



Università degli Studi di Sassari

**CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE
CURRICULUM IN NEUROSCIENZE**

XXXII CICLO

Direttore: Prof. Andrea Fausto Piana

G6PD-CARENZA E DEGENERAZIONE MACULARE LEGATA ALL'ETÀ

Tutor

Prof. Antonio Pinna

Tesi di dottorato di:

Dott. Ermete Giancipoli

Esame anno accademico 2016/2017

INDICE

Introduzione	2
G6PD-carezza	3
Degenerazione maculare legata all'età (DMLE)	10
Le drusen come markers immunologici di DMLE	16
Ruolo dei macrofagi nella DMLE	23
Genetica e DMLE	25
Indicatori sistemici di Infiammazione, disfunzione endoteliale e DMLE	36
Terapia	38
Scopo dello studio	45
Materiali e metodi	46
Risultati	50
Discussione	53
Conclusioni	58
Bibliografia	59

INTRODUZIONE

La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è un enzima ubiquitario fondamentale per il metabolismo ossidoriduttivo di tutte le cellule aerobiche, in quanto catalizza la prima reazione della via metabolica degli esoso monofosfati. La sua funzione consiste nell'ossidazione del glucosio-6-fosfato in 6-fosfo-gluconolattone, con produzione di NADPH e di ribosio per la sintesi di nucleotidi, e molecole degradabili nel processo di glicolisi per la produzione di energia.

La carenza di G6PD è l'enzimopatia più frequente nel mondo, e la Sardegna è una delle regioni dove raggiunge le più alte percentuali.

La Degenerazione Maculare senile (DMLE) è la causa principale di grave riduzione dell'acuità visiva nelle persone oltre i 60 anni di età nel mondo Occidentale. È una complessa patologia che riconosce diversi fattori di rischio come età, sesso, razza, esposizione alla luce, dieta, fumo di sigaretta e malattie vascolari. Recentemente sono stati identificati nuovi elementi coinvolti nella patogenesi della malattia: variazioni di sequenze di DNA codificanti per i fattori del complemento, modificazioni del TIMP-3 e attivazione di citochine infiammatorie. La conoscenza dei nuovi fattori coinvolti nella patogenesi di questa malattia potrà in futuro aprire la strada a nuove strategie terapeutiche per combattere la DMLE.

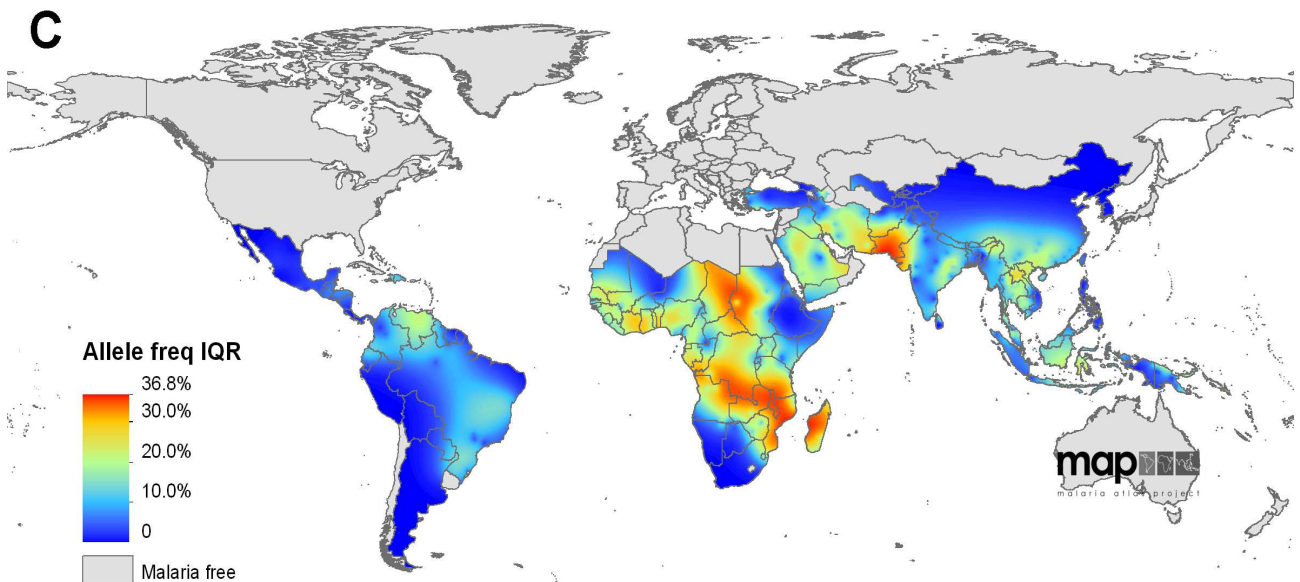
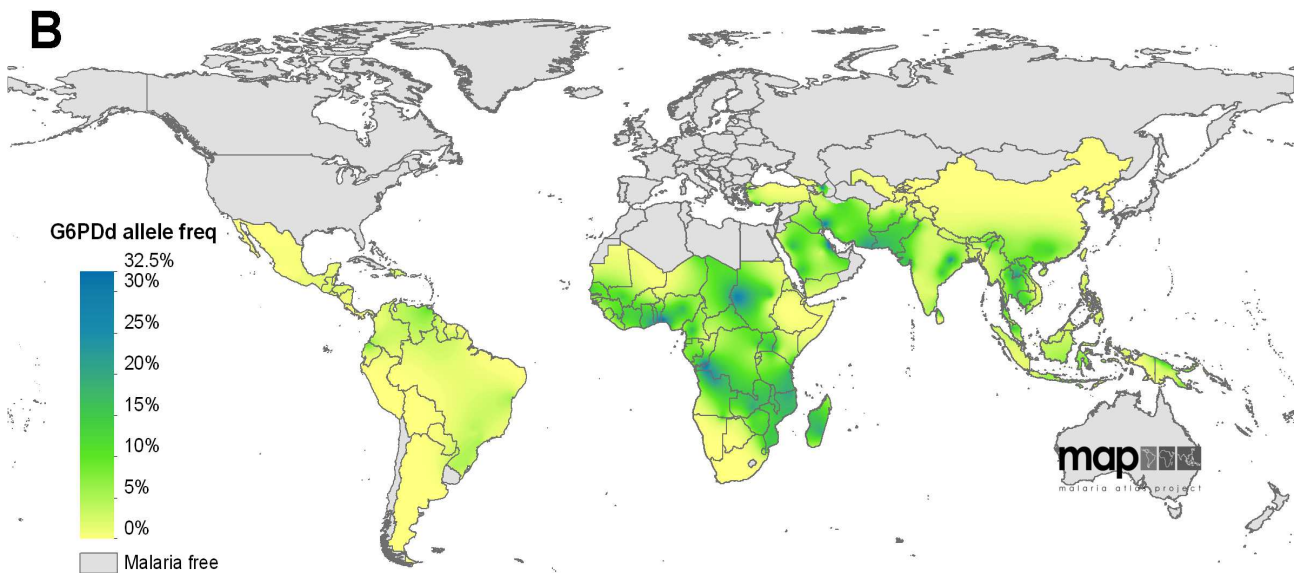
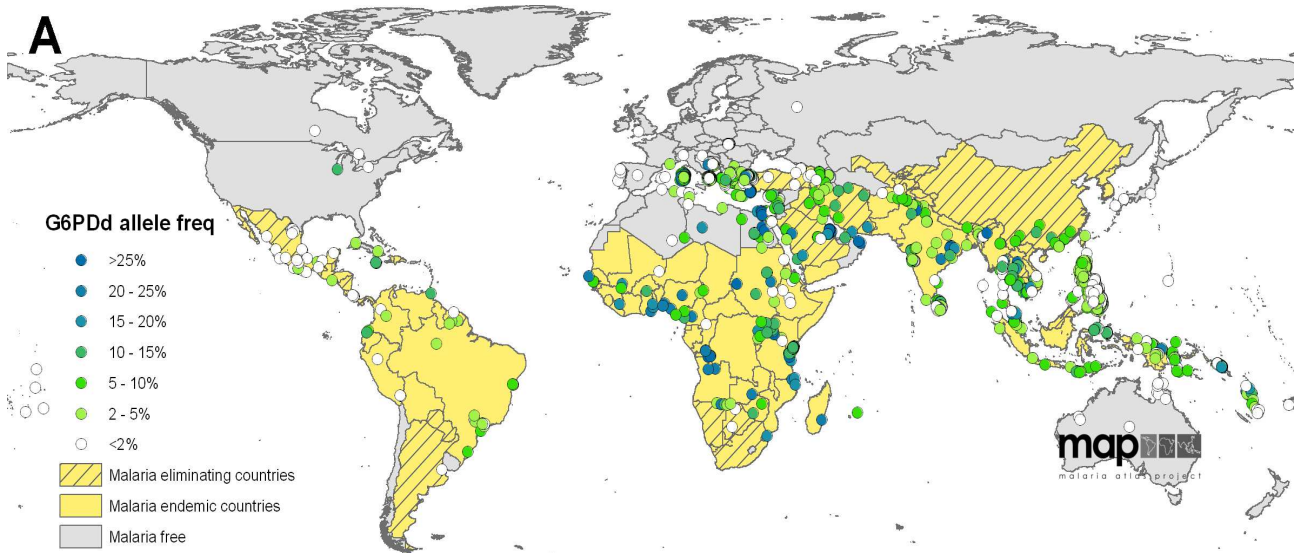
Lo scopo dello studio effettuato presso il nostro istituto è quello di identificare e qualificare l'esistenza di una eventuale relazione tra G6PD carenza e DMLE.

G6PD – CARENZA

Il deficit di Glucosio-6-fosfato deidrogenasi è il difetto enzimatico più comune nel mondo: riguarda infatti circa 400 milioni di individui.

Il difetto si riscontra prevalentemente nelle regioni tropicali e subtropicali del mondo, con maggiore prevalenza in Africa, Asia, Medio Oriente, Mediterraneo, Papua Nuova Guinea. Negli Stati Uniti la prevalenza fra i maschi di colore è di circa il 10%.

In Italia il deficit di G6PD è particolarmente diffuso nella valle del Po, nel Meridione, in Sicilia e soprattutto in Sardegna, una delle aree con maggiore incidenza, con valori riportati tra il 10 e il 15%. La distribuzione geografica del deficit è simile a quella della malaria, della talassemia e della drepanocitosi; si ritiene che questo difetto enzimatico costituisca un vantaggio selettivo, con modalità non del tutto note, nei confronti della malaria da *Plasmodium Falciparum*.



Il gene codificante la produzione del G6PD è localizzato nella regione telomerica del braccio lungo del cromosoma X (banda Xq28); il difetto consegue sostanzialmente ad una mutazione puntiforme. Nei maschi emizigoti, pertanto, la carenza è totale; nelle femmine, invece, l'attività enzimatica può essere assente (omozigote) oppure parziale (eterozigote). In queste ultime è presente una doppia popolazione eritrocitaria (mosaicismo), una normale e una carente, in accordo con l'ipotesi di Mary Lyon che sostiene l'inattivazione causale precoce, durante la vita embrionale, di uno dei due cromosomi X. Per tale ragione, nelle femmine eterozigoti, l'attività dell'enzima è notevolmente variabile e la diagnosi è condizionata dal test utilizzato. Detto ciò, è facile comprendere il motivo per cui gli studi epidemiologici sulla diffusione del deficit di G6PD hanno generalmente considerato esclusivamente la frequenza nella popolazione maschile.

I polimorfismi del gene della G6PD generano più di 400 varianti dell'enzima (isoenzimi a differente mobilità elettroforetica): i due isoenzimi principali sono la G6PD tipo B⁺ (standard di riferimento) e tipo A⁺; le varianti più frequenti, derivanti da mutazioni puntiformi del gene strutturale, sono la G6PD A⁻ (o africana) e la G6PD mediterranea (più frequente nei caucasici). Il difetto conseguente può comportare una più rapida degradazione intracellulare dell'enzima, una ridotta attività enzimatica o entrambe.

In Sardegna sono state segnalate varianti sporadiche: Seattle, Sassari, Cagliari e Cagliari 2, quest'ultima solo con un lieve deficit enzimatico.

La G6PD è un enzima ubiquitario, distribuito in tutte le cellule, la cui funzione è catalizzare il primo passaggio nella via dei pentosi-fosfati e produrre NADPH, richiesto nelle reazioni riduttive di molteplici vie sintetiche come la preservazione e la rigenerazione della forma ridotta di glutatione (GSH). Nei globuli rossi, che non possiedono mitocondri e non hanno, quindi, sistemi alternativi per la produzione di NADPH, la difesa contro qualsiasi forma di stress ossidativo dipende dalla G6PD. Il NADPH è responsabile della riduzione della forma disolfuro del glutatione (GSSG) alla forma sulfidrilica (GSH).

Il GSH è indispensabile per conservare la struttura normale del globulo rosso impedendo la denaturazione dell'emoglobina. Se i livelli di glutatione sono ridotti (come accade nei soggetti G6PD carenti), in presenza di uno stress ossidativo, l'emoglobina viene denaturata, precipita sulla membrana deformandola e rendendola rigida, con conseguente precoce eliminazione dal circolo di questi eritrociti anomali da parte dei macrofagi splenici.

Dal punto di vista fisiopatologico, dunque, la carenza di G6PD determina un incremento della vulnerabilità eritrocitaria agli stress ossidativi, che può essere silente oppure sfociare in anemia emolitica acuta o cronica non sferocitica.

Clinica

Le espressioni cliniche principali del difetto di G6PD sono quattro: **l'anemia emolitica da farmaci e da agenti infettivi, il favismo, l'anemia emolitica cronica e l'iperbilirubinemia neonatale.**

Affinché si abbiano tali manifestazioni è indispensabile che, oltre al difetto enzimatico intraglobulare, si abbia l'esposizione degli eritrociti agli stress ossidativi. La sensibilità del soggetto G6PD carente all'antimalarico primachina riveste un importante ruolo storico nell'ambito di tale deficit enzimatico, che è stato scoperto proprio in seguito a molteplici studi condotti per chiarire l'insorgenza di anemia emolitica acuta in soggetti trattati con questo farmaco. Altri farmaci in grado di determinare anemia emolitica nel soggetto G6PD-carente sono: antinfettivi (acido nalidixico, furazolidone, nitrofurantoina, sulfametossazolo, niridazolo, fenozopiridina), antiblastici (doxorubicina), analgesici (acetanilide), diagnosi (blu di metilene). La crisi emolitica acuta da farmaci si manifesta improvvisamente dopo 1 – 3 giorni dall'assunzione del composto; l'anemia normocitica e normocromica è marcata, l'emoglobinuria intensa, compaiono i corpi di Heinz, aumenta la bilirubinemia e l'ittero si fa manifesto. La sintomatologia è caratterizzata da senso di profondo malessere, astenia, dolori lombari e addominali, brividi, febbre, nausea e

vomito. Il dosaggio della G6PD lontano dalla crisi ne mostrerà la carenza. L'unica terapia è la profilassi.

Dopo 5 giorni circa compare intensa reticolocitosi e un sostanziale miglioramento dell'anemia.

Per **favismo** si intende un'anemia emolitica acuta in soggetti con deficit di G6PD secondario all'ingestione dei semi o, meno frequentemente, all'inalazione di polline di *Vicia Faba*; questa seconda modalità di esposizione tuttavia è stata messa in dubbio da alcuni autori. La crisi emolitica, determinata dall'ingestione delle fave, è dovuta alle sostanze ossidanti contenute nei semi: la divicina e l'isouramide. L'emolisi può essere molto grave e inizia circa due giorni dopo l'ingestione delle stesse.

È importante notare che la G6PD carenza è condizione necessaria ma non sufficiente a determinare il favismo: si presume che esistano altri fattori concomitanti (per esempio genetici) che concorrono a dare luogo alla manifestazione clinica in associazione all'ingestione di fave.

La maggior parte dei casi di favismo si verifica in soggetti con varianti di G6PD che comportano un grado severo di deficit, ma occasionalmente può manifestarsi in soggetti con G6PD A-. Una delle varianti che più comunemente può determinare favismo è quella Mediterranea, associata ad attività enzimatica non rilevabile con le comuni metodiche (classe 2 dell'OMS: deficienza severa); si tratta del difetto che più comunemente si riscontra in Sardegna, ed è questo il motivo per cui il favismo è di

riscontro frequente ed ha rappresentato un importante problema di salute pubblica nei confronti del quale, nel 1981, fu attuato dal Dipartimento della Salute dell'Amministrazione Regionale un programma di screening gratuito sulla popolazione generale.

Tipicamente l'ingestione di fave scatena, dopo 6 – 24 ore, una crisi emolitica acuta con rapida anemizzazione; la sintomatologia e i reperti di laboratorio sono sovrapponibili all'emolisi da farmaci. Anche in questo caso, la terapia è sostanzialmente profilattica; il cortisone attenua il quadro clinico-ematologico dell'emolisi acuta.

L'anemia emolitica cronica non sferocitica è la terza manifestazione clinica correlata al deficit di G6PD e rientra nella classe 1 dell'OMS; geneticamente si correla ad una mutazione sporadica del gene. La prevalenza nella popolazione non è nota.

Infine il deficit di G6PD è la causa più frequente di ittero neonatale dopo la malattia emolitica nel neonato; si manifesta più frequentemente nella variante Mediterranea, mentre è rara nella variante Africana. L'abnorme suscettibilità all'emolisi (in alcuni casi è richiesta l'exsanguinotrasfusione) può essere dovuta ad ipoglicemia, a ridotta attività della glutatione-perossidasi, all'azione ossidante della vitamina K talvolta somministrata ai neonati.

DEGENERAZIONE MACULARE LEGATA ALL'ETA' (DMLE)

La Degenerazione Maculare legata all'età (DMLE) è un'affezione degenerativa che coinvolge la regione maculare in persone di età superiore ai 55 anni. La gravità e la frequenza ne fanno la causa principale di grave riduzione dell'acuità visiva, definita "cecità legale", nelle persone oltre i 60 anni nel mondo occidentale. La DMLE può essere divisa clinicamente in una forma asciutta (dry), la più frequente e meno grave, ed in una essudativa (wet). Quest'ultima rappresenta il 20% circa della DMLE, ma è la causa di circa il 90% dei gravi casi di riduzione irreversibile dell'acuità visiva. Tale malattia comporta una progressiva perdita della porzione centrale del campo visivo, con risparmio di quella periferica: il che si traduce nel non poter più leggere, guidare, riconoscere i volti delle persone, ecc.

Secondo stime abbastanza recenti, ogni anno nel mondo compaiono circa 500.000 nuovi casi di DMLE essudativa e questo numero, con l'aumento della vita media, tenderà a salire vertiginosamente nei prossimi decenni. Si stima che 8,5 milioni di americani siano attualmente affetti da tale patologia e, secondo le previsioni, entro il 2020 si prevedono circa 7,5 milioni di nuovi casi, sempre negli Stati Uniti.

In Italia 800.000-1.000.000 di persone presentano segni iniziali di DMLE, con circa 100.000 nuovi casi di DMLE/anno. In Sardegna sono presenti circa 25.000 persone a rischio di degenerazione maculare oltre i 55 anni, con circa 8.000 casi di degenerazione maculare conclamata.

La degenerazione maculare senile è una malattia complessa da studiare a causa del potenziale coinvolgimento di vari fattori tra cui quello demografico, ambientale, i rischi legati all'età, sesso, razza, esposizione alla luce, dieta, fumo e malattie cardiovascolari.

Classificazione

La classificazione della DMLE più utilizzata nella pratica clinica e negli studi clinici ed epidemiologici è quella dell'AREDS, che distingue la DMLE in 4 categorie:

- a) Categoria 1 o assente: poche e piccolissime drusen con diametro $< 63\mu$
- b) Categoria 2 o forma iniziale (Early DMLE): poche drusen di dimensioni intermedie (diametro $63-124\mu$)
- c) Categoria 3 o forma intermedia: numerose drusen di dimensioni intermedie, almeno una di grosse dimensioni (diametro $\geq 125\mu$) o atrofia geografica dell'EPR non coinvolgente il centro della fovea in uno o entrambi gli occhi;

d) Categoria 4 o forma avanzata: forma atrofica (atrofia geografica centrale) dell'EPR o della coriocalpillare coinvolgente il centro della fovea o neovascolarizzazione coroideale, oppure perdita visiva dovuta a DMLE in almeno un occhio.

La classificazione oggi universalmente riconosciuta, tuttavia, è quella dell'International Age Related Macular Degeneration Epidemiological Study Group che suddivide la patologia in due fasi:

1) Age Related Maculopathy (ARM), la fase più precoce, caratterizzata da:

- drusen soft (se hanno contorni mal definiti) e/o hard (con contorni ben definiti); tra queste due forme, le prime vengono considerate come un aspetto precoce della DMLE, mentre le seconde si possono trovare anche in soggetti non affetti da maculopatia e pertanto non vengono considerate patognomoniche;
- anomalie dell'EPR, con aree focali di iper o ipopigmentazione. L'iperpigmentazione è la conseguenza dell'ipertrofia e dell'iperplasia dell'EPR, mentre l'ipopigmentazione fa seguito all'atrofia dell'EPR e della coriocalpillare, la cui forma terminale è l'atrofia geografica.

2) Age-Related Macular Degeneration (ARMD), fase tardiva caratterizzata da:

- Atrofia geografica dell'EPR e della coriocalpillare: tali alterazioni rientrano nella "forma secca" di DMLE, di solito causa di un modesto deficit visivo;
- Maculopatia neovascolare (essudativa), caratterizzata dalla neovascolarizzazione coroideale, cioè neovasi a partenza dalla coriocalpillare che attraversano la membrana di Bruch espandendosi negli spazi sottoretinici,

provocando distacchi sierosi o emorragici dell'EPR che possono associarsi al distacco della retina neurosensoriale; proliferazione fibrovascolare sottoretinica o sub-EPR; emorragie subretiniche; presenza di essudati duri.

Le neovascolarizzazioni coroidali (CNV) a loro volta possono essere classificate:

1) in base all'aspetto fluorangiografico:

a) **forma classica**, caratterizzata da un'area di iperfluorescenza coroideale con margini ben definiti, individuabile nei tempi precoci, seguita da un incremento di iperfluorescenza da diffusione o accumulo che ne oscura i margini nei tempi intermedi e tardivi;

b) **forma occulta**, distinta in : Tipo 1 o distacco fibrovascolare dell'EPR, che si presenta come un'area irregolare di sollevamento dell'EPR con iperfluorescenza irregolare o granulata (meno intensa di una CNV classica) entro i primi minuti dell'esame con fenomeni di impregnazione e leakage tardivi; Tipo 2 o diffusione tardiva di origine non determinabile, caratterizzata da aree scarsamente delineate di iperfluorescenza chiazzeata o puntata con minimo leakage a livello dell'EPR, spesso associato ad accumulo tardivo del colorante nello spazio sottoretinico.

2) in base alla sede: **CNV Extrafoveale**, localizzata ad una distanza $\geq 200\mu$ dalla zona foveale avascolare; **CNV Iuxtafoveale**, fra 199 e 1 μ dalla FAZ; **CNV Subfoveale**, situata sotto la FAZ.

3) in base alle proporzioni delle componenti della lesione: **CNV prevalentemente classica**, in cui l'area di CNV di tipo classico occupa almeno il 50% dell'intera lesione, con o senza componente occulta; **CNV minimamente classica**, dove l'area

di CNV di tipo classico occupa meno del 50% ma più dello 0% dell'intera lesione; **CNV occulta**, dove non è presente alcuna percentuale di CNV classica.

4) in base all'Angiografia al Verde di Indocianina (ICG) si distinguono i due sottogruppi: **vasculopatia coroideale polipoidale (PCV)**, più comune nella razza asiatica, caratterizzata dalla presenza di vasi coroideali con tipiche dilatazioni aneurismatiche(polipi) associate a distacchi sieroemorragici dell'EPR e ampie emorragie sottoretiniche; **proliferazione angiomatosa retinica (RAP)**, caratterizzata da neovascolarizzazione che origina dal neuroepitelio e tende ad approfondirsi verso la coroide e ad anastomizzarsi con i vasi coroideali. Se ne distinguono tre stadi: stadio I con neovascolarizzazione confinata al neuroepitelio; stadio II, in cui la neovascolarizzazione causa un distacco del neuroepitelio; stadio III, in cui sono presenti le anastomosi retino-coroideali.

Caratteristiche cliniche

La DMLE, come già detto, è stata classificata in due forme cliniche: una forma secca (dry) ed una umida (wet). La neovascolarizzazione coroideale è caratteristica della forma umida, condizione che si ritrova nel 10% circa dei casi. Sebbene entrambe le forme di DMLE possano causare perdita visiva, la forma umida è coinvolta nel 90% circa dei casi di perdita visiva severa. È, inoltre, generalmente accettato che la forma umida della DMLE è preceduta e si sviluppa dalla forma secca. Al contrario la forma

secca è molto più comune ed è caratterizzata clinicamente dalla presenza di drusen maculari, che sono depositi localizzati fra l'EPR e la membrana di Bruch, e da atrofia geografica, caratterizzata dalla morte delle cellule dell'EPR con atrofia dei fotorecettori sovrastanti.

La DMLE solitamente non è clinicamente evidente prima dei 50 anni. Dai reperti autoptici, la DMLE è riscontrata nel 33% degli occhi delle persone con più di 65 anni e nel 30% circa delle persone al di sopra dei 75 anni. La prevalenza della malattia varia dall'1,6% in soggetti di età compresa tra i 52 e i 64 anni, al 27,9% in quelli oltre i 75 anni. La prevalenza di DMLE è trascurabile all'età di 50 anni, mentre raggiunge il 6% a 80 anni.

Tali discrepanze possono essere spiegate, in parte, dal fatto che l'occhio, così come altri organi, subisce un processo normale di invecchiamento indipendente dalla DMLE che, diversamente dalle distrofie maculari giovanili, può rendere la diagnosi più difficile. Inoltre la DMLE è associata a malattie cardiovascolari e ad altri disordini importanti, per cui è possibile che molti soggetti potenzialmente affetti possano decedere a causa delle patologie cardiovascolari prima che la DMLE si manifesti, riducendo così la prevalenza della patologia negli 80enni.

Fattori di rischio demografici ed ambientali per la DMLE

L'età, il sesso, la razza, l'esposizione alla luce, patologie cardiovascolari concomitanti, la dieta, il fumo sono possibili fattori di rischio per la DMLE. La DMLE ha una prevalenza maggiore nella popolazione bianca, rispetto ai non-bianchi. Esistono studi contrastanti sull'effetto della esposizione cronica alla luce (ultravioletta o visibile) sulla retina.

LE DRUSEN COME MARKERS IMMUNOLOGICI DI DMLE

I costituenti molecolari e cellulari delle drusen sono stati analizzati approfonditamente. Gran parte del materiale ritrovato nelle drusen è sintetizzato da cellule che normalmente si trovano nell'occhio, ma parte del materiale deriva invece da fonti extraoculari. Per esempio il complemento, i lipidi, le lipoproteine B ed E sono costituenti comuni delle drusen oculari e delle placche aterosclerotiche, suggerendo che gli stessi processi biochimici ed immunologici possano essere coinvolti in entrambe le condizioni; l'amiloide beta, una delle componenti infiammatorie principali delle placche nell'Alzheimer, si ritrova anche nelle drusen. Hageman et al. hanno proposto che le drusen possano essere il prodotto di una risposta infiammatoria localizzata che segue un danno dell'EPR coinvolgendo gli antigeni HLA ed il sistema del complemento. L'ipotesi si basa sull'osservazione delle drusen nella glomerulonefrite membranoproliferativa di tipo II (MPGNII), una patologia renale in cui una disfunzione immunologica mediata dal complemento conduce a insufficienza renale. In questa condizione le drusen sono identiche a quelle della DMLE.

Le drusen sono depositi focali di materiale extracellulare, siti tra la membrana basale dell'EPR e lo strato collagene della membrana di Bruch. Rappresentano importanti fattori di rischio e indicatori biologici della degenerazione maculare senile e sono comunemente osservate negli individui di età maggiore di 60 anni e nel contesto clinico della DMLE. Le dimensioni, il numero, l'estensione e la confluenza delle drusen sono importanti determinanti nel rischio di sviluppo di DMLE (Pauleikhoff et al., 1990). La presenza di drusen soft, grandi e/o confluenti è correlata alla comparsa di neovascolarizzazione coroideale, con un rischio relativo di 2,1 negli occhi con cinque o più drusen e di 1,5 negli occhi con una o più grosse drusen (Macular Photocoagulation Study Group, 1993).

La presenza di drusen è associata a vari deficit visivi che si manifestano prima della perdita dell'acuità visiva: cambiamenti nella sensibilità ai colori e al contrasto, nel recupero funzionale maculare, nella sensibilità visiva centrale, nella sensibilità al contrasto spaziotemporale (Frennesson et al., 1995; Holz et al., 1995; Midena et al., 1997, 1994; Stangos et al., 1995; Tolentino et al., 1994).

Diversi studi sono stati intrapresi nell'intento di determinare la composizione delle drusen, nella convinzione che comprendere la costituzione di un deposito correlato a una patologia potesse apportare nuove informazioni sul processo patogenetico stesso.

Lipidi

Donders per primo nel 1854 osservò la presenza di lipidi nelle drusen. Con l'uso di tecniche istochimiche ed enzimatiche si concluse che la componente lipidica delle drusen comprendeva probabilmente molecole glicolipidiche, cerebrosidi e/o gangliosidi (Wolter and Falls, 1962; Farkas et al., 1971; Pauleikhoff et al., 1992). Pauleikhoff et al. (1992) suggerirono l'esistenza di classi distinte di drusen, alcune con caratteristiche più "idrofile", altre più "idrofobe". Holz et al. (1994) hanno riscontrato una maggiore concentrazione lipidica nella regione maculare rispetto alle regioni periferiche della membrana di Bruch; le caratteristiche di questi lipidi farebbero supporre una loro origine cellulare piuttosto che vascolare. Al contrario Curcio et al. (2001) descrivono la presenza di entrambe le forme di colesterolo esterificato e non esterificato nella membrana di Bruch e nelle drusen: tali autori ipotizzano che la quantità notevole di colesterolo esterificato nelle drusen possa implicare una fonte vascolare (plasmatica) dei lipidi associati alle drusen e alla membrana di Bruch. Studi condotti da Haimovici et al. (2001) comprovano la presenza di esteri di colesterolo nelle drusen.

Nonostante i numerosi studi condotti, la fonte (cellulare, vascolare o combinata) dei lipidi associati alle drusen rimane un enigma. Tuttavia Hageman et al. hanno appurato che i geni per alcune lipoproteine associate alle drusen (come la lipoproteina E) sono trascritti a livello locale, mentre altre molecole (come la componente P dell'amiloide) sembrano avere un'origine epatica, e arriverebbero alla membrana di Bruch tramite il circolo. Anche i lipidi associati alle drusen potrebbero avere allo stesso modo un'origine eterogenea.

Carboidrati

Farkas et al. per primi ammisero l'esistenza di glicolipidi all'interno delle drusen (1971). Kliffen et al. (1994; 1996), Farkas et al. (1971; 1996) identificarono glicoconiugati ricchi in glicosaminoglicani in depositi all'interno della membrana di Bruch.

Mullins et al. (1997) identificarono, come carboidrati maggiormente rappresentati nelle drusen, sia soffici che dure, glicocomposti con terminazioni costituite da glucosio/mannosio, N-acetilglucosamina, acido sialico. Quando si provò a rimuovere, tramite neuraminidasi, i residui di acido sialico delle terminazioni dei carboidrati associati alle drusen, fu possibile ritrovare disaccaridi di galattosamina (Mullins e Hageman, 1999). Questi disaccaridi erano confinati in un core centrale costituito da glicoproteine con carboidrati legati tramite legami O-glicosidici. La presenza di questi domini costituenti un core all'interno delle drusen è indicativa di un ruolo del core stesso nei primissimi stadi dello sviluppo delle drusen, simile all'accrescimento di una perla nella conchiglia di un'ostrica.

Proteine

I costituenti proteici delle drusen identificati per primi con metodi immunostochimici includevano ubiquitina (Loeffler e Mangini, 1997), integrine (Brem et al., 1994), inibitori tissutali delle metalloproteasi (Fariss et al., 1997), prodotti finali della glicosilazione (Ishibashi et al., 1998), beta-amiloide (Loeffler et al., 1995), fibronectina (Pauleikhoff et al., 1992) e C1q (van der Schaft et al., 1993). Negli ultimi anni sono state identificate la vitronectina (Hageman et al., 1999), la componente P dell'amiloide, l'apolipoproteina E, il fattore X, le catene lambda delle immunoglobuline, fattori di attivazione del complemento, come il complesso C5b-9, e antigeni MHC di classe II (Johnson et al., 2000; Mullins et al., 2000; Mullins e Hageman, 1997). L'eterogeneità molecolare non corrisponde a dei fenotipi ultrastrutturalmente o clinicamente definiti (Hageman e Mullins, 1999).

Virtualmente tutte le proteine recentemente scoperte nelle drusen sono in qualche modo associate all'infiammazione e/o ad altri processi immuno-associati. Alcune sono classiche proteine di fase acuta, mentre altre sono componenti della cascata del complemento, o inibitori della via di attacco alla membrana del complemento. Altri ancora sono associati con l'attivazione immunologica, la coagulazione, la fibrinolisi. Inoltre molte di queste molecole sono comuni nei depositi patologici associati ad altre malattie come il morbo di Alzheimer, l'aterosclerosi, l'elastosi, l'amiloidosi, le glomerulonefriti (Mullins et al., 2000): così si è pensato fosse possibile che percorsi patogenetici comuni potessero essere coinvolti nella loro formazione.

Componenti cellulari

Secondo i modelli tradizionali della formazione delle drusen, qualsiasi materiale cellulare al loro interno era di origine dall'EPR. Infatti nelle drusen "iniziali" si possono ritrovare frammenti cellulari e organelli derivati dall'EPR, o addirittura intere cellule. Inoltre sono state descritte vescicole di EPR che si estendono attraverso la membrana basale dell'EPR stesso all'interno delle drusen o nei siti della loro successiva formazione (Ishibashi et al., 1986). Costituenti dell'EPR, come lipofuscina e melanina, si possono talvolta osservare nelle piccole e precoci drusen.

Un'osservazione nuova e potenzialmente molto significativa consiste nel fatto che molecole normalmente associate alle cellule, inclusi gli antigeni HLA-DR e CD specifici, si associano alle drusen. Queste molecole sono spesso localizzate in domini solitari, tipo "core", nel contesto delle drusen (Mullins et al., 2000). Analisi immunofenotipiche recenti hanno documentato che questi core derivano da estensioni cellulari di cellule dendritiche coroideali, potenti cellule presentanti l'antigene associate con svariati processi di immunomodulazione. Inoltre questi processi delle cellule dendritiche sono tipicamente associati alle vescicole di EPR già descritte. Questi dati suggeriscono per la prima volta che il processo di formazione delle drusen possa essere cellulo-mediato e che specifiche vie immunomediate possano avere dei ruoli significativi in questi eventi.

mRNA

Molte delle molecole associate alle drusen, identificate recentemente usando metodi immunoistochimici, sono sintetizzate principalmente nel fegato. La loro fuoriuscita dai capillari della coroide e la conseguente aggregazione lungo la membrana di Bruch costituisce un potenziale avvio verso la loro deposizione all'interno delle drusen. Ad ogni modo alcuni tipi cellulari locali nella neuroretina, nell'EPR e/o nella coroide, che si trovano in prossimità della membrana di Bruch, potrebbero anch'essi avere la capacità di sintetizzare parte di queste molecole. Di recente è stata ottenuta la prova della trascrizione genica di alcune molecole associate alle drusen nella neuroretina, nell'EPR e nella coroide con l'uso di tecniche di PCR: diversi prodotti di PCR ottenuti a partire da mRNA associati alle drusen (TIMP-3, apolipoproteina E, vitronectina, C3, C5, C9) sono stati rinvenuti nella neuroretina, nell'EPR, nella coroide e/o in cellule dell'EPR umane isolate (Alexander et al., 1990; Anderson et al., 2001; Hageman et al., 1999; Mullins et al., 2000). Sono stati anche intrapresi studi di tipo quantitativo per identificare i livelli di espressione delle molecole associate alle drusen, al fine di determinare se possano essere espresse localmente in quantità significative e se l'espressione dei geni codificanti per tali molecole possa cambiare sostanzialmente in funzione dell'età, del danno, di una patologia oculare. Per esempio, le analisi PCR di tipo quantitativo hanno determinato i livelli di espressione per tre proteine associate alle drusen: apolipoproteina E, vitronectina e C5, nella retina, nell'EPR e nella coroide. I tassi standardizzati dell'mRNA per

l'apolipoproteina E nella retina e nell'EPR/coroide in relazione al fegato erano rispettivamente 0,45 e 0,15, e i tassi di mRNA per la vitronectina nella retina e nell'EPR/coroide rispetto al fegato erano 0,47 e 0,06. Da sottolineare, quindi, che i livelli di mRNA per entrambi l'apolipoproteina E e la vitronectina erano quasi il 50% di quelli misurati nel fegato, e significativamente più alti dei tassi nel cervello rispetto al fegato (0.28 e 0.01). I tassi dell'mRNA di C5 in relazione al fegato erano rispettivamente 0.45 ± 0.55 e 0.14 ± 0.12 nella retina e nell'EPR/coroide.

RUOLO DEI MACROFAGI NELLA DMLE

Ambati et al. descrivono la degenerazione retinica in topi che mancano della proteina chemotattica 1 dei monociti (MCP-1), un fattore chemotattico dei macrofagi e delle cellule T di memoria, o del suo ligando (CCR-2). La degenerazione in questi topi porta allo sviluppo di entrambe le forme neovascolare (umida) e atrofica (secca) della DMLE. Questi dati sostengono l'ipotesi che cellule infiammatorie, in particolare i macrofagi, possano essere causa del danno in questa patologia.

Le drusen della DMLE sono considerate da alcuni il residuo di materiale non digerito proveniente da cellule fagocitiche mal funzionanti dello strato epiteliale retinico. Sembrerebbero consistere in "scarti" di vario materiale biologico: lipidi ricchi di colesterolo, svariate proteine ed altro. In particolare, all'interno di queste strutture sono state identificate lipoproteine ossidate, il che sosterebbe l'ipotesi secondo la

quale potrebbero derivare da un danno ossidativo. Le drusen contengono anche sostanze potenzialmente chemotattiche verso i macrofagi, come componenti del sistema del complemento e immunoglobuline.

Studi clinici mostrano una correlazione tra la formazione delle drusen e l'autofluorescenza (osservata tramite un oftalmoscopio scanning laser), indice indiretto dell'accumulo di depositi granulari nello strato cellulare dell'EPR. Questi depositi, denominati granuli di lipofuscina, sono membrane cellulari parzialmente degradate all'interno di lisosomi, e si accumulano in cellule che endocitano lipoproteine ossidate, ma che non possono disporne in modo adeguato. Questa deficienza si verifica sia in cellule scavenger predisposte a questo compito di smaltimento delle lipoproteine, come i macrofagi invecchiati nelle lesioni aterosclerotiche (cellule schiumose), sia in fagociti meno "professionali", come i neuroni del sistema nervoso centrale e le cellule dello strato epiteliale retinico. Difetti di tale funzione nelle cellule epiteliali retiniche e nei macrofagi della coroide potrebbero contribuire all'accumulo di drusen nel tempo.

Oltre alla già conosciuta attività proinfiammatoria, MCP-1 potrebbe anche possedere un ruolo immunomodulatorio. Per esempio sembra favorire lo shift della risposta immune T-cellulare verso i T-helper di tipo II, promuovendo la produzione dell'interleuchina-4 (IL-4) e sopprimendo la citochina IL-12 associata alla risposta T-helper di tipo I. Le cellule della barriera emato-retinica, comprese quelle dell'EPR, producono costitutivamente MCP-1 e possono secernerne in grande quantità dopo

l'esposizione ad altre citochine e chemochine (quali IL-1B e il fattore di necrosi tumorale alfa).

L'esperienza di Ambati et al. supporta tale ruolo omeostatico e di immunoregolazione di MCP-1, così come la sua funzione chemotattica verso i macrofagi proinfiammatori o proangiogenici. MCP-1 potrebbe anche coordinare il turnover dei macrofagi residenti e delle cellule dendritiche immature, che formano entrambi una rete cellulare nella coroide, che è intimamente a contatto con lo strato cellulare epiteliale. Cellule dendritiche immature mediano la tolleranza immunologica e sono state implicate nella tolleranza indotta agli antigeni. Inoltre MCP-1 sembra essere richiesto per l'induzione della tolleranza immunologica verso gli antigeni che derivano dalla superficie mucosa, che potrebbe realizzare tramite l'induzione della tolleranza in cellule dendritiche.

Potrebbe avere senso la considerazione che, nell'occhio, una diminuita produzione di MCP-1, da parte di cellule senescenti e morenti dello strato epiteliale retinico, possa intaccare la funzione omeostatica e fagocitica dei macrofagi e delle cellule dendritiche residenti. Di conseguenza potrebbero accumularsi drusen ricche di agenti chemotattici, con la capacità di iniziare una risposta infiammatoria di basso grado, che condurrebbe al reclutamento di macrofagi proangiogenici attivati derivati dal midollo osseo. Sarebbero questi macrofagi che potrebbero indurre la patologia degenerativa maculare senile.

GENETICA E DMLE

La svolta nella storia dell'inflammatione si è avuta qualche anno fa, principalmente grazie ai polimorfismi umani di singoli-nucleotidi (SNPs), cambiamenti sottili di sequenza del DNA che possono essere usati per rilevare le varianti del gene colpevoli di una malattia. Durante questi ultimi anni, i ricercatori hanno usato gli SNPs per identificare varie regioni cromosomiche che contengono i geni in grado di influenzare il rischio di ottenere DMLE. Nel marzo 2006, tre gruppi indipendenti condotti da Josephine Hoh di Yale; Albert Edwards di Dallas e Lindsay Farrer di Boston, hanno segnalato quello che avevano scoperto su un gene del cromosoma 1 che aumenta notevolmente il rischio di ottenere DMLE. Il gene codifica per una proteina denominata Fattore H del Complemento che mantiene sotto stretto controllo il sistema del complemento in modo che non attacchi le cellule sane. I ricercatori hanno scoperto che persone con una variante particolare del gene per il fattore H erano più predisposte a sviluppare DMLE. La variante ad alto rischio potrebbe spiegare fino al 50% dei casi, presumibilmente perché il prodotto della proteina del gene alterato è meno efficace nell'inibizione della via del complemento. I geni correlati alla degenerazione maculare senile confermano la nozione che l'inflammatione abbia un ruolo centrale nel danneggiare la zona centrale della retina in questo disordine della visione. Hageman et al. hanno segnalato il collegamento tra un gene e l'attivazione della cascata del complemento. Questo gene, individuato sul cromosoma 6, produce una proteina denominata fattore B addetta all'attivazione del complemento.

L'infezione può essere determinante nello sviluppo di DMLE. Alcuni studi condotti su occhi di pazienti con DMLE essudativa, caratterizzata dallo sviluppo di vasi sanguigni nella macula, mostravano pazienti con pregressa infezione da Chlamydia. Una connessione di causa fra l'infezione data dalla Chlamydia e la DMLE deve essere tuttavia confermata.

Pericak-Vance et al. inoltre propongono l'interazione tra il gene LOC387715 e il tabagismo come uno dei fattori di rischio ambientali più importanti per la DMLE. I ricercatori hanno trovato che il rischio risultante dall'associazione del fumo con la variante del gene era più alto della somma del rischio dei singoli due fattori nel promuovere lo sviluppo di DMLE.

Il fattore H e i geni di B e LOC387715 non sono gli unici fattori genetici che probabilmente influenzano il rischio di sviluppare DMLE. Per esempio, in uno studio pubblicato in passato, Pericak-Vance et al. si sono basati sull'analisi di otto geni che sono stati ritenuti coinvolti nello sviluppo di DMLE. La loro analisi ha anche compreso il VEGF. Il prodotto del gene VEGF stimola lo sviluppo dei vasi sanguigni, e ciò ha suggerito che esso possa partecipare alla formazione della DMLE essudativa, che è la forma più severa. Ma i geni del complemento ed il LOC387715 sono certamente i responsabili principali del rischio di DMLE. Dovendo basarsi su tali ricerche si può allora considerare seriamente l'uso di misure preventive come evitare di fumare, diminuire l'ingestione di cibi grassi ed aumentare l'assunzione di antiossidanti e di carotenoidi.

Identificazione del fattore H

Hageman et al. sostengono che una variazione nel gene per il fattore H (HF1/CFH) accresce drammaticamente la probabilità di sviluppare la DMLE, così come la glomerulonefrite membrano-proliferativa di tipo II (MPGN II). HF1 codifica per una proteina coinvolta nella prima linea di difesa immunologica dell'organismo (il sistema innato) rivolta contro le infezioni batteriche e altri microbi. Di questo gene esisterebbero sia varianti protettive che a rischio.

In studi precedenti Hageman, Mullins, Anderson e Johnson implicavano la cascata del complemento, facente parte del sistema immunologico innato, nella formazione delle drusen. Le drusen contengono residui di EPR, processi cellulari dendritici e una varietà di molecole immuno-associate come immunoglobuline, antigeni di classe II, diverse componenti del complemento, attivatori e regolatori. Uno di questi regolatori, il fattore H, è una componente chiave della via alternativa di attivazione del complemento. Tutte insieme queste osservazioni hanno condotto i ricercatori a concludere che la DMLE, così come altre patologie senili, come il morbo di Alzheimer e l'aterosclerosi, possa veder coinvolta una grossa componente infiammatoria.

Gli Autori hanno notato che la MPGN II, se si tralascia il suo esordio precoce, ha manifestazioni oculari indistinguibili dalla DMLE. Una mutazione puntiforme nel gene HF1 (I1166R) causa MPGN II nei maiali e nei topi con una grave deficienza di

fattore H, che sviluppano una glomerulonefrite severa. Inoltre gli individui affetti in due grandi famiglie colpite da MGPN II mostravano linkage al cromosoma 1q31-32, un locus vicino alla regione 1q25-31 che era stata precedentemente associata alla DMLE. Tutte queste osservazioni hanno portato i ricercatori a considerare il fattore H come il candidato principale per entrambe la DMLE e l'MPGN II. La variante genetica a rischio per lo sviluppo di DMLE più frequente è stata associata a quasi la metà dei 900 soggetti affetti in studio, mentre compariva nel 29% dei 400 controlli ($P=10^{-3}$). La forza di questa associazione è di gran lunga superiore in confronto ad anomalie genetiche precedentemente attribuibili alla DMLE (ABCA4, FBNL5, FBNL6, geni APOE).

Nella prima linea di difesa contro i microrganismi e altre particelle estranee si trova il sistema del complemento, deputato a riconoscere, attaccare e uccidere i microrganismi invasivi creando dei fori nelle loro membrane. In alcuni casi, tuttavia, l'attivazione sostenuta del complemento può condurre all'infiammazione cronica, aggravare il danno tissutale locale e contribuire in modo significativo alla progressione della patologia, come succede nel morbo di Alzheimer e nell'aterosclerosi. Per prevenire tale danno alcune proteine, tra cui il fattore H, il principale inibitore solubile della via alternativa di attivazione del complemento, tengono il sistema sotto stretto controllo. Poiché la maggior parte delle variazioni identificate occupano importanti siti funzionali della proteina HF1, i ricercatori hanno suggerito la possibilità che queste varianti a rischio possano alterare il

comportamento della proteina HF1 e ostacolare il suo ruolo nel regolare la via del complemento nella risposta immune.

Si potrebbe quindi affermare che individui con DMLE e MPGN II condividono un difetto funzionale nella proteina fattore H che colpisce la funzionalità del sistema del complemento. Variazioni di singoli nucleotidi potrebbero per esempio cambiare il legame di HF1 al frammento C3b del complemento o alla proteina C reattiva, all'acido sialico, o all'eparina. In modo simile queste variazioni potrebbero alterare le interazioni tra HF1 e i microbi, rendendo forse i tessuti, come l'EPR, più suscettibili alle infezioni. Questo concetto si basa sul fatto che i più importanti attivatori della via alternativa del complemento sono molecole che si ritrovano facilmente su molte superfici batteriche e virali. L'ipotesi finale consiste nel presupposto che una disfunzione del sistema del complemento possa risultare in un danno tissutale locale, soprattutto nei siti più vulnerabili come il glomerulo renale e la macula. Hageman et al. hanno anche dimostrato che lo strato elastico della membrana di Bruch è preferenzialmente più sottile nella regione maculare. Una rottura di questo fine strato e la conseguente infiammazione potrebbero spiegare la predilezione della macula alla formazione di lesioni, inclusa la formazione di membrane neovascolari coroideali.

L'aplotipo di HF1 a rischio si associa con una vasta gamma fenotipica di DMLE, eccetto forse l'atrofia geografica, osservata in un piccolo gruppo di pazienti; si presuppone quindi che non esista una relazione distinta tra il genotipo associato alla malattia e il fenotipo clinico.

Inoltre i risultati di questo studio sono congruenti con alcuni fattori di rischio epidemiologicamente associati alla DMLE. Il fumo ad esempio inibisce l'attività del fattore H e accresce il rischio di DMLE da 4 a 5 volte.

I dati di Hageman et al. concordano anche con le precedenti affermazioni sul ruolo del complemento nella DMLE. Sembra probabile che l'eredità di un alplotipo HF1 a rischio, in combinazione con un agente infettivo o altri attivatori atipici della via alternativa, come immunocomplessi, il peptide beta dell'amiloide, o il colesterolo, possano accrescere sostanzialmente la suscettibilità individuale alla DMLE e all'MPGN II.

È chiaro che le molecole coinvolte nell'attivazione del complemento e nella sua regolazione saranno i futuri target per lo sviluppo di test diagnostici precoci e trattamenti terapeutici per la DMLE e forse anche per altre patologie ad origine infiammatoria.

Il gene HTRA1

Un locus sul cromosoma 10q26 è da tempo correlato al rischio di DMLE. Il polimorfismo di un singolo nucleotide, rs11200638, nella regione promotrice del gene HTRA1, è la variante genica più probabilmente coinvolta nello sviluppo della patologia, con un rischio attribuibile del 49,3%. Esperimenti immunoistochimici hanno svelato, tramite l'uso di anticorpi monoclonali, la presenza del prodotto di

HTRA1 nelle drusen di occhi affetti da DMLE. Il polimorfismo del singolo nucleotide rs11200638 è situato 512 bp (paia di basi) a monte del sito di inizio della trascrizione del gene HTRA1. Tale gene codifica per un membro della famiglia delle proteasi seriniche espresse nella retina e nell'EPR (nei topi). HTRA1 sembrerebbe regolare la degradazione dei proteoglicani della matrice extracellulare. Questa attività si pensa possa facilitare l'accesso degli enzimi degradanti la matrice, come le collagenasi e le metalloproteasi della matrice, ai loro substrati. La sovraespressione di HTRA1 può alterare l'integrità della membrana di Bruch, favorendo l'invasione dei capillari coroideali attraverso la matrice extracellulare, come si verifica nella DMLE essudativa. Inoltre HTRA1 lega e inibisce il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) un importante regolatore della deposizione della matrice extracellulare e dell'angiogenesi. DeWan et al. riportano la stessa associazione tra tale variazione nucleotidica di HTRA1 e la DMLE essudativa nella popolazione cinese.

TIMP-3 nella membrana di Bruch: cambiamenti durante l'invecchiamento e nella DMLE.

Le metalloproteasi della matrice (MMPs) e i rispettivi inibitori tissutali (TIMPs) giocano un importante ruolo nel ricambio della membrana extracellulare (ECM). Le MMPs costituiscono una famiglia di enzimi secernenti, attualmente con più di 20 membri, che sono coinvolti nel degradare componenti dell'ECM nel corso del normale ricambio e rinnovamento. Le MMPs, inoltre, sono implicate nelle fasi iniziali della neovascolarizzazione, in cui si pensa possano essere richieste, con altre proteasi, per la degradazione dei componenti della membrana capillare, come un

requisito preliminare per la formazione di nuovi vasi. I TIMPs, che sono rappresentati da quattro prodotti distinti del gene, si pensa che sopprimano la degradazione eccessiva della ECM e possano svolgere un ruolo funzionale importante nella limitazione della neovascolarizzazione. Timp-3 una volta secreto, si lega a componenti della ECM, mentre le altre TIMPs no.

Un ruolo del Timp-3 nella membrana di Bruch può essere quello di potente inibitore locale dell'attività del MMP, regolare il turnover della membrana di Bruch, così come limitare la neovascolarizzazione coroidale.

La distrofia del fondo di Sorsby è paragonabile ad un inizio precoce, ereditario, della degenerazione maculare, caratterizzato dall'ispessimento della membrana di Bruch e dalla neovascolarizzazione submaculare. Mutazioni nel gene Timp-3 sono state trovate in famiglie con la distrofia del fundus di Sorsby. Studi di Immunoistochimica in un occhio donato da un paziente con Sorsby hanno mostrato un vasto accumulo di Timp-3 nella membrana di Bruch ispessita. Queste osservazioni hanno condotto a valutare la presenza del Timp-3 e la sua distribuzione nella membrana ispessita di Bruch degli occhi con DMLE. Anche se nessuna mutazione nella regione di codificazione o negli elementi regolatori del gene Timp-3 è stata scoperta in pazienti con DMLE fin qui osservati, Timp-3 in eccesso all'interno della ECM potrebbe essere causa di ispessimento della membrana di Bruch ed impedire il normale rimodellamento della membrana. A causa dell'importanza della permeabilità della membrana di Bruch nel traffico dei metaboliti fra coroide e EPR, è importante capire il ruolo del Timp-3 nell'invecchiamento normale e nella DMLE.

Lo studio condotto da Motohiro Kamei e Joe G. Hollyfield ha analizzato 36 occhi normali enucleati post mortem (tra 14-96 anni) e 15 occhi con DMLE (tra i 74-98 anni) ed è stata valutato il cambiamento nella distribuzione del Timp-3 in relazione all'età. Sono stati confrontati anche i livelli di TIMP-3 negli occhi di pazienti con DMLE e nei controlli sani della stessa età.

Dallo studio si è visto che il Timp-3 immunoreattivo era presente nella membrana di Bruch in ogni campione di tessuto proveniente da donatori normali ed era distribuito nell'intero spessore della membrana. Anche se l'immunoreattività era uniforme in ogni campione dei donatori, in generale, gli occhi dei donatori più giovani hanno mostrato minore intensità di immunoreattività rispetto agli occhi dei donatori più anziani. Il Timp-3 immunoreattivo non era evidente nella retina neurosensoriale, in coroide, o nella sclera.

Distribuzione e presenza del TIMP-3 negli occhi con DMLE

Ciascuno occhio con DMLE utilizzato conteneva soft drusen. Ogni volta che sono state osservate drusen morbide, sia isolate che confluenti, ciascuna era intensamente immunoreattiva con l'anticorpo anti- Timp3. Anche le drusen dure, quando presenti, erano fortemente immunoreattive.

Nella membrana di Bruch sotto le distese zone di atrofia dell'EPR, l'immunoreattività Timp-3 non era evidente o poco rilevabile. La neovascolarizzazione coroidale era presente in 8 dei 15 occhi di donatori con DMLE. Nelle zone dove l'EPR aveva proliferato intorno ad una membrana neovascolare coroidale o a una cicatrice fibroblastica, il Timp-3 immunoreattivo circondava l'EPR iperplastico. L'immunoreattività era bassa e mostrava una distribuzione irregolare, probabilmente a causa di una perdita della funzione e della polarità della proliferazione dell'EPR.

Nelle regioni di transizione fra le zone di atrofia dell'EPR e un EPR normale, vi erano diminuzioni di immunoreattività del Timp-3, ma esso era presente nella drusen morbide e sotto lo strato elastico centrale della membrana di Bruch.

La quantità di Timp-3 presente nella membrana di Bruch sotto la macula nella retina umana normale sembra essere dipendente dall'età.

Sezioni provenienti dalla fovea di donatori dalla seconda alla terza decade di vita erano debolmente immunoreattive con l'anticorpo anti-TIMP-3. Inoltre, la distribuzione di Timp-3 è cambiata nella nona e decima decade, con l'estensione dell'immunoreattività dalla membrana di Bruch alla coriocapillare.

L'analisi quantitativa ha mostrato che il contenuto e la funzione del Timp-3 nella macula aumentava con l'età con un significativo coefficiente di correlazione ($r = 0.66$ e 0.67 , rispettivamente). Timp-3 quindi è una proteina correlata all'invecchiamento.

L'analisi quantitativa ha indicato che i livelli Timp-3 erano significativamente elevati nella macula degli occhi con DMLE rispetto ad occhi normali.

Gli occhi con DMLE, tuttavia, hanno mostrato una distribuzione non uniforme, con una virtuale assenza di immunoreattività di Timp-3 nelle zone di atrofia dell'EPR e una abbondante immunoreattività nelle zone al di fuori delle aree atrofiche dove l'EPR era presente. Questo indica che la distribuzione del Timp-3 nella DMLE in occhi con atrofia dell'EPR non è uniforme.

Vari fattori ereditari o non ereditari quali alterazioni proteiche, sforzi ossidativi, o disordini degli enzimi idrolitici possono contribuire, con l'invecchiamento, ad accelerare l'accumulo di questi residui. Poiché Timp-3 inibisce largamente le MMPs, drusen con un eccesso di Timp-3 possono ritardare il rinnovamento della membrana di Bruch. Ciò può provocare ispessimento della membrana di Bruch, riduzione della permeabilità della membrana di Bruch al traffico di metaboliti e di sostanze nutrienti fra la coroide ed l'EPR, e conseguente atrofia dell'EPR e dei fotorecettori.

Nelle zone dove era stata osservata neovascolarizzazione coroidale, l'EPR era assente e nessuna immunoreattività per Timp-3 era evidente nella membrana di Bruch sottostante.

Concludiamo che il contenuto di Timp-3 nella membrana di Bruch in macula aumenta durante il normale invecchiamento e che il contenuto di Timp-3 è elevato oltre i livelli normali nella regione maculare degli occhi con DMLE. Ciò suggerisce che Timp-3 possa essere una delle molecole chiave nell'ispessimento della membrana di Bruch nell'invecchiamento normale ed nella DMLE.

INDICATORI SISTEMICI DI INFIAMMAZIONE, DISFUNZIONE ENDOTELIALE E DMLE

È stato ipotizzato che l'infiammazione abbia un ruolo nella patogenesi della DMLE. Hageman et al. hanno indicato che le drusen contengono proteine connesse con processi immuno-mediati ed infiammazione. Cellule infiammatorie croniche sono state osservate sulla superficie esterna della membrana di Bruch in occhi con degenerazione maculare senile di tipo essudativo. Queste cellule possono causare lesioni aterogeniche e microvascolari da rilascio diretto di ossidanti, composti tossici dell'ossigeno ed enzimi proteolitici che possono anche danneggiare la membrana di Bruch. Tuttavia, i dati degli studi epidemiologici fin qui osservati, non hanno indicato un rapporto costante fra infiammazione sistemica o presenza di markers infiammatori e DMLE.

La disfunzione endoteliale, derivata dall'infiammazione, dall'ipertensione, dal tabagismo e da altri fattori, è stata considerata un presupposto nella patogenesi della DMLE. L'intento dello studio di Klein et al. è stato di analizzare se i markers di infiammazione sistemica e di disfunzione endoteliale fossero associati alla DMLE. Le procedure seguite in questo studio hanno incluso: il peso, l'altezza e la pressione sistemica, un questionario standardizzato, che ha incluso domande specifiche per quanto riguarda una storia di enfisema, artrite, tabagismo, consumo di alcol ed uso di vitamine. Non sono state trovate prove dell'associazione di questi indicatori di infiammazione sistemica con la DMLE, in accordo con i dati dello studio

cardiovascolare (CHS). Questa mancanza di associazione tra gli indicatori di infiammazione sistemica studiati (hsCRP sierica, SAA, Tnf- α ed IL-6) e DMLE concorda con l'inefficacia dimostratasi nell'uso di farmaci antinfiammatori per via sistemica. Prove cliniche hanno invece suggerito i possibili effetti benefici dei corticosteroidi somministrati per via intravitreale. I corticosteroidi intravitreali riducono l'incidenza di membrane neovascolari laser-indotte nei primati, attraverso la riduzione dell'attività delle cellule infiammatorie e del loro numero nella coroide. Altri potenziali meccanismi includono la riduzione dell'espressione del VEGF e la down-regulation della molecola di adesione 1 intracellulare (ICAM-1) espressa sulle cellule dell'EPR e sull'endotelio dei vasi, che regola l'adesione dei leucociti e la diapedesi durante l'infiammazione.

TERAPIA

Terapia medica

La terapia medica è importante soprattutto nelle fasi precoci della DMLE secca, ed è basata sull'assunzione di integratori a base di sostanze ad azione antiossidante, antinfiammatoria e neuroprotettiva. Lo studio AREDS I (2001) ha dimostrato che la supplementazione con antiossidanti, zinco o antiossidanti e zinco associati può ridurre il rischio a 5 anni di progressione verso la DMLE avanzata. Da allora, la formulazione utilizzata nello studio è entrata nella normale pratica clinica e negli

Stati Uniti rappresenta ancora la terapia di scelta nei pazienti che appartengono alle categorie a rischio di sviluppare la DMLE avanzata. I ricercatori hanno però raccomandato prudenza nell'utilizzo del beta carotene nei pazienti fumatori, per la possibilità di un incremento del rischio di sviluppare il carcinoma polmonare.

Lo studio successivo, denominato AREDS II, ha esaminato l'effetto di alti dosaggi di carotenoidi (luteina/zeaxantina) e acidi grassi polinsaturi ω -3 (DHA, acido docosaenoico ed EPA, acido eicosapentaenoico), mettendo in evidenza come, soprattutto questi ultimi, svolgano un ruolo protettivo nei confronti del tessuto retinico esercitando un'azione antinfiammatoria, inibendo la neoangiogenesi, contrastando l'apoptosi ed esplicando un effetto neuroprotettivo in caso di danno ischemico.

Lo studio italiano CARMIS (Carotenoids in Age-related Maculopathy Italian Study) del 2012 ha dimostrato inoltre che l'utilizzo di carotenoidi (Luteina, Zeaxantina e Astaxantina) in associazione con il trattamento con antiossidanti, è anche in grado di migliorare la funzionalità visiva.

Tra gli altri micronutrienti che potrebbero essere utili nel prevenire la progressione della DMLE, ricordiamo l'acido folico, la vitamina B6, la vitamina B12, il Licopene e l'enzima Q10.

Terapia laser e PDT

Rappresentano la miglior opzione di trattamento per:

- RAP (proliferazione angiomatosa polipoidale)
- Lesioni polipoidali
- Lesioni neovascolari con vaso afferente evidente

1. Fotocoagulazione classica

Consiste nell'applicazione di luce al tessuto con un'energia tale da generare un importante rialzo di temperatura (oltre i 65° C), che provoca una denaturazione delle proteine e necrosi colliquativa del tessuto, con conseguente morte delle cellule colpite. Questo effetto dipende dalla lunghezza d'onda impiegata, dall'intensità e dalla durata dell'esposizione.

2. Termoterapia transpupillare (TTT)

Si basa sullo stesso principio della fotocoagulazione classica, ma con un minore innalzamento della temperatura coroidale; il danno cellulare che ne deriva non è

istantaneo ma si manifesta con una necrosi ritardata. La TTT si è dimostrata utile nel trattamento delle CNV occulte, ma è raramente utilizzata a causa dei drammatici effetti collaterali derivanti da un eccessivo trattamento e della mancanza di trial clinici randomizzati che ne comprovino la reale efficacia.

3. Terapia fotodinamica (PDT)

Consiste nella somministrazione per via endovenosa di una sostanza fotosensibilizzante, la Verteporfina, e nella sua successiva attivazione mediante irradiazione laser, dopo un lasso di tempo utile al suo accumulo a livello della lesione neovascolare. Le molecole del farmaco, una volta attivate, producono radicali liberi e forme reattive dell'ossigeno, con conseguente danno delle cellule endoteliali a livello della lesione e trombosi. Con l'avvento dei farmaci anti-VEGF, capaci non solo di arrestare la progressione della forma neovascolare ma anche di migliorare l'acuità visiva, l'impiego della PDT è notevolmente diminuito.

4. Trattamento del Feeder Vessel

Consiste nel trattamento laser mirato sul vaso afferente della membrana neovascolare. Questa opzione terapeutica è disponibile solo in alcuni centri altamente specializzati.

Terapia endovitreal

I farmaci attualmente disponibili per la DMLE sono:

1. anti-VEGF

in particolare:

- Pegaptanib (Macugen): è un aptamero selettivo, che blocca solo il VEGF₁₆₅, per cui risulta meno efficace rispetto agli altri farmaci disponibili, ma più sicuro a livello sistemico.
- Bevacizumab (Avastin): è un anticorpo monoclonale murino umanizzato, non selettivo, che blocca tutte le isoforme del VEGF-A. Approvato nel 2004 dal FDA per il trattamento delle metastasi colon-rettali, è impiegato off-label in oftalmologia dal 2005.
- Ranibizumab (Lucentis): è un frammento anticorpale dell'anticorpo monoclonale murino umanizzato che costituisce il Bevacizumab. È anch'esso

un anti-VEGF non selettivo che blocca tutte le isoforme del VEGF-A, ed è in grado di attraversare rapidamente la retina grazie al suo basso peso molecolare.

- Aflibercept (Eylea): è una proteina solubile capace di bloccare il VEGF con affinità 200 volte superiore rispetto al Ranibizumab. Penetra agevolmente attraverso gli strati retinici ed è in grado di bloccare, oltre al VEGF-A, anche il VEGF-B e il PLG-F. Ha inoltre un effetto più duraturo rispetto agli altri anti-VEGF.

Dopo la dose di carico, che consiste in tre iniezioni ogni 30 giorni, esistono tre possibili regimi di somministrazione in base all'evoluzione del quadro clinico:

- Mensile (bimestrale per l'Aflibercept)
- A richiesta (in presenza di segni di attività biomicroscopici/OCT)
- "Treat and extend" (allungare progressivamente l'intervallo dei trattamenti, specialmente nelle recidive frequenti, anche in assenza di segni di attività).

2. Steroidi

Utilizzati per la loro azione antinfiammatoria e per le proprietà anti-permeabilità, anti-angiogeniche e anti-fibrotiche. Nonostante ciò, non sono considerati la terapia di prima scelta della malattia, ma adiuvanti da utilizzare

in casi selezionati associati ad anti-VEGF con o senza PDT nei non responders, oppure in caso di accentuata fibrosi o in alcuni sottotipi di CNV, o ancora in presenza di abbondante essudazione. Gli steroidi attualmente disponibili per uso intravitreale sono:

- Triamcinolone acetone
- Desametasone fosfato

Terapia chirurgica

Può esser presa in considerazione:

- In caso di insoddisfacente risposta alla terapia con anti-VEGF;
- In caso di rottura dell'EPR coinvolgente la fovea;
- In caso di estese emorragie sottoretiniche

Le tecniche chirurgiche attualmente disponibili sono:

1. **Traslocazione maculare**, con rotazione della retina intorno al nervo ottico di circa 40-45° per fare in modo che la macula venga posizionata su un'area di coroide ed EPR sani, e una contro-rotazione del bulbo oculare agendo sui muscoli extra-oculari;

2. **Trapianto autologo di coroide**, che consiste nel portare sotto alla fovea un patch di coroide a tutto spessore che viene prelevato dalla media periferia dello stesso occhio.

SCOPO DELLO STUDIO

Numerosi studi hanno suggerito che la G6PD-carezza potrebbe avere un effetto protettivo nei confronti della cardiopatia ischemica, delle malattie cerebrovascolari e del carcinoma del colon-retto (Cocco et al., 1998; Dore et al., 2016; Pes et al., 2017). Inoltre, gli individui con G6PD-carezza hanno un rischio notevolmente ridotto di presentare un'occlusione venosa retinica (RVO) e una neurite ottica ischemica anteriore non arteritica (NAION) (Pinna et al., 2007, 2008).

Nel 2011, uno studio condotto da Cappai e coll. sosteneva che la G6PD-carezza fosse responsabile di una più rapida comparsa di retinopatia diabetica proliferante in pazienti con diabete di tipo 1 rispetto ai controlli non G6PD-carenti; i risultati di tale studio, condotto su un campione limitato di pazienti, furono successivamente smentiti dallo studio condotto successivamente da Pinna e coll., che evidenziò una ridotta prevalenza della G6PD-carezza nei pazienti diabetici con PDR rispetto ai controlli non diabetici, anche se con un risultato non statisticamente significativo.

Il concetto che la G6PD-carezza possa svolgere un ruolo protettivo nei confronti di diverse patologie correlate all'età, è nuovo e non ancora scientificamente provato.

Allo stato attuale si conosce ben poco riguardo il ruolo della G6PD-carezza nella DMLE. Il nostro studio è stato progettato per valutare la frequenza della G6PD-carezza negli uomini sardi affetti da DMLE e verificare se essa stessa rappresenti un fattore di rischio per la DMLE o abbia un effetto protettivo nei confronti di questa importante causa di riduzione dell'acuità visiva negli anziani.

MATERIALI E METODI

Il presente studio ha utilizzato un modello di studio caso-controllo, reclutando 79 uomini con DMLE allo stadio tardivo e 79 controlli di sesso maschile di pari età senza DMLE, tra Marzo e Dicembre del 2016. Le donne sono state escluse dallo studio a causa del ridotto numero tra queste di individui omozigoti, con completa assenza di attività della G6PD eritrocitaria. La dimensione del campione è stata calcolata prima dell'indagine, con un test bilaterale con un livello di significatività del 5%, con un potere statistico dell'80% per individuare un rischio relativo stimato di 0,5, assumendo un tasso di prevalenza di G6PD dell'8% come riferito in precedenza (Maida et al., 1973; Pinna et al., 2009; Pes et al., 2018), e un'incidenza di 25.000 nuovi casi di DMLE per anno (dato dell'Istituto Nazionale di Statistica – ISTAT, 2004, Italia).

È stata ottenuta l'approvazione del comitato di revisione etica istituzionale e lo studio è stato condotto rispettando i principi della Dichiarazione di Helsinki. Ciascun partecipante ha ricevuto informazioni dettagliate e ha fornito il proprio consenso informato prima dell'inclusione.

I criteri di inclusione per i casi erano: sesso maschile, origini sarde e diagnosi di stadio tardivo di DMLE (DMLE neovascolare o atrofia geografica coinvolgente il

centro della macula) in almeno un occhio (AREDS, 2001). Tutti i pazienti con DMLE sono stati sottoposti ad una valutazione oftalmologica completa, comprendente anche la fluorangiografia e l'OCT della macula (3D OCT-1000 Mark II, Topcon CO, Tokyo, Japan). I controlli, di sesso maschile e di pari età dei casi, anch'essi di origini sarde, sono stati selezionati tra coloro che venivano sottoposti ad intervento di asportazione della cataratta. Anch'essi sono stati sottoposti ad una valutazione oftalmologica standardizzata, comprendente la BVCA, l'esame alla lampada a fessura, la tonometria ad appianazione e l'esame del fundus. I pazienti con qualsiasi evidenza clinica di maculopatia (per esempio DMLE precoce, DMLE umida o secca, edema maculare cistoide, membrana epiretinica, alterazioni dell'EPR, corioretinopatia sierosa centrale, edema maculare diabetico, ecc.) e/o patologie vascolari retiniche (occlusione venosa retinica, retinopatia diabetica, ecc.) sono stati esclusi.

Sono state inoltre prese in esame le condizioni mediche sia dei casi sia dei controlli, in particolare indice di massa corporea (BMI), ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, diabete mellito, status cardio- e cerebrovascolare (storia di angina, infarto del miocardio, TIA, ictus), patologie renali e uso di farmaci. Le definizioni di ipertensione arteriosa sistemica, diabete e ipercolesterolemia sono state fornite in precedenza (Pinna et al., 2007).

Le informazioni riguardanti il fumo di sigaretta sono state acquisite mediante un questionario compilato dall'intervistatore, confrontando i pazienti attualmente fumatori con coloro che hanno fumato in passato o non hanno mai fumato.

La pressione arteriosa è stata misurata in posizione seduta per tre volte dopo una pausa di almeno 5 minuti; la media delle tre misurazioni è stata utilizzata per l'analisi. A ciascun partecipante è stato fatto un prelievo venoso a digiuno, e sono stati effettuati i comuni esami di laboratorio comprendenti emocromo completo, emoglobina, glicemia, creatinina, colesterolo totale, HDL, LDL; trigliceridi, transaminasi (ALT e AST) e bilirubina. L'attività della G6PD negli eritrociti è stata determinata usando un test quantitativo (G6PD/6PGD, -Biomedic snc, Sassari, Italia), come descritto in precedenza (Pinna et al., 2007).

In aggiunta, sono stati dosati i livelli di vitamina B12 e folati in tutti i pazienti con DMLE. La vitamina B12 e i folati sono stati dosati con un analizzatore IMX (Abbott Laboratories Diagnostic Division, Abbott Park, IL), basato sulla determinazione immunoenzimatica a cattura di particelle (MEIA), mentre l'IMX per i folati si avvale una tecnica a cattura di ioni. Per questi saggi immunologici, i coefficienti di variabilità inter- e intra-saggio erano <10%. I valori plasmatici normali di vitamina B12 e folati sono rispettivamente 179-1162 pg/ml e 2.7-34 ng/ml.

È stata fornita un'analisi descrittiva per tutte le variabili misurate. Le variabili categoriche sono state confrontate per mezzo del test Z per quel che riguarda le

proporzioni, mentre le differenze tra casi e controlli per variabili quantitative sono state analizzate mediante il test *t di Student*.

Modelli di regressione logistica sono stati utilizzati per calcolare le stime dei Rapporti di Probabilità (ORs), considerando la DMLE come una variabile dipendente e includendo BMI, pressione arteriosa sistolica e diastolica, glicemia, creatinina, colesterolo totale, LDL, HDL, trigliceridi, leucociti totali, emoglobina, ALT, AST, bilirubina, G6PD – carenza, fumo, patologie cardio- e cerebrovascolari (si/no), uso di farmaci antiaggreganti e/o anticoagulanti (si/no) e farmaci ipolipemizzanti (si/no) come covarianti (modello completo).

Inoltre, sono stati aggiunti termini di interazione ai modelli di regressione per identificare possibili fattori confondenti. È stato utilizzato un livello di significatività di 0,2 per rimuovere le covarianti dal modello multivariato. I rapporti di probabilità (OR) e gli intervalli di confidenza (CI) al 95% sono stati calcolati con stime di massima verosimiglianza. Valori di $P < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata effettuata con software commerciale (STATA ver.12; StataCorp, College Station, TX).

Il 4% dei casi di DMLE e il 7% dei soggetti di controllo eleggibili per lo studio hanno rifiutato di parteciparvi. Il motivo principale è stato “non interessato”.

RISULTATI

Il gruppo di studio consisteva di 79 uomini con DMLE (età media: 78 ± 7 anni, intervallo 57-92 anni). Il gruppo di controllo comprendeva un identico numero di uomini perfettamente corrispondenti ai casi per età, senza DMLE. In entrambi i gruppi, tutti gli individui erano di origine sarda.

Nel gruppo della DMLE, 19 pazienti presentavano DMLE essudativa in entrambi gli occhi, 1 atrofia geografica bilaterale, 3 DMLE essudativa in un occhio e atrofia geografica nell'occhio controlaterale, e 56 DMLE essudativa in un occhio e DMLE allo stadio precoce nell'altro occhio.

I pazienti con DMLE essudativa hanno ricevuto una media di 5 iniezioni intravitreali di un farmaco anti-VEGF (bevacizumab, ranibizumab o aflibercept) per occhio.

I due gruppi dei casi e dei controlli presentavano identici valori medi di pressione intraoculare (14 ± 2.6 mmHg e 14 ± 3.5 mmHg). Quattro (5%) pazienti con DMLE e 7 (9%) pazienti affetti da cataratta avevano il glaucoma, con una differenza non statisticamente significativa.

Le caratteristiche sistemiche e i risultati degli esami ematochimici sono riassunti nella Tabella 1. Tutti i pazienti diabetici presentavano un diabete di tipo 2. Sia i pazienti affetti da DMLE sia i soggetti di controllo presentavano percentuali simili di diabete,

ipertensione, ipercolesterolemia, patologie cardio- e cerebrovascolari, patologie renali croniche, G6PD-carenza, fumo e uso di farmaci antiaggreganti e/o anticoagulanti e ipolipemizzanti. Allo stesso modo, non c'erano differenze significative per BMI, emoglobina, glicemia, creatinina, trigliceridi, LDL, ALT e bilirubina. D'altra parte, i pazienti con DMLE presentavano livelli significativamente elevati di pressione sistolica e diastolica, colesterolo plasmatico e HDL, e livelli significativamente bassi di leucociti totali e AST. I livelli plasmatici medi di vitamina B12 e folati nei pazienti con DMLE rientravano nei normali range (299 pg/ml e 5.2ng/ml rispettivamente).

Tabella 1. Caratteristiche sistemiche e risultati degli esami ematochimici dei pazienti con degenerazione maculare legata all'età (DMLE) e dei controlli con cataratta senza DMLE.

	Pazienti con DMLE (n = 79)	Controlli (n = 79)	P (Casi vs Controlli)
Iperensione arteriosa sistemica, n (%)*	55 (69.6)	51 (64.6)	0.5
Diabete mellito, n (%)†	14 (17.7)	20 (25.3)	0.25
Ipercolesterolemia, n (%)‡	37 (46.8)	42 (53.2)	0.43
Indice di massa corporea (kg/cm ²), media ± SD	27.2 ± 5.5	27.1 ± 3.7	0.84
Malattie cardio- e cerebrovascolari, n (%)	11 (13.9)	10 (12.7)	0.82
Patologie renali	3 (3.8)	2 (2.5)	0.65
G6PD carenza, n (%)	7 (8.9)	8 (10.1)	0.79
Fumo, n (%)	11 (8.7)	11 (8.7)	1
Pressione arteriosa sistolica (mm Hg), media ± SD	141.2 ± 18.4	134.1 ± 14.4	0.0075
Pressione arteriosa diastolica (mm Hg), media ± SD	80.6 ± 9.3	76.1 ± 9.9	0.0039
Leucociti totali (x10 ³ /μL)	7.0 ± 1.9	7.99 ± 2.4	0.0073
Emoglobina (g/dL), media ± SD	14.0 ± 1.62	14.0 ± 2.2	0.99
Glicemia (mg/dL), media ± SD	107.8 ± 23.4	121.1 ± 57.4	0.06
Colesterolo totale (mg/dL), media ± SD	193.3 ± 35.6	178.6 ± 42.5	0.02
HDL (mg/dL), media ± SD	54.7 ± 12.1	49.3 ± 12.3	0.0055
LDL (mg/dL), media ± SD	116 ± 35.2	105.0 ± 38.4	0.0643
Trigliceridi (mg/dL), media ± SD	103.5 ± 53.3	117.6 ± 58.4	0.11
Creatinina (mg/dL), media ± SD	0.9 ± 0.4	1.07 ± 0.6	0.06

ALT (U/L), media \pm SD	16.6 \pm 7.7	19.8 \pm 14.2	0.08
AST (U/L), media \pm SD	18.3 \pm 6.2	22.4 \pm 12.2	0.0075
Bilirubina (mg/dL), media \pm SD	0.8 \pm 0.4	0.9 \pm 0.5	0.09
Farmaci antiaggreganti e anticoagulanti, n (%)	28 (35.4)	28 (35.4)	1
Farmaci ipolipemizzanti, n (%)	24 (30.4)	27 (34.2)	0.61

* Pressione arteriosa sistolica \geq 140 mm Hg o diastolica \geq 90 mm Hg o assunzione di farmaci antipertensivi.

† Glicemia a digiuno \geq 126 mg/dL e/o \geq 200 mg/dL dopo due ore di carico orale di glucosio (75 g) o in trattamento con terapia insulinica o ipoglicemizzanti orali.

‡ Colesterolo plasmatico \geq 220 mg/dL o in trattamento con farmaci ipolipemizzanti.

La selezione successiva ha portato ad un modello finale di regressione logistica con 8 variabili, comprendenti pressione arteriosa diastolica, LDL, HDL, leucociti totali, emoglobina, AST, fumo e malattie cardio- e cerebrovascolari concomitanti (si/no). In tale modello, la regressione logistica ha dimostrato che la DMLE era associata in maniera significativa ad alti livelli di pressione arteriosa diastolica (OR=1.09, 95% CI=1.03-1.15, P=0.02) e di LDL (OR=1.02, 95% CI= 1.0001-1.03, P=0.049) e bassi livelli di leucociti totali (OR= 0.71, 95% CI=0.56-0.88, P=0.02) e AST (OR=0.92, 95% CI=0.85-0.99, P=0.044) Non è stato riscontrato nessun termine di interazione statisticamente significativo.

DISCUSSIONE

La G6PD-carenza è il più comune deficit enzimatico negli esseri umani, con circa 400 milioni di persone affette nel mondo (Beutler, 1994). Ha un'elevata prevalenza (5-30%) nelle regioni tropicali e subtropicali del mondo, come Africa, Asia, Medio Oriente, Mediterraneo e Papua Nuova Guinea (WHO Working Group, 1989; Ruwende et al., 1998)). Negli Stati Uniti, i maschi Afro-Americani sono frequentemente affetti, con una prevalenza del 10% (Ruwende et al., 1998). La Sardegna è una delle aree con la più alta prevalenza, con percentuali tra l'8 e il 15% (Martinez di Montemuros et al., 1997; Maida et al., 1973; Cocco et al., 1998; Batetta et al., 2002; Pinna et al., 2007, 2009; Pes et al., 2018).

Molti studi hanno suggerito che la distribuzione geografica del deficit di G6PD, che è altamente correlata con la distribuzione di endemicità, attuale e passata, della malaria, sia il risultato di un polimorfismo equilibrato che conferisce resistenza all'infezione da falciparum malaria (Beutler, 1994). Inoltre, recenti studi hanno riscontrato forti evidenze di protezione contro malattie ischemiche cardiache e cerebrovascolari, RVO, NAION e carcinoma del colon-retto negli individui G6PD-carenti (Cocco et al., 1998; Pinna et al., 2007, 2008; Dore et al., 2016; Pes et al., 2017).

Complessivamente, questi dati suggeriscono che la G6PD-carenza potrebbe avere un effetto protettivo contro lo sviluppo di varie patologie correlate all'età.

I principali fattori di rischio per lo sviluppo della DMLE avanzata includono l'età, fattori genetici, etnicità e stress ossidativo (Beatty et al., 2000; Despret et al., 2006; Khan et al., 2006; Yang et al., 2006; Yates et al., 2007; Schimdl et al., 2015; Hong et al., 2016). Il fumo di sigaretta è il principale fattore di rischio modificabile identificato in molti studi (Yang et al., 2006; Tan et al., 2007); pertanto, la sospensione del fumo è fortemente raccomandata ai pazienti a rischio per la DMLE. Numerosi studi di popolazione e caso-controllo hanno indagato la correlazione tra AMD, ipertensione arteriosa sistemica e altre patologie cardiovascolari, riportando però risultati contrastanti (AREDS, 2000; Delcourt et al., 2001; McCarty et al., 2001; Hyman et al., 2000; Klein et al., 2007; Keilhauer et al., 2013; Fernandez et al., 2012; Olea et al., 2012).

Si conosce ben poco riguardo il ruolo della G6PD-carenza nella patogenesi della DMLE. Sulla base delle nostre migliori conoscenze, siamo ignari dell'esistenza di precedenti studi che abbiano ricercato una possibile correlazione tra gli stadi tardivi della DMLE e il deficit di G6PD. In teoria, una riduzione della produzione di NADPH potrebbe paradossalmente costituire una protezione nei confronti dello stress ossidativo, come riportato da un recente studio che associava un'elevata attività della G6PD ed elevati livelli di NADPH ad una disfunzione endoteliale e vascolare (Gupte, 2008). Infatti, il NADPH G6PD-derivato, un cofattore per la NADPH ossidasi,

accresce la produzione di anioni superossido, incrementando così lo stress ossidativo (Gupte, 2008). La G6PD-carenza potrebbe inoltre offrire protezione nei confronti delle microangiopatie coroideali a causa della ridotta sintesi di colesterolo (Batetta et al., 2002).

Nel nostro studio, abbiamo riscontrato la stessa prevalenza di G6PD-carenza nei pazienti affetti da DMLE e nei soggetti di controllo (8.9% e 10.1% rispettivamente). La successiva regressione logistica ha dimostrato che la G6PD-carenza non ha un effetto protettivo significativo contro la DMLE, né rappresenta un fattore di rischio per le maculopatie degenerative. Anche se non si è evidenziato un sostanziale effetto protettivo o promovente del deficit di G6PD nello sviluppo della DMLE, c'è comunque la possibilità che la G6PD-carenza abbia un effetto meno pronunciato, non identificato a causa di un errore di tipo II causato dalla dimensione del campione relativamente piccola, largamente dipendente dall'incidenza della DMLE. Infatti, se noi ipoteticamente aumentassimo di 60 volte il numero dei casi e dei controlli (4740 invece di 79) e mantenessimo gli stessi tassi di prevalenza della G6PD-carenza come sopra, troveremmo un effetto protettivo statisticamente significativo della G6PD-carenza sullo sviluppo degli stadi tardivi della DMLE (OR=0.86, 95% CI=0.75-0.99; P=0.036).

Il nostro studio dimostra come lo stadio tardivo della DMLE è significativamente associato con alti livelli di pressione arteriosa diastolica e LDL, sebbene il rapporto di probabilità (OR) sia piuttosto piccolo, soprattutto per i valori di LDL. I nostri risultati

sono coerenti con quelli di precedenti studi che hanno identificato l'ipertensione arteriosa sistemica e i livelli sierici di colesterolo come fattori di rischio per la DMLE (AREDS, 2000; Hyman et al., 2000; Olea et al., 2012; Fan et al., 2017; Jonasson et al., 2014; Klein et al., 1993; Tan et al., 2007), ma contrastanti con quelli di altri studi (Delcourt et al., 2001; Tan et al., 2007; Klein et al., 2014). Il metabolismo dei lipidi è stato a lungo ipotizzato come un fattore importante nella patogenesi della DMLE (Swaroop et al., 2009): infatti, i depositi di lipidi nella membrana di Bruch costituiscono almeno il 40% del volume delle drusen (Curcio et al., 2005).

La correlazione tra ipertensione arteriosa sistemica, colesterolo e DMLE suggerisce la presenza di fattori di rischio comuni per malattie cardiovascolari e DMLE, e supporta l'ipotesi di una patogenesi simile per le due patologie.

Nel nostro studio, abbiamo riscontrato livelli più bassi di leucociti totali nei pazienti affetti da DMLE; inoltre, il rischio per DMLE era significativamente associato con bassi livelli di leucociti totali. Precedenti studi epidemiologici hanno evidenziato risultati contrastanti riguardo l'associazione tra DMLE e conta leucocitaria. Molteplici studi, infatti, hanno riscontrato una correlazione tra alti livelli di leucociti plasmatici totali e incremento del rischio di DMLE (Klein et al., 1993; Yasuda et al., 2009; Shankar et al., 2007), mentre altri non hanno identificato alcun legame tra i due elementi (Inhoffen et al., 1990; Whu et al., 2007; Gopinath et al., 2013). Questi risultati sono ulteriormente complicati dai nostri riscontri, che mostrano una correlazione inversa, con una riduzione del rischio di DMLE in presenza di alti livelli

di leucociti totali. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che il ruolo dei leucociti totali nella DMLE non è ancora chiaro.

Nel nostro studio, i pazienti con DMLE avevano livelli significativamente ridotti di AST, e il rischio di DMLE era significativamente associato con bassi livelli di AST. Non siamo a conoscenza di ulteriori studi che abbiano analizzato una possibile correlazione tra DMLE e transaminasi. Il significato del nostro riscontro, che implica che alti livelli di AST possano essere protettivi nei confronti della DMLE, rimane ancora oscuro e necessita di ulteriori approfondimenti.

È risaputo che il fumo di sigaretta aumenta significativamente il rischio di DMLE. Tuttavia, nel nostro studio, i pazienti con DMLE e i soggetti di controllo con cataratta senza DMLE presentavano percentuali simili di fumatori. Questo risultato non dovrebbe sorprenderci, dal momento che il fumo rappresenta un fattore di rischio modificabile non solo per la DMLE ma anche per la cataratta senile (Robman et al., 2005; Christen et al., 1992; Klein et al., 1999).

Nella nostra ricerca, il gruppo di controllo fu selezionato da pazienti sottoposti ad intervento di cataratta. È estremamente improbabile che questa strategia possa aver introdotto un bias da selezione, perché la prevalenza (10.1%) del deficit di G6PD trovata nel gruppo di controllo era la stessa presente nella popolazione sarda generale (Maida et al., 1973; Pinna et al., 2009; Pes et al., 2018). Questo risultato può escludere l'ipotesi che il deficit di G6PD possa dar luogo ad un aumento della suscettibilità alla cataratta, in pieno accordo con studi precedenti che hanno

dimostrato che i pazienti G6PD-carenti non presentano un rischio maggiore di sviluppare la cataratta (Pinna et al., 2009; Meloni et al., 1990).

Una limitazione importante di questo studio è che esso è stato ristretto ad un gruppo limitato e geneticamente omogeneo di pazienti (cioè quelli di origine sarda), per cui le nostre scoperte non possono essere applicate ai pazienti con DMLE di origini non sarde. Inoltre, nonostante entrambe le forme di DMLE, essudativa e secca, condividano le stesse caratteristiche patogenetiche e le stesse cause, abbiamo analizzato solo un ridotto numero di pazienti con atrofia geografica.

CONCLUSIONI

Il nostro studio suggerisce che la G6PD-carenza non ha un effetto protettivo contro l'insorgenza della DMLE, né rappresenta un fattore di rischio per la stessa. D'altro canto, la DMLE è associata in maniera significativa con alti valori di pressione arteriosa diastolica e LDL e con bassi livelli di leucociti totali e AST. Questi risultati necessitano di ulteriori conferme da studi condotti su larga scala, coinvolgendo anche pazienti di origini non sarde.

BIBLIOGRAFIA

1. Siniscalco M, Bernini L, Latte B, Motulski AG. Favism and thalassemia and their relationship to malaria. *Nature*, 1961; 190: 1179-1180
2. Luzzatto L, Notaro R. Malaria. Protecting against bad air. *Science*. 2001; 293: 442-443.
3. Bienzle U, Lucas AO, Ayeni O, Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *Lancet*. 1972; 1: 107-110
4. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, et al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*. 1995; 376: 246-249.
5. Klein R et al. Prevalence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 99: 933-943, 1992.

6. Kahn HA et al. The Framingham Eye Study Outline and major prevalence findings. *Am J Epidemiol* 106: 17-32, 1977.
7. Seddon JM, George S, Rosner B, Rifai N. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. *Arch Ophthalmol*. 2005 Jun;123(6):774-82.
8. Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2006 Mar-Apr;51(2):137-52.
9. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004 Apr;122(4):598-614.
10. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2001 Nov;20(6):705-32
11. Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH. Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1985;223(2):69-76.
12. Forrester JV. Macrophages eyed in macular degeneration. *Nat Med* 2003 Nov;9(11):1350-1

13. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 2003 Nov;9(11):1390-7.
14. Wiggs JL. Complement factor H and macular degeneration: the genome yields an important clue. *Arch Ophthalmol.* 2006 Apr;124(4):577-8.
15. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, Olson L, Kenealy SJ, Hauser M, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Jan;47(1):329-35.
16. Emil Wirostko, William J. Wirostko, Barbara M. Wirostko. Age-related macular degeneration is an inflammatory disease possibly treatable with minocycline. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004 Apr;82(2):243-4.
17. Kamei M, Hollyfield JG. TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Sep;40(10):2367-75.
18. Bailey TA, Alexander RA, Dubovy SR, Luthert PJ, Chong NH. Measurement of TIMP-3 expression and Bruch's membrane thickness in human macula. *Exp Eye Res.* 2001 Dec;73(6):851-8.
19. Strunnikova N, Hilmer S, Flippin J, Robinson M, Hoffman E, Csaky KG. Differences in gene expression profiles in dermal fibroblasts from control and

- patients with age-related macular degeneration elicited by oxidative injury. *Free Radic Biol Med.* 2005 Sep 15;39(6):781-96
20. Nakata K, Crabb JW, Hollyfield JG. Crystallin distribution in Bruch's membrane-choroid complex from AMD and age-matched donor eyes. *Exp Eye Res.* 2005 Jun;80(6):821-6.
21. Bok D. Evidence for an inflammatory process in age-related macular degeneration gains new support. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 17;102(20):7053-4.
22. Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH. Senile macular degeneration. The involvement of giant cells in atrophy of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986 Mar;27(3):364-71.
23. Penfold P, Killingsworth M, Sarks S. An ultrastructural study of the role of leucocytes and fibroblasts in the breakdown of Bruch's membrane. *Aust J Ophthalmol.* 1984 Feb;12(1):23-31.
24. Vine AK, Stader J, Branham K, Musch DC, Swaroop A. Biomarkers of cardiovascular disease as risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2005 Dec;112(12):2076-80.
25. Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J; Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch*

- Ophthalmol. 2004;122(4):564-572. doi: 10.1001/archophth.122.4.564. Cited in PubMed: PMID: 15078675.
26. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report number 8. Arch Ophthalmol. 2001; 119(10):1417-1436. Cited in PubMed: PMID: 11594942.
27. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol. 2000; 45(2):115-134. Cited in PubMed: PMID: 11033038.
28. Despret DD, Klaver CC, Witteman JC, Bergen AA, Kardys I, de Maat MP, Boekhoorn SS, Vingerling JR, Hofman A, Oostra BA, et al. Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. JAMA. 2006; 296(3):301-309. doi: 10.1001/jama.296.3.301. Cited in PubMed: PMID: 16849663.
29. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JR, Bradley M, Moore AT, Bird AC; Genetic Factors in AMD Study. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. Br J Ophthalmol. 2006; 90(1):75-80. doi: 10.1136/bjo.2005.073643. Cited in PubMed: PMID: 16361672.

30. Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, Chen H, Zhao Y, Pearson E, Li X, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006; 314(5801):992-993. doi: 10.1126/science.1133811. Cited in PubMed: PMID: 17053109.
31. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2007; 357(6):553-561. doi: 10.1056/NEJMoa072618. Cited in PubMed: PMID: 17634448.
32. Schmidl D, Garhöfer G, Schmetterer L. Nutritional supplements in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2015; 93(2):105-121. doi: 10.1111/aos.12650. Cited in PubMed: PMID: 25586104.
33. Hong N, Shen Y, Yu CY, Wang SQ, Tong JP. Association of the polymorphism Y402H in the CFH gene with response to anti-VEGF treatment in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol*. 2016 94(4):334-345. doi: 10.1111/aos.13049. Cited in PubMed: PMID: 27151934.
34. Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J*. 1994;8(2):174-181. Cited in PubMed: PMID: 8119488.
35. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood*. 1994;84(11):3613-3636. Cited in PubMed: PMID: 7949118.

36. Martinez di Montemuros F, Dotti C, Tavazzi D, Fiorelli G, Cappellini MD. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Italy. *Haematologica*. 1997; 82(4):440-445. Cited in PubMed: PMID: 9299858.
37. Maida A, Pettinato S, Bo G. Clinical manifestations of favism and G6PD deficiency: epidemiological survey in the province of Sassari (Sardinia, Italy). *Haematologica*. 1973; 58: 1265-1282.
38. Cocco P, Todde P, Fornera S, Manca MB, Manca P, Sias AR. Mortality in a cohort of men expressing the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. *Blood*. 1998;91(2):706-709. Cited in PubMed: PMID: 9427729.
39. Batetta B, Bonatesta RR, Sanna F, Putzolu M, Mulas MF, Collu M, Dessì S. Cell growth and cholesterol metabolism in human glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient lymphomononuclear cells. *Cell Prolif*. 2002;35(3):143-154. Cited in PubMed: PMID: 12027950.
40. Pinna A, Carru C, Solinas G, Zinellu A, Carta F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in retinal vein occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(6):2747-2752. doi: 10.1167/iovs.06-1064. Cited in PubMed: PMID: 17525208.
41. Pinna A, Pes A, Zinellu A, Carta A, Solinas G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and senile cataract in a Sardinian male population, Italy. *Ophthalmic Epidemiol*. 2009; 16(6):395-399. doi: 10.3109/09286580903312293. Cited in PubMed: PMID: 19995205.

42. Pes GM, Errigo A, Bitti A, Dore MP. Effect of age, period and birth-cohort on the frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Sardinian adults. *Ann Med*. 2018; 50(1):68-73. doi: 10.1080/07853890.2017.1390247. Cited in PubMed: PMID: 28985689.
43. Dore MP, Davoli A, Longo N, Marras G, Pes GM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of colorectal cancer in Northern Sardinia: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(44):e5254. doi: 10.1097/MD.0000000000005254. Cited in PubMed: PMID: 27858887.
44. Pes GM, Bassotti G, Dore MP. Colorectal Cancer Mortality in Relation to Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Consanguinity in Sardinia: A Spatial Correlation Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017; 18(9):2403-2407. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.9.2403. Cited in PubMed: PMID: 28950694.
45. Pinna A, Solinas G, Masia C, Zinellu A, Carru C, Carta A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy in a Sardinian population, Italy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(4):1328-1332. doi: 10.1167/iovs.07-1115. Cited in PubMed: PMID: 18385045.
46. WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*. 1989; 67(6):601-611. Cited in PubMed: PMID: 2633878.
47. Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med*. 1998; 76(8):581-588. Cited in PubMed: PMID: 9694435.

48. Tan JS, Mitchell P, Kifley A, Flood V, Smith W, Wang JJ. Smoking and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125(8):1089-1095. doi: 10.1001/archophth.125.8.1089. Cited in PubMed: PMID: 17698756.
49. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study report number 3. *Ophthalmology.* 2000; 107(12):2224-2232. Cited in PubMed: PMID: 11097601.
50. Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M, Vernet MH. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA Study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2001; 8(4):237-249. Cited in PubMed: PMID: 11471092.
51. McCarty CA, Mukesh BN, Fu CL, Mitchell P, Wang JJ, Taylor HR. Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119(10):1455-1462. Cited in PubMed: PMID: 11594944.
52. Hyman L, Schachat AP, He Q, Leske MC, Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2000; 118(3):351-358. Cited in PubMed: PMID: 10721957.
53. Klein R, Deng Y, Klein BE, Hyman L, Seddon J, Frank RN, Wallace RB, Hendrix SL, Kuppermann BD, Langer RD, et al. Cardiovascular disease, its

- risk factors and treatment, and age-related macular degeneration: Women's Health Initiative Sight Exam ancillary study. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143(3):473-483. doi: 10.1016/j.ajo.2006.11.058. Cited in PubMed: PMID: 17317391.
54. Keilhauer CN, Fritsche LG, Guthoff R, Haubitz I, Weber BH. Age-related macular degeneration and coronary heart disease: evaluation of genetic and environmental associations. *Eur J Med Genet.* 2013; 56(2):72-79. doi: 10.1016/j.ejmg.2012.10.005. Cited in PubMed: PMID: 23103884.
55. Fernandez AB, Wong TY, Klein R, Collins D, Burke G, Cotch MF, Klein B, Sadeghi MM, Chen J. Age-related macular degeneration and incident cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Ophthalmology.* 2012; 119(4):765-770. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.09.044. Cited in PubMed: PMID: 22197438.
56. Olea JL, Tunon J. Patients with neovascular age-related macular degeneration in Spain display a high cardiovascular risk. *Eur J Ophthalmol.* 2012; 22(3):404-411. doi: 10.5301/ejo.5000023. Cited in PubMed: PMID: 21786274.
57. Gupte SA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008; 9(9):993-1000. Cited in PubMed: PMID: 18729006.
58. Fan Q, Maranville JC, Fritsche L, Sim X, Cheung CMG, Chen LJ, Gorski M, Yamashiro K, Ahn J, Laude A, et al. HDL-cholesterol levels and risk of age-related macular degeneration: a multiethnic genetic study using Mendelian

- randomization. *Int J Epidemiol.* 2017; 46(6):1891-1902. doi: 10.1093/ije/dyx189. Cited in PubMed: PMID: 29025108.
59. Jonasson F, Fisher DE, Eiriksdottir G, Sigurdsson S, Klein R, Launer LJ, Harris T, Gudnason V, Cotch MF. Five-year incidence, progression, and risk factors for age-related macular degeneration: the age, gene/environment susceptibility study. *Ophthalmology.* 2014; 121(9):1766-1672. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.03.013. Cited in PubMed: PMID: 24768241
60. Klein R, Klein BE, Franke T. The relationship of cardiovascular disease and its risk factors to age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 1993; 100(3):406-414. Cited in PubMed: PMID: 8460013.
61. Tan JS, Mitchell P, Smith W, Wang JJ. Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* 2007; 114(6):1143-1150. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.09.033. Cited in PubMed: PMID: 17275090.
62. Klein R, Myers CE, Buitendijk GH, Rochtchina E, Gao X, de Jong PT, Sivakumaran TA, Burlutsky G, McKean-Cowdin R, Hofman A, et al. Lipids, lipid genes, and incident age-related macular degeneration: the three continent age-related macular degeneration consortium. *Am J Ophthalmol.* 2014; 158(3):513–524e3. doi: 10.1016/j.ajo.2014.05.027. Cited in PubMed: PMID: 24879949.
63. Swaroop A, Chew EY, Rickman CB, Abecasis GR. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-

- related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009; 10: 19-43. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164350. Cited in PubMed: PMID: 19405847.
64. Curcio CA, Presley JB, Millican CL, Medeiros NE. Basal deposits and drusen in eyes with age-related maculopathy: evidence for solid lipid particles. *Exp Eye Res.* 2005; 80(6):761-775. doi: 10.1016/j.exer.2004.09.017. Cited in PubMed: PMID: 15939032.
65. Yasuda M, Kiyohara Y, Hata Y, Arakawa S, Yonemoto K, Doi Y, Iida M, Ishibashi T. Nine-year incidence and risk factors for age-related macular degeneration in a defined Japanese population the Hisayama study. *Ophthalmology.* 2009; 116(11):2135-2140. doi: 10.1016/j.opthta.2009.04.017. Cited in PubMed: PMID: 19744734.
66. Shankar A, Mitchell P, Rochtchina E, Tan J, Wang JJ. Association between circulating white blood cell count and long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(4):375-382. doi: 10.1093/aje/kwk022. Cited in PubMed: PMID: 17110636.
67. Inhoffen W, Nüssgens Z. Rheological studies on patients with posterior subretinal neovascularization and exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1990; 228(4):316-320. Cited in PubMed: PMID: 2401414.

68. Wu KH, Tan AG, Rochtchina E, Favaloro EJ, Williams A, Mitchell P, Wang JJ. Circulating inflammatory markers and hemostatic factors in age-related maculopathy: a population-based case-control study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(5):1983-1988. doi: 10.1167/iovs.06-0223. Cited in PubMed: PMID: 17460250.
69. Gopinath B, Flood VM, Rochtchina E, Wang JJ, Mitchell P. Homocysteine, folate, vitamin B-12, and 10-y incidence of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98(1):129-135. doi: 10.3945/ajcn.112.057091. Cited in PubMed: PMID: 23636242.
70. Robman L, Taylor H. External factors in the development of cataract. *Eye.* 2005; 19(10):1074-1082. doi: 10.1038/sj.eye.6701964. Cited in PubMed: PMID: 16304587.
71. Christen WG, Manson JE, Seddon JM, Glynn RJ, Buring JE, Rosner B, Hennekens CH. A prospective study of cigarette smoking and risk of cataract in men. *JAMA.* 1992; 268(8):989-993. Cited in PubMed: PMID: 1501324.
72. Klein BE, Klein RE, Lee KE. Incident cataract after a five-year interval and lifestyle factors: the Beaver Dam eye study. *Ophthalmic Epidemiol.* 1999; 6(4):247-255. Cited in PubMed: PMID: 10544339.
73. Meloni T, Carta F, Forteleoni G, Carta A, Ena F, Meloni GF. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and cataract of patients in Northern Sardinia. *Am J Ophthalmol.* 1990; 110(6):661-664. Cited in PubMed: PMID: 2248331.

74. Piermarocchi S, Miotto S, Invernizzi A, Bottoni F, Staurenghi G, Giovannini A, Saitta A, Pertile G, L'oculista italiano, collana "Le monografie", vol.1: Degenerazione Maculare Legata all'Età, 2012