

EPR & AMD

di Amedeo Lucente

Introduzione

L'epitelio pigmentato retinico (EPR/RPE) è costituito da un singolo strato di cellule a forma esagonale/polygonale, con aspetto nel suo insieme colonnare, interposto tra la membrana di Bruch (BrM) e i fotorecettori retinici[1]. Studiato dalla metà del 19° secolo, l'EPR è stato riconosciuto come tessuto distinto, con origine embrionale dalla doppia invaginazione delle vescicole ottiche diencefaliche, opposto, anche per polarità apice-apice (apical-to-apical), ai fotorecettori retinici[2].

Lo sviluppo embrionale, geneticamente determinato, è condizionato da diversi segnali bioumorali.

Tra questi il *growth factor activin* che fa parte del fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), una citochina secreta nello spazio intercellulare con spiccata capacità d'induzione filogenetica[3].

Una delle più frequenti e conosciute alterazioni retiniche da squilibrio tra fattori di crescita e d'inibizione è l'iperplasia dell'EPR. Quest'occasione e comunemente sottovalutata rispetto oftalmoscopico richiede di essere distinto dai

nevi coroideali che hanno la possibilità di viraggio verso un melanoma.

E' opportuno altresì considerare, d'altra parte, che una semplice iperplasia di queste cellule, anche se occasionalmente, può essere associata a poliposi adenomatosa familiare favorente il cancro del colon, la più frequente neoplasia dell'apparato gastroenterico[4].

L'integrità morfologica dell'EPR è di fondamentale importanza per la complessa attività elettro-funzionale della neuroretina, e per contrastare l'insorgere di

diverse patologie corio-retiniche (Fig. 1).

Il suo ruolo nelle maculopatie non è stato tuttavia ancora pienamente delineato, anche se da molto tempo è oggetto di studi e continue approfondite ricerche.

Lo scopo di quest'articolo è di discutere, per quanto possibile, il rapporto dell'EPR nella patogenesi delle maculopatie, dando uno sguardo, inevitabilmente non esaustivo, alla più recente ed interessante letteratura.

EPR e Maculopatie

L'EPR umano è un tappeto monostratificato di circa 5 milioni di unità cellulari. Prevalentemente esagonali al polo posteriore con un diametro medio di 16 micron,

le cellule pigmentate aumentano di estensione in area equatoriale, fino a 60 micron in estrema periferia retinica. Il numero complessivo dei fotorecettori oltrepassa notevolmente quello delle cellule pigmentate (130 milioni contro 5 milioni), per cui più fotorecettori sono in contatto con una cellula pigmentata oltre l'area strettamente maculare. Solo in quest'area privilegiata per la visione

distinta il rapporto tra le cellule dell'EPR e i fotorecettori è di uno a uno [2].

I coni e i bastoncelli sono connessi ai microvilli dell'EPR (5-7 μ m di lunghezza) con l'interposizione di una sottile matrice interfotorecettoriale di origine mesenchimale, densa rete di proteine e proteoglicani contenente enzimi, fattori di crescita, proteine di trasporto e altri componenti[5].

Lo spazio tra EPR e fotorecettori è quindi virtuale; diventa reale in alcune patologie, nel distacco di retina o

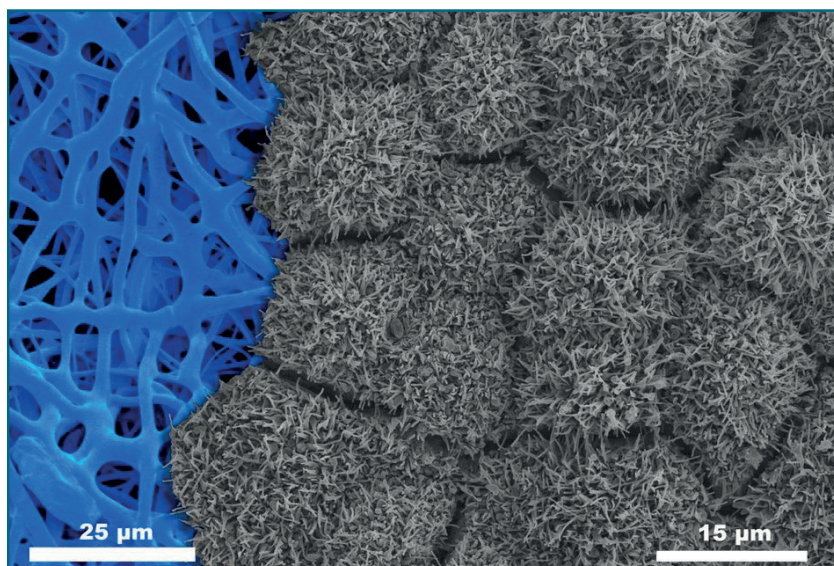


Fig. 1 - Fotografia con microscopio a scansione di alcune cellule dell'EPR coltivate su trama di nanofibre in blu (falsi colori); sono stati utilizzati due differenti ingrandimenti (barre in basso).
Immagine preparata da Nathan Hotaling (da Kapil Bharti).

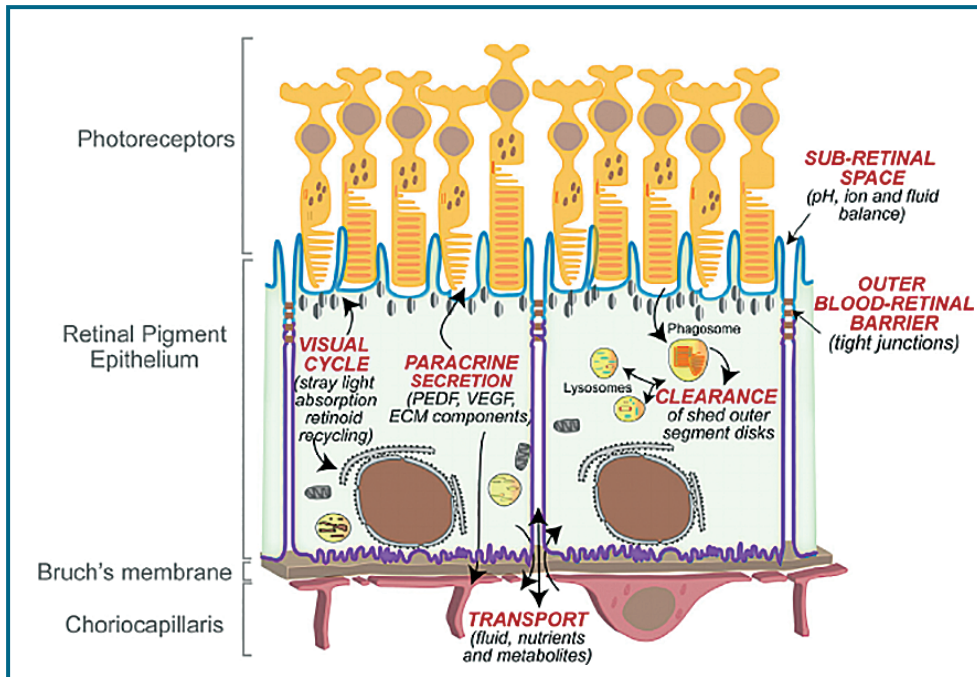


Fig. 2 - Rapporti anatomo-fisiologici tra EPR, fotorecettori e matrice interfotorecettoriale.

nella sierosa centrale. Dal lato basale si trovano la BrM e l'epitelio fenestrato della coriocalpillare. Le singole cellule dell'EPR, molto polarizzate, separano così il tessuto nervoso retinico dal letto vascolare della coriocalpillare, con funzioni simili alla barriera ematoencefalica[6]. Le sue capacità funzionali sono molteplici, spesso con modalità bidirezionali.

Le singole cellule dell'EPR rendono, infatti, disponibili i fattori nutrienti provenienti dalla coroide ai fotorecettori, e scaricano nella coriocalpillare metaboliti, ioni e l'acqua in eccesso.

A dispetto dell'apparente semplicità cito-istologica queste cellule sovrintendono, inoltre, negli occhi dei vertebrati, all'assorbimento della luce eccessiva per ridurre lo stress ossidativo, alla secrezione di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), alla mediazione immunologica, al turnover/fagocitosi dei segmenti esterni dei fotorecettori, alla secrezione ed espressione di numerose proteine retiniche (Fig. 2) [7].

Una mancata funzionalità dell'EPR è stata da più ricerche assunta come fattore predisponente della degenerazione maculare legata all'età, principale causa di cecità legale nel mondo occidentale e terza causa nei paesi in via di sviluppo [8].

La degenerazione maculare retinica legata all'età AMD o ARMD (Age Macular Degeneration, Age Related Macular Degeneration) è un disordine della struttura della retina centrale con incidenza progressiva all'aumentare dell'età.

Si manifesta, com'è noto, in due forme: umida "wet form", e non essudativa o secca "dry form", con severe diminuzioni visive, fino alla cecità, specie nelle popolazioni occidentali [9].

L'incidenza annuale negli Stati Uniti è stimata essere di 3,5 per 1000 abitanti sopra i 50 anni (~ 1.9/1000 per la forma secca, ~ 1.8/1000 per la forma umida)[10].

Secondo il National Institutes of Health (NIH) l'AMD ha una prevalenza del 5.4% tra i bianchi, 4.6% tra i cinesi, 4,2% tra gli ispanici e 2.4% tra la popolazione nera[11].

Entro il 2020 si prevedono oltre 3 milioni di persone interessate da questa malattia negli USA[12].

Anche se sono coinvolte e/o alterate direttamente o indirettamente molte cellule retiniche, l'EPR è ritenuto lo strato cellulare inizialmente responsabile di entrambe le forme di maculopatie.

I fattori genetici certamente determinano e modulano le complesse alterazioni strutturali che portano all'AMD; tuttavia il meccanismo d'innescò e progressione dell'AMD, nonostante gli innumerevoli studi, rimane ancora poco conosciuto.

EPR e Wet Form AMD

Una potenziale Neovascolarizzazione Coroideale CNV (Choroidal neovascularization) caratterizza la forma umida delle maculopatie, la più pericolosa e distruttiva per la funzione visiva.

I primi neovasi iniziano a proliferare dalla coriocalpillare, penetrano la BrM e possono espandersi attraverso diverse modalità nei distretti retinici.

La Wet Form, più frequente nell'anziano generalmente dopo i 70 anni, è quasi sempre a rapida evoluzione, con severe perdite visive, formazione di emorragie sottoretiniche e devastanti cicatrici disciformi.

Le più accreditate ipotesi per lo sviluppo delle CNV prevedono sostanzialmente due principali cause, non necessariamente disgiunte:

- a) Irregolarità della BrM
- b) Maggiore espressione non bilanciata di VEGF

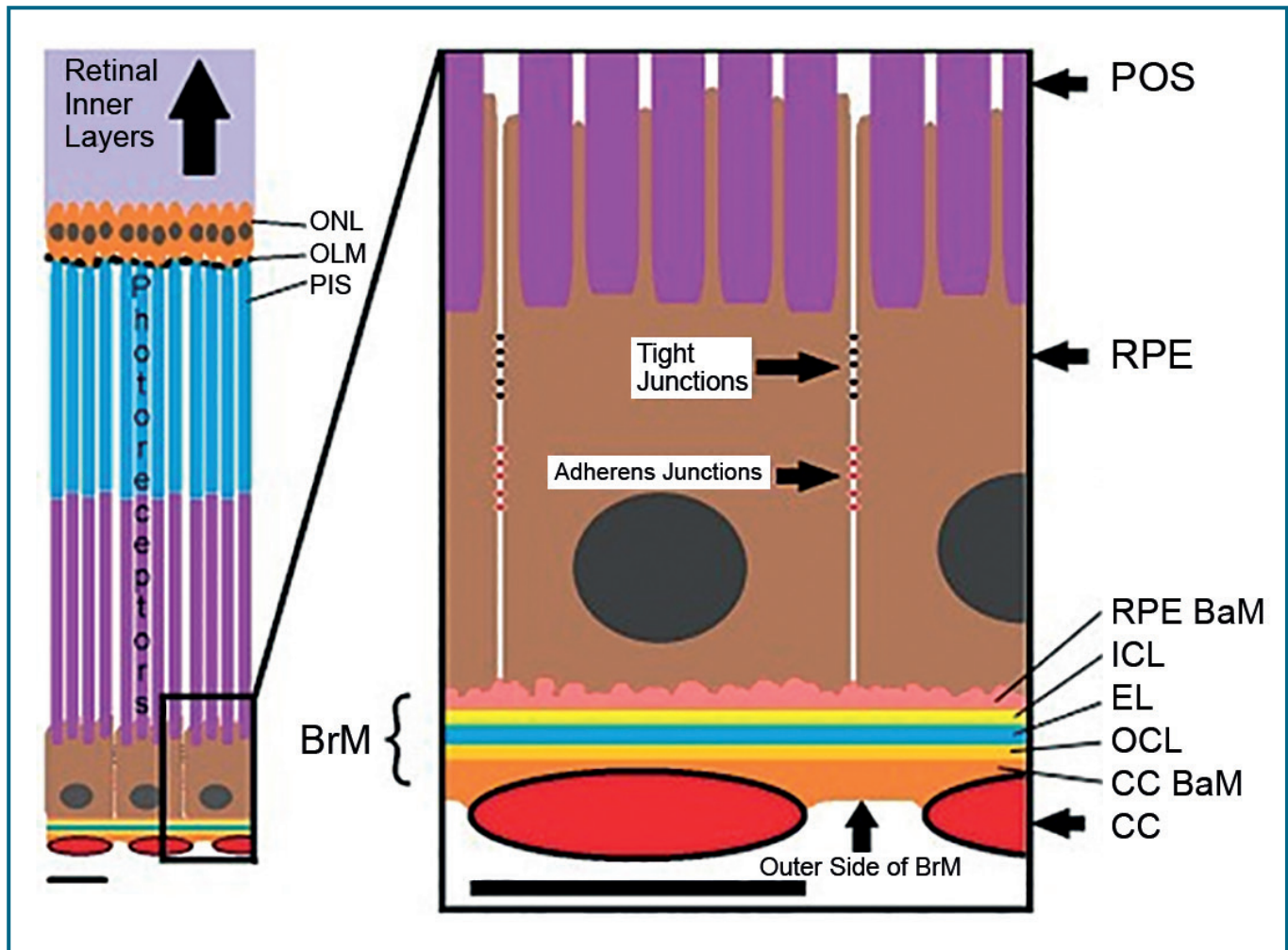


Fig. 3 - Complesso coriocalpillare CC - Membrana di Bruch BrM - EPR. A sinistra retina esterna, EPR e CC. A destra dettaglio CC - BrM - EPR - POS complex. (CC: CorioCapillare, BrM: Membrana di Bruch, RPE: Epitelio Pigmentato Retinico, CCBaM: Membrana Basale CC, OCL: Strato Collagene Esterno, EL: Strato Elastico, ICL: Strato Collagene Interno, RPEBaM: Membrana Basale EPR, POS: Segmenti Esterni Fotorecettori, PIS: Segmenti Interni Fotorecettori, ONL: Strato Nucleare Esterno). (Abbas Shirinifard et al., Biblio 15).

Le alterazioni della BrM includono difetti nella continuità cellulare e/o della sua matrice basale.

Fenomeni infiammatori di diversa origine sono sempre presenti e influenzano, non poco, i meccanismi dell'angiogenesi[13].

L'espressione non bilanciata di VEGF, anche se ritenuta la più importante causa per lo sviluppo di CNV, non sembra sufficiente a determinare e sostenere da sola uno sviluppo efficace di neovasi retinici[14].

- Shirinifard A et al. hanno preso recentemente in considerazione i principali meccanismi della proliferazione neovascolare retinica.

L'adesione tra i singoli elementi cellulari è da molti studi considerata fondamentale per l'inizio e il progressivo sviluppo della CNV[15].

Partendo da questa condivisa convinzione gli autori

hanno utilizzato una multi-cell computer simulation e un modello meccanico computazionale che coinvolge la coriocalpillare, la BrM e i fotorecettori, in conformità agli studi sperimentali di Glazier JA et al. (Glazier-Graner-Hogeweg model, GGH, Cellular Potts Model, CPM) (Fig. 3)[16].

Gli autori hanno previsto vari scenari sperimentali per la gemmazione e successiva proliferazione neovascolare, prendendo in considerazione il variare dell'adesività BrM - RPE - POS complex (Photoreceptors Outer Segments) senza altre concause, e dopo invecchiamento e/o l'instaurarsi di fenomeni infiammatori, sia su retine umane che con modelli animali[15].

Per le simulazioni tridimensionali gli autori hanno utilizzato il metodo CompuCell3D simulation secondo gli studi di Swat et al. [17,18].

Infine, per lo sviluppo di una CNV, hanno tracciato

gli scenari possibili sperimentali in accordo alle osservazioni cliniche e alle ricerche di laboratorio descritte in letteratura.

Hanno previsto lo sviluppo di una CNV:

- a) *Nello spazio tra BrM e EPR, (Sub-RPE, Occult, Type 1 CNV);*
- b) *Nello spazio tra EPR e fotorecettori, (Sub-Retinal, Classic, Type 2 CNV);*
- c) *Simultaneamente in entrambi gli spazi, (Combined, Type 3 CNV).*

La CNV Type 3 può manifestarsi e svilupparsi, a sua volta, da una CNV Type 1 o Type 2 [19].

Secondo il Macular Photocoagulation Study Group il 40% circa di CNV Type 1 porta ad una significativa perdita visiva entro 12 mesi; inoltre, la CNV Type 1 ha una conversione nel Type 3 nel 23% entro 3 mesi, mentre un ulteriore 23% vira entro 12 mesi [19].

Sempre secondo il Macular Photocoagulation Study Group la prognosi delle CNV, nonostante le diverse terapie, resta non favorevole. Solo il 20% dei pazienti con CNV Type 1 ha, infatti, un quadro stabile e/o migliorato a 36 mesi dalla comparsa della patologia[19].

I diversi fattori di crescita growth-factor e le alterazioni della BrM coinvolti nello sviluppo delle CNV hanno suggerito agli autori differenti patterns di crescita, suggestivi modelli in 3D multi-cell model, e possibili sequenze fisio-patologiche.

Gli scenari sperimentali descritti in questo studio sono:

- a) *Alterazioni dell'adesione tra EPR ed EPR (RPE-RPE epithelial junctional adhesion);*
- b) *Alterazioni dell'adesione tra il complesso basale della BrM ed EPR (RPE-BrM adhesion);*
- c) *Alterazioni dell'adesione tra EPR e POS, (RPE-POS adhesion).*

Gli autori hanno ipotizzato quattro possibili scenari allorché un gettone neovascolare si forma e inizia a svilupparsi:

- 1) *Resistenza di tutte le adesioni cellulari, tra RPE-RPE, EPR-BrM, RPE-POS senza sviluppo di CNV;*
- 2) *Non aderenza tra RPE-BrM (per accumulo di sostanze lipido-simili) con sviluppo di Early Sub-RPE CNV o Type 1;*
- 3) *Non aderenza RPE-POS e/o RPE-RPE (per es. processi infiammatori) con adesione ancora presente tra BrM e la sua membrana basale, con sviluppo di Early Sub-Retina CNV o Type 2;*
- 4) *Non aderenza simultanea tra RPE-RPE e RPE-BrM con sviluppo di Sub-RPE e Sub-Retina CNV o Type 3.*

Questi modelli sperimentali di simulazione al computer hanno inoltre indicato che la sola presenza di piccole interruzioni della BrM non sono sufficienti a stimolare e sostenere un valido sviluppo di una CNV (Fig. 4).

Le mutazioni biochimiche delle componenti dalla matrice intercellulare tra i fotorecettori e EPR sembrano, quindi, fortemente coinvolte nello sviluppo e progressione delle varie forme di CNV [15].

EPR e Dry Form AMD

Ci sono numerosi studi che attestano la capacità mitotica delle cellule dell'EPR[20,21].

Molte e più evidenti ricerche scientifiche escludono, al contrario, la capacità replicativa di queste cellule: anche se presente, sarebbe limitata, sporadica, non sufficiente a contrastare efficacemente l'insorgere e/o l'evoluzione delle varie forme di AMD[22].

Una valida ipotesi per la progressione della dry form AMD prevede la morte delle singole cellule dell'EPR, con conseguente stress e alterazione dei fotorecettori corrispondenti.

Un'altra ipotesi prevede che la degenerazione e la conseguente apoptosi delle cellule dell'EPR porterebbero ad un insufficiente numero di cellule pigmentate, incongrua loro redistribuzione, conseguenti rotture nella continuità anatomo-fisiologica del tappeto cellulare pigmentato, e possibile innesco di AMD [22]. A fronte di queste incertezze patogenetiche, la Dry Form AMD è la forma più frequente di maculopatia (85%-90%).

- *Bonilha, V.L. et al.* ipotizzano che questi eventi cito-istologici possano avvenire in area maculare prima che in periferia, determinando i differenti fenotipi di AMD. L'età, pur essendo ritenuta un fattore di rischio per le AMD, non trova sufficienti supporti sperimentali secondo gli studi di questi autori.

Non ci sono, infatti, evidenze scientifiche che convalidino, con l'aumento dell'età, la diminuzione del numero, il cambiamento delle dimensioni ed eventuali redistribuzioni delle cellule dell'EPR[23].

E' chiaro che l'assetto genico determina le manifestazioni fenotipiche. Il fenotipo non è, com'è noto, una semplice manifestazione del genotipo, e questa regola vale anche per le AMD. Le caratteristiche fenotipiche sono il risultato di un combinato tra genotipo e altre forze macro e/o micro ambientali, con variabili poco conosciute e quantificabili, conoscenze già esposte da Wilhelm Johannsen nel 1911[24].

- *Ach T. et al.*, in tempi più recenti, a conferma di quanto detto, utilizzando l'autofluorescenza lipofuscinodipendente, non hanno rilevato perdite di cellule

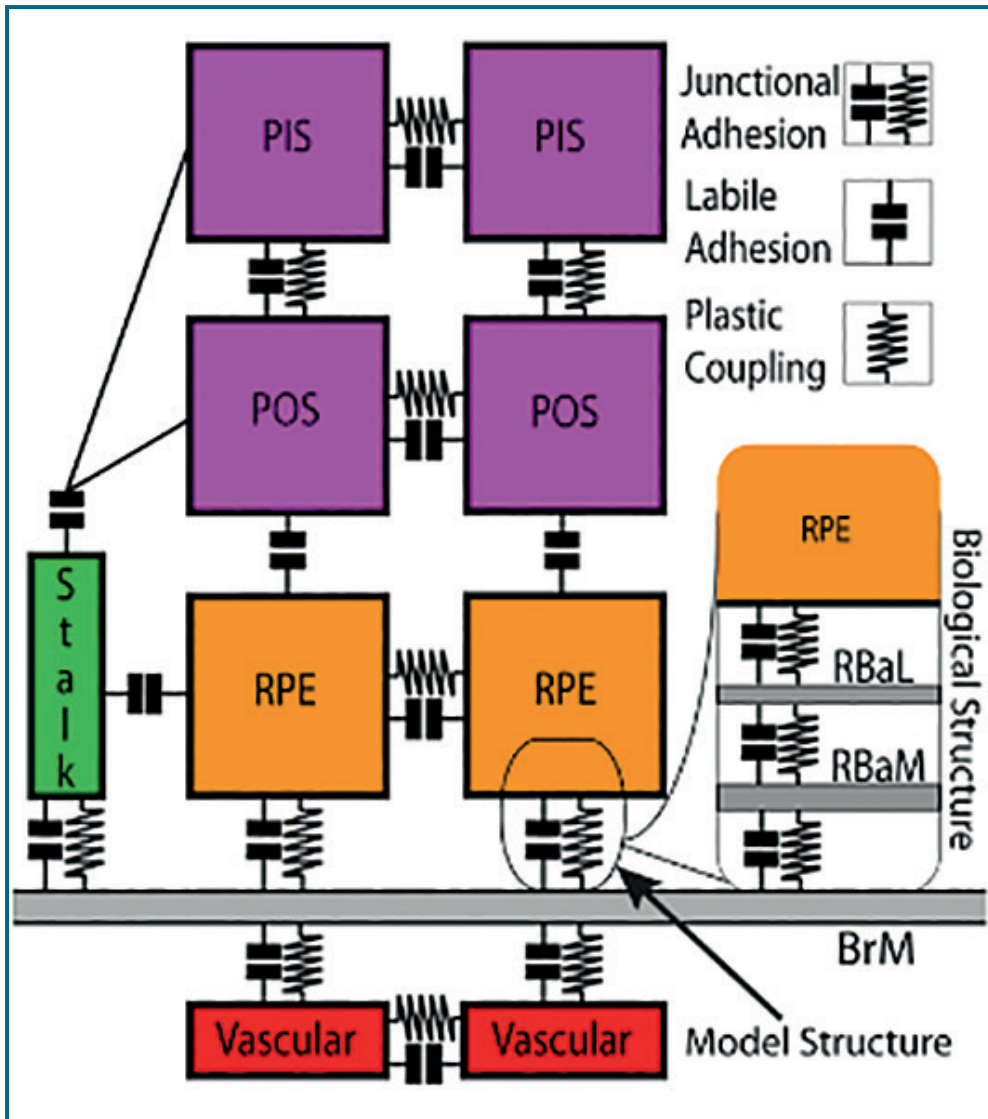


Fig. 4 - Modello di simulazione ed interazione tra i componenti cellulari e non cellulari nel processo neovascolare corio-retinico. (Abbas Shirinifard et al., Biblio 15).

dell'EPR con l'età[25].

L'accumulo di glutazione nelle cellule dell'EPR sembra essere un chiaro segnale di stress per la retina; questo dato si trova associato agli iniziali danni nelle AMD. In entrambe le forme di AMD le cellule del Muller, al pari dell'EPR, sono interessate dall'accumulo di glutamina e glutazione.

Tali molecole possono raggiungere anche valori doppi rispetto alle normali concentrazioni intracellulari, sin dalle fasi iniziali della patologia [26].

Il glutazione svolge un ruolo importante nel prevenire l'ossidazione dei lipidi e nella purificazione dai radicali aldeidici, processi essenziali per l'integrità delle cellule retiniche, in primo luogo EPR e fotorecettori. Uno dei primi segni di danno nell'AMD è il riscontro dell'ipertrofia dei corpi dei fotorecettori, delle cellule del Muller e dell'EPR, spesso associato all'aumento di glutazione.

A dispetto del ruolo che i processi ossidativi svolgono nella patogenesi dell'AMD, e dell'importanza del glutazione nell'omeostasi cellulare, modeste restano tuttavia le conoscenze circa i meccanismi che portano alle due varianti fenotipiche dell'AMD[27].

La progressione della Dry AMD s'innescia con alterazioni iniziali istologiche, procede per alterazioni intermedie, e arriva a forme decisamente più avanzate (early, intermediate, advanced).

- Frederick L. Ferris III et al. riportano i risultati per una nuova classificazione dell'AMD che 26 oftalmologi di diverse nazionalità, esperti in maculopatie, in collaborazione con altre figure scientifiche, hanno concorso a descrivere nel 2013, utilizzando il metodo Delphy modificato. Condividendo criteri comuni hanno indicato AMD come unico termine da utilizzare, al posto di ARM o ARMD [28].

In questo lavoro di riclassificazione i soggetti privi di drusen e alterazioni pigmentarie sono stati considerati senza alcuna forma di AMD.

Le drusen sono depositi extracellulari che si accumulano inizialmente tra l'EPR e lo strato interno collagene della BrM. La presenza di piccole drusen ($\leq 63 \mu\text{m}$, drupelets) è stata considerata normale secondo l'età, non clinicamente rilevante per il rischio e sviluppo di AMD nel tempo.

Soggetti con drusen di media grandezza ($\geq 63 \mu\text{m}$ e $\leq 125 \mu\text{m}$) e senza alterazioni pigmentarie, sono stati considerati con *Early AMD*. Soggetti con drusen grandi ($\geq 125 \mu\text{m}$) o con alterazioni pigmentarie associate a drusen medie sono stati considerati con *Intermediate AMD*.

Soggetti con più alterazioni associate, Wet o Dry AMD sono stati considerati con *Late AMD*. Il rischio stimato

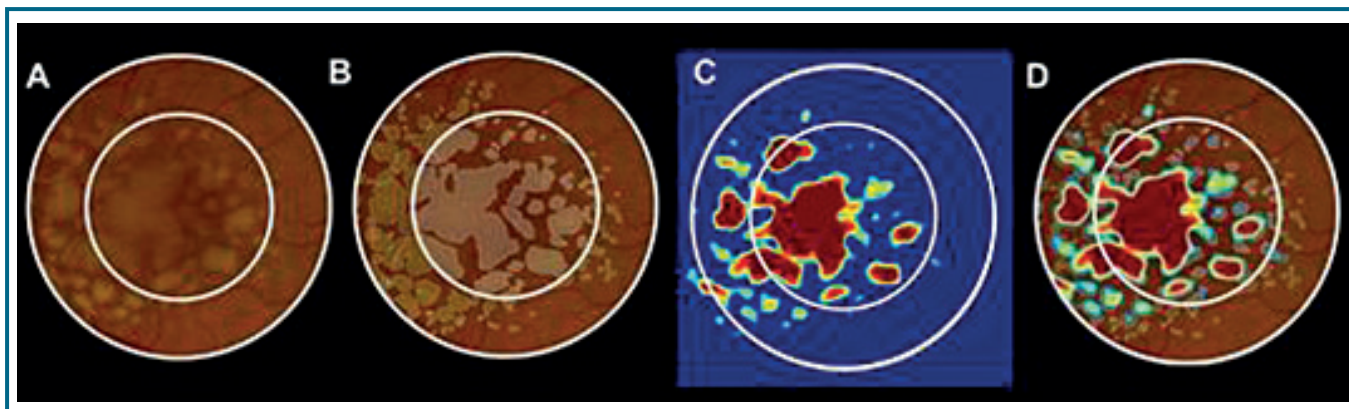


Fig. 5 - Esempio di un buon agreement tra le drusen aree misurate manualmente su retinografia a colori e con algoritmo implementato su HD-OCT Cirrus Zeiss. (A) Fundus Color con aree circolari a 3 e 5 mm. (B) Drusen delineate manualmente (drusen area 3.46 mm² a 3 mm, 5.65 mm² a 5 mm). (C) Drusen map con algoritmo automatizzato (drusen area 3.47 mm² a 3 mm, 5.14 mm² a 5 mm). (D) Soprapposizione delle drusen map automatica e manuale. La misurazione eseguita con l'algoritmo non identifica la maggior parte delle aree ipogmentate evidenti al Fundus Color classificate dai selezionatori come drusen. (Zohar Yehoshua, Giovanni Gregori et al.)

di progressione a 5 anni delle forme Late AMD è 100 volte maggiore, con range di rischio di 0.5% per le forme retiniche normali per età, fino al 50% per le forme intermedie di AMD[28].

AMD e Imaging in Progress

Numerosi studi hanno cercato di valutare e identificare i fattori di rischio associati ad AMD.

Oltre l'età e il fumo di sigaretta che sembrano avere un qualche ruolo secondo alcune ricerche, gli altri fattori di rischio come l'ipertensione arteriosa, il consumo di alcool, l'esposizione alla luce solare e le malattie cardiovascolari hanno fatto rilevare legami di causalità inconsistenti con l'AMD[29].

Le drusen grandi, in particolare se associate ad alterazioni dell'EPR, invece, sono state riconosciute come fattore di rischio per la progressione dell'AMD[30].

L'atrofia geografica si evidenzia nello stadio finale della Dry AMD, seconda causa più comune di deficit visivi severi dopo la Wet AMD[31].

Com'è noto da tempo è caratterizzata dal graduale allargamento delle chiazze atrofiche (patches) a discapito delle cellule dell'EPR, coinvolgendo cellule neurosensoriali e coriocapillare, rispettivamente sopra e sotto l'EPR [32].

Il coinvolgimento bilaterale e simmetrico dell'area maculare da parte di drusen, associate a forme avanzate di AMD, è stato largamente documentato nei diversi fenotipi delle maculopatie [33, 34], e confermato anche in studi istopatologici post-mortem[35].

La fotografia a colori è stata per anni l'unica modalità d'imaging utilizzata con successo negli studi clinici ed epidemiologici per seguire l'AMD nel tempo[36].

L'imaging fotografico è ancora un valido ed insostituibile supporto nei Report delle AMD, come vedremo in seguito. L'estrema variabilità degli aspetti riscontrabili nei fenotipi delle AMD fa emergere, tuttavia, i limiti dell'esame fotografico nel quantificare l'estensione delle aree di atrofia, e nella rappresentazione della morfologia e numero delle drusen [37].

I moderni SD-OCT offrono in vivo una nuova opportunità di diagnosi e studio nel descrivere, classificare le drusen, e determinare l'estensione dei patches nella Dry AMD[38].

Algoritmi con capacità di segmentazione nel tessuto retinico sono già disponibili, con strategie manuali ed automatizzate (Carl Zeiss Meditec Inc, Dublin, CA, USA) [39].

Sono stati eseguiti dal 2010 studi e ricerche che attestano la validità dell'analisi algoritmica con SD-OCT, con riscontro per la riproducibilità dei dati elaborati [40-42].

- B Diniz et al. (Doheny Eye Institute, Los Angeles, CA, USA) in collaborazione con alcuni studiosi di altre università, nel 2015 hanno esaminato 434 occhi di soggetti di età superiore a 50 anni con HD-OCT Cirrus Zeiss, utilizzando l'algoritmo RPE analysis (6.0.), implementato nel device per questo studio e, successivamente commercializzato dopo validazione da parte della FDA, Food and Drug Administration [43]. Sono stati presi in considerazione sesso, età, abitudine al fumo di sigaretta e pressione arteriosa sistemica. Per l'indagine sulle drusen e sulle aree di atrofia dell'EPR l'algoritmo utilizza due aree concentriche, la più centrale di 3 mm (Central Circle, CC) e una seconda

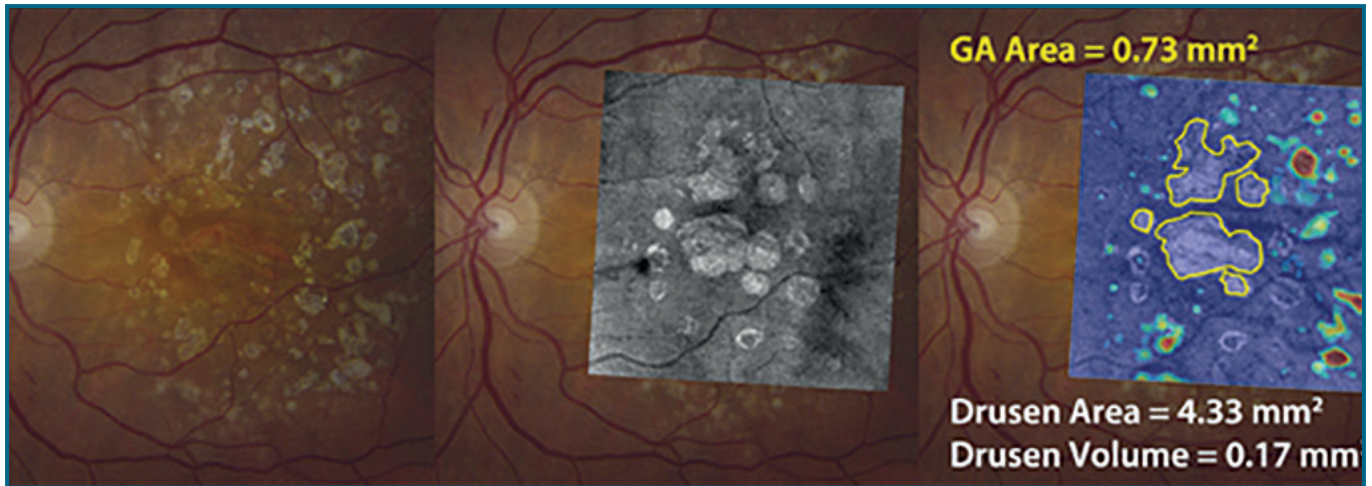


Fig. 6 - Fotografia a colori della retina; la sovrapposizione Cirrus OCT fundus evidenzia l'atrofia geografica GA; l'immagine ibrida mostra l'estensione delle GA, del volume ed estensione delle drusen. L'ultima immagine è stata eseguita utilizzando l'algoritmo di Giovanni Gregori del Bascom Plamer Eye Institute. (Brandon J. Lujan).

zona di 3-5 mm esterna alla prima (Perifoveal Ring, PR) (Fig. 5).

L'area retinica è stata indagata con scansioni 6 mm x 6 mm centrate in fovea dopo dilatazione, con protocollo scansione/volume 200 x 200 mm³; sono state prese in considerazione solo scansioni di buona qualità (signal strength > 7). Le aree di atrofia dell'EPR sono state trovate più estese tra le donne (0.63 ± 0.16 vs 0.26 ± 0.08 mm², $P=0.05$) con incremento all'aumentare dell'età. Le drusen in zona perifoveale aumentano di estensione con l'età ($P<0,001$); nella zona centrale rimangono stabili dopo i 70 anni (0.25 ± 0.06 mm² tra 70-79 anni contro 0.25 ± 0.07 mm² dopo 80 anni).

Molto sorprendentemente il volume delle drusen nella zona centrale (CC = 3 mm) era più ridotto dopo gli 80 anni (0.009 ± 0.003 mm³) rispetto ai soggetti tra 70-79 anni (0.02 ± 0.008 mm³) [43].

Mentre la grandezza delle drusen era simile tra il gruppo dei fumatori e non fumatori, l'area (0.29 mm², $P=0.05$) e il loro volume (0.40 mm³, $P=0.005$) in zona perifoveale erano correlate al tempo d'utilizzo del fumo di sigarette. L'estensione dell'area di atrofia (0.24 mm², $P=0.10$), delle drusen in area perifoveale (0.29 mm², $P=0.05$) e il loro volume (0.40 mm³, $P=0.005$) erano direttamente associati alla pressione arteriosa sistemica, con coinvolgimento di entrambi gli occhi dei soggetti esaminati [43].

- *Zohar Yehoshua et al.*, in un loro recente lavoro, affermano che l'esame fotografico resta fondamentale nell'indagine delle drusen, perché evidenzia mediamente aree retiniche coinvolte più estese rispetto all'analisi con SD-OCT. L'algoritmo finora utilizzato con SD-OCT riconosce, infatti, come drusen solo le

deformazioni dell'EPR sopra una certa soglia, escludendo spesso drupelets, le drusen piane e i depositi drusenoidi sottoretinici (Fig. 6).

L'autore termina che le due tecniche possono essere comunque complementari, aggiungendo informazioni molto utili alla diagnosi e prognosi delle AMD [44].

Ultimate Goal e Considerazioni Finali

- *Alfredo Dubra* (Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, United States) da alcuni anni si è dedicato all'imaging in vivo dell'EPR con numerose pubblicazioni su animali e sull'uomo, insieme con alcuni collaboratori di altre università [45].

In un recente lavoro del 2016, utilizzando uno scanning laser a banda larga, ottiche adattive Adaptive Optics (AO) e angiografia all'indocianina (AO-ICG) in campo scuro (dark-field), l'autore ha investigato alcune retine di soggetti sani riuscendo ad evidenziare il mosaico dell'EPR. Sono state individuate 2209 cellule epiteliali in tre regioni d'interesse (regions of interest, ROI) scelte vicino all'area foveale, con una densità media di 5811 cellule/mm², paragonabile ad altri report che riportano valori simili su retine umane, con picchi di densità in fovea ± 7500 cellule/mm² e ± 5000 cellule/mm² ad 1° di eccentricità [46].

L'autore ha utilizzato i diagrammi di Voronoi (Georgij Voronoi, 1868-1908), un tipo di decomposizione matematica degli spazi rispetto a determinati punti presi in considerazione, che permettono un effetto facilmente comprensibile ed iconograficamente efficace del mosaico epiteliale esaminato, molto simile all'imaging endoteliale corneale (Fig. 7).

Le cellule dell'EPR, come riferito, sono considerate

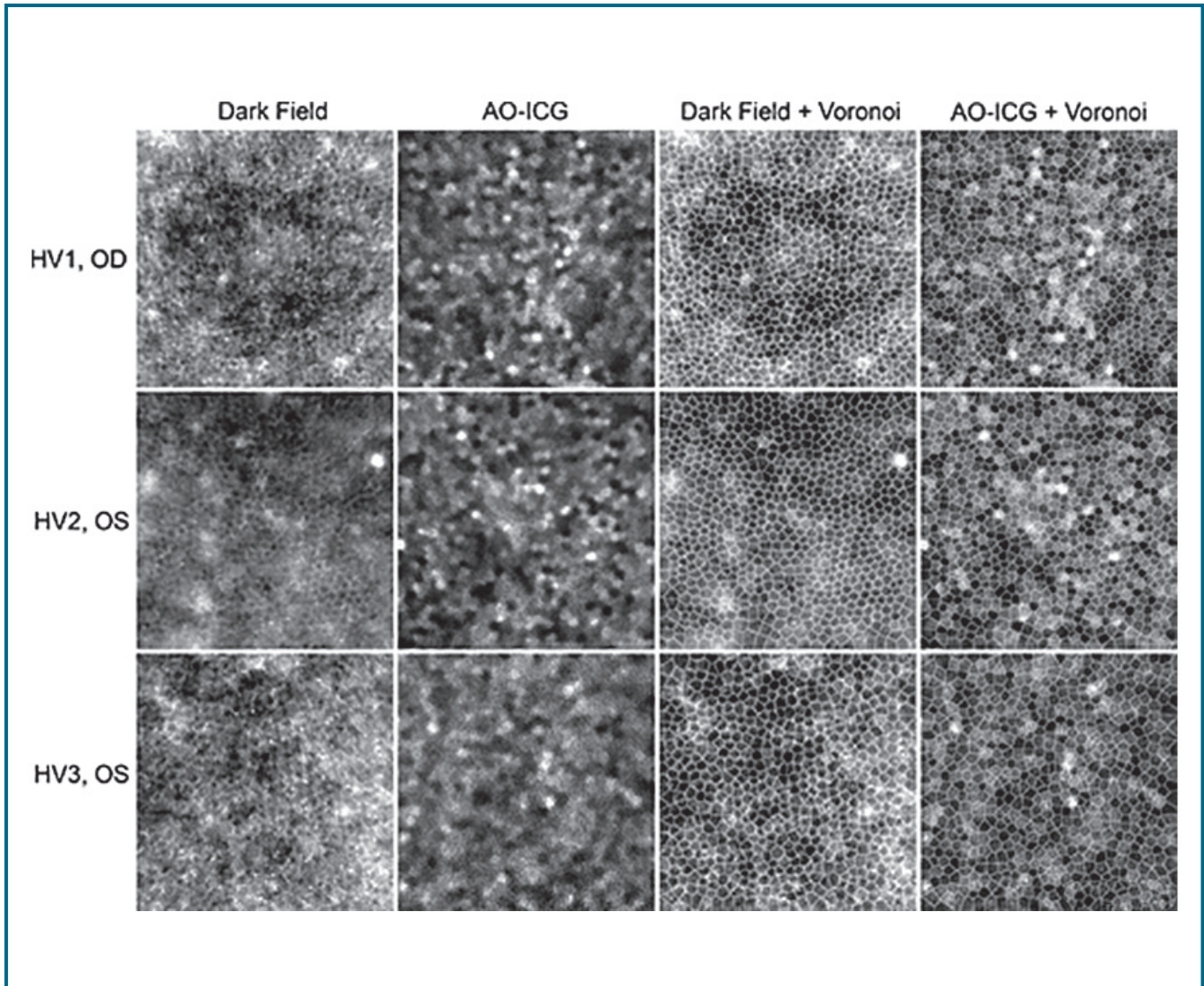


Fig. 7 - Tre imaging di retine umane, HV1, HV2, HV3, con Ottiche Adattive AO in area foveale. (Da sinistra a destra). Riflettenza dei fotorecettori con AO confocale; immagine dell'EPR con AO e Dark Field; immagine con filtro infrarosso e fluorescenza AO-ICG. Tutte le ROI (region of interest) sono state selezionate a 1° dal centro foveale, area con più alta densità di coni. (Scale bar: 50 μ m) (Johnny Tam et al.).

elementi cellulari terminali differenziati post-mitotici. Nell'invecchiamento il loro numero diminuisce, il volume citoplasmatico aumenta e diventano spesso multinucleate, condizione biologica che possiamo definire di "pre-apoptosi non a tempo". Normalmente il tappeto dell'EPR si mantiene inalterato per lunghi anni suggerendo l'esistenza di meccanismi riparatori e/o compensatori ancora non chiariti, già ipotizzati dagli studi pubblicati da Ts'o MO e Friedman nella seconda metà degli anni Sessanta[47,48]. E' stato descritto e riferito che i cambiamenti dell'EPR avvengono con l'aumento dell'età, aumentano con l'instaurarsi delle forme di AMD, e che le correlazioni tra le singole cellule dell'EPR e le terminazioni dei fotorecettori garantiscono il loro fisiologico turnover. Un'alterazione di questi delicati rapporti è stata descritta tra le cause dell'AMD[49].

Recentissime ricerche valorizzano il ruolo dell'EPR come porta immunologica (gateway) della corioretina, con modalità simile all'epitelio dei plessi corioidi dell'encefalo, specie nei confronti di leucociti e monociti[50].

Il fermento scientifico intorno all'EPR, come ho cercato di evidenziare, non si è mai arrestato. Le nuove possibilità d'imaging con AO-OCT potranno sicuramente dare risposte molto efficaci nella prevenzione delle AMD.

Il ruolo dell'EPR per molti versi misterioso e indecifrabile sarà, ancora una volta, fondamentale per ogni possibile quanto auspicabile valido progresso; le nuove tecnologie Hi-Tech costituiranno sicuramente il mezzo necessario più efficace per ogni prossima e futura conoscenza nella patogenesi e terapia dell'AMD. ■

BIBLIOGRAFIA E SITIGRAFIA

1. El-Beltagy AEFBM. Light and electron microscopic studies on the pigmented epithelium and photoreceptors of the retina of common buzzard (*Buteo buteo*). *Tissue Cell* 2015; 47: 78–85.
2. Lucente A. *EPR e l'Imaging retinico*. *Oftalmologia domani* - N. 3 - Anno 2011
3. Jennifer J Hill, Tammy-Lynn Tremblay, Christiane Cantin, Maureen O'Connor-McCourt, John F Kelly and Anne EG Lenferink, Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (TGF)-beta induced epithelial to mesenchymal transition, 7thspace.com, 8 gennaio 2009. URL consultato il 21 gennaio 2009.
4. Shields JA, Shields CL, Eagle RC Jr, Singh AD: Adenocarcinoma arising from congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 119:597–602, 2001.
5. Rohlich P. The interphotoreceptor matrix: electron microscopic and histochemical observations on the vertebrate retina. *Exp Eye Res.* 1970; 10: 80–6.
6. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004; 16: 1–13.
7. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005; 85: 845–81.
8. Ferris FL III. Senile macular degeneration: review of epidemiologic features. *Am J Epidemiol.* 1983; 118: 132–51.
9. Binder S, Krebs I, Ralf-Dieter H, et al. Outcome of transplantation of autologous retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: a prospective trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(11): 4151–4160.
10. Rudnicka AR, Kapetanakis VV, Jarrar Z, et al. Incidence of late-stage age-related macular degeneration in American whites: systematic review and meta-analysis. *Am J Ophthalmol.* 2015;160:85–93, e83.
11. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology.* 2006; 113:373–380.
12. Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122:564–72.
13. Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, et al. (2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 82: 99–110.
14. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Hackett SE, et al. (2004) Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 201: 393–400.
15. Shirinifard A, Glazier JA, Swat M, Gens JS, Family F, Jiang Y, Grossniklaus HE - *PLoS Comput. Biol.* (2012). Adhesion Failures Determine the Pattern of Choroidal Neovascularization in the Eye: A Computer Simulation Study.
16. Glazier JA, Graner F (1993) Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Physical Review E* 47: 2128–2154.
17. (<http://www.compuCell3d.org/>).
18. Swat MH, Hester SD, Balter AI, Heiland RW, Zaitlen BL, et al. (2009) Multicell simulations of development and disease using the CompuCell3D simulation environment. *Methods Mol Biol* 500: 361–428.
19. Group MPS (1996) Occult choroidal neovascularization. Influence on visual outcome in patients with age-related macular degeneration. *Macular Photocoagulation Study Group. Arch Ophthalmol* 114: 400–412.
20. Al Hussaini, H., Kam, J.H., Vugler, A., Semo, M., and Jeffery, G. (2008). Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo. *Mol. Vis.* 14, 1784–1791.
21. Kokkinopoulos, I., Shahabi, G., Colman, A., and Jeffery, G. (2011). Mature peripheral RPE cells have an intrinsic capacity to proliferate; a potential regulatory mechanism for age-related cell loss. *PLoS One* 6:e18921. doi:10.1371/journal.pone.0018921.
22. Bryan W. Jones, Rebecca L. Pfeiffer, William D. Ferrell, Carl B. Watt, James Tucker and Robert E. Marc. *Retinal Remodeling and Metabolic Alterations in Human AMD*. *Frontiers in Cellular Neuroscience* | www.frontiersin.org, April 2016 | Volume 10 | Article 103.
23. Bonilha, V.L. (2008). Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. *Clin. Ophthalmol.* 2,413- 424. doi:10.2147/oph.s2151.
24. Johannsen W. 1911. The genotype conception of heredity. *American Naturalist* 45, 129-159.
25. Ach, T., Huisin, C., McGwin, G. Jr., Messinger, J. D., Zhang, T., Bentley, M. J., et al. (2014). Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 4832–4841. doi:10.1167/iops.14-14802.
26. Marc, R.E., Jones, B.W., and Watt, C.B. (2005). *Retinal Remodeling: Circuitry Revisions Triggered by Photoreceptor Degeneration*. Springer: Kluwer Academic Press Corporation.
27. Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D., and Sternberg, P. (1999). Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 5:32.
28. Frederick L. Ferris III, C. P. Wilkinson, Alan Bird, Usha Chakravarthy, Emily Chew, Karl Csaky, Srinivas R. Sadda, on behalf of the Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. Article in *Ophthalmology*. January 2013. DOI:10.1016/j.ophtha.2012.10.036. Source: PubMed.
29. Butt AL, Lee ET, Klein R, Russell D, Ogola G, Warn A et al. Prevalence and risks factors of age-related macular degeneration in Oklahoma Indians: the Vision Keepers Study. *Ophthalmology* 2011; 118: 1380–1385.
30. Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin MA. Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol* 1999; 44: 1–29.
31. Fleckenstein M, Adrion C, Schmitz-Valckenberg S, Göbel AP, Bindewald-Wittich A, Scholl H et al. Concordance of disease progression in bilateral geographic atrophy due to AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 5: 637–642.
32. Sunness JS. The natural history of geographic atrophy, the advanced atrophic form of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999; 5: 25.
33. Roy M, Kaiser-Kupfer M. Second eye involvement in age-related macular degeneration: a four-year prospective study. *Eye* 1990; 4: 813–818.
34. Wang JJ, Mitchell P, Smith W, Cumming RG. Bilateral involvement by age related maculopathy lesions in a population. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 743–747.
35. Coffey AJ, Brownstein S. The prevalence of macular drusen in postmortem eyes. *Am J Ophthalmol* 1986; 102:164–171.
36. Yehoshua Z, Rosenfeld PJ, Gregori G, Penha F. Spectral domain optical coherence tomography imaging of dry age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2010; 41(Suppl): S6–14.

segue ●●●>

<... segue

37. Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Adrion C, Visvalingam S, Goebel AP, Moßner A et al. Progression of age-related geographic atrophy: role of the fellow eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 6552–6557.
38. Gregori G, Wang F, Rosenfeld PJ, Yehoshua Z, Gregori NZ, Lujan BJ et al. Spectral domain optical coherence tomography imaging of drusen in non-exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2011; 118: 1373–1379.
39. Chiu SJ, Izatt JA, O'Connell RV, Winter KP, Toth CA, Farsiu S. Validated automatic segmentation of AMD pathology including drusen and geographic atrophy in SD-OCT images. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 53–61.
40. Gregori G, Wang F, Rosenfeld PJ, Yehoshua Z, Gregori NZ, Lujan BJ et al. Spectral domain optical coherence tomography imaging of drusen in non-exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2011; 118: 1373–1379.
41. Nittala M, Ruiz-Garcia H, Sadda SR. Accuracy and reproducibility of automated drusen segmentation in eyes with non-neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 8319–8324.
42. Yehoshua Z, Garcia Filho CA, Penha FM, Gregori G, Stetson PF, Feuer WJ et al. Comparison of geographic atrophy measurements from the OCT fundus image and the sub-RPE slab image. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2013; 44: 127–32.
43. B Diniz, DC Rodger, VR Chavali, T MacKay, SY Lee, D Stambolian and SVR Sadda. Drusen and RPE atrophy automated quantification by optical coherence tomography in an elderly population. *Eye* (2015) 29, 272–279, 2015.
44. Zohar Yehoshua, Giovanni Gregori, Srinivas R. Sadda, Fernando M. Penha, Raquel Goldhardt, Muneeswar G. Nittala, Ranjith K. Konduru, William J. Feuer, Pooja Gupta, Ying Li, and Philip J. Rosenfeld. Comparison of Drusen Area Detected by Spectral Domain Optical Coherence Tomography and Color Fundus Imaging.
45. Johnny Tam, Jianfei Liu, Alfredo Dubra, and Robert Fariss. In Vivo Imaging of the Human Retinal Pigment Epithelial Mosaic Using Adaptive Optics Enhanced Indocyanine Green Ophthalmoscopy. *iovs.arvojournals.org* j ISSN: 1552-5783.
46. Ach T, Huislingh C, McGwin G, et al. Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:4832–4841.
47. Ts'o MO, Friedman E (1967) The retinal pigment epithelium. I. Comparative histology. *Arch. Ophthalmol.* 78, 641–649.
48. Ts'o MO, Friedman E (1968) The retinal pigment epithelium. 3. Growth and development. *Arch. Ophthalmol.* 80, 214–216.
49. Mei Chen, Dinusha Rajapakse, Monika Fraczek, Chang Luo, John V. Forrester and Heping Xu. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye – a mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging Cell* (2016) 15, pp436–445.
50. Benhar I, Reemst K, Kalchenko V, Schwartz. The retinal pigment epithelium as a gateway for monocyte trafficking into the eye. *MEMBO J.* 2016 Jun1;35(11):1219-35.doi: 10.15252/embj.201694202. Epub 2016 Apr 22.