Mean age female (years)	77.77	78.15	78.13	78.62	77.55	78.13
Eyes with classic or predominantly classic lesions, mean, n (%)	3 (33.33)	17 (54.84)	2 (33.33)	2 (33.33)	13 (50.00)	13 (40.63)
Size of lesion (mm ²) ± SD	5.2 ± 2.5	5.3 ± 2.4	5.8 ± 2.6	5.5 ± 2.2	5.4 ± 2.4	5.5 ± 2.6
Size of choroidal neovascularization (mm ²) ± SD	2.7 ± 1.4	2.5 ± 1.3	2.9 ± 1.6	2.9 ± 1.3	2.5 ± 1.5	2.8 ± 1.7
Greatest linear dimension (µm) ± SD	3682 ± 458	3592 ± 432	3817 ± 510	3788 ± 413	3636 ± 453	3713 ± 461
Foveal thickness (µm) ± SD	414 ± 163	399 ± 158	422 ± 178	426 ± 149	392 ± 165	421 ± 189
Pretreatment VA (mean ± SD)	31.67 ± 17.61	35.48 ± 14.17	35.63 ± 12.79	28.67 ± 20.24	36.73 ± 12.08	34.78 ± 14.33
Post-treatment VA (mean ± SD)	29.89 ± 18.67	41.74 ± 13.46	44.25 ± 14.99	24.84 ± 20.98	43.27 ± 10.57	42.22 ± 16.10
Outcome (mean ± SD)	-1.78 ± 6.3	+6.26 ± 11.6	+8.62 ± 10.9	-3.84 ± 6.5	+6.54 ± 11.5	+7.44 ± 10.8
Completely dry lesions after induction therapy, n (%)	3 (33.33)	17 (54.83)	14 (58.33)	1 (16.66)	13 (50.00)	23 (71.87)

SD: Standard deviation; VA: Visual acuity.

Tabella 3. Caratteristiche dei pazienti arruolati.

Polimorfismi genici del VEGF-A

In Tabella 4 sono riportate le frequenze geniche, le frequenze alleliche, i valori di chi-quadro (χ^2) e l'analisi dell'equilibrio di Hardy-Weinberg per i polimorfismi del gene VEGF-A dei 64 pazienti inseriti nello studio. Poiché il valore di P è per tutti i genotipi maggiore di 0,05 ($P > 0,05$) si può affermare che nei 64 pazienti la loro distribuzione, per i polimorfismi del VEGF-A in studio, è in equilibrio di Hardy-Weinberg, come anche recentemente riportato da García-Closas e colleghi (Garcia-Closas, Malats et al. 2007).

Posizione	Genotipo	Frequenza genica N%	Frequenza allelica N%	Chi-Quadro	Equilibrio di Hardy-Weinberg
VEGF (A-2578C)	9AA	AA=14,06%	79C=61,72% 49A=38,28%	$\chi^2=0,040$	$P=0,841$ SI
	31AC	AC=48,44%			
	24CC	CC=37,50%			
VEGF (G-1154A)	6GG	GG=9,38%	38G=29,69% 90A=70,31%	$\chi^2=0,046$	$P=0,830$ SI
	26AG	AG=40,62%			
	32AA	AA=50,00%			

If $p < 0.05$ - not consistent with HWE.

Tabella 4. Chi-quadro ed equilibrio di Hardy-Weinberg per i polimorfismi del VEGF-A.

È stata valutata la risposta funzionale completa dopo il trattamento che comprende la misurazione dell'acuità visiva (espressa in numero di lettere ed eseguita con tavole ETDRS). Il campione totale ha evidenziato un incremento medio di 6.02 ± 11.11 lettere ETDRS ($P < 0.001$; 95% CI: 3.239-8.792), dal valore basale di 35.00 ± 14.02 ad un valore finale di 41.02 ± 15.32 lettere ERDRS (tabella 2). Al basale l'acuità visiva dei sei genotipi non è statisticamente significativa. L'acuità visiva pre e post-trattamento per tutti gli occhi è stata esaminata in correlazione a tutti i differenti genotipi del VEGF-A.

Ranibizumab è risultato essere significativamente efficace nei pazienti portatori degli alleli del VEGF-A -2578C, da -1.778 (numero di pazienti; n=9), +6.258 (n=31) a +8.625 (n=24) lettere EDTRS rispettivamente per i genotipi AA, AC e CC; P=0.0192). Questi dati suggeriscono che ranibizumab potrebbe essere più efficace nei pazienti portatori dell'allele C dopo misurazione dell'acuità visiva (figura 10A). I dati riguardanti il genotipo del VEGF-A rs1570360 (-1154G/A) e la sua correlazione con l'acuità visiva pre e post trattamento non sono risultati statisticamente significativi. I pazienti portatori di questo genotipo del VEGF-A hanno riscontrato una di acuità visiva di -3.833 (n=6), +6.538 (n=26) e +7.438 (n=32) lettere ETDRS per i genotipi GG, AG e AA, rispettivamente (P=0.0325; figura 10B).

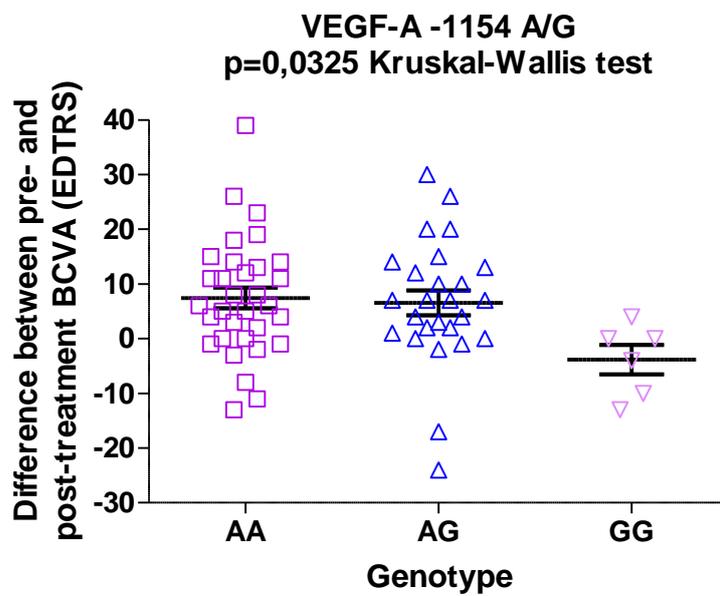
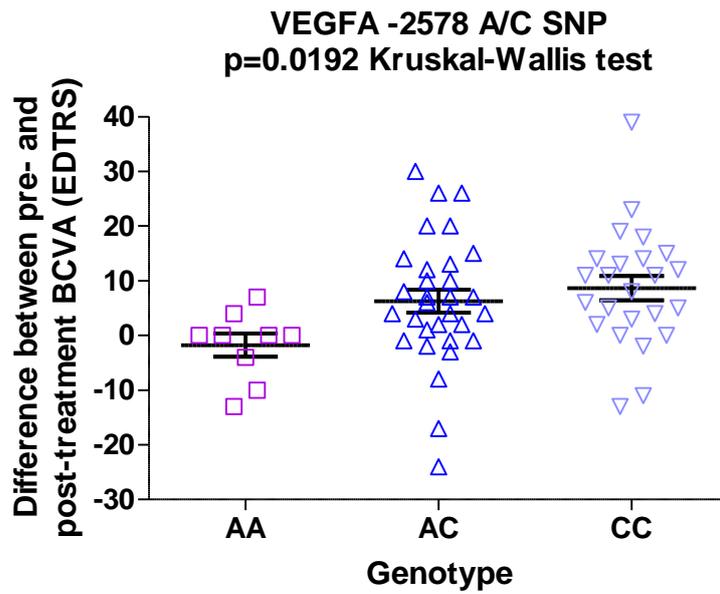


Figura 10 A

DISCUSSIONE

La degenerazione maculare senile di tipo umido è la principale causa di perdita irreversibile della vista negli individui al di sopra dei 65 anni. A causa del continuo aumento dell'età della popolazione nei Paesi Industrializzati, l'attività di ricerca sta incrementando gli studi per prevenire o ritardare il peggioramento della patologia. La neovascolarizzazione coroidea è sicuramente l'evento critico della degenerazione maculare con la formazione di nuovi vasi al di sotto della retina, attraverso la membrana di Bruch e l'epitelio retinico pigmentato, che comportano un progressivo deterioramento della parte centrale della retina, la macula, determinando una lenta e progressiva perdita dell'acuità visiva. I pazienti affetti dalla degenerazione maculare senile di tipo umido, quindi, non riescono a percepire i dettagli fini di un oggetto, con elevate difficoltà a focalizzare le immagini. La patologia interessa solo la retina centrale, non quella periferica, per cui gli affetti mantengono la visione laterale ed una residua abilità funzionale sino alla cecità parziale e/o completa all'interno del campo visivo. La degenerazione compromette la qualità di vita del paziente, riducendo la stabilità posturale e aumentando le cadute in quanto viene meno la percezione della profondità, fondamentale per evitare gli ostacoli nell'ambiente; il 30% dei pazienti con degenerazione maculare in entrambi gli occhi sviluppa una grave depressione dovuta alla perdita della condizione di indipendenza ((Rovner, Casten et al. 2007)). La terapia utilizzata nel trattamento della degenerazione maculare senile, inizialmente, aveva come obiettivo la distruzione dei vasi sottoretinici neoformati, tramite fotocoagulazione laser. La maggior parte dei pazienti, tuttavia, registrava una grave e immediata perdita del visus a causa del danno che il laser provocava anche nella retina sana. Successivamente è stato identificato il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) come regolatore chiave del processo angiogenico: agendo attraverso molteplici vie di trasduzione del segnale, stimola la formazione dei nuovi vasi e aumenta la permeabilità vascolare, eventi particolarmente importanti nella neovascolarizzazione coroidale tipica della degenerazione maculare senile di tipo umido. La sua identificazione ha spinto i ricercatori a sintetizzare il frammento anticorpale umanizzato Ranibizumab (Lucentis®), sviluppato specificamente per uso oftalmico. Quest'ultimo, presenta importanti proprietà anti-angiogeniche riconoscendo, legando e neutralizzando tutte le isoforme del VEGF, inclusa la VEGF₁₆₅. Iniettato intravitrealmente, permette in questo

modo di arrestare la progressione della malattia inibendo la neovascolarizzazione, non coinvolgendo la retina sana e migliorando nettamente la qualità di vita del paziente. L'individuo, recuperando la funzionalità visiva, riacquista l'autonomia necessaria per lo svolgimento dell'attività quotidiana che risultava compromessa dopo l'insorgenza della patologia. Ranibizumab, per questa sua efficacia, è raccomandato dal National Institute for Clinical Excellence (NICE), ente che esamina il rapporto costo-beneficio dei farmaci, in quanto gli studi clinici ad oggi effettuati su numerosi pazienti (MARINA, ANCHOR e PIER), hanno dimostrato che il farmaco previene l'evoluzione della degenerazione, migliorando, in questo modo, la qualità di vita degli individui affetti. Attualmente la farmacogenetica rappresenta uno dei campi della farmacologia più interessanti per l'importante prospettiva di poter personalizzare la terapia in funzione del background genetico del paziente. In particolare, ad oggi, non vi sono studi relativi alla farmacogenetica di Ranibizumab, che prendano in esame i polimorfismi del gene del VEGF-A, il bersaglio specifico del farmaco.

Lo scopo del presente studio è stato valutare la possibile associazione tra gli SNP del VEGF-A e la risposta funzionale dopo una loading phase di tre iniezioni mensili di ranibizumab in pazienti affetti da DMS essudativa. Nonostante follow-up più lunghi potrebbero risultare molto interessanti da un punto di vista clinico, in questo studio è stato scelto di analizzare un follow-up di breve periodo (un mese dopo la loading phase) per le seguenti ragioni: nel trial ANCHOR il miglioramento è stato riportato dopo tre iniezioni, mentre le successive hanno dimostrato solo la stabilizzazione dell'acuità visiva (Brown, Kaiser et al. 2006); nel presente studio vorremmo suggerire il potenziale ruolo della farmacogenetica nel predire l'assenza di risposta nella terapia a breve termine in modo da poter cambiare precocemente l'approccio terapeutico in questi pazienti. L'identificazione di pazienti responders e non responders all'inizio della loading phase potrebbe essere d'aiuto per la scelta del trattamento. Nei pazienti che rispondono alla terapia sarà possibile ridurre costosi esami diagnostici e permettere una migliore interazione tra oftalmologi nelle aree periferiche del nostro paese, riducendo lunghe liste di attesa e soprattutto i costi del Sistema Sanitario Nazionale. Questo studio farmacogenetico pilota permette di identificare per la prima volta una significativa associazione tra uno SNP della regione promotore del gene VEGF-A, l'rs699947 (-2578 A/C) e l'acuità visiva dopo la somministrazione intravitreale di ranibizumab. Inoltre,

questo studio prospettico è stato disegnato con un calcolo *a priori* di un sample size con una potenza di 0.8. Il sample size calcolato è stato sufficiente per trovare l'80% di miglioramento visivo con il genotipo -2578CC rispetto al genotipo -2578AA del VEGF-A. Tuttavia, non si può escludere la possibilità che un campione più grande avrebbe potuto influenzare l'esito dello studio.

Lo SNP rs699947 (-2578A/C) è stato valutato in precedenti studi di farmacogenetica che coinvolgono solo trattamenti con PDT e bevacizumab, ma non ranibizumab. Imai e colleghi hanno dimostrato che i pazienti portatori dell'allele C sono risultati più frequenti nel gruppo non responder dopo una singola iniezione di bevacizumab (Imai, Mori et al.). Il genotipo CC è stato associato a esito negativo dopo il trattamento PDT (Immonen, Seitsonen et al.). Al contrario, Nakata et al. (Nakata, Yamashiro et al.) e Tsuchihashi et al. (Tsuchihashi, Mori et al.) non hanno riportato alcuna differenza statisticamente significativa per questa variante del VEGF in risposta sia alla monoterapia che alla triplice terapia con bevacizumab (bevacizumab, PDT e triamcinolone acetone intravitreale) o in risposta a PDT, rispettivamente. I dati del presente studio hanno dimostrato un significativo miglioramento dell'outcome nel genotipo CC omozigote (8,625 lettere) e nel genotipo eterozigote AC (6,268 lettere) se confrontati con il genotipo AA wild-type omozigote (-1,778 lettere) dopo tre iniezioni di ranibizumab ($p = 0,0192$, test di Kruskal-Wallis). L' rs1570360 (-1154G/A) è stato studiato solo in risposta a PDT (Imai, Mori et al. ; Tsuchihashi, Mori et al. ; Parmeggiani, Gemmati et al. 2009) e in questi studi, gli autori non hanno trovato una differenza statisticamente significativa tra i genotipi e la risposta funzionale. I nostri risultati hanno dimostrato che i portatori del genotipo AA omozigote (7,438 lettere) e AG eterozigote (6,538 lettere) presentano una risposta migliore dei portatori del genotipo wild-type GG (-3,833 lettere e, anche se senza potenza statistica, vi è una tendenza verso la significatività [$p = 0,0325$, test di Kruskal-Wallis]). Diversi fattori possono essere responsabili della differenza tra i risultati di questo studio e la letteratura pubblicata sulle terapie con gli antiangiogenici. Gli studi farmacogenetici precedentemente pubblicati coinvolgono solo PDT e bevacizumab, ma non ranibizumab. Approcci terapeutici e farmaci differenti sono stati utilizzati e anche se questi ultimi sono simili, ma non identici, per struttura chimica o per il loro meccanismo d'azione (ranibizumab e bevacizumab), la risposta funzionale potrebbe essere

diversamente influenzata dai genotipi del VEGF-A. Negli studi precedentemente pubblicati il regime di dosaggio di bevacizumab era variabile, i criteri di risposta erano diversi e la durata del follow-up, questi fattori potrebbero aver giocato un ruolo importante sulla risposta funzionale. Inoltre, diversi valori di miglior acuità visiva corretta (BCVA) basali possono rappresentare un potenziale fattore in grado di influenzare il risultato dopo il trattamento e le differenze cliniche tra gli studi. Il gene del VEGF-A è altamente polimorfico e diversi studi hanno dimostrato che i polimorfismi nella regione del promotore del gene VEGFA sono associati con la produzione della proteina VEGF (Pasqualetti, Danesi et al. 2007). Abbiamo ipotizzato che diversi SNPs del VEGF potrebbero essere responsabili per la diversa espressione del VEGF intravitreale ed essere correlati a diverse risposte ai farmaci anti-VEGF: un'alta concentrazione di VEGF vitreo non può essere completamente bloccata da una singola iniezione di ranibizumab (0,5 ml mg/0.05), consentendo la crescita e il sostegno alla membrana neovascolare. Infatti, la concentrazione basale del VEGF vitreo nei pazienti DMS è stata riportata essere superiore rispetto ai controlli (Tong, Chan et al. 2006; Funk, Karl et al. 2009) e associata ad una prognosi peggiore (Lai, Liu et al. 2009). Inoltre, dopo le iniezioni anti-VEGF, una riduzione significativa è stata osservata in riferimento al VEGF vitreo (Sawada, Miyake et al. ; Chan, Lai et al. 2008; Ahn and Moon 2009). Tuttavia, non sono disponibili dati in merito ad una possibile correlazione tra gli SNP del VEGF rs1570360 (-1154G/A) e rs699947 (-2578 A/C) e la concentrazione basale del VEGF vitreo o la sua riduzione dopo terapia con anti-VEGF. L'unico report sulla correlazione tra la concentrazione di VEGF vitreo e i polimorfismi del VEGF è stato pubblicato da Lin e colleghi (Lin, Wan et al. 2008). Le concentrazioni di VEGF vitreo di sei pazienti affetti da AMD umida portatori del genotipo del VEGF +936 TT (44.77 ± 12.21 pg / ml) sono risultate significativamente più alte rispetto a quelle di cinque controlli normali portatori del genotipo CC ($11,68 \pm 3,58$ pg / ml, $p < 0.001$) (Ahn and Moon 2009). Così, qualsiasi studio futuro in questo campo è necessario per identificare SNP del VEGF con un fenotipo vitreo ben definito. Un altro aspetto importante del nostro studio clinico prospettico è la presenza di estesi criteri di esclusione. Undici dei sedici pazienti sono stati esclusi per lesioni prevalentemente emorragiche (in cui almeno il 50% della lesione era emorragia come definito dal SST) (Bressler, Bressler et al. 2004). Infatti, in questi pazienti la prognosi a lungo termine è solitamente scarsa perché la risoluzione dell' emorragia submaculare è associata alla

formazione di una cicatrice maculare, anche se vi è una risoluzione completa di attività della lesione (Avery, Fekrat et al. 1996). Inoltre, nessun risultato sulla CNV in prevalenza emorragica dovuta a farmaci anti-VEGF è stato fornito da studi clinici randomizzati (Gragoudas, Adamis et al. 2004). Nonostante studi clinici randomizzati e controllati su larga scala, come MARINA e ANCHOR (Blinder, Bradley et al. 2003; Gragoudas, Adamis et al. 2004; Brown, Kaiser et al. 2006; Rosenfeld, Brown et al. 2006), abbiano dimostrato che ranibizumab sia efficace nel trattamento della DMLE neovascolare, sono disponibili limitati dati pubblicati in merito alla sua efficacia nelle lesioni prevalentemente emorragiche a causa di CNV, e senza una definizione di uno standard di cura (Chang, Do et al.). Gli altri pazienti sono stati esclusi per trattamenti precedenti, in quanto questo avrebbe potuto influenzare i risultati dello studio. Infine, gli altri criteri di esclusione considerati in questo lavoro sono stati gli stessi di altri studi clinici su ranibizumab e AMD essudativa (Brown, Kaiser et al. 2006; Rosenfeld, Brown et al. 2006).

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che lo SNP rs699947 (-2578 A/C) della regione promotore del gene del VEGF-A, può essere considerato come un marker farmacogenetico per futuri studi clinici randomizzati al fine di valutare la risposta funzionale al trattamento con ranibizumab intravitale in pazienti affetti da AMD neovascolare. La presenza di particolari genotipi del VEGF-A può consentire la scelta di un trattamento specifico e personalizzato anti-VEGF in questo tipo di pazienti. Inoltre, conoscendo il profilo genetico dei pazienti si potrebbe contribuire a modulare la terapia con ranibizumab, ad esempio aumentando il numero di iniezioni nei pazienti portatori dei genotipi non responsivi. Tuttavia, ulteriori studi clinici prospettici e randomizzati con coorti più ampie dovrebbero essere condotti per convalidare i nostri risultati preliminari.

Bibliografia

- Abraham, P., H. Yue, et al. "Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 2." Am J Ophthalmol **150**(3): 315-324 e1.
- Abraham, P., H. Yue, et al. (2010). "Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 2." Am J Ophthalmol **150**(3): 315-324 e1.
- Ahn, J. K. and H. J. Moon (2009). "Changes in aqueous vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor after ranibizumab alone or combined with verteporfin for exudative age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **148**(5): 718-724 e1.
- Ambati, J., B. K. Ambati, et al. (2003). "Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies." Surv Ophthalmol **48**(3): 257-93.
- Anderson, D. H., R. F. Mullins, et al. (2002). "A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye." Am J Ophthalmol **134**(3): 411-31.
- Augood, C. A., J. R. Vingerling, et al. (2006). "Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE)." Arch Ophthalmol **124**(4): 529-35.
- Avery, R. L., S. Fekrat, et al. (1996). "Natural history of subfoveal subretinal hemorrhage in age-related macular degeneration." Retina **16**(3): 183-9.
- Avery, R. L., D. J. Pieramici, et al. (2006). "Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration." Ophthalmology **113**(3): 363-372 e5.
- Bashshur, Z. F., A. Bazarbachi, et al. (2006). "Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **142**(1): 1-9.
- Bates, D. O., T. G. Cui, et al. (2002). "VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma." Cancer Res **62**(14): 4123-31.
- Bergeron-Sawitzke, J., B. Gold, et al. (2009). "Multilocus analysis of age-related macular degeneration." Eur J Hum Genet **17**(9): 1190-9.
- Bhisitkul, R. B. (2006). "Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments." Br J Ophthalmol **90**(12): 1542-7.

Bhutto, I. A., D. S. McLeod, et al. (2006). "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration." Exp Eye Res **82**(1): 99-110.

Bird, A. C., N. M. Bressler, et al. (1995). "An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group." Surv Ophthalmol **39**(5): 367-74.

Blander, J. M. and R. Medzhitov (2004). "Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors." Science **304**(5673): 1014-8.

Blinder, K. J., S. Bradley, et al. (2003). "Effect of lesion size, visual acuity, and lesion composition on visual acuity change with and without verteporfin therapy for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: TAP and VIP report no. 1." Am J Ophthalmol **136**(3): 407-18.

Boekhoorn, S. S., A. Isaacs, et al. (2008). "Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study." Ophthalmology **115**(11): 1899-903.

Brantley, M. A., Jr., A. M. Fang, et al. (2007). "Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab." Ophthalmology **114**(12): 2168-73.

Bressler, N. M., S. B. Bressler, et al. (2004). "Surgery for hemorrhagic choroidal neovascular lesions of age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no. 13." Ophthalmology **111**(11): 1993-2006.

Bressler, S. B. (2009). "Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration." Ophthalmology **116**(10 Suppl): S1-7.

Brown, D. M., P. K. Kaiser, et al. (2006). "Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **355**(14): 1432-44.

Brown, D. M., M. Michels, et al. (2009). "Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study." Ophthalmology **116**(1): 57-65 e5.

Campochiaro, P. A., P. Soloway, et al. (1999). "The pathogenesis of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration." Mol Vis **5**: 34.

Chan, W. M., T. Y. Lai, et al. (2008). "Changes in aqueous vascular endothelial growth factor and pigment epithelial-derived factor levels following intravitreal bevacizumab injections for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration or pathologic myopia." Retina **28**(9): 1308-13.

Chang, M. A., D. V. Do, et al. "Prospective one-year study of ranibizumab for predominantly hemorrhagic choroidal neovascular lesions in age-related macular degeneration." Retina **30**(8): 1171-6.

Churchill, A. J., J. G. Carter, et al. (2006). "VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration." Hum Mol Genet **15**(19): 2955-61.

Churchill, A. J., J. G. Carter, et al. (2008). "VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(8): 3611-6.

D'Amico, D. J., H. N. Masonson, et al. (2006). "Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: two-year safety results of the two prospective, multicenter, controlled clinical trials." Ophthalmology **113**(6): 992-1001 e6.

Davis-Smyth, T., H. Chen, et al. (1996). "The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade." EMBO J **15**(18): 4919-27.

Despriet, D. D., C. M. van Duijn, et al. (2009). "Complement component C3 and risk of age-related macular degeneration." Ophthalmology **116**(3): 474-480 e2.

Donoso, L. A., T. Vrabec, et al. "The role of complement Factor H in age-related macular degeneration: a review." Surv Ophthalmol **55**(3): 227-46.

Donoso, L. A., T. Vrabec, et al. (2010). "The role of complement Factor H in age-related macular degeneration: a review." Surv Ophthalmol **55**(3): 227-46.

Edwards, A. O., R. Ritter, 3rd, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 421-4.

Faul, F., E. Erdfelder, et al. (2007). "G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences." Behav Res Methods **39**(2): 175-91.

Ferrara, D. C., J. E. Merriam, et al. (2008). "Analysis of major alleles associated with age-related macular degeneration in patients with multifocal choroiditis: strong association with complement factor H." Arch Ophthalmol **126**(11): 1562-6.

Ferrara, N. "Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy." Nat Med **16**(10): 1107-11.

Ferrara, N. (2010). "Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy." Nat Med **16**(10): 1107-11.

Ferrara, N., L. Damico, et al. (2006). "Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration." Retina **26**(8): 859-70.

Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-76.

Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**(2): 851-8.

Ferrara, N., R. D. Mass, et al. (2007). "Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration." Annu Rev Med **58**: 491-504.

Fisher, S. A., G. R. Abecasis, et al. (2005). "Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration." Hum Mol Genet **14**(15): 2257-64.

Folk, J. C. and E. M. Stone "Ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **363**(17): 1648-55.

Folk, J. C. and E. M. Stone (2010). "Ranibizumab Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration." New England Journal of Medicine **363**(17): 1648-1655.

Frank, R. N. (1997). "Growth factors in age-related macular degeneration: pathogenic and therapeutic implications." Ophthalmic Res **29**(5): 341-53.

Friedman, D. S., B. J. O'Colmain, et al. (2004). "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States." Arch Ophthalmol **122**(4): 564-72.

Fritsche, L. G., T. Loenhardt, et al. (2008). "Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA." Nat Genet **40**(7): 892-6.

Funk, M., D. Karl, et al. (2009). "Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab." Ophthalmology **116**(12): 2393-9.

Garcia-Closas, M., N. Malats, et al. (2007). "Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk." PLoS Genet **3**(2): e29.

Gold, B., J. E. Merriam, et al. (2006). "Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration." Nat Genet **38**(4): 458-62.

- Gotoh, N., R. Yamada, et al. (2006). "No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese." Hum Genet **120**(1): 139-43.
- Gottfredsdottir, M. S., T. Sverrisson, et al. (1999). "Age related macular degeneration in monozygotic twins and their spouses in Iceland." Acta Ophthalmol Scand **77**(4): 422-5.
- Gragoudas, E. S., A. P. Adamis, et al. (2004). "Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **351**(27): 2805-16.
- Grossniklaus, H. E. and W. R. Green (2004). "Choroidal neovascularization." Am J Ophthalmol **137**(3): 496-503.
- Hageman, G. S., D. H. Anderson, et al. (2005). "A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(20): 7227-32.
- Haines, J. L., M. A. Hauser, et al. (2005). "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 419-21.
- Hammond, C. J., A. R. Webster, et al. (2002). "Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study." Ophthalmology **109**(4): 730-6.
- Heiba, I. M., R. C. Elston, et al. (1994). "Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study." Genet Epidemiol **11**(1): 51-67.
- Imai, D., K. Mori, et al. "CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration." J Ocul Biol Dis Infor **3**(2): 53-9.
- Immonen, I., S. Seitsonen, et al. "Vascular endothelial growth factor gene variation and the response to photodynamic therapy in age-related macular degeneration." Ophthalmology **117**(1): 103-8.
- Immonen, I., S. Seitsonen, et al. (2010). "Vascular endothelial growth factor gene variation and the response to photodynamic therapy in age-related macular degeneration." Ophthalmology **117**(1): 103-8.
- Jager, R. D., W. F. Mieler, et al. (2008). "Age-related macular degeneration." N Engl J Med **358**(24): 2606-17.
- Janik-Papis, K., M. Zaras, et al. (2009). "Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population." Exp Mol Pathol **87**(3): 234-8.

- Johnson, L. V., W. P. Leitner, et al. (2001). "Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration." Exp Eye Res **73**(6): 887-96.
- Katta, S., I. Kaur, et al. (2009). "The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview." J Genet **88**(4): 425-49.
- Klaver, C. C., M. Kliffen, et al. (1998). "Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration." Am J Hum Genet **63**(1): 200-6.
- Klaver, C. C., R. C. Wolfs, et al. (1998). "Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study." Arch Ophthalmol **116**(12): 1646-51.
- Klein, M. L., W. M. Mauldin, et al. (1994). "Heredity and age-related macular degeneration. Observations in monozygotic twins." Arch Ophthalmol **112**(7): 932-7.
- Klein, R., C. F. Chou, et al. "Prevalence of age-related macular degeneration in the US population." Arch Ophthalmol **129**(1): 75-80.
- Klein, R., C. F. Chou, et al. (2011). "Prevalence of age-related macular degeneration in the US population." Arch Ophthalmol **129**(1): 75-80.
- Klein, R., K. J. Cruickshanks, et al. (2010). "The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors." Arch Ophthalmol **128**(6): 750-8.
- Klein, R., K. J. Cruickshanks, et al. "The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors." Arch Ophthalmol **128**(6): 750-8.
- Klein, R., B. E. Klein, et al. (1992). "Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study." Ophthalmology **99**(6): 933-43.
- Klein, R. J., C. Zeiss, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 385-9.
- Kliffen, M., H. S. Sharma, et al. (1997). "Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy." Br J Ophthalmol **81**(2): 154-62.
- Kvanta, A., P. V. Algvere, et al. (1996). "Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(9): 1929-34.
- Lai, T. Y., D. T. Liu, et al. (2009). "Visual outcomes and growth factor changes of two dosages of intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration: a randomized, controlled trial." Retina **29**(9): 1218-26.

Laws, S. M., E. Hone, et al. (2003). "Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription." J Neurochem **84**(6): 1215-36.

Lee, A. Y., A. K. Raya, et al. (2009). "Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab." Br J Ophthalmol **93**(5): 610-3.

Lin, J. M., L. Wan, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **145**(6): 1045-1051.

Lip, P. L., A. D. Blann, et al. (2001). "Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction." Ophthalmology **108**(4): 705-10.

McKay, G. J., S. Dasari, et al. "Complement component 3: an assessment of association with AMD and analysis of gene-gene and gene-environment interactions in a Northern Irish cohort." Mol Vis **16**: 194-9.

McKay, G. J., S. Dasari, et al. (2010). "Complement component 3: an assessment of association with AMD and analysis of gene-gene and gene-environment interactions in a Northern Irish cohort." Mol Vis **16**: 194-9.

Meads, C. and C. Hyde (2004). "Photodynamic therapy with verteporfin is effective, but how big is its effect? Results of a systematic review." Br J Ophthalmol **88**(2): 212-7.

Meyers, S. M., T. Greene, et al. (1995). "A twin study of age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **120**(6): 757-66.

Mitchell, P., W. Smith, et al. (1995). "Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study." Ophthalmology **102**(10): 1450-60.

Mordenti, J., R. A. Cuthbertson, et al. (1999). "Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration." Toxicol Pathol **27**(5): 536-44.

MPS (1991). "Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Five-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group." Arch Ophthalmol **109**(8): 1109-14.

MPS (1994). "Laser photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group." Arch Ophthalmol **112**(4): 500-9.

Nakata, I., K. Yamashiro, et al. "VEGF gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab and triple therapy in age-related macular degeneration." Jpn J Ophthalmol **55**(5): 435-43.

Nowak, J. Z. (2006). "Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy." Pharmacol Rep **58**(3): 353-63.

Ohno-Matsui, K., I. Morita, et al. (2001). "Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF." J Cell Physiol **189**(3): 323-33.

Okamoto, H., S. Umeda, et al. (2006). "Complement factor H polymorphisms in Japanese population with age-related macular degeneration." Mol Vis **12**: 156-8.

Parenti, A., L. Brogelli, et al. (2002). "Effect of hypoxia and endothelial loss on vascular smooth muscle cell responsiveness to VEGF-A: role of flt-1/VEGF-receptor-1." Cardiovasc Res **55**(1): 201-12.

Parmeggiani, F., D. Gemmati, et al. (2009). "Predictive role of gene polymorphisms affecting thrombin-generation pathway in variable efficacy of photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration." Recent Pat DNA Gene Seq **3**(2): 114-22.

Pasqualetti, G., R. Danesi, et al. (2007). "Vascular endothelial growth factor pharmacogenetics: a new perspective for anti-angiogenic therapy." Pharmacogenomics **8**(1): 49-66.

Perrin, R. M., O. Konopatskaya, et al. (2005). "Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor." Diabetologia **48**(11): 2422-7.

Polak, M. B. and F. Behar-Cohen (2008). "Exudative age-related macular degeneration: efficacy and limits of the different treatments." Journal Francais D Ophtalmologie **31**(5): 537-556.

Polak, M. B. and F. Behar-Cohen (2008). "[Exudative age-related macular degeneration: efficacy and limits of the different treatments]." J Fr Ophtalmol **31**(5): 537-56.

Reich, D. E., M. Cargill, et al. (2001). "Linkage disequilibrium in the human genome." Nature **411**(6834): 199-204.

Rivera, A., S. A. Fisher, et al. (2005). "Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk." Hum Mol Genet **14**(21): 3227-36.

Rosenfeld, P. J., D. M. Brown, et al. (2006). "Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **355**(14): 1419-31.

Rosenfeld, P. J., S. D. Schwartz, et al. (2005). "Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration." Ophthalmology **112**(6): 1048-53.

Rovner, B. W., R. J. Casten, et al. (2007). "Preventing depression in age-related macular degeneration." Arch Gen Psychiatry **64**(8): 886-92.

Sarks, J., K. Tang, et al. (2006). "Development of atrophy of the retinal pigment epithelium around disciform scars." Br J Ophthalmol **90**(4): 442-6.

Sawada, O., T. Miyake, et al. "Aqueous vascular endothelial growth factor after intravitreal injection of pegaptanib or ranibizumab in patients with age-related macular degeneration." Retina **30**(7): 1034-8.

Schmidt, S., C. Klaver, et al. (2002). "A pooled case-control study of the apolipoprotein E (APOE) gene in age-related maculopathy." Ophthalmic Genet **23**(4): 209-23.

Scholl, H. P., P. Charbel Issa, et al. (2008). "Systemic complement activation in age-related macular degeneration." PLoS One **3**(7): e2593.

Seddon, J. M., U. A. Ajani, et al. (1997). "Familial aggregation of age-related maculopathy." Am J Ophthalmol **123**(2): 199-206.

Seddon, J. M., J. Cote, et al. (2005). "The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences." Arch Ophthalmol **123**(3): 321-7.

Senger, D. R., S. J. Galli, et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-5.

Shastri, B. S. "Genetic diversity and medicinal drug response in eye care." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **248**(8): 1057-61.

Shastri, B. S. (2010). "Genetic diversity and medicinal drug response in eye care." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **248**(8): 1057-61.

Sheridan, C. M., S. Pate, et al. (2009). "Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in human choroidal neovascular membranes." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **247**(10): 1361-7.

Simonelli, F., G. Frisso, et al. (2006). "Polymorphism p.402Y>H in the complement factor H protein is a risk factor for age related macular degeneration in an Italian population." Br J Ophthalmol **90**(9): 1142-5.

Simonelli, F., M. Margaglione, et al. (2001). "Apolipoprotein E polymorphisms in age-related macular degeneration in an Italian population." Ophthalmic Res **33**(6): 325-8.

Sivaprasad, S. (2008). "Role of pegaptanib sodium in the treatment of neovascular age-related macular degeneration." Clin Ophthalmol **2**(2): 339-46.

Sivaprasad, S. and N. V. Chong (2006). "The complement system and age-related macular degeneration." Eye (Lond) **20**(8): 867-72.

Souied, E. H., N. Leveziel, et al. (2005). "Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population." Mol Vis **11**: 1135-40.

Spencer, K. L., M. A. Hauser, et al. (2007). "Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration." Hum Mol Genet **16**(16): 1986-92.

Spencer, K. L., M. A. Hauser, et al. (2008). "Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration." Hum Mol Genet **17**(7): 971-7.

Steinbrook, R. (2006). "The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration." N Engl J Med **355**(14): 1409-12.

Strachan, T. and A. P. Read (1999).

Strachan, T. and A. P. Read (1999). Human molecular genetics **2**. New York, Wiley-Liss.

Tong, J. P., W. M. Chan, et al. (2006). "Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in polypoidal choroidal vasculopathy and choroidal neovascularization." Am J Ophthalmol **141**(3): 456-62.

Tong, Y., J. Liao, et al. "LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis." Mol Vis **16**: 1958-81.

Tong, Y., J. Liao, et al. (2010). "LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis." Mol Vis **16**: 1958-81.

Tsuchihashi, T., K. Mori, et al. "Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration." Ophthalmology **118**(1): 93-100.

Vingerling, J. R., I. Dielemans, et al. (1995). "The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study." Ophthalmology **102**(2): 205-10.

Waheed, N. K. and J. W. Miller (2004). "Aptamers, intramers, and vascular endothelial growth factor." Int Ophthalmol Clin **44**(3): 11-22.

Wells, J. A., R. Murthy, et al. (1996). "Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation." Br J Ophthalmol **80**(4): 363-6.

Wickremasinghe, S. S., R. H. Guymer, et al. "Retinal venular calibre dilatation after intravitreal ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration." Clin Experiment Ophthalmol **40**(1): 59-66.

Witmer, A. N., G. F. Vrensen, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease." Prog Retin Eye Res **22**(1): 1-29.

Wolf, C. R., G. Smith, et al. (2000). "Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics." BMJ **320**(7240): 987-90.

Xu, Y., N. Guan, et al. (2008). "Association of CFH, LOC387715, and HTRA1 polymorphisms with exudative age-related macular degeneration in a northern Chinese population." Mol Vis **14**: 1373-81.

Yu, J., P. Wiita, et al. (2007). "Biochemical analysis of a common human polymorphism associated with age-related macular degeneration." Biochemistry **46**(28): 8451-61.

Zarbin, M. A. (2004). "Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration." Arch Ophthalmol **122**(4): 598-614.

Zarepari, S., K. E. Branham, et al. (2005). "Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration." Am J Hum Genet **77**(1): 149-53.

Zarepari, S., M. Buraczynska, et al. (2005). "Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration." Hum Mol Genet **14**(11): 1449-55.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare le persone che hanno collaborato alla progettazione e realizzazione dello studio illustrato in questa tesi: il Prof. Marco Nardi, Direttore della U.O Oculistica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, il Dott. Michele Figus e il Dott. Stefano Lazzeri, della U.O Oculistica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, la Dr.ssa Paola Orlandi, la Dr.ssa Anna Fioravanti, la Dr.ssa Teresa Di Desidero e in particolare il Dr. Guido Bocci della Divisione di Farmacologia dell'Università di Pisa.