

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"



FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
TECNOLOGIE AVANZATE IN BIOMEDICINA

XX CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

Variabilità Genetica e Fenotipica
del Glaucoma Pigmentario

DOTTORANDO

DR. FRANCESCO ODDONE

TUTOR

PROF. GIANLUCA MANNI

COORDINATORE

PROF. LUIGI GIUSTO SPAGNOLI

Generalità sulla malattia glaucomatosa.....	3
Sindrome da dispersione di pigmento e glaucoma pigmentario.....	4
Aspetto clinico.....	6
Segni clinici di PDS o PG nelle diverse strutture oculari.....	8
Associazione con altre patologie.....	9
Diagnosi.....	9
Approccio terapeutico.....	10
Prevenzione.....	11
La genetica del glaucoma.....	12
Loci di suscettibilità genetica GLC.....	15
Il Gene MYOC.....	16
Polimorfismo MYOC mt1(-1000 C/G).....	18
Genetica del Glaucoma Pigmentario.....	18
Overlapping Syndrome: Glaucoma pseudoesfoliativo/GlaucomaPigmentario.....	19
Gene LOXL1 e Glaucoma Pseudoesfoliativo.....	21
Obiettivi dello Studio.....	22
Materiali e Metodi.....	23
Disegno dello studio.....	23
Phenotipizzazione.....	Error! Bookmark not defined.
POAG Patients:.....	Error! Bookmark not defined.
PG patients:.....	Error! Bookmark not defined.
Controls subjects :.....	Error! Bookmark not defined.
Variabili d'esame.....	23
Scala dei parametri qualitativi nel Glaucoma Pigmentario/Sindrome da dispersione pigmentaria:.....	27
Analisi Genetica.....	28
Estrazione del DNA.....	28
Analisi Statistica.....	37
Risultati.....	37
Risultati biometrici/funzionali.....	37
Analisi Genetica.....	46
Tipizzazione genetica della casistica per lo SNP mt(-1000C/G).....	46
Sequenziamento gene LOXL1.....	51
Discussione e Conclusioni.....	54
Bibliografia.....	59

Generalità sulla malattia glaucomatosa

In questi ultimi anni le nostre conoscenze sulla malattia glaucomatosa hanno modificato il tradizionale concetto che si aveva della malattia stessa. Recenti studi sulla sua patogenesi e sul suo inquadramento nosologico ne hanno reso difficile una esatta definizione.

Il glaucoma è un'otticopatia cronica e progressiva caratterizzata da specifiche alterazioni morfologiche della papilla del disco ottico e da una riduzione del campo visivo. Tale danno è stato da sempre collegato alla pressione intraoculare (IOP) elevata, che tuttora resta il principale fattore di rischio per l'insorgenza del glaucoma. In un passato non lontano il glaucoma è stato definito come una malattia in cui la pressione oculare è troppo alta perché nella papilla ottica sia mantenuta una circolazione di sangue sufficiente per la sopravvivenza dei suoi tessuti. Da tale definizione si deduce che l'elemento patogenetico determinante, responsabile dei danni anatomico funzionali oculari è rappresentato dalla pressione intraoculare che, superando valori critici o valori soglia, spesso individuali, provoca una ischemia localizzata elettivamente a livello della testa del nervo ottico. Le indagini epidemiologiche che si sono succedute hanno notevolmente infirmato la validità della suddetta definizione e l'evidenza clinica di numerosi casi di glaucoma progressivo che non si arresta nonostante la IOP risulti normale hanno messo in discussione la centralità di tale fattore nella patogenesi del danno glaucomatoso; per questi motivi sarebbe più corretto parlare di glaucoma come di neuropatia ottica IOP-sensibile. Dal 1996 infatti l'American Academy of Ophthalmology ha stabilito una nuova definizione del POAG: "Il glaucoma cronico ad angolo aperto è una neurotticopatia su base multifattoriale in cui si verifica una perdita caratteristica delle fibre del nervo ottico". Questa nuova definizione, inoltre, stabilisce che le caratteristiche peculiari del glaucoma sono legate o ad una compromissione visiva oppure ad un particolare aspetto della testa del nervo ottico o dello strato delle fibre nervose retiniche, mentre i valori di IOP non sono neppure menzionati. Ciò implica che il glaucoma in una fase precoce può essere caratterizzato da campi visivi perfettamente normali e, a differenza di quanto accadeva in passato, nella nuova definizione della malattia non deve essere necessariamente presente un deficit funzionale rilevabile all'esame del campo visivo.

L'attenzione è stata quindi posta sul danno a livello delle cellule ganglionari retiniche (RGC). Il danno a livello di queste cellule, che rappresentano il terzo neurone della via visiva, precede di molto tempo le alterazioni del campo visivo.

I meccanismi per cui si verifica tale degenerazione delle RGC non sono ancora del tutto chiari, tuttavia le principali teorie patogenetiche sono due: Teoria meccanica e Teoria vascolare.

Secondo la prima teoria, l'ipertensione oculare cronica determinerebbe direttamente sulla neuroretina ed in particolar modo sulle fibre assonali delle RGC una interruzione del flusso assoplasmatico che si eserciterebbe soprattutto a livello dell'anello sclerale di Elschnig e dei pori della lamina cribrosa sclerale,

determinando in ultima analisi la morte delle cellule in questione.

Secondo la teoria vascolare/ischemica invece, un deficit di perfusione a carico della papilla ottica potrebbe indurre un' atrofia della componente nervosa papillare con conseguente insorgenza e progressione dell'otticopatìa glaucomatosa. Quest'ultima teoria in particolar modo potrebbe spiegare meglio della precedente i casi di glaucoma a pressione normale.

Sindrome da dispersione di pigmento e glaucoma pigmentario

La sindrome da dispersione di pigmento è molto più frequente di quanto si ritenesse in passato ed è annoverata tra le principali cause di glaucoma.

Agli inizi del 1900, Von Hippel per primo teorizzò che il glaucoma poteva essere causato dalla deposizione di granuli di pigmento nella camera anteriore, con il risultato di un'ostruzione al deflusso dell'umore acqueo. Nello stesso periodo, Levensohn osservava dispersione di pigmento nella camera anteriore di un suo paziente con glaucoma e avanzava l'ipotesi dell'origine iridea di tale pigmento. Sono comunque stati Koeppe e Jess nel 1923 a teorizzare una diretta relazione di causa-effetto tra l'accumulo di pigmento nella camera anteriore e il glaucoma, e solo nel 1940 Sugar e Barbour ne descrissero per la prima volta le caratteristiche cliniche e istopatologiche. Sugar riportò un caso di una giovane donna con degenerazione del corpo ciliare e dell'epitelio pigmentato dell'iride, accompagnata dalla deposizione di pigmento in camera anteriore e dal 1949 cominciò ad usare il termine di “ glaucoma pigmentario” per descrivere questo inusuale tipo di glaucoma secondario. Da allora, molti altri pazienti sono stati osservati, contribuendo ad aumentare e ben delineare le caratteristiche cliniche di quella che si sarebbe rivelata entità non affatto “rara”, come invece i due autori pensavano inizialmente.

La triade patognomonica prevedeva la presenza dei seguenti segni:

- Fuso di Krukenberg.
- Difetti di transilluminazione iridea.
- Intensa pigmentazione del trabecolato.

Attualmente, il concetto di PG non è ristretto rigidamente alla triade, ma la presenza anche di altre caratteristiche, descritte in seguito, guida alla diagnosi.

Per questo tipo di glaucoma esiste una corrispettiva forma – la Sindrome da Dispersione di Pigmento

(PDS) – definita dalle medesime caratteristiche cliniche in assenza dei segni di glaucoma, in cui cioè IOP, nervo ottico e campo visivo sono normali.

Il disturbo pigmentario, ritenuto in passato relativamente poco diffuso, è in realtà piuttosto comune. In uno screening per glaucoma negli Stati Uniti la PDS è stata stimata colpire circa il 2.5% della popolazione bianca (età media 41.5 anni negli uomini, 35.9 nelle donne). Sulla percentuale di conversione da PDS a PG i dati presenti in letteratura sono molto variabili. In uno studio retrospettivo su pazienti con diagnosi di PDS il rischio di sviluppare un PG è risultato del 10% a 5 anni e del 15% a 15 anni. Altri studi hanno riportato percentuali di gran lunga superiori.

Non bisogna dimenticare che la prevalenza del PG potrebbe essere sottostimata per la scomparsa nel tempo dei segni patognomici di malattia.

La forma pigmentaria si manifesta in massima misura nella terza e quarta decade di vita, mentre va poi incontro a remissione fino a scomparire nell'età avanzata.

Colpisce prevalentemente la razza bianca, sebbene recentemente sia stato sollevato il sospetto che nella popolazione nera il disturbo sia altrettanto diffuso, ma semplicemente meno evidente: l'iride intensamente pigmentata potrebbe mascherare i difetti stromali in transilluminazione e la deposizione di pigmento sulla sua superficie; l'intensa pigmentazione del trabecolato potrebbe essere giustificata dalla pigmentazione tipica della razza nera. In caso di sospetto, nella popolazione nera, è estremamente importante la valutazione della quantità di pigmento depositata sull'apparato zonulare.

La PDS si manifesta in eguale misura negli uomini e nelle donne, mentre il PG colpisce il sesso maschile con un rapporto maschi: femmine di circa 3:1.

La patologia è solitamente bilaterale e la miopia ne è un fattore predisponente.

In conclusione, il tipico paziente affetto da forma pigmentaria è maschio, giovane e miope.

Nello sviluppo della forma pigmentaria sembrano responsabili fattori multipli e fattori genetici sembrerebbero coinvolti nella insorgenza della PDS.

Studi su famiglie affette hanno dimostrato che la PDS è un disordine ad ereditarietà autosomica, a penetranza elevata nei bianchi e incompleta nella popolazione nera.

Una anomalia e debolezza intrinseca dell'epitelio pigmentato è stata ritenuta alla base del difetto; studi istopatologici hanno dimostrato cambiamenti dell'epitelio pigmentato irideo in forma di atrofia e di ipopigmentazione.

Inoltre, fattori meccanici sarebbero responsabili della liberazione del pigmento in camera anteriore, secondo la teoria sviluppata per la prima volta nel 1979 da Campbell:

Nella forma pigmentaria si verifica un contatto tra le fibre zonulari e la faccia posteriore dell'iride. La continua frizione durante i fisiologici movimenti pupillari logora l'epitelio pigmentato irideo, con

conseguente liberazione di granuli di pigmento.

Questa frizione iridozonulare è confermata dalla osservazione istopatologica che i difetti iridei si trovino in corrispondenza dei pacchetti di fibre zonulari. Ulteriori conferme derivano dagli studi biometrici ed ultrabiomicroscopici, in cui negli occhi con PDS la camera anteriore appare più profonda, il cristallino più piatto e l'iride più concava rispetto ai controlli normali.

Inoltre, durante alcuni movimento oculari come l'accomodazione o l'ammiccamento, o durante l'esercizio fisico si verifica una aumento relativo della pressione negativa nella camera posteriore rispetto a quella anteriore; questo gradiente pressorio induce l'accentuazione della caratteristica concavità dell'inserzione iridea, più lassa che nei soggetti normali; questa condizione descritta come "blocco pupillare inverso" contribuisce ad incrementare il contatto iridozonulare. La midriasi è un'altra condizione che induce il contatto tra iride e zonula e determina un aumento della liberazione di pigmento.

Infine, in alcuni occhi si può verificare un contatto tra la faccia posteriore dell'iride e la capsula del cristallino con liberazione sia di pigmento irideo che di materiale esfoliativo di provenienza capsulare. Questa frizione spiega la frequente concomitanza del difetto pigmentario con quello pseudoesfoliativo.

Il materiale così liberato si deposita a livello del trabecolato ostruendone le maglie e inducendo delle modifiche ultrastrutturali, tali da ridurre il deflusso dell'umore acqueo e creare un quadro di blocco trabecolare.

Aspetto clinico

A livello corneale, nel PG si osserva la presenza di depositi verticalmente nella porzione centrale, a formare il cosiddetto Fusco di Krukenberg. Questa caratteristica disposizione delle particelle è dovuta ai moti convettivi dell'acqueo all'interno della camera anteriore. Si riscontra caratteristicamente nelle forme pigmentarie, ma non è patognomonica né indispensabile per la diagnosi.

La camera anteriore mostra in sospensione fini particelle pigmentarie. La fluttuazione di particelle pigmentate presente già in miosi, aumenta considerevolmente con la midriasi. La dilatazione della pupilla induce aumenti transitori della IOP di entità del pigmento liberato. La camera anteriore ha profondità maggiore rispetto agli occhi normali.

Per quanto riguarda l'iride, in transilluminazione il corpo dell'iride può mostrare difetti di pigmentazione di forma allungata ("slit-like") disposti radialmente nella media periferia, in corrispondenza dei punti di contatto dell'iride con i pacchetti di fibre zonulari.

La presenza di questi difetti di transilluminazione è una importante caratteristica diagnostica. La loro assenza, tuttavia non permette di escludere la diagnosi, dato che in molti pazienti una iride spessa e di pigmentazione scura può mascherarne la visualizzazione. E questo potrebbe spiegare la assenza di difetti iridei nella popolazione nera.

Inoltre, sulla superficie anteriore si possono rilevare granuli di pigmento. La spolveratura di pigmento può occasionalmente essere sufficientemente densa da conferire all'iride un aspetto più scuro, simulando una eterocromia iridea. Anche sulla superficie anteriore e posteriore del cristallino si può ritrovare il deposito di particelle diffuse di pigmento.

I pazienti con PDS possono presentare anisocoria, in cui la pupilla più ampia si riscontra nell'occhio con maggior dispersione di pigmento.

Le fibre zonulari sono tipicamente indebolite per la deposizione di materiale pigmentario su di esse; allo stesso modo, il corpo ciliare, pur non visibile clinicamente, presenta un accumulo di materiale pigmentato sui processi ciliari.

All'esame gonioscopico, l'angolo appare aperto a 360° ed il trabecolato appare fortemente pigmentato: si presenta come una ampia banda scura circonferenziale. Il pigmento si deposita anche sulla linea di Schwalbe, soprattutto inferiormente, creando una seconda banda scura, più sottile. Nel PG, inoltre, l'inserzione iridea è tipicamente posteriore e tende ad avere configurazione concava, realizzando così il contatto con le fibre zonulari.

Il segmento posteriore non mostra patognomiche alterazioni cliniche, sebbene il gruppo di Ritch abbia recentemente avanzato l'ipotesi di una alterazione congenita e/o strutturale a carico del complesso epitelio pigmentato retinico/fotorecettori nella forma PDS/PG, riscontrabile all'elettro-oculogramma. Tale debolezza intrinseca dell'epitelio pigmentato irideo potrebbe predisporre l'occhio ad un danneggiamento soprattutto durante la frizione iridozonulare. Questa ipotesi è supportata dalla più alta incidenza di distacco di retina e di degenerazione a lattice verificatasi in tali occhi.

Il coinvolgimento della congiuntiva e delle strutture orbitarie non è stato descritto.

Segni clinici di PDS o PG nelle diverse strutture oculari

Cornea	• Fusco di Krukenberg • depositi di pigmento sull'endotelio
Camera Anteriore	• particelle pigmentate fluttuanti nell'acqueo • aumento di profondità della camera
Iride	• difetti di transilluminazione in media periferia, di aspetto allungato ("slit-like") • granuli di pigmento sulla superficie anteriore • eterocromia • anisocoria • inserzione posteriore della radice iridea • aspetto concavo della radice iridea
Cristallino	• depositi di pigmento sulla capsula anteriore e posteriore
Apparato Zonulare e Ciliare	• depositi di materiale pigmentario sulla zonula e sul corpo ciliare
Angolo	• intensa pigmentazione del trabecolato • intensa pigmentazione della linea di Schwalbe • solitamente aperto a 360° • inserzione posteriore della radice iridea
Segmento Posteriore	• non alterazioni cliniche di rilievo
Congiuntiva e Annessi	• non alterazioni cliniche di rilievo

Associazione con altre patologie

Oculari - La prevalenza di degenerazione a lattice e l'incidenza di distacco retinico (RD) sono superiori nei pazienti con PDS rispetto alla popolazione generale; in uno studio su un gruppo di 407 pazienti (799 occhi) affetti da PDS l'incidenza di RD riscontrata è stata 6.4%.

La sindrome pseudoesfoliativa, patologia differente per eziologia e aspetto clinico, si presenta talvolta associata alla forma pigmentaria clinicamente in forma combinata, tanto da aver indotto Ritch e coll. a sviluppare il concetto di “overlap syndrome”: lo sviluppo di una delle due forme in paziente già affetto dall'altra rappresenta un ulteriore fattore di rischio destinato ad aggravare decorso e prognosi della sottostante patologia glaucomatosa.

Sistemiche - Nel PG non sono note associazioni con patologie sistemiche.

Diagnosi

La diagnosi è essenzialmente clinica, mediante attento esame alla lampada a fessura comprensivo di tonometria e gonioscopia.

Per identificare chiaramente la concavità della inserzione iridea si può chiedere al paziente di fissare un oggetto ravvicinato mentre lo si osserva alla lampada a fessura: l'accomodazione evoca un blocco pupillare inverso, accentuando la concavità iridea.

L'esecuzione di un esame UBM può essere utile per confermare l'aspetto concavo dell'inserzione iridea, la lassità del pacchetto di fibre zonulari e il quadro di blocco pupillare inverso.

È stato dimostrato che l'esercizio fisico può indurre, in alcuni pazienti predisposti, la liberazione massiva di pigmento e scatenare un picco ipertensivo. Per identificare i soggetti in cui questo avviene, può essere indicata la esecuzione di un test di provocazione cinetico (test da sforzo): tonometria e attenta osservazione del contenuto della camera anteriore prima e dopo aver chiesto al paziente di svolgere la sua tipica attività fisica.

Allo stesso modo, per identificare i soggetti con maggior instabilità di pigmento è indicato un test di provocazione farmacologico: tonometria e attenta osservazione del contenuto della camera anteriore prima e dopo somministrazione di fenilefrina 10%.

Diagnosi di PG viene posta in presenza di PDS associata a otticopatie o alterazioni campimetriche. L'aumento della IOP di per sé non è sufficiente a definire la forma glaucomatosa; è stato dimostrato tuttavia aumentare il rischio di conversione da PDS a PG.

Curiosamente, alcuni segni di PG scompaiono con l'avanzare dell'età e col diminuire della liberazione di pigmento dall'iride; tra essi proprio i caratteri patognomonic, come il fuso di Krukenberg, i difetti di transilluminazione iridea e la pigmentazione del trabecolato. Per questa ragione la diagnosi di PG se effettuata tardivamente risulta più difficile, e il rischio di misdiagnosi e di sottostima potrebbe essere elevato.

La capacità di riconoscere queste alterazioni permette di intervenire nel modo più mirato in termini di prevenzione e trattamento.

La diagnosi differenziale deve essere posta con altre patologie caratterizzate dalla dispersione di pigmento in camera anteriore. Tra esse, sono da ricordare la sindrome pseudoesfoliativa-frequentemente associata alla PDS, alcune forme di uveite, trauma e recessione d'angolo, melanos, melanoma oculare, melanocitoma del corpo ciliare, interventi chirurgici complicati, impianto di IOL fache rifrattive da camera posteriore, POAG.

Approccio terapeutico

Il trattamento farmacologico mirato a limitare la dispersione di pigmento prevede l'utilizzo di farmaci miotici; secondo la teoria meccanica proposta da Campbell, lo stiramento dell'iride dovrebbe ridurre il contatto iridozonulare e facilitare il deflusso dell'acqueo per via trabecolare. Questi farmaci, tuttavia, richiedono un accurato esame preventivo della retina periferica per escludere la presenza di aree degenerative o rotture, peraltro non rare nei miopi, e inoltre aumentano il rischio di sviluppo di sinechie posteriori; pertanto si consiglia di non farne un uso cronico, ricorrendo di preferenza invece agli altri ipotonizzanti utilizzati comunemente nel trattamento medico del glaucoma. Tra questi, la scelta di farmaci che agiscono aumentando il deflusso trabecolare appare più razionale. Il controllo della IOP con terapia medica si mantiene in circa la metà dei casi nel PG. I farmaci ipotonizzanti non miotici, pur controllando bene la IOP, non interrompono il continuo meccanismo di dispersione di pigmento.

Nei casi in cui la terapia farmacologica non si rivela sufficiente al controllo della malattia glaucomatosa, è indicato il trattamento con trabeculoplastica argon laser (ALTP). I risultati sono soddisfacenti soprattutto nelle fasi iniziali, e nei pazienti più giovani, e in quelli in cui la patologia è insorta da minor tempo: la risposta è migliore nei trentenni rispetto ai cinquantenni, nei glaucomi di recente diagnosi,

rispetto a quelli di vecchia diagnosi. L'efficacia va riducendosi col passare del tempo: l'efficacia a 1 anno è di circa l'80%, a 2 del 62% e 6 anni del 45% . Dato che il trabecolato è intensamente pigmentato, si raccomanda l'uso di potenze laser inferiori alla norma

Il ricorso alla chirurgia è inevitabile in condizioni di ipertensioni non controllata con i precedenti metodi. Questo si verifica prima e in percentuale maggiore nei pazienti con PG rispetto a controlli affetti da POAG; inoltre, prima dei maschi che nelle femmine. L'approccio alla chirurgia filtrante deve essere molto cauto nel PG, poiché i pazienti, per lo più giovani e miopi, mostrano una elevata tendenza alla ipotonia post chirurgica. Altri rischi legati alla giovane età dei soggetti sono il fallimento della chirurgia a lungo termine per la cicatrizzazione di bozza, e il precoce sviluppo della cataratta. Queste possibili complicanze devono essere accuratamente presentate ai pazienti prima di ricorrere al bisturi. Complessivamente, comunque, le percentuali di successo della chirurgia nei pazienti con PG sono sovrapponibili a quelle dei pazienti di pari età affetti da POAG.

Prevenzione

Nella forma pigmentaria, allo scopo di interrompere il meccanismo di blocco pupillare inverso, come misura preventiva è stata proposta l'iridotomia Nd: Yag Laser periferica.

I dati attualmente a nostra disposizione non sono sufficienti per indicare l'iridotomia in tutti i soggetti affetti da PDS. Uno studio⁵¹ su 21 individui affetti da PSD bilaterale senza ipertono ha indagato l'effetto della iridotomia sulla insorgenza di ipertono oculare; dopo l'esecuzione della iridotomia su un occhio in ciascun paziente, tenendo il controlaterale come controllo, a 2 anni di follow up il 52.3% degli occhi non trattati (11/21) ha mostrato un aumento significativo della IOP (+ 5 mmHg rispetto al baseline), riscontrato invece solo nel 4.7% (1/21) di quelli trattati. Il risultato è apparso più evidente nei soggetti con PDS “ad alto rischio”, ovvero quelli più giovani, con marcata concavità iridea e che presentavano intensa dispersione di pigmento al test di provocazione con fenilefrina. Questo effetto protettivo sembra mantenersi a 10 anni di follow up⁵²: tra i soggetti con PDS ad alto rischio non trattati, la conversione a PG (stabilita arbitrariamente come aumento medio della IOP di almeno 5 mmHg) è stata osservata nel 95.3%, mentre solo nel 38% tra quelli sottoposti a iridotomia YAG laser. Viceversa, negli individui “a basso rischio” la percentuale di conversione a PG è stata inferiore al 10% indipendentemente dalla esecuzione di iridotomia.

Questi studi suggeriscono dunque l'esecuzione di una iridotomia YAG laser preventiva nei soggetti di età < 40 anni, con dispersione attiva di pigmento e evidente concavità della radice dell'iride.

Al contrario, non vi sono al momento sufficienti informazioni per giustificare l'uso di una iridotomia

Yag laser negli occhi che hanno già sviluppato un vero e proprio glaucoma pigmentario. L'unico (e recente) contributo al proposito non è giunto ad alcuna conclusione definitiva essendo frutto di una revisione retrospettiva non controllata.

È consigliato uno stretto monitoraggio dei pazienti immediatamente dopo il trattamento laser, per controllare eventuali rialzi pressori; è stato dimostrato infatti che i pazienti con PDS sviluppano maggiori puntate di ipertono rispetto ai soggetti trattati con iridotomia per altri motivi (i.e. per angolo stretto).

La prognosi dei pazienti con PG/PDS è relativamente buona e diventa più facile controllare nel tempo la IOP. Talvolta la IOP può tornare normale spontaneamente e ciò può essere associato o meno a un decremento della pigmentazione trabecolare. I pazienti con glaucoma pigmentario non precedentemente rilevato possono essere erroneamente classificati in seguito come affetti da Normal Tension Glaucoma NTG.

La genetica del glaucoma

Uno dei maggiori fattori di rischio nella patogenesi dell'otticopatìa glaucomatosa è certamente la presenza di una storia familiare della malattia. L'aggregazione familiare ha pertanto suggerito che specifiche variazioni di sequenza possano contribuire allo sviluppo della malattia glaucomatosa, offrendo la possibilità di una migliore comprensione dei meccanismi molecolari legati alla patogenesi della malattia.

Il carattere familiare del glaucoma è stato evidenziato sin dalla metà del 1800 ed era già un dato acquisito che una storia familiare di glaucoma rappresentasse un importante fattore di rischio di sviluppo della patologia.

Una porzione variabile (35-56%) di pazienti con il glaucoma o l'ipertensione oculare ha avuto una storia familiare positiva. Numerosi studi hanno messo in evidenza una maggiore concordanza per il glaucoma tra gemelli monozigoti rispetto ai gemelli di zigoti, presumibilmente attribuibile ad una significativa predisposizione genetica. I parenti di primo grado di pazienti o di sospetti di glaucoma presentano un rischio 7-10 volte maggiore di soffrire di questa patologia rispetto alla popolazione generale; di conseguenza, il rischio di insorgenza della malattia varia tra il 2,8% ed il 13,5% rispetto allo 0,5% e il 2% della popolazione generale.

Anche se l'ereditabilità del glaucoma è alta, non si osserva in generale una trasmissione mendeliana (di tipo semplice) o l'evidenza di un unico gene di suscettibilità.

Le forme di glaucoma più comuni nella popolazione generale rappresentano probabilmente l'espressione di un meccanismo multifattoriale e si riscontrano anche in più componenti di uno stesso albero familiare con apparenti caratteristiche di trasmissione ereditaria autosomica dominante o recessiva.

Il glaucoma ha le caratteristiche tipiche delle malattie complesse: gli individui che presentano un allele di suscettibilità non hanno la certezza di ammalarsi, bensì un rischio maggiore di sviluppare la malattia rispetto alla popolazione generale. Si suole definire tratto complesso ogni fenotipo che non osserva una trasmissione mendeliana classica (recessivo o dominante) attribuibile ad un singolo gene.

Le malattie complesse possono presentare alcune caratteristiche che ne complicano l'analisi e la diagnosi: l'eterogeneità genetica (la stessa predisposizione può essere determinata dalla presenza di differenti alleli in differenti geni), le fenocopie (lo stesso fenotipo clinico può essere determinato da esclusivi fattori ambientali), penetranza incompleta (non tutti i portatori di allele di suscettibilità manifestano la malattia).

Solitamente anche nel glaucoma primario ad angolo aperto (POAG) in cui l'ereditabilità del fenotipo è la più alta, non si osserva una trasmissione mendeliana semplice o l'evidenza di specifici geni di suscettibilità. Sono stati descritti in letteratura molti alberi genealogici in cui l'ereditarietà risulta essere autosomica dominante nel caso del glaucoma primario ad angolo aperto ad insorgenza precoce, mentre nella forma ad insorgenza adulta si è osservata prevalentemente un'ereditarietà a penetranza incompleta. Nell'ipotesi di tipo poligenico o multifattoriale l'ereditarietà del glaucoma non è ascrivibile ad un singolo gene ma all'interazione combinata di molti geni, ognuno dei quali può correlarsi con i diversi endofenotipi clinici della malattia, ovvero la pressione intraoculare (IOP), la facilità al deflusso, le dimensioni della papilla e la risposta ipertensiva ai corticosteroidi. Secondo queste ipotesi all'interno di una famiglia sono presenti tratti genetici che possono conferire un rischio variabile per ciascun individuo. Questi fattori possono avere un effetto additivo o moltiplicativo e quindi solo il concorrere di più fattori, inclusi quelli non genetici, possono determinare l'insorgenza della malattia. Al contrario del modello di malattia monogenica in cui una variante di un gene determina un fenotipo facilmente riconoscibile, i geni di suscettibilità alterano il rischio della malattia ma non sono né necessari né sufficienti per determinare la patologia.

Nelle malattie complesse, come può essere considerato il glaucoma, siamo di fronte alla concomitante interazione tra eterogeneità clinica e genetica combinata all'influenza di fattori ambientali: diversi geni con effetto ridotto sul fenotipo interagiscono tra di loro e contemporaneamente subiscono l'influenza dell'esposizione ambientale. I fattori ambientali sono costituiti principalmente dalla dieta, dallo stile di vita, e da fattori biologici, come le barriere ematocellulari e l'omeostasi cellulare (stress ossidativo, meccanico o ormonale). Infine esistono altri fattori addizionali che concorrono alla manifestazione del fenotipo quali l'età, le popolazioni di origine, la struttura del bulbo oculare o l'invecchiamento.

Solo dagli anni '80 in poi, l'evoluzione delle tecniche molecolari ha permesso di porre i presupposti per stabilire le basi genetiche del glaucoma. L'intervento di diversi geni nell'eziologia del glaucoma è stato ormai ampiamente provato e sono state identificate alcune regioni cromosomiche (loci) associate con la malattia: ad oggi sono stati riportati circa 20 loci genetici, anche se non tutti ben caratterizzati.

Un locus di suscettibilità è una qualsiasi regione cromosomica nella quale si ritiene sia localizzato un gene di predisposizione.

Le varie forme di glaucoma sono state raggruppate in 3 categorie ad uso della nomenclatura genetica dalla "Human Genome Organization-Genome Database Nomenclature Committee" (HUGO/GDC).

"GLC" è stato designato come simbolo generale per i geni del glaucoma primario. I numeri 1,2,3 vengono aggiunti dopo GLC per designare rispettivamente il glaucoma ad angolo aperto (GPAA), ad angolo chiuso (GPAC), finora non individuato geneticamente, ed il glaucoma primario congenito (GPC). Ad ogni nuovo gene e/o locus che viene individuato, viene assegnata una lettera, in ordine alfabetico; 11 loci sono stati identificati GLC1A-K.

Sino a questo momento la forma di glaucoma più studiata dal punto di vista genetico è sicuramente quella del glaucoma primario ad angolo aperto.

A questa manifestazione della patologia sono stati associati 3 geni diversi, ma la gran parte dei dati sinora collezionati riguardano il gene MYOC, la relativa proteina e i meccanismi in cui è coinvolta. Il primo locus associato alla malattia è stato individuato all'interno della regione q21-31 del cromosoma 1 e denominato GLC1A⁵⁷. La conferma di questo linkage iniziale è stata successivamente replicata in diverse famiglie originarie di varie popolazioni, fino a quando nel gennaio 1997 è stato localizzato il gene responsabile del GPAA denominato *TIGR* (Trabecular Meshwork Induced Glucocorticoid Response Gene) che codifica una proteina di 57 kilodalton, successivamente rinominato Miocillina dalla commissione internazionale HUGO.

Loci di suscettibilità genetica GLC.

Locus	Gene	Chromosome	Phenotype	Inheritance
<i>GLC1A</i>	MYOC	1q23-24	JOAG/POAG	AD
<i>GLC1B</i>		2cen-q13	POAG	AD
<i>GLC1C</i>		3q21-24	POAG	AD
<i>GLC1D</i>		8q23	POAG	AR
<i>GLC1E</i>	OPTN	10p15-p14	JOAG/POAG	?
<i>GLC1F</i>		7q35-36	POAG	AD
<i>GLC1G</i>	WDR36	5q22.1	POAG	?
<i>GLC1H</i>		2p16.3-p15	JOAG	AD
<i>GLC1I</i>		15q11-q13	JOAG	AD
<i>GLC1J</i>		9q22	JOAG	?
<i>GLC1K</i>		20p12	JOAG	?

Il Gene MYOC

Il gene Miocillina è costituito da tre esoni e produce un RNA messaggero di circa 2130 nucleotidi; livelli considerevoli di proteina sono stati messi in evidenza nel corpo trabecolato, nell'iride, nel corpo ciliare e nella sclera, mentre l'espressione risulta diminuita nella retina e nel nervo ottico. La Miocillina, proteina composta da una catena di 504 aminoacidi, presenta una regione idrofobica N-terminale, una zona di omologia con la Miosina(25%) a livello del primo esone, una “cerniera”(Leucin Zipper-like motif) di leucine intervallate ogni 7 aminoacidi, ed un lungo tratto del terzo esone in stretta omologia con l'Olfactomedina(40%), una proteina altamente conservata nella scala evolutiva che si esprime sulla superficie neurosensoriale dell'epitelio olfattivo sia nel rospo che nel ratto. La zona ricca di Leucine è caratterizzata da una conformazione ad α -elica e nei siti opposti 5 residui di Arginina, suggerendo che queste ripetizioni di Leucine e Arginine possano essere coinvolte nelle interazioni proteina-proteina.

La struttura proteica della miocillina è probabilmente rappresentata da un dimerico nella sua forma attiva all'interno della cellula e in particolare la prima parte del gene sintetizza la parte compresa nel doppio strato lipidico della membrana cellulare mentre l'ultima parte, rappresentata dal terzo esone, codifica un importante dominio funzionale. La proteina normale si trova nella matrice extracellulare ed è secreta dalle cellule. L'ipotesi più accreditata è che il probabile ruolo della miocillina consista nella sua attivazione, dopo esposizione delle cellule della rete trabecolare ai glucocorticoidi, da cui probabilmente deriva un aumento della resistenza al deflusso dell'umore acqueo e quindi della pressione intraoculare. Le forme mutate della proteina non sono secrete, presentano alterazioni nella struttura terziaria e formano multimeri che si accumulano nel reticolo endoplasmatico delle cellule del trabecolato: il glaucoma miocillina-indotto è una malattia da “storage” nel Reticolo Endoplasmatico, in cui l'espressione cronica di proteina “misfolded” non secreta porta a disfunzione e morte delle cellule del trabecolato, e in ultima analisi, quindi, al fenotipo glaucoma. È stato inoltre postulato che tali mutazioni inibiscano il clivaggio endoproteolitico intracellulare della miocillina che normalmente rilascia il dominio dell'olfactomedina. Le forme mutate della proteina inoltre possono prevenire la normale processazione e secrezione di altre proteine che sono necessarie per la normale funzione del pathway di efflusso trabecolare. I difetti del gene Myoc sono presenti nell'8% dei casi di glaucoma primario ad angolo aperto ad insorgenza giovanile (JOAG) e nell'1,1-4% dei casi di glaucoma ad insorgenza adulta. Il gene miocillina sembra contribuire con una penetranza di circa l'80-90% nella manifestazione della malattia glaucomatosa. In questo gene è stato identificato un considerevole numero di mutazioni associate a differenti caratteristiche nella manifestazione clinica della malattia. Le mutazioni si riscontrano solitamente nei casi familiari e raramente in quelli sporadici, e coprono circa il 3% di tutti i glaucomi ad angolo aperto nella popolazione generale. La quasi totalità dei difetti molecolari è di natura puntiforme e causa la sostituzione di un aminoacido (missenso) localizzato nel terzo esone nella zona

ad alta omologia con l'olfactomedina. La conoscenza della struttura molecolare della proteina ha fornito alcuni indizi per capire come le mutazioni finora individuate possano interferire col suo normale funzionamento. Le mutazioni agiscono in modo differente a seconda che siano sostituzioni nucleotidiche (missense) o inserzioni/delezioni (frameshift) ed in base al dominio proteico coinvolto. In particolare le mutazioni missense appaiono soprattutto in amminoacidi altamente conservati nella scala evuzionistica, passando dalla struttura più semplice di queste proteine in organismi meno evoluti agli organismi più complessi. Probabilmente queste varianti molecolari ostacolano il corretto ripiegamento della proteina alterandone l'affinità per il substrato. Nel caso delle inserzioni/delezioni viene alterato il modulo di lettura del RNA messaggero e introdotto un codone di stop prematuro a valle della mutazione, determinando così la formazione di proteine tronche e causando un funzionamento anomalo o assente. Sono stati condotti negli ultimi anni vari studi di screening di mutazione su un gran numero di popolazioni diverse, sia di origine europea che americana o asiatica, e sono state evidenziate sinora un totale di 73 mutazioni nel gene miocillina, sia su pazienti ad insorgenza giovanile che adulta. Il glaucoma a pressione normale e l'ipertensione oculare sembrano invece essere associati indipendentemente con le mutazioni della miocillina. Le mutazioni più comuni sono la Gln368Stop e Arg46Stop, presenti rispettivamente nei discendenti europei e in quelli asiatici e derivanti da un fondatore comune. È ragionevole supporre che vi siano grandi differenze nell'espressione o nella funzione tra proteine che portano sostituzioni aminoacidiche e quelle che vengono troncate prematuramente. Le mutazioni missense o nonsense alterano la struttura terziaria della proteina e queste differenze si esprimono in mutamenti nella funzione, nell'emivita e nell'interazione con altri prodotti proteici. Le forme alterate della miocillina possono competere a livello cellulare con la forma normale della stessa proteina o concorrere con essa nell'interazione con le altre proteine.

In questo momento non è possibile fornire ipotesi certe sui meccanismi esatti con cui le mutazioni della miocillina causano lo status patologico.

Sono stati proposti:

secrezione di proteina nulla (nel modello cellulare normale le quantità secrete sono considerevoli)

la miocillina può formare omoeterodimeri e interagire in vivo con alcune catene proteiche della miosina; l'RNA messaggero della miocillina è stato recentemente rilevato come uno dei componenti strutturali del foderò di mielina dei nervi periferici

meccanismo di guadagno di funzione: il topo knockout per la miocillina si sviluppa normalmente con una pressione intraoculare ed una morfologia oculare normale, suggerendo che l'assenza totale della miocillina è inoffensiva per la pressione oculare ed il campo visivo

È noto che la somministrazione esogena di glucocorticoidi è associata ad un alto rischio di aumento della pressione intraoculare⁶¹ in persone affette da glaucoma e nei loro familiari. I glucocorticoidi

incrementano la produzione di miocillina nelle cellule umane del trabecolato ed è interessante notare che forme anomale o livelli eccessivi di questa proteina sono associati all'incremento dei valori pressori oculari. Per ciò che concerne la variabilità mutazionale nella miocillina, nel corso del 2003 è stata identificata una nuova variante del gene localizzata nella regione del promoter, che è stata oggetto di diversi studi sul trabecolato effettuati su pazienti sensibili al trattamento stereoidico.

Polimorfismo MYOC mt1(-1000 C/G)

La variazione di sequenza TIGR/MYOC mt.1 (-1000 C/G) consiste in un polimorfismo biallelico (SNP) che modifica l'espressione del gene ed è stato associato ad una progressione più rapida della malattia.

In particolare questo polimorfismo sembra essere un marcatore di scarso controllo della pressione intraoculare e di danni più gravi a livello del disco ottico e del campo visivo, potenzialmente dovuti ad una perdita di risposta all'intervento terapeutico. Queste analisi sono basate sull'osservazione clinica di 142 pazienti con GPAA con età superiore a 35 anni e con un follow up di approssimativamente 15 anni. L'analisi effettuata ha messo in evidenza che esistono effetti indipendenti della variante sulla progressione della malattia, tenendo conto dei fattori di rischio di base della malattia che includono età, storia familiare, inizio del trattamento farmacologico, eventuale intervento chirurgico, miopia, severità iniziale del fenotipo.

Questo polimorfismo è presente in circa il 15% degli individui di origine caucasica e sembra correlare con una maggior velocità di progressione della malattia, dimostrabile sia a livello del campo visivo che del nervo ottico dopo almeno 8 anni di osservazione retrospettiva. Il polimorfismo mt1 infatti non correla con la gravità della malattia valutata in un determinato momento (ragion per cui altri studi non hanno trovato associazione tra mt1 e severità del glaucoma), ma ha solo un valore prognostico in quanto suggerisce una predisposizione ad un decorso più infausto della patologia.

Genetica del Glaucoma Pigmentario

Particolarmente interessante è il modello di trasmissione genetica studiato nella sindrome da dispersione di pigmento e nel glaucoma pigmentario. Negli individui con evidenza clinica di dispersione di pigmento, la malattia può essere sporadica o ereditaria e la maggior parte dei pedigrees dimostrano un pattern di trasmissione autosomica dominante. Questi risultati si basano su uno studio condotto su

54 membri di 4 famiglie di razza bianca (delle quali, due di discendenza irlandese e le altre due provenienti dall'Europa occidentale e con antenati irlandesi) affette da sindrome da dispersione di pigmento e glaucoma pigmentario. I componenti delle famiglie sono stati clinicamente esaminati alla ricerca di evidenze cliniche di sindrome da dispersione di pigmento. I genotipi sono stati usati per l'analisi di linkage al fine di identificare marcatori genetici che segregano con la malattia. Ventotto pazienti hanno mostrato evidenze cliniche di sindrome da dispersione di pigmento e 14 di questi presentavano un'elevata pressione intraoculare che necessitava di trattamento medico o chirurgico o di entrambi. L'analisi molecolare ha dimostrato un significativo linkage tra il fenotipo malattia e un marcatore genetico localizzato sul telomero del braccio lungo del cromosoma 7 (7q35-q36); ciò ha portato alla conclusione che la sindrome da dispersione di pigmento mostra un pattern di ereditarietà autosomica dominante. La localizzazione del gene responsabile è il primo passo verso l'isolamento del gene stesso, la cui caratterizzazione consentirà una migliore elucidazione sui meccanismi fisiopatologici della malattia e potenzialmente porterà a nuovi approcci diagnostici e terapeutici. Il modello animale è stato meglio caratterizzato. Il topo DBA/2J sviluppa spontaneamente una condizione simile alla sindrome da dispersione di pigmento e al glaucoma pigmentario umani. I geni candidati allo sviluppo della malattia nel topo sembrano essere due: *TYRP1* (Tyrosinase-related protein1) presente sul cromosoma 4 e *Gpnmb* (Glycoprotein NMB) presente sul cromosoma 6. Mutazioni del gene *TYRP1* sono causa di atrofia stromale dell'iride (ISA iris stromal atrophy) attraverso un meccanismo che coinvolge la produzione di pigmento, mentre quelle nel gene *Gpnmb* correlano con la dispersione di pigmento irideo (IPD iris pigment dispersion). Progenie omozigote per entrambi gli alleli ISA e IPD presentano un esordio più precoce e una maggiore severità nella dispersione di pigmento e nell'atrofia stromale dell'iride. Entrambi questi geni sono coinvolti nella produzione di pigmento e/o nella stabilizzazione dei melanosomi. L'ipotesi più accreditata è che nel processo di produzione di pigmento, i melanosomi alterati liberino intermedi tossici responsabili di atrofia iridea e di conseguente glaucoma pigmentario; ciò è supportato dal fatto che la sostanziale riduzione di pigmento allevia la sindrome nel topo DBA/2J. Tuttavia nessuno di questi geni sembra contribuire allo sviluppo della patologia nell'uomo.

Overlapping Syndrome: Glaucoma pseudoesfoliativo/ Glaucoma Pigmentario

Il glaucoma pigmentario presenta inoltre alcune somiglianze patogenetiche ed epidemiologiche con un'altra forma di glaucoma, il glaucoma pseudoesfoliativo.

Sebbene si tratti indubbiamente di entità diverse per eziologia ed aspetto clinico, talvolta le due forme si manifestano clinicamente in forma combinata, tanto da aver indotto Ritch e coll. a sviluppare il concetto di "overlap syndrome": lo sviluppo di una delle due forme in paziente già affetto dall'altra

rappresenta un ulteriore fattore di rischio destinato ad aggravare decorso e prognosi della sottostante patologia glaucomatosa.

Col termine di *Sindrome Pseudoesfoliativa* (PEX) si è soliti far riferimento ad un disordine sistemico, legato all'età, della matrice extracellulare, caratterizzato dalla produzione multifocale e dal progressivo accumulo di materiale fibrillare in vari tessuti dell'organismo intra ed extra oculari, quale risultato di una eccessiva produzione, di una insufficiente degradazione o di entrambi.

Tutte le strutture del segmento anteriore dell'occhio sono coinvolte: depositi di materiale biancastro sulla superficie anteriore del cristallino rappresentano la più importante caratteristica clinica. Tuttavia, il pattern patognomonico è costituito anche da tre zone maggiormente visibili in midriasi: un disco centrale, una zona intermedia creata dall'esfoliazione di materiale dalla superficie della lente durante i movimenti fisiologici e una zona granulare periferica.

All'esame gonioscopico, l'angolo si presenta aperto per 360° (raramente sono presenti delle sinechie) e il trabecolato è pigmentato: segno caratteristico è la Linea di Sanpaulesi, banda di pigmentazione a livello della linea di Schwalbe.

La presenza di sindrome pseudoesfoliativa associata a ipertono ed alterazioni campimetriche o morfologiche a carico del nervo ottico configura il quadro di *Glaucoma Pseudoesfoliativo* (PEXG). Il glaucoma pseudoesfoliativo si ritiene sia la causa identificabile più comune di glaucoma ad angolo aperto, rappresentando circa il 25% di tutte le forme di glaucoma. Il 40% dei pazienti con la sindrome sono destinati a sviluppare la forma glaucomatosa entro 10 anni.

La patologia, la cui prevalenza aumenta con l'avanzare dell'età (approssimativamente dal 10% al 20% negli individui di età superiore ai 60 anni), sembra essere più frequente tra i soggetti di etnia scandinava, anche se è stata descritta praticamente in tutte le etnie, con differenze di distribuzione geografica verosimilmente attribuibili a fattori genetici ed ambientali della popolazione presa in esame.

La caratteristica tendenza di questo disturbo a manifestarsi con più frequenza in cluster geografici, etnici e/o familiari ha suggerito l'ipotesi di un meccanismo multifattoriale, laddove l'importanza di fattori genetici predisponenti è di gran lunga predominante.

La patogenesi del disturbo pseudoesfoliativo resta tuttora sconosciuta, così come l'esatta composizione chimica del materiale che si deposita su tutte le strutture oculari non è ancora ben chiara.

Secondo studi molecolari, biochimici e immunoistochimici, tale materiale si compone di un complesso di glicoproteine/proteoglicani formato da fibrille con epitopi di fibre elastiche quali elastina e tropoelastina e da microfibrille quali fibrillina e diverse glicoproteine associate alle microfibrille.

Gene LOXL1 e Glaucoma Pseudoesfoliativo

Il gene LOXL1, localizzato sul cromosoma 15 (15q24-q25), sembra conferire suscettibilità allo sviluppo del fenotipo esfoliativo, in quanto implicato nella formazione del tessuto elastico e collagene e nell'omeostasi della matrice extracellulare; inoltre, LOXL1 è espresso a livello di numerosi tessuti oculari, come la lamina cribrosa, l'epitelio lenticolare, la cornea, il muscolo ciliare, e il trabecolato, tutti tessuti coinvolti nella produzione di matrice extracellulare anomala.

Le fibre elastiche sono i maggiori componenti della matrice extracellulare e sono costituite da un core centrale di materiale omogeneo, l'elastina, e da microfibrille composte di fibrillina, fibulina e glicoproteine associate.

Durante la formazione delle fibrille elastiche, compaiono inizialmente le microfibrille in associazione con la superficie della cellula e successivamente si deposita tra di esse l'elastina sotto forma del suo precursore, tropoelastina, ricco in residui di lisina.

Le molecole di tropoelastina sono secrete dalla cellula negli spazi extracellulari dove si aggregano trasformandosi nell'elastina insolubile attraverso meccanismi di polimerizzazione.

Il ruolo funzionale delle microfibrille nella formazione delle fibre elastiche non è chiaro.

L'ipotesi più probabile è che esse svolgano un ruolo strutturale orientando le molecole di tropoelastina durante la costruzione del polimero di elastina.

Il prodotto del gene LOXL1 è un membro della famiglia delle lisil-ossidasi, enzimi che catalizzano la deaminazione ossidativa dei residui di lisina della tropoelastina e il relativo cross-linking tra le varie molecole.

Il gene è costituito da una porzione intronica e da sette esoni, cinque dei quali (2-6) sono altamente conservati e codificano per l'estremità carbossi-terminale del prodotto genico, che contiene il dominio catalitico dell'enzima e che è essenziale per l'interazione con la tropoelastina e con la fibulina; l'esone 1 codifica per il pro-peptide LOXL1 che necessita di clivaggio per permettere l'attivazione catalitica dell'enzima.

Topi knockout per tale gene mostrano una marcata riduzione del contenuto di fibre elastiche in diversi organi, con lo sviluppo di quadri di prolasso pelvico, enfisema, anomalie vascolari e cutanee.

Il sequenziamento completo del gene su diverse popolazioni ha consentito di identificare variazioni di sequenza (SNPs) all'interno delle porzioni introniche e di quelle esoniche (in particolare a carico dell'esone 1) il cui allotipo sembra essere associato al rischio maggiore di sviluppare la sindrome e il glaucoma pseudoesfoliativo.

Obiettivi dello Studio

1. Confrontare le caratteristiche demografiche e fenotipiche oculari nei pazienti con Sindrome da Dispersione di Pigmento, Glaucoma Pigmentario e nei soggetti sani
2. Stabilire una correlazione tra i dati demografici/biometrici e i segni clinici in PG/PDS
3. Studio della prevalenza del polimorfismo Myoc mt1 (-1000 C/G) nel Glaucoma Pigmentario, Nel Glaucoma Primario ad Angolo Aperto e nel soggetto sano.
4. Sequenziamento del gene LOXL1 nel Glaucoma Pigmentario, Nel Glaucoma Primario ad Angolo Aperto e nel soggetto sano.

La presenza di correlazioni può offrire un sostanziale progresso nell'epidemiologia genetica della malattia con potenziale impatto nello screening e nel trattamento precoce della patologia. I familiari dei soggetti affetti saranno in grado di avere una stima del rischio empirico di sviluppare la sindrome e la malattia, consentendo agli individui ad alto rischio un monitoraggio periodico con eventuale trattamento preventivo. I risultati dell'indagine genetica potrebbero determinare l'identificazione di nuovi meccanismi patogenetici e quindi di possibili target terapeutici per lo sviluppo di farmaci più efficaci o basati sul genotipo individuale.

Materiali e Metodi

Disegno dello studio

Trasversale osservazionale con gruppo di controllo

Fenotipizzazione

Pazienti con Glaucoma Primario ad Angolo Aperto (POAG)

Criteri di inclusione

Storia documentata di IOP>24mmHG, 2 campi visivi consecutivi con glaucoma hemifield test risultato fuori dai limiti della norma, MD e PSD oltre il 95% dei limiti di confidenza, e un cluster di almeno 3 punti con $P<0.05$ nell'area campione di deviazione, ognuno con $P<0.01$ interessante lo stesso emicampo; il cluster non deve essere contiguo con la macchia cieca e non attraversare il meridiano orizzontale.

Criteri di esclusione:

Qualsiasi patologia oculare passata o presente diversa dal glaucoma o ogni altra causa di glaucoma secondario.

Pazienti con Glaucoma pigmentario:

Criteri di inclusione:

Trabecolato pigmentato, presenza del fuso di Krukemnerg e transilluminazione nella media periferia iridea, storia di IOP ≥ 22 mmHg, aspetto del disco ottico glaucomatoso e corrispondente difetto del campo visivo come precedentemente definito.

Criteri di esclusione:

Qualsiasi patologia oculare passata o presente diversa dal glaucoma o ogni altra causa di glaucoma secondario.

Soggetti di controllo:

Criteri di inclusione:

IOP ≤ 22 mmHg in entrambe gli occhi.

Criteri di esclusione:

Qualsiasi patologia oculare presente o passata, una storia familiare di glaucoma, almeno una misurazione nella storia clinica $>21\text{mmHg}$, storia clinica di un uso sistemico o topico di steroidi, campo visivo danneggiato sulla base dei criteri prima definiti.

Variabili d'esame

Lo studio si è inizialmente concentrato sul reclutamento e sulla completa fenotipizzazione dei soggetti con sindrome da dispersione pigmentaria o glaucoma pigmentario, soggetti affetti da glaucoma primario ad angolo aperto e soggetti sani di controllo. Ai pazienti reclutati è stato chiesto di portare tutti i parenti diretti, per la realizzazione di un minuzioso pedigree. L'accurata definizione dei fenotipi, infatti, è di critica importanza negli studi genetici, quando tratti quantitativi multipli partecipano alla caratterizzazione del fenotipo. Per una precisa diagnosi di sindrome da dispersione pigmentaria e glaucoma pigmentario è fondamentale distinguere la sindrome primaria da altre forme secondarie di rilascio di pigmento quali traumi, sindrome pseudoesfoliativa, presenza di impianti intraoculari e liberazione fisiologica di pigmento dai tessuti oculari legata all'età. Inoltre accanto a queste informazioni di natura prettamente qualitativa fornite da un esame clinico standard dell'occhio, si rende necessario l'uso di nuove tecnologie per una quantificazione discreta dei tratti fenotipici, come lo spessore dello strato delle fibre nervose, la morfologia della testa del nervo ottico e lo stato funzionale di differenti sottopopolazioni di cellule ganglionari retiniche. Questo approccio consente una più accurata discriminazione tra soggetti normali, soggetti portatori della sindrome senza evidenza di danno glaucomatoso, soggetti ad uno stadio precoce di malattia glaucomatosa e soggetti con glaucoma conclamato.

Lo screening dei pazienti da inserire nello studio è stato effettuato tra quelli normalmente seguiti nell'ambulatorio del centro glaucoma del Policlinico di Tor Vergata, Roma.

Solo il riscontro, attraverso il controllo delle cartelle personali nonché delle visite di follow up e degli esami strumentali precedenti, di un totale rispetto dei criteri di inclusione ed esclusione in seguito riportati ha permesso a tali pazienti di entrare a far parte dello studio suddetto.

Dopo il reclutamento, ciascun paziente è stato sottoposto ad una fenotipizzazione oftalmologica completa e al prelievo di un campione ematico ai fini dell'analisi genetica. Lo scopo dello studio e le metodiche d'esame sono state dettagliatamente esplicate nel relativo consenso informato.

La raccolta dei dati demografici e anamnestici è stata seguita dalla valutazione oftalmologica clinica completa dei soggetti arruolati e dei loro parenti, comprendente:

Esame dell'acuità visiva per lontano e per vicino: si è proceduti alla stima dell'acuità visiva naturale e

corretta mediante ottotipo standardizzato EDTRS, cercando di raggiungere la migliore correzione

Cheratometria

Misura dello spessore corneale (pachimetria): La pachimetria ad ultrasuoni misura lo spessore corneale centrale. I pazienti con cornee sottili hanno un rischio maggiore di sviluppare il glaucoma ad angolo aperto, soprattutto se si associa un aumentato rapporto verticale tra escavazione e diametro della papilla ottica. Lo spessore corneale centrale (CCT) è stato calcolato alla media di 5 misurazioni ottenute durante la stessa visita usando il pachimetro ad ultrasuoni (TOMEY Bio & Pachy Meter AL-2000) previa instillazione di un anestetico locale in goccia (Novesina). Tra una misurazione e l'altra il paziente è stato fatto ammicciare.

Profondità della camera anteriore (anterior chamber depth ACD) , spessore della lente (lens thickness LT) e lunghezza assiale del bulbo (AxL) : la lunghezza assiale del bulbo viene misurata usando un dispositivo ad ultrasuoni A-mode munito di sonda a contatto corneale. La cornea è anestetizzata tramite instillazione di un anestetico topico. Il paziente viene istruito a fissare un target distante, posto immediatamente dietro l'operatore. È richiesta una deviazione standard per la lunghezza assiale $< 0,13$ mm; se la deviazione standard è maggiore, le misure vengono ripetute altre due volte, se il risultato è $> 0,13$, le misure possono essere accettate.

Esame biomicroscopico del segmento anteriore alla lampada a fessura

Valutazione dell'endotelio corneale: la presenza del caratteristico fuso di krukenberg sulla superficie endoteliale è stata valutata e definita come "assente" "moderata" o "definita". Il fuso, sebbene comune, non è né patognomônico né unico nella PDS, e nei casi di lunga durata potrebbe essere più difficile da individuare, poiché con il tempo tende a divenire più piccolo e di colore più chiaro

Transilluminazione iridea : il particolare orientamento del fascio di luce consente di individuare l'atrofia dell'epitelio pigmentato irideo , dovuta a dispersione di pigmento dalla media periferia, che si rende evidente con i tipici difetti di transilluminazione radiale. Questi difetti sono appunto causati dal fatto che il pigmento dell'iride viene eroso dal contatto con la zonula. Se asimmetrico, l'occhio con atrofia iridea maggiore può mostrare una pupilla leggermente più grande

Presenza di pigmento fluttuante rilasciato nell'umore acqueo e disperso dai movimenti di convezione dell'acqueo stesso: la valutazione è stata effettuata prima e dopo dilatazione farmacologica della pupilla, dimostrando una spolveratura di granuli e il loro conseguente deposito su tutte le strutture della camera anteriore, inclusi le fibre zonulari e il corpo ciliare. Il pigmento appare finemente granulare e di aspetto omogeneo, rispetto alla più grossolana pigmentazione riscontrata nella sindrome pseudoesfoliativa

Cristallino: dopo la dilatazione, la pigmentazione è stata individuata anche nei punti in cui le fibre zonulari si congiungono alla capsula posteriore del cristallino; il pigmento in quest'area viene chiamato "striscia di Scheie". Tale reperto si apprezza comunque meglio attraverso l'esame gonioscopico

Valutazione gonioscopica dell'angolo della camera anteriore: La gonioscopia è la visualizzazione dell'angolo della camera anteriore e permette l'osservazione dell'angolo irido-corneale mediante una particolare lente a contatto in grado di deviare i raggi luminosi provenienti dal trabecolato corneo-sclerale in un punto in cui possano essere focalizzati dal biomicroscopio. Una adeguata anestesia è importante per il confort del paziente e per ottenere le migliori condizioni d'esame; si è quindi proceduti alla instillazione nel sacco congiuntivale di lidocaina topica al 2%. Al paziente è stata applicata una speciale lente a contatto contenente uno specchio che ha permesso l'osservazione dell'angolo di drenaggio e della sua pervietà. La presenza, la distribuzione e la quantità di pigmento nelle strutture angolari sono state analizzate e gradate sulla base dell'esperienza clinica. Nei casi di malattia franca e conclamata, l'esame ha rivelato una densa banda di pigmentazione scura a livello del trabecolato, soprattutto posteriore, e sull'intera circonferenza dell'angolo in maniera uniforme; in alcuni casi il pigmento si deposita anteriormente alla linea di Schwalbe, come se fosse una "linea di Sampaolesi", che è caratteristica del glaucoma pseudoesfoliativo. Ci si è soffermati anche sull'attenta valutazione della forma della periferia iridea, dell'inserzione della radice iridea e dell'ampiezza della banda ciliare. In accordo con l'ipotetico meccanismo patogenetico, in quasi tutti i soggetti abbiamo riscontrato un aspetto caratteristico dell'iride con una concavità medio-periferica; ciò sarebbe alla base della continua frizione irido zonulare ed è confermata dall'osservazione che la risoluzione del blocco pupillare, mediante iridotomia periferica, appiattisce l'iride e riduce il contatto.

Misurazione della pressione intraoculare (IOP) mediante tonometro ad applanazione di Goldmann: si tratta di uno step critico e di fondamentale importanza nella gestione del paziente e necessita di una corretta interpretazione del dato ottenuto. La misurazione della IOP è stata eseguita con tonometro ad applanazione di Goldmann previa instillazione di un anestetico locale in goccia (Novesina) ed applicazione di un colorante (Fluoresceina). Sono state effettuate 2 misurazioni e si è poi considerata la media; nel caso invece ci sia stata una differenza > 2 mmHg tra le due misure ne è stata eseguita una terza e si è considerata quindi la mediana. Nella sindrome da dispersione di pigmento e nel glaucoma pigmentario, la IOP può essere inizialmente instabile, cosicché rilevazioni normali non escludono un glaucoma. Alcuni pazienti esibiscono più alti livelli e maggiori fluttuazioni della IOP rispetto al glaucoma primario ad angolo aperto (POAG) e, al momento della diagnosi, è frequente riscontrare danni più avanzati in un occhio e più moderati nell'altro.

Misura del diametro verticale del disco ottico e del rapporto cup/disk : il C/D è definito dal rapporto tra la zona escavata e l'area del disco ottico; è preferibile misurare il C/D sull'asse verticale

Valutazione di altre patologie oculari incidentali

Esame del campo visivo : perimetria convenzionale bianco su bianco con tecnologia Humphrey 24-2 sita-standard. E' il gold standard nella diagnosi di difetti campimetrici glaucomatosi.

FDT-matrix 24-2: Programma 24-2 con strategia ZEST (Humphrey Matrix - Zeiss with Welch Allyn

FDT).

Polarimetria laser a scansione confocale ottenuta con GDx VCC Nerve Fiber Analyser system : La polarimetria a scansione laser (GDx) studia la birifrangenza dello strato delle fibre nervose retiniche e misura anche le variazioni dello spessore delle fibre del nervo ottico.

Scala dei parametri qualitativi nel Glaucoma Pigmentario/ Sindrome da dispersione pigmentaria:

- pigmentazione trabecolare: nessuna, lieve, moderata, densa
- transilluminazione iridea: nessuna, moderata, definita
- fuso di krukenberg: nessuno, moderato, definito
- concavità iridea: nessuna, moderata, definita

Analisi Genetica

Estrazione del DNA

Protocollo estrazione DNA mediante uso di fenolo-cloroformio

Materiale a 4°C:

- 1) NP40
- 2) Lisivillo
- 3) Fenolo
- 4) cloroformio (CIA)
- 5) etanolo 100% (conservato a -20C)
- 6) Provette da 2ml sterili (4 x ogni campione)

Protocollo:

1. Aggiungere 800µl di campione omogeneizzato in una provetta da 2ml
2. Aggiungere 800µl di NP40
3. Vortexare e centrifugare a 14.000rpm per 5minuti
4. Eliminare il surnatante per capovolgimento
5. Aggiungere al pellet 1600µl di NP40
6. Vortexare e centrifugare a 14.000rpm per 5minuti
7. Eliminare il surnatante per capovolgimento
8. Aggiungere al pellet 800µl di lisivillo e vortexare
9. Sigillare i tappi delle provette con parafilm e mettere sulla ruota per 1ora
10. Aggiungere 800µl di fenolo
11. Vortexare e centrifugare a 14.000rpm per 5minuti

12. Prelevare e inserire il surnatante in una nuova provetta sterile
13. Aggiungere 800µl di fenolo
14. Vortexare e centrifugare a 14.000rpm per 5minuti
15. Prelevare e inserire il surnatante in una nuova provetta sterile
16. Aggiungere 800µl di cloroformio
17. Vortexare e centrifugare a 14.000rpm per 5minuti
18. Prelevare e inserire il surnatante in una nuova provetta sterile
19. Aggiungere 1ml di etanolo100% freddo
20. Si culla la provetta fino a vedere una “nuvola” contenente DNA
21. Mettere il campione a -80 per facilitare la precipitazione
22. Centrifugare a 14.000rpm per 5minuti
23. Eliminare il surnatante con una pipetta
24. Lasciare asciugare l'eventuale residuo di etanolo
25. Aggiungere 70µl di acqua per l'eluizione

Real Time PCR

La PCR Real-Time è una metodologia che si basa sull'accoppiamento di un termociclatore con un sistema di rilevamento della fluorescenza introducendo la possibilità di monitorare costantemente, in “tempo reale”, l'andamento della reazione. La possibilità di visualizzare l'accumulo del prodotto di amplificazione in “real time” è reso possibile dalla marcatura di sonde con molecole fluorescenti. Sono state messe a punto differenti chimiche che consentono di rilevare in modo specifico gli ampliconi e per quanto riguarda il lavoro da noi svolto si è utilizzato un saggio real-time basato sulla chimica più diffusa nei laboratori analisi, la TaqMan®. Il saggio in questione si basa sulla presenza nella tradizionale miscela di reazione della PCR di un oligonucleotide sonda non estendibile, che ibrida specificatamente una regione del DNA bersaglio compresa tra le due sequenze degli oligonucleotidi primer. La sonda è marcata con due molecole fluorescenti: il reporter, una fluoresceina modificata posta all'estremità 5' e il quencher, una rodamina modificata posta all'estremità 3', la cui fluorescenza è l'unica efficientemente misurabile quando la sonda è integra; durante la PCR, ad ogni ciclo di amplificazione l'enzima Taq polimerasi non solo duplica il bersaglio, ma, con la sua attività 5'-3' endonucleasica, degrada anche la sonda ad esso ibridata separando i due fluorocromi e rendendo così pienamente rilevabile l'emissione del reporter. Dato che una coppia di DNA duplicata durante la PCR è accompagnata dalla liberazione di una molecola di reporter, la fluorescenza relativa che si accumula nel campione è in ogni momento proporzionale alla quantità di DNA amplificato. Tale tecnica è stata condotta sullo strumento ABI

PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in grado di funzionare contemporaneamente sia da termociclatore sia da fluorimetro . Il programma deputato a gestire lo strumento, Sequence Detection System (SDS), acquisisce lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione di PCR e converte la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Il ciclo di PCR in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter dovuto non a mera variazione del “rumore di fondo” del sistema ma a specifico evento di amplificazione è definito ciclo soglia (Ct) della reazione.

Il saggio Taqman® quantifica il DNA bersaglio al ciclo soglia quindi, quando la reazione di PCR è in fase esponenziale, condizione essenziale per eseguire una corretta quantizzazione.

Disegno delle sonde allele specifiche per saggio di discriminazione allelica

Per la genotipizzazione su larga scala è stata utilizzata la metodica della Real-Time PCR mediante saggio di discriminazione allelica con chimica TaqMan® .

In un sistema biallelico, come nel nostro caso, nella stessa reazione ci saranno due diverse sonde marcate con un diverso fluoroforo (FAM TM e VIC TM) ciascuna complementare ad uno degli alleli dello SNPs in analisi. Durante la fase di annealing le sonde si ibrideranno ciascuna con il proprio filamento specifico. Ne risulta che un aumento della fluorescenza alla lunghezza d'onda specifica di uno dei due fluorofori è compatibile con uno stato di omozigosità per quel determinato allele, mentre l'emissione di fluorescenza di entrambe le lunghezze d'onda è compatibile con uno stato di eterozigosità [Dorak 2006].

I saggi di discriminazione allelica sono stati ordinati utilizzando direttamente l'Assays-by-designSM service: un servizio che disegna, sintetizza e fornisce primers e probes qualitativamente controllati per saggi di espressione genica e di discriminazione allelica previa sottomissione di sequenze specifiche validate tramite il programma File Builder (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I saggi di discriminazione allelica vengono sintetizzati solo se superano i controlli di qualità:

- Ogni primer ed ogni sonda viene singolarmente testata tramite spettroscopia di massa per verificare la corretta sintesi degli oligonucleotidi.
- Deve essere stato prodotto almeno un cluster di discriminazione allelica facilmente interpretabile.
- I saggi per i quali i primer e le sonde non raggiungono standard di rendimento non superano i

controlli di qualità.

- Le sequenze che fiancheggiano lo SNPs interessato sono state formattate convalidate ed ordinate.

Preparazione del saggio di Real-Time PCR di discriminazione allelica

Su di una piastra a lettura ottica da 96 campioni vengono aggiunti ad ogni pozzetto:

TaqMan® Universal PCR Master Mix	12.50 µl
SNP Genotyping assay	0.31 µl
bdH ₂ O	1.40 µl
DNA	1.00 µl

La TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) contiene il buffer, i dNTPs e la Taq Gold Polimerasi

Lo SNP Genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) contiene i due primers (Forward e Reverse) e le due sonde specifiche per ogni allele una marcata al 5' con il fluoroforo FAM™ con fluorescenza nel rosso e l'altra con il fluoroforo VIC® con fluorescenza nel verde.

Una volta preparata la piastra questa viene caricata sullo strumento alle seguenti condizioni di incubazione:

1 min	a 60°C	pre-read: per rilevare l'emissione iniziale della fluorescenza
2 min	a 50°C	
10 min	a 95°C	
15 sec	a 95°C	} 40 cicli
1 min	a 60°C.	
1 min	a 60°C	post-read: per il rilevamento della clusterizzazione dei due diversi genotipi.

I risultati vengono analizzati e letti tramite il software SDS in dotazione.

La sequenza dei primer utilizzata per analizzare il saggio è la seguente:

Primer

-MyocForward GCGAATAGAGCCATAAACTCAAAGTG

-MyocReverse AGTATAAAATGTCTGTGATTTCTATTGGTAATGACAA

Le sonde utilizzate per discriminare le basi sono le seguenti:

per la base G, è stata utilizzata la sonda marcata con il fluoroforo VIC

per la base C, è stata utilizzata la sonda marcata con il fluoroforo FAM

-Sonda VIC CACAGGTACTGTTATTAC

-Sonda FAM CACAGGTACTCTTATTAC

Ri-sequenziamento diretto

E' stato utilizzato il metodo di Sanger per il sequenziamento degli acidi nucleici al fine di ottenere una conferma dei genotipi dei soggetti analizzati che metta in luce l'effettiva specificità ed il corretto funzionamento dei saggi Real-Time nell'attribuzione dei genotipi (Shandure et al.2004).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

La sequenza nucleotidica da analizzare viene amplificata utilizzando in un volume finale di 30 µl:

Primer forward: 2,0 µl (7 pmoli)

Primer reverse: 2,0 µl (7 pmoli)

dNTP: 3,5 µl

MgCl₂ : 1,8 µl

Buffer: 3,0 µl

(Il buffer contiene: KCl 1M, TrisHCl 1M)

Taq polimerasi: 0,2 µl

H₂O: 15,1 µl

DNA 2,5 µl

I primer utilizzati sono stati disegnati in modo specifico per ogni SNPs .

Il ciclo di PCR utilizzato per l'amplificazione dei nostri marcatori è il seguente:

5 min	a	95°C	Attivazione della polimerasi	
40 sec	a	94°C	Denaturazione	} 40 cicli
30 sec	a	58-60°C	Appaiamento	
40 sec	a	72°C	Estensione	
7 min	a	72°C	Estensione finale	

Per verificare l'avvenuta amplificazione il prodotto di PCR in maniera elettroforetica sul gel d'agarosio 1,8%

Prima purificazione

Il prodotto correttamente amplificato viene purificato eliminando i primers e i nucleotidi non incorporati tramite reazione enzimatica che comporta l'uso di:

Prodotto PCR	15.0 µl
Fosfatasi alcalina (CIP) 10.000 U/ml	0.5 µl
Exonucleasi I (EXO I) 20.000 U/ml	0.1 µl
Buffer 10X	3.0 µl
bdH ₂ O	11.4 µl

La Mix di reazione viene sottoposta a 37° C per un ora e a 75° C per 75 minuti. Per controllare l'effettiva purificazione della sequenza da analizzare e per determinare il titolo del DNA purificato si esamina l'intensità della banda elettroforetica su gel di agarosio all'1.8%.

Reazione di sequenza

Per la reazione di sequenza viene utilizzato il kit the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) con il seguente protocollo in un volume finale di 20 ul:

Big Dye Terminator	4 µl
--------------------	------

Buffer 5x	2 μ l
Primer (forward o reverse)	1 μ l
DNA + H ₂ O	13 μ l

Il ciclo della PCR di sequenza consiste in :

1 min	a	96 °C	} 25 cicli
10 sec	a	96 °C	
5 sec	a	50 °C	
4 min	a	60 °C	

Seconda purificazione

Per la seconda purificazione viene utilizzato un *kit* commerciale di colonnine filtrate CentriSep spin column™ (Princeton Separations):

- Si idratano le colonnine con 0.8 ml di ddH₂O;
- Si eliminano le eventuali bolle d'aria dalla porzione inferiore del filtro;
- Si compatta la matrice per circa 30 min;
- Si centrifuga a 2300 rpm per 2 min;
- Si sostituisce la *epENDORF* sottostante la colonnina per la raccolta dell'eluato;
- Si carica della PCR al centro della matrice;
- Si centrifuga a 2300rpm per 2 min;
- Si ottiene circa 20 μ l di prodotto nella *epENDORF* sottostante pronti per l'analisi di sequenza.

Un primo livello di analisi prenderà in considerazione i profili genotipici analizzati al locus MYOC al fine di verificare se siano identificabili sottogruppi di pazienti glaucomatosi correlabili con i diversi profili clinici e per verificare la presenza di una differenziale frequenza alleliche e/o genotipica tra i pazienti reclutati e i soggetti di controllo.

In particolare verrà condotto uno studio di associazione. Gli studi di associazione vengono effettuati in genere per testare appunto l'ipotesi che un gene candidato risulti effettivamente coinvolto nella patogenesi della malattia; si confrontano infatti le caratteristiche genetiche dei malati e quelle della popolazione sana. Tali studi si propongono di verificare l'associazione di un determinato allele per la

malattia in esame attraverso l'osservazione di due popolazioni distinte di soggetti: una (casi) caratterizzata dalla presenza della malattia, l'altra (controlli) caratterizzata dalla sua assenza. Qualora un allele mostri una frequenza differente nei casi rispetto ai controlli, ciò è compatibile con la presenza di associazione.

Gli studi di associazione valutano le frequenze di specifici alleli marcatori in 2 gruppi di soggetti all'interno di una popolazione formata da individui che presentano il fenotipo malattia (casi) ed individui sani per la patologia in esame (controlli).

L'ipotesi che sostiene uno studio di associazione è che la presenza di polimorfismi genetici (in particolare gli SNPs) sia correlata all'aumento o alla diminuzione del rischio di sviluppare patologie complesse. Esistono infatti varianti alleliche che hanno un ruolo predisponente alle malattie e che quindi si trovano più frequentemente nella popolazione degli individui affetti rispetto ai controlli sani; al contrario esistono varianti con un ruolo protettivo che sono più frequenti negli individui sani rispetto agli affetti.

Se un determinato allele marcatore viene riscontrato con una frequenza maggiore nei casi rispetto ai controlli, ciò può essere dovuto a tre ragioni principali:

a) la malattia è determinata da un allele localizzato molto vicino ad un allele marcatore, fenomeno conosciuto come linkage disequilibrium.

Il linkage disequilibrium è la tendenza di 2 o più alleli di loci strettamente associati, a trovarsi insieme sullo stesso tratto cromosomico in una popolazione, con una frequenza maggiore rispetto a quella attesa sulla base delle singole frequenze alleliche.

L'osservazione che l'allele malattia è in disequilibrium con l'allele marcatore consente di restringere notevolmente (diversamente da quanto avviene nel linkage) la regione entro la quale ricercare il gene causativo.

Il linkage infatti prende vantaggio dalla ricombinazione all'interno di una famiglia, il linkage disequilibrium invece prende vantaggio da molti eventi di ricombinazione che accadono storicamente all'interno di una popolazione. Questa è la ragione per la quale il linkage ha una risoluzione di 10-20 cM mentre l'associazione con approccio tramite linkage disequilibrium ha una maggior risoluzione (0.1-0.2 cM) [Kruglyak, 1999].

b) Stratificazione della popolazione: la popolazione contiene sottogruppi geneticamente distinti che mostrano diverse frequenze dell'allele esaminato.

c) Reazione diretta causa-effetto: l'allele marcatore è effettivamente l'allele di suscettibilità e predispone alla malattia. Il grafico in figura 12 mostra come varianti geniche frequenti (come gli alleli di suscettibilità alle malattie complesse) in una determinata popolazione presentino una penetranza minore

rispetto alle mutazioni rare delle malattie monogeniche.

Il classico studio caso-controllo confronta la frequenza di un allele, o di un genotipo, in un campione di persone non imparentate tra loro, e la frequenza del medesimo allele in un campione di controlli sani.

Le difficoltà riscontrate in uno studio di associazione, soprattutto per quanto concerne la riproducibilità dei risultati ottenuti, derivano dalle differenze tra le popolazioni in esame, dalla disomogeneità dei metodi utilizzati nella definizione del fenotipo e dall'eterogeneità genetica della patologia in esame.

Se le popolazioni dei casi e dei controlli sono caratterizzate da un background genetico differente (nei campioni è rappresentata più di una popolazione) le differenze nelle frequenze alleliche dello SNP in esame non sono il risultato di una relazione causale con la malattia.

Questo fenomeno, conosciuto come stratificazione, è responsabile della maggior parte dei fallimenti di riproducibilità degli studi caso-controllo e deve essere attentamente valutato prima di condurre gli esperimenti.

Ne deriva che la non riproducibilità di un risultato non è definitiva e non esclude categoricamente il coinvolgimento di un gene o un locus nella patogenesi della malattia, ma deve stimolare ulteriori ricerche con approcci alternativi o con metodi più rigorosi basati ad esempio sull'analisi di una casistica più ampia.

La designazione di una regione di suscettibilità ad una patologia complessa permette quindi di intraprendere uno studio di associazione. Il metodo statistico del χ^2 permette di stabilire se esiste un'associazione preferenziale di uno degli alleli del polimorfismo con la malattia, oppure se le frequenze di distribuzione degli alleli non si discostano significativamente da quelle.

Il nostro studio si è proposto di determinare le frequenze alleliche e genotipiche di una particolare variazione di sequenza localizzata nella regione promoter del gene Myoc; i dati riportati in letteratura (vedi introduzione) suggeriscono che la presenza del polimorfismo biallelico(C/G) nei casi di glaucoma primario ad angolo aperto correla con una progressione più rapida della neuropatia ottica e con un fenotipo più severo, che si manifesta come deterioramento del campo visivo o danno a carico della testa del nervo ottico.

La nostra analisi è stata condotta sia su pazienti affetti da glaucoma primario ad angolo aperto(POAG) sia su pazienti affetti da sindrome da dispersione di pigmento e glaucoma pigmentario; i dati sono poi stati confrontati con quelli della popolazione sana di controllo.

Analisi Statistica

- Statistica descrittiva (media e deviazione standard)
- Test di Kruskal-Wallis
- Test del X^2
- Regressione logistica: permette di stabilire la relazione tra una variabile dipendente dicotomica e una o più variabili indipendenti; è un test statistico che consente di analizzare problemi in cui sono presenti una o più variabili indipendenti che determinano un effetto (outcome). L'effetto è misurato come una variabile dicotomica. L'obiettivo della regressione logistica è trovare il modello più idoneo a descrivere la relazione tra la caratteristica dicotomica d'interesse e un insieme di variabili indipendenti.

Risultati

Risultati biometrici/funzionali

È stata analizzata una casistica comprendente 59 pazienti affetti da PDS/PG e 28 soggetti sani, scelti come popolazione di controllo. I risultati dell'indagine sono di seguito riportati.

Il confronto dei valori medi relativi alla lunghezza assiale del bulbo (AxL) tra i due gruppi ha mostrato una differenza significativa ($p=0,038$), i casi presentano un valore di AxL maggiore rispetto ai controlli

Il cristallino è risultato essere significativamente più spesso nei soggetti affetti rispetto alla popolazione di controllo ($p=0,01$)

Il rapporto tra profondità della camera vitrea e lunghezza assiale del bulbo (VCD/AxL ratio) si è dimostrato significativamente differente nei casi rispetto ai controlli

Non sono state riscontrate differenze significative nei due gruppi relativamente alle altre caratteristiche biometriche prese in esame e cioè spessore corneale (CCT), profondità della camera anteriore (ACD), rapporto camera anteriore/lunghezza assiale (ACD/AxL ratio), Profondità camera vitrea (VCD), e refrazione.

Come atteso, sono risultate statisticamente significative le differenze riguardo i parametri funzionali osservate nei casi rispetto ai controlli:

HFA_MD $p=0,005$

HFA_PSD $p=0,002$

Matrix_MD $p=0,01$

Matrix_PSD $p=0,001$

NFI(GDx) $p=0,01$

IOP $p=0,001$

	Controlli			Casi (PDS+PG)			
	Total	Mean	St.dev	Total	Mean	St.dev	p
Age	28	29,36	5	59	49,12	13,27	0,08
CCT	28	538,4	33,61	59	543,4	38,82	0,6
AxL	28	24,33	1,27	59	25,06	1,6	0,038
Lens	28	3,76	0,27	59	4,26	0,48	0,01
Sphere	28	-2,57		59	-3,35	3,66	0,3
HFA_MD	28	-1,66	1,24	59	-4,46	6,9	0,005
HFA_PSD	28	1,58	0,94	59	3,02	3,11	0,002
Matrix_MD	28	-0,24	2,9	59	-4,91	6,73	0,001
Matrix_PSD	28	2,63	0,63	59	3,5	1,63	0,001
NFI	28	15,82	6,82	59	30,65	21,31	0,001
VCD	28	16,98	1,26	59	17,22	1,55	0,50
ACD	28	3,59	0,28	59	3,59	0,42	0,9
VCD/AxL	28	0,7	0,02	59	0,69	0,02	0,015
ACD/AxL	28	0,15	0,01	59	0,14	0,01	0,2

Sono state prese in considerazione le eventuali differenze presenti tra soggetti affetti da sindrome da dispersione di pigmento e quelli affetti da glaucoma pigmentario (la forma conclamata della malattia).

L'analisi dei dati biometrici non ha evidenziato differenze significativamente statistiche nei due gruppi (PDS versus PG)

Differenze significativamente statistiche sono state riscontrate nei parametri funzionali dei soggetti affetti dalla forma glaucomatosa rispetto a quelli affetti da dispersione di pigmento:

HFA_MD $p=0,027$

Matrix_MD $p=0,045$

NFI(GDx) $p=0,034$

	Casi				
	PDS		PG		
	Mean	St.dev.	Mean	St.dev.	p
Age	48,5	13,91	49,49	13,05	0,8
CCT	544,14	35,46	542,97	41,42	0,9
AxL	25	1,91	25,1	1,43	0,8
Lens	4,23	0,49	4,27	0,48	0,8
Sphere	-2,91	4,27	-3,61	3,27	0,5
HFA_MD	-2,26	2,83	-5,68	8,14	0,027
HFA_PSD	2,11	1,7	3,54	3,6	0,1
Matrix_MD	-2,78	4,63	-6,21	7,5	0,045
Matrix_PSD	3,18	1,07	3,7	1,88	0,2
NFI	23,11	16,37	35,13	22,84	0,05
VCD	17,11	1,73	17,28	1,46	0,7
ACD	3,65	0,38	3,55	0,44	0,3
VCD/AxL	0,68	0,02	0,69	0,03	0,5
ACD/AxL	0,15	0,01	0,14	0,01	0,2

L'analisi dei dati clinici ha dimostrato che:

non ci sono differenze tra PDS e PG nell'incidenza di concavità iridea e difetti di transilluminazione iridea

	Casi		
Concavità iridea	PG	PDS	p
Nessuna	65,50%	34,50%	0,6
Moderata	53,30%	46,70%	0,6
Definita	69,20%	30,80%	0,9

	Casi		
Transilluminazione	PG	PDS	p
Nessuna	57,50%	42,50%	0,3
Moderata	78,60%	21,40%	0,3
Definita	60%	40%	0,4

la severità della pigmentazione del trabecolato è simile tra PDS e PG

	Casi		
TMP	PG	PDS	p
Lieve	40%	60%	0,3
Moderata	68,40%	31,60%	0,3
Densa	66,70%	33,30%	0,3

la severità della pigmentazione trabecolare non incrementa con l'età nei casi PDS/PG

non è stata dimostrata alcuna relazione statisticamente significativa tra il grado di pigmentazione trabecolare e la presenza di concavità iridea

	PG		PDS	
	Rho	p	Rho	p
TMP/Concavità	0,24	0,3	0,18	0,2

I segni clinici di malattia sono stati messi in relazione con i dati biometrici e funzionali mediante il Kruskal-Wallis Test.

Un grado severo di pigmentazione trabecolare si è dimostrato significativamente associato con un danno funzionale maggiore (Matrix_MD $p=0,038$)

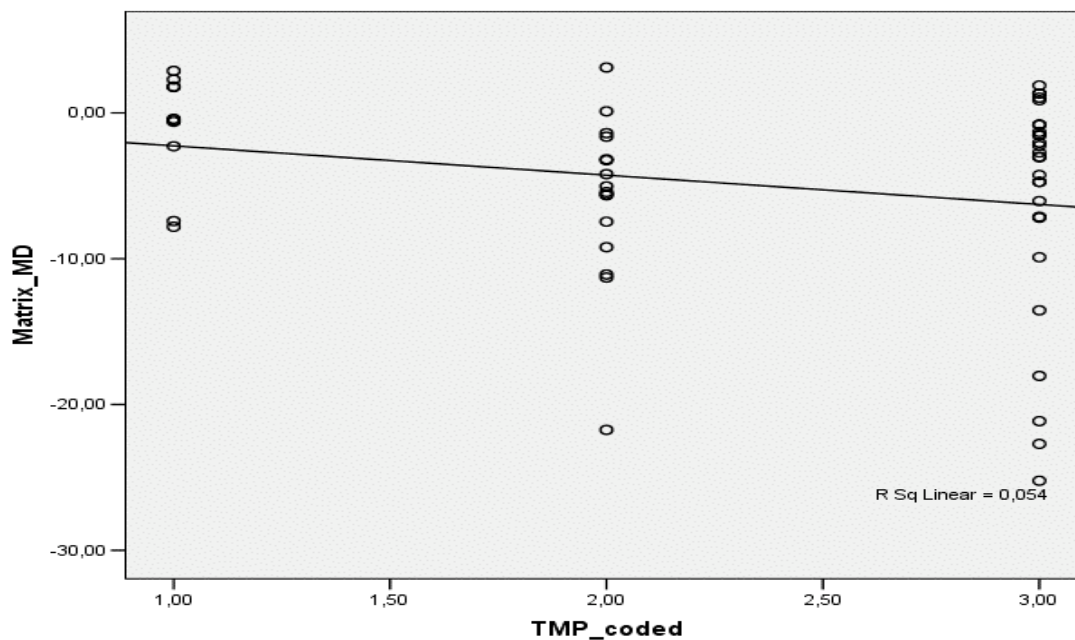
KRUSKAL-WALLIS by TMP:

Test Statistics^{a,b}

	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
Age	2,583	2	,275
AXL	1,995	2	,369
ACD	2,402	2	,301
LENS	1,451	2	,484
KAv	,537	2	,764
Sphere	,364	2	,834
C_D	5,118	2	,077
HFA_MD	3,319	2	,190
HFA_PSD	1,411	2	,494
Matrix_MD	6,525	2	,038
Matrix_PSD	3,838	2	,147
TSNIT_Av	1,041	2	,594
SUP	,345	2	,842
INF	1,806	2	,405
NFI	2,710	2	,258
Vitreus_Chamber_depth	2,670	2	,263
VCD_AxL	2,252	2	,324
ACD_AxL	3,742	2	,154

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TMP_coded



Un grado marcato di concavità iridea è associato in maniera statisticamente significativa ad uno spessore ridotto del cristallino ($p=0,045$). La relazione è maggiormente evidente tra grado marcato di concavità versus grado moderato piuttosto che grado marcato versus assenza di concavità

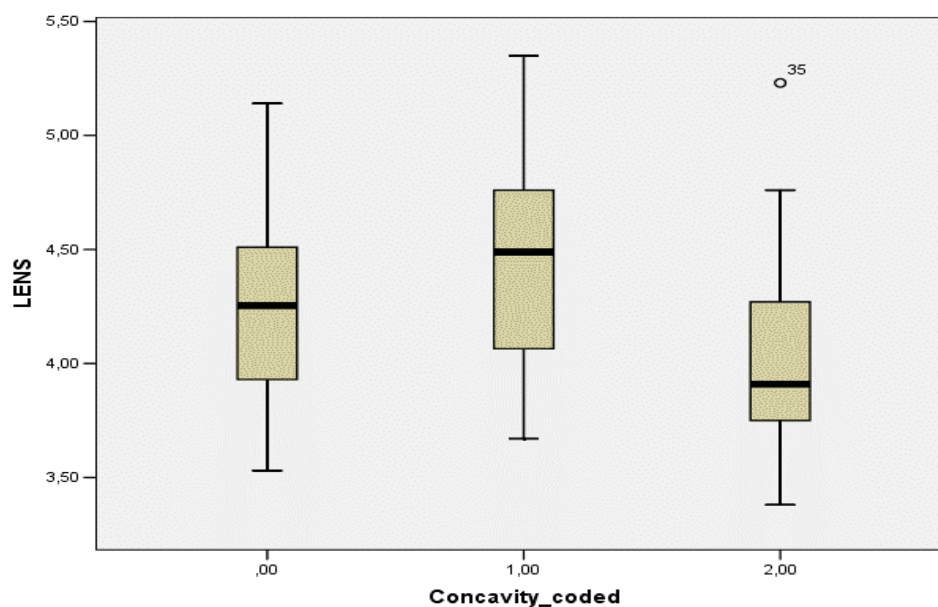
KRUSKAL-WALLIS by CONCAVITA'

Test Statistics^{a,b}

	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
Age	11,408	2	,003
AXL	3,312	2	,191
ACD	2,649	2	,266
LENS	6,224	2	,045
KAv	1,437	2	,488
Sphere	1,195	2	,550
C_D	,122	2	,941
HFA_MD	8,121	2	,017
HFA_PSD	3,115	2	,211
Matrix_MD	1,978	2	,372
Matrix_PSD	3,241	2	,198
TSNIT_Av	,875	2	,646
SUP	1,843	2	,398
INF	1,946	2	,378
NFI	2,181	2	,336
Vitreus_Chamber_depth	3,097	2	,213
VCD_AxL	4,297	2	,117
ACD_AxL	,740	2	,691

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Concavity_coded



Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra la presenza del fuso di krukenberg e i difetti di transilluminazione iridea rispetto ai parametri biometrico/funzionali presi in esame.

KRUSKAL-WALLIS by FUSO

Test Statistics^{a,b}

	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
Age	,911	2	,634
AXL	1,559	2	,459
ACD	2,547	2	,280
LENS	,269	2	,874
KAv	1,251	2	,535
Sphere	,338	2	,845
C_D	,244	2	,885
HFA_MD	5,212	2	,074
HFA_PSD	2,252	2	,324
Matrix_MD	2,570	2	,277
Matrix_PSD	1,532	2	,465
TSNIT_Av	,135	2	,935
SUP	1,831	2	,400
INF	1,225	2	,542
NFI	,138	2	,933
Vitreus_Chamber_depth	,989	2	,610
VCD_AxL	,567	2	,753
ACD_AxL	1,655	2	,437

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Krukenmberg_coded

KRUSKAL-WALLIS by TRANSILLUMINAZIONE

Test Statistics^{a,b}

	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
Age	,911	2	,634
AXL	1,559	2	,459
ACD	2,547	2	,280
LENS	,269	2	,874
KAv	1,251	2	,535
Sphere	,338	2	,845
C_D	,244	2	,885
HFA_MD	5,212	2	,074
HFA_PSD	2,252	2	,324
Matrix_MD	2,570	2	,277
Matrix_PSD	1,532	2	,465
TSNIT_Av	,135	2	,935
SUP	1,831	2	,400
INF	1,225	2	,542
NFI	,138	2	,933
Vitreus_Chamber_depth	,989	2	,610
VCD_AxL	,567	2	,753
ACD_AxL	1,655	2	,437

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Krukenmberg_coded

Regressione logistica

La relazione tra la presenza della patologia e la **lunghezza assiale del bulbo AxL** è risultata statisticamente significativa ($p=0,042$), come mostrato nella tabella seguente.

Logistic regression

Dependent Y	Factor_diagnosi
-------------	-----------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std.Error	P
AXL	0,3704	0,1826	0,04255
Constant	-8,4107		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
AXL	1,4483	1,0125 to 2,0716

Classification table

È stata altresì dimostrata una relazione statisticamente significativa tra la presenza della patologia e lo **spessore del cristallino** ($p=0,01$)

Logistic regression

Dependent Y	Factor_diagnosi
-------------	-----------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std.Error	P
LENS	3,6094	0,9211	0,00008911
Constant	-13,5903		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
LENS	36,9437	6,0741 to 224,6964

Classification table

L'analisi statistica non ha evidenziato una relazione significativa tra la presenza del fenotipo malattia e le

due variabili indipendenti **ACD** e **VCD**, come riportato di seguito

Logistic regression

Dependent Y	Factor_diagnosi
-------------	-----------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std.Error	P
ACD	-0,04774	0,6127	0,9379
Constant	0,8997		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
ACD	0,9534	0,2869 to 3,1684

Classification table

Logistic regression

Dependent Y	Factor_diagnosi
-------------	-----------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std.Error	P
Vitreus_Chamber_depth	0,1151	0,1640	0,4829
Constant	-1,2393		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
Vitreus_Chamber_depth	1,1220	0,8135 to 1,5474

Classification table

Analisi Genetica

Tipizzazione genetica della casistica per lo SNP mt(-1000C/G)

L'analisi genetica condotta è stata volta alla tipizzazione del polimorfismo biallelico C/G localizzato nella regione del promotore del gene *Myoc*.

Sono stati analizzati 59 campioni ematici provenienti da pazienti affetti da sindrome da dispersione di pigmento e/o glaucoma pigmentario, 177 campioni provenienti da pazienti affetti da glaucoma primario ad angolo aperto (POAG) e 125 campioni provenienti da soggetti sani, scelti come popolazione di controllo.

I risultati dell'indagine genetica hanno dimostrato che nei 59 casi di PDS/PG, la frequenza dell'allele G è risultata essere del 0.06 compatibile con una frequenza del genotipo C/G di 0.12;

nei 177 casi di POAG la frequenza dell'allele G è risultata essere dello 0.07 compatibile con una frequenza del genotipo C/G di 0.14; nei 125 controlli la frequenza dell'allele G è risultata essere dello 0.116 compatibile con una frequenza del genotipo C/G di 0.23, come riportato nella seguente tabella.

Tabella 1. Frequenze alleliche e genotipiche dello SNP mt(-1000 C/G) in PDS/PG, in POAG, in controlli sani

	Glaucoma pigmentario	POAG	Controlli
C/C	52	152	96
C/G	7	25	29
totale	59	177	125
Frequenza allelica	6%	7,0%	11,6%
Frequenza genotipica	12%	14,0%	23,2%

Test del χ^2

Tabella di contingenza

	Dati genotipo Myoc-glaucoma pigmentario		
	A	B	
1	7 C/G	29 C/G	36
2	52 C/C	96 C/C	148
Tot.	59	125	184
	Risultati		
	A	B	
1	11,05	24,50	
2	47,5	101	

$$\chi^2=3.27$$

gradi di libertà=1

probabilità=0.070

	Dati genotipo Myoc-POAG		
	A	B	
1	25 C/G	29 C/G	54
2	152 C/C	96 C/C	248
Tot.	177	125	302
	Risultati		
	A	B	
1	31,60	22,40	
2	145	103	

$$\chi^2=4.11$$

gradi di libertà=1

probabilità= 0.043

Odds Ratio

L'Odds Ratio costituisce una misura della forza di associazione statistica tra fattore di rischio e malattia presa in esame; la sua interpretazione è la stessa del Rischio Relativo (RR) ma si ritiene più opportuno utilizzare tale calcolo nel caso di malattie rare nella popolazione, quale risulta appunto essere il glaucoma.

$$\text{Odds Ratio (o rapporto crociato)} = a/b / c/d = a \times d / b \times c$$

dove $a = \text{malati esposti}$

$b = \text{non malati esposti}$

$c = \text{malati non esposti}$

$d = \text{non malati non esposti}$

Glaucoma pigmentario OR=0,44 C.I. (0,17-1,05)

POAG OR=0,54 C.I. (0,17-0,91)

Polimorfismo Myoc mt1 (-1000 C/G): Regressione logistica

I risultati della regressione logistica dimostrano come non esista una relazione statisticamente significativa tra la presenza del fenotipo glaucomatoso e il polimorfismo al locus *MYOC*, come riportato in tabella

Logistic regression

Dependent Y	Factor_diagnosi
-------------	-----------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std. Error	P
MYOC_Coded	-0,9067	0,7788	0,2443
Constant	1,7540		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
MYOC_Coded	0,4038	0,0878 to 1,8584

Classification table

La presenza del polimorfismo biallelico al locus *MYOC* non influenza in maniera statisticamente significativa nessuna delle variabili considerate: concavità iridea, fuso di krkenberg, pigmentazione trabecolare, difetti di transilluminazione, come riportato di seguito

Logistic regression

Dependent Y	Concavity_dicothomus
-------------	----------------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std.Error	P
MYOC_Coded	-1,4633	1,1520	0,2040
Constant	0,07696		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
MYOC_Coded	0,2315	0,0242 to 2,2136

Classification table

Logistic regression

Dependent Y	Krukenmberg_coded
-------------	-------------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std.Error	P
MYOC_Coded	-0,6523	0,9704	0,5014
Constant	1,5686		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
MYOC_Coded	0,5208	0,0777 to 3,4891

Classification table

Regression

Dependent Y	TMP_coded
Independent X	MYOC_Coded
Coefficient of determination R ²	0,0006784
Residual standard deviation	0,7632

Regression Equation

$y = 2,3462 + -0,06044 x$				
Parameter	Coefficient	Std.Error	T-value	P
Intercept	2,3462	0,1058	22,1687	<0,0001
Slope	-0,06044	0,3073	-0,1967	0,8448

Analysis of Variance

Logistic regression

Dependent Y	Transill_dicothomus
-------------	---------------------

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std.Error	P
MYOC_Coded	0,5232	0,8207	0,5238
Constant	-0,8109		

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds Ratio	95% CI
MYOC_Coded	1,6875	0,3378 to 8,4308

Classification table

I soggetti affetti che presentano il polimorfismo biallelico C/G mostrano in maniera statisticamente significativa ($p=0,03$) un fuso di krukenberg meno marcato rispetto ai soggetti con polimorfismo in omozigosi C/C

Sequenziamento gene LOXL1

Il sequenziamento dell'intero gene non ha dimostrato alcuna associazione statisticamente significativa per quanto riguarda le frequenze alleliche degli SNPs intronici ed esonici nella casistica da noi studiata; le frequenze alleliche risultano essere conformi all'atteso nella nostra popolazione in esame.

Si conferma il dato degli altri studi circa la mancanza di correlazione tra polimorfismi del LOXL1 e POAG, trattandosi infatti di entità nosologiche a differente patogenesi; anche nella popolazione di glaucomi pigmentari non sembra essere presente una associazione statisticamente significativa con gli aplotipi di rischio a carico della porzione intronica e dell'esone 1 del gene.

L'analisi di sequenza da noi condotta ha tuttavia consentito di identificare un interessante SNPs, rs 2304722 C/T, localizzato nell'esone 6 del gene; l'allele C di tale variazione di sequenza sembra presentare una frequenza significativa diversa rispetto all'atteso solo nei casi di glaucoma pigmentario e non nelle altre due popolazioni in esame, POAG e controlli sani.

LOXL1 Campioni Pigmentario

Posizione	SNP	Variazione	Frequenze genotipiche	Frequenze alleliche	Frequenze Hap-Map	Hardy Weinberg
Introne	rs2165241	C/T	C/C = 0.27 C/T = 0.47 T/T = 0.26	C = 0.51 T = 0.49	C=0.392 T=0.608	ok
Esone 6	rs2304722	C/T	C/C = 0.01 C/T = 0.16 T/T = 0.82	C= 0.096 T= 0.904	C=0.205 T=0.795	ok

LOXL1 Campioni di controllo

Posizione	SNP	Variazione	Frequenze genotipiche	Frequenze alleliche	Frequenze Hap-Map	Hardy Weinberg
Introne	rs2165241	C/T	C/C = 0.26 C/T = 0.48 T/T = 0.26	C = 0.5 T = 0.5	C=0.392 T=0.608	ok
Esone 6	rs2304722	C/T	C/C = 0.04 C/T = 0.38 T/T = 0.58	C= 0.23 T= 0.77	C=0.205 T=0.795	ok

LOXL1 campioni POAG

Posizione	Nome SNP	Variazione	Frequenze genotipiche	Frequenze alleliche	Frequenze Hap-Map	Hardy Weinberg
Introne	rs2165241	C/T	C/C 1 = 0.30 C/T = 0.56 T/T = 0.14	C = 0.58 T = 0.42	C=0.392 T=0.608	ok
Esone 6	rs2304722	C/T	C/C = 0.06 C/T = 0.43 T/T = 0.51	C= 0.28 T= 0.72	C=0.205 T=0.795	ok

Discussione e Conclusioni

Lo studio trasversale da noi condotto, relativamente agli obiettivi proposti e all'analisi dei risultati statistici ottenuti, ha dimostrato la presenza di alcune differenze circa i parametri biometrici presi in esame tra la popolazione affetta e quella di controllo. L'interpretazione di tali dati potrebbe fornire un ulteriore supporto circa il meccanismo patogenetico, per altro non ancora ben chiaro, che sottende la patologia in esame.

L'analisi statistica ha evidenziato una maggiore lunghezza assiale del bulbo negli occhi dei soggetti affetti confrontata con la popolazione di controllo e ciò è in accordo con la già nota incidenza di miopia nei casi. Il 60-80% dei pazienti affetti da PDS/PG sono miopi e solo il 20% sono emmetropi (+/- 1 D) (Sugar, 1966). Un vizio refrattivo miopico può essere considerato come predittore di contatto irido-lenticolare, anche indipendentemente dalla presenza di PDS/PG. L'allungamento e l'allargamento tipici dell'occhio miopico fanno sì che l'iride, e soprattutto la sua porzione periferica, disponga di uno spazio maggiore e quindi possa incurvarsi posteriormente, incrementando la frizione irido-zonulare e la liberazione di pigmento che sono alla base della patogenesi della malattia. Questa differenza anatomica legata alla maggiore concavità della porzione dell'iride, con conseguente maggiore liberazione di pigmento, causa l'aumento di pressione oculare in camera anteriore. Si determina così progressivamente un'inversione del rapporto pressorio tra camera anteriore e camera posteriore (blocco pupillare inverso) che tende ad amplificare il contatto tra iride e zonula con l'instaurarsi perciò di un circolo vizioso.

La miopia inoltre potrebbe aumentare l'espressione fenotipica delle anomalie genetiche descritte nei casi di PDS/PG. La lunghezza assiale del bulbo potrebbe quindi correlare con la presenza della patologia.

La relazione significativa trovata tra il grado di pigmentazione trabecolare e il danno funzionale evidenziato con il Matrix può trovare una spiegazione se si considerano i peculiari cambiamenti istomorfologici che si verificano nel meshwork trabecolare dei soggetti affetti da PDS/PG. I granuli di pigmento si ritrovano numerosi all'interno delle cellule trabecolari e non sono rinvenuti invece negli spazi intertrabecolari o cribriformi. In molte regioni lungo l'intera circonferenza dell'angolo irido-corneale sono stati osservati perdita di cellule trabecolari e di spazi intertrabecolari, fusione di lamelle e un incremento di materiale extracellulare sotto lo strato interno dei canali (Gottanka J, 2006). Tali cambiamenti sono responsabili del collasso delle strutture trabecolari e della obliterazione delle vie di drenaggio, con sviluppo di una incrementata pressione intraoculare. L'insulto continuo a carico del nervo ottico e la sofferenza innescata si rifletterebbero nella alterazione funzionale precoce evidenziata al Matrix.

Un dato interessante che è emerso consiste nella mancata relazione tra presenza di concavità iridea e

grado di pigmentazione trabecolare. Ciò lascia intuire come la liberazione del pigmento sia ascrivibile non solo alla caratteristica conformazione concava dell'iride ma ad altri meccanismi fino a questo momento ancora sconosciuti, verosimilmente di tipo genetico.

Tuttavia è stato altresì dimostrato come la presenza della concavità iridea si associ ad una maggiore lunghezza assiale del bulbo e alla alterazione di parametri di danno funzionale, a conferma della sua importanza patogenetica.

Per quanto riguarda le due sottopopolazioni di casi, PDS versus PG, non è stata rilevata alcuna differenza circa i parametri biometrici e i segni clinici considerati; come ci si aspettava l'unica differenza consiste nella presenza di alterazioni di tipo funzionale nei soggetti con la forma conclamata della malattia rispetto a quelli che presentano la sola dispersione di pigmento.

Analizzati i dati clinici e biometrici, abbiamo sentito l'esigenza di approfondire un altro aspetto di questa entità unica, quale è appunto il glaucoma pigmentario. A tal fine, si è cercato di stabilire una correlazione tra fenotipo e genotipo attraverso lo studio del gene *Myoc*, e in particolare del polimorfismo biallelico C/G.

Il gene *myoc* (locus *GLC1A*) situato sul cromosoma 1q23-q25, è stato il primo gene associato al glaucoma primario ad angolo aperto. E' stato suggerito che il prodotto del *Myoc* possa essere responsabile di un aumento della pressione intraoculare attraverso una ostruzione del deflusso dell'umore acqueo.

Il presente studio è stato disegnato per determinare la prevalenza del polimorfismo del promoter mt1 (-1000 C/G) del *Myoc* nel glaucoma pigmentario/sindrome da dispersione pigmentaria e nel glaucoma primario ad angolo aperto nella popolazione italiana. Tale polimorfismo biallelico si colloca nella regione cromosomica corrispondente al promotore del gene *myoc* ed ha una prevalenza di circa il 15% nella popolazione generale.

I risultati del presente studio hanno permesso di rilevare nella popolazione esaminata una frequenza del polimorfismo C/G nel 14% nei pazienti affetti da glaucoma primario ad angolo aperto e del 23% nei soggetti di controllo sani, indicando l'assenza di differenze significative nella distribuzioni di questi alleli nella popolazione da noi presa in esame. Questi risultati sono in accordo sia con quanto precedentemente osservato da Alward e collaboratori che hanno riscontrato una frequenza di circa il 14.2% e 22.5%, sia con quanto precedentemente osservato da Colomb e collaboratori che hanno osservato una frequenza del 17.6% e 16% rispettivamente nel glaucoma primario ad angolo aperto e nei soggetti sani.

Il gene *myoc* codifica per una proteina secretoria, la miocillina, un membro della famiglia delle proteine della matrice extracellulare contenenti il dominio dell'olfactomedina. Il ruolo fisiologico della miocillina ed il ruolo delle sue varianti nella patogenesi della malattia glaucomatosa non sono ancora stati

caratterizzati; non è chiaro se un aumento dell'espressione del *Myoc* è responsabile dell'aumento della pressione intraoculare o se l'aumento dell'espressione del *Myoc* è secondariamente indotto dallo stress causato dall'aumento della pressione intraoculare legato ad altri meccanismi di danno tissutale. Sono state avanzate diverse ipotesi sulle possibili correlazioni tra mutazioni del gene *myoc* e sviluppo del glaucoma. Liu e Vollrath (2004) hanno osservato che forme di miocillina mutanti vanno incontro ad errori di ripiegamento, hanno un'elevata tendenza all'aggregazione e all'accumulo in grandi aggregati a livello del reticolo endoplasmatico in cellule differenziate di trabecolato sclero-corneale umano, suggerendo che le forme di glaucoma associate a mutazioni della miocillina possano essere classificate come malattie da accumulo del reticolo endoplasmatico, caratterizzate da una cascata di eventi in cui l'espressione cronica della miocillina mal ripiegata e non secreta dalla cellula conduce alla morte della cellula trabecolare e in ultima analisi allo sviluppo del fenotipo glaucomatoso.

Alcuni autori hanno osservato un'associazione tra il polimorfismo mt1 del *Myoc* e una predisposizione ad una minore risposta individuale alla terapia ipotonizzante oculare associato ad un decorso più rapido ed aggressivo della patologia glaucomatosa. Questa variabile non è stata tuttavia analizzata nel presente studio per diverse ragioni. In prima istanza per l'elevato livello di incertezza nella sua quantificazione clinica. Infatti la scarsa risposta alla terapia viene calcolata come differenza tra pressione intraoculare in trattamento e pressione intraoculare alla diagnosi che, nella maggior parte dei casi, è soggetta ad un grande margine di inaccuratezza, essendo riferita dal paziente al momento dell'anamnesi e non direttamente misurabile. Inoltre la differenza tra pressione alla diagnosi e pressione in terapia è legata al tipo di trattamento a cui è stato sottoposto il singolo paziente, e avrebbe un significato solo se i pazienti venissero osservati in studi prospettici all'interno di un protocollo terapeutico rigidamente definito.

Il nostro studio, per la prima volta in letteratura, si è proposto di determinare la prevalenza del polimorfismo biallelico C/G in una popolazione di soggetti affetti da forme glaucomatose differenti dal glaucoma primario ad angolo aperto; la sindrome da dispersione pigmentaria e il glaucoma pigmentario ne sono un eccellente esempio.

L'esigenza di indirizzare e approfondire la ricerca in tale direzione nasce per le ragioni di seguito riportate: da un lato, i dati presenti in letteratura si esprimono in termini di polimorfismo mt1 quale marcatore di scarso controllo della pressione intraoculare e di danni più gravi a livello del disco ottico e del campo visivo; dall'altro, i pazienti affetti dal fenotipo pigmentario solitamente mostrano un andamento alquanto instabile dei valori pressori, esibendo più alti livelli e maggiori fluttuazioni della IOP rispetto al POAG in un contesto di danno avanzato già alla diagnosi di malattia.

I risultati dell'indagine genetica sembrano tuttavia non evidenziare alcuna relazione in tal senso; è stata rilevata una frequenza del polimorfismo C/G pari al 12% nei pazienti affetti da PG a fronte di una già citata frequenza del 23% nei controlli sani.

L'assenza di una distribuzione significativa e preferenziale degli alleli nella popolazione dei pazienti con

PG porta ad affermare che la variante mt1 non sembra influenzare né lo sviluppo del fenotipo pigmentario né il decorso clinico della malattia. .

Il glaucoma pigmentario presenta inoltre alcune somiglianze patogenetiche ed epidemiologiche con un'altra forma di glaucoma, il glaucoma pseudoesfoliativo.

Sebbene si tratti indubbiamente di entità diverse per eziologia ed aspetto clinico, talvolta le due forme si manifestano clinicamente in forma combinata, tanto da aver indotto Ritch e coll. a sviluppare il concetto di “overlap syndrome”: lo sviluppo di una delle due forme in paziente già affetto dall'altra rappresenta un ulteriore fattore di rischio destinato ad aggravare decorso e prognosi della sottostante patologia glaucomatosa.

Col termine di *Sindrome Pseudoesfoliativa* (PEX) si è soliti far riferimento ad un disordine sistemico, legato all'età, della matrice extracellulare, caratterizzato dalla produzione multifocale e dal progressivo accumulo di materiale fibrillare in vari tessuti dell'organismo intra ed extra oculari, quale risultato di una eccessiva produzione, di una insufficiente degradazione o di entrambi. La presenza di sindrome pseudoesfoliativa associata a ipertono ed alterazioni campimetriche o morfologiche a carico del nervo ottico configura il quadro di *Glaucoma Pseudoesfoliativo* (PEXG).

Il gene LOXL1, localizzato sul cromosoma 15 (15q24-q25), sembra conferire suscettibilità allo sviluppo del fenotipo esfoliativo, in quanto implicato nella formazione del tessuto elastico e collagene e nell'omeostasi della matrice extracellulare; inoltre, LOXL1 è espresso a livello di numerosi tessuti oculari, come la lamina cribrosa, l'epitelio lenticolare, la cornea, il muscolo ciliare, e il trabecolato, tutti tessuti coinvolti nella produzione di matrice extracellulare anomala.

Il prodotto del gene LOXL1 è un membro della famiglia delle lisil-ossidasi, enzimi che catalizzano la deaminazione ossidativa dei residui di lisina della tropoelastina e il relativo cross-linking tra le varie molecole.

Il gene è costituito da una porzione intronica e da sette esoni, cinque dei quali (2-6) sono altamente conservati e codificano per l'estremità carbossi-terminale del prodotto genico, che contiene il dominio catalitico dell'enzima e che è essenziale per l'interazione con la tropoelastina e con la fibulina; l'esone 1 codifica per il pro-peptide LOXL1 che necessita di clivaggio per permettere l'attivazione catalitica dell'enzima.

I primi studi di genotipizzazione sono stati condotti in maniera indipendente da Stefansson (Reykjavik) e da Jonasson su popolazioni svedesi e islandesi affette da PEX, PEXG, e POAG; sono stati identificati uno SNP intronico, rs 2165241, e due SNP nonsinonimi (codificanti cioè per peptidi diversi) nell'esone 1, rispettivamente rs 1048661 e rs 3825942, che sono in linkage disequilibrium, ossia hanno la tendenza a trovarsi insieme, con una frequenza maggiore, rispetto a quanto atteso casualmente,.

Per quanto riguarda l'esone 1, sono stati studiati tre aplotipi derivanti dai polimorfismi: G-A, G-G, T-G ed è stato dimostrato che, mentre G-A ha un bassissimo rischio di associazione alla patologia, e T-G un

rischio intermedio, l'omozigosi G-G ha il maggior rischio di associazione, addirittura 700 volte rispetto alle persone portanti le variazioni a basso rischio; inoltre, l'allele T dello SNP intronico rs 2165241 è fortemente associato alla presenza di omozigosi G-G.

In Islanda e in Svezia l'aplotipo ad alto rischio è molto comune, con una frequenza media di circa il 50%.

I dati inerenti l'importanza dell'aplotipo G-G sono in accordo con i risultati raggiunti da altri studi che hanno preso in esame la popolazione americana e italiana. In tutti questi casi, non è stata messa in evidenza una pari associazione dell'aplotipo di alto rischio con il glaucoma primario ad angolo aperto. Alla luce di ciò, si tende a considerare tale disordine quale microfibrillogenia elastica stress-indotta, riconducibile ad una eccessiva produzione ed abnorme aggregazione di microfibrille elastiche, prodotte da diversi tipi cellulari capaci di esprimere un fenotipo potenzialmente elastogenico.

I vari autori concordano nell'affermare che la determinazione sistematica dello specifico aplotipo del LOXL1 potrebbe consentire un nuovo tipo di analisi ossia un'analisi di rischio, permettendo così la stratificazione dei pazienti in adeguate categorie (ad alto o basso rischio) ai fini di un più corretto management clinico/terapeutico.

Sull'onda di queste recenti scoperte, abbiamo voluto sequenziare lo stesso gene non solo su campioni di soggetti affetti da POAG, per confermare i risultati degli altri studi, ma anche, e per la prima volta, su quelli affetti da glaucoma pigmentario; un primo livello di analisi prenderà in considerazione i profili genotipici per verificare la presenza di una differenziale frequenza allelica e/o genotipica tra i pazienti reclutati e i soggetti di controllo.

Il sequenziamento dell'intero gene da noi condotto non ha dimostrato alcuna associazione statisticamente significativa per quanto riguarda le frequenze alleliche degli SNPs intronici ed esonici nella casistica da noi studiata; le frequenze alleliche risultano essere conformi all'atteso nella nostra popolazione in esame.

Si conferma il dato degli altri studi circa la mancanza di correlazione tra polimorfismi del LOXL1 e POAG, trattandosi infatti di entità nosologiche a differente patogenesi; anche nella popolazione di glaucomi pigmentari non sembra essere presente una associazione statisticamente significativa con gli aplotipi di rischio citati in letteratura.

L'analisi di sequenza da noi condotta ha tuttavia consentito di identificare un interessante SNPs, rs 2304722 C/T, localizzato nell'esone 6 del gene; l'allele C di tale variazione di sequenza sembra presentare una frequenza statisticamente significativa rispetto all'atteso solo nei casi di glaucoma pigmentario e non nelle altre due popolazioni in esame, POAG e controlli sani. Tale dato necessita comunque di ulteriori approfondimenti in popolazioni più vaste per la sua conferma e di studi di espressione differenziale per la sua corretta interpretazione.

Bibliografia

1. Goldberg I. How common is glaucoma worldwide? In Weinreb R, Kitazawa Y, Krieglstein G eds. *Glaucoma in the 21st century*. London: Mosby, 2000; 3-8
2. Wilson MR; Martone J. Epidemiology of chronic open-angle glaucoma. In Ritch R, Shields MB, Krupin T eds. *The glaucomas-clinical sciences*, 2nd ed. St Louis: Mosby, 1996; 729-738
3. Lichter PR. Expectation of clinical trials. Results of Early Manifest Clinical Trial. *Arch Ophthalmol* Oct 2002. Vol 120 No. 10.
4. American Academy of Ophthalmology. Preferred practice pattern: primary open-angle glaucoma. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 1996
5. Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR et al. Chronic glaucoma selectively damage large optic nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:913-20.
6. Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Chronic human glaucoma causing selectively greater loss of large optic nerve fibers. *Ophthalmology* 1988; 95:357-63.
7. Sommer A, Katz J, Quigley HA, et al. Clinically detectable nerve fiber atrophy precedes the onset of glaucomatous field loss. *Arch Ophthalmol* 1991;
8. Carassa R, Gandolfi S, Miglior S. Il glaucoma. *Quaderni di Oftalmologia*. SOI Editore, Aprile 2002.
9. Bucci M.G. *Oftalmologia*. Società Editrice Universo II ristampa 2001.
10. Chiquet C, Salle M. Epidemiology in glaucoma. *European Journal of Ophthalmology* supplement, 11/2002.
11. Klein BEK, Klein R, Sponsel WE. Prevalence of glaucoma. *Ophthalmology* 1992;99:1499-504
12. Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Quigley HA, Royall RM, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. *JAMA* 1990;266:369-74
13. Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, et al. Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 1998;105:209-15.
14. The Eye Disease Prevalence Research Group. Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States. *Arch. Ophthalmol* 2004;122:532-38
15. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Healey PR. Prevalence of open angle glaucoma in Australia. *Ophthalmology* 1996;103:1661-69

16. Cerulli L, Miglior M, Ponte F . L'epidemiologia oftalmica in Italia. I.N.C. Editore. 1997.
17. Bonini L. Epidemiologia del glaucoma. Oftalmographia n°1/2001
18. Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study. Baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. Arch Ophthalmol 2002;120:714-20
19. Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E. Early Manifest Glaucoma Trial Group. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. Arch Ophthalmol 2003;121:48-56
20. Rossetti L, Fogagnolo P, Miglior S, Orzatesi N. A meta-analysis of randomized clinical trials on medical treatment of glaucoma. Ophthalmology in press.
21. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B for the EMGT group. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression. Results of the Early Manifest Glaucoma Trial. Arch Ophthalmol 2002;120:1268-79
22. The AGIS Investigators: The Advanced Glaucoma Intervention Study(AGIS).The relationship between control of IOP and visual field deterioration. Am J Ophthalmol 2000;130:429-40
23. Davenger M, Ringvold A, Bilka S. The probability of having glaucoma at different IOP levels. Acta Ophthalmol 1991;69:565-68
24. Dielemans I, Vingerling JR, Wolfs RCW, Hofman A, Grobee DE, de Jong PTVM. The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in the Netherlands. Ophthalmology 1994;101:1851-55
25. Brandt JD. The influence of corneal thickness on the diagnosis and management of glaucoma. J Glaucoma 2001;10:s65-s67
26. Sommer A. Glaucoma: facts and fancies. Eye 1996;10:295-301
27. Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S. A collaborative glaucoma survey for 1988 in Japan. Rinsho Ganka 1990;44:653-59
28. Mitchell P, Lee AJ, Rochtchina E, Wang JJ. Open-angle glaucoma and systemic hypertension. The Blue Mountains Eye Study. J Glaucoma 2004;13:319-26
29. Bonomi L, Marchini G, Marraffa M. Vascular risk factors for primary open-angle glaucoma: The Egna-Neumarkt Study. Ophthalmology 2000;107:1287-93
30. Tielsch JM, Katz K, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Hypertension, perfusion pressure and primary open angle glaucoma. Arch Ophthalmol 1995;113:216-21
31. Graham SL, Drance SM. Nocturnal Hypotension: role in glaucoma progression. Surv

Ophthalmol 1999;43:s10-s16

32. Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Family history and risk of primary open angle glaucoma. Arch Ophthalmol 1994;112:69-73
33. Leske MC, Rosenthal J. Epidemiological aspects of open angle glaucoma. Am J Epidemiol 1979;109:250-72
34. Sugar HS, Barbour FA. Pigmentary glaucoma: a rare clinical entity. Am J Ophthalmol 1949;32:90
35. Kanski JJ. Clinical Ophthalmology. A systematic approach. Fourth Edition. Butterworth Heinemann, 1999
36. Ritch R, Steinberger D, Leibmann JM. Prevalence of pigment dispersion syndrome in a population undergoing glaucoma screening. Am J Ophthalmol 1993;115:707-10
37. Siddiqui Y, Ten Hulzer RD, Cameron JD, Hodge DO, Johnson DH. What is the risk of developing pigmentary glaucoma from pigment dispersion syndrome? Am J Ophthalmol. 2003;135:794-9
38. Ritch R. Pigment dispersion syndrome. Am J Ophthalmol. 1998;126:442-5
39. Farrar SM, Shields MB. Current concepts in pigmentary glaucoma. Surv Ophthalmol 1993;37:233-52
40. Migliazzo CV, Shaffer RN, Nykin R, Magee S. Long-term analysis of pigmentary dispersion syndrome and pigmentary glaucoma. Ophthalmology 1986;93:1528-36
41. Ritch R, Liebmann J, Robin A, Pollack IP, Harrison R, Levene RZ et al. Argon Laser Trabeculoplasty in pigmentary glaucoma. Ophthalmology 1993;100:909-13
42. Roberts DK, Chaglasian MA, Meetz RE. Clinical sign of the pigment dispersion syndrome in blacks. Optom Vis Sci 1997;74:993
43. Scheie HG, Cameron JD. Pigment dispersion syndrome: a clinical study. Br J Ophthalmol 1981;65:264-9
44. Roberts DK, Meetz RE, Chaglasian MA. The inheritance of the pigment dispersion syndrome in blacks. J Glaucoma 1999;8:250-6
45. Campbell DG. Pigmentary dispersion and glaucoma. A new theory. Arch Ophthalmol. 1979;97:1667-72
46. Haynes WL, Alward WLM, Thompson HS. Distortion of the pupil in patients with the pigment dispersion syndrome. J Glaucoma 1994;3:329
47. Greenstein VC, Seiple W, Liebmann J, Ritch R. Retinal pigment epithelial dysfunction in

- patients with pigment dispersion syndrome: implications for the theory of pathogenesis. *Arch Ophthalmol*.2001;119:1291-5
48. Kupfer C, Kuwabara T, Kaiser-Kupfer M. The histopathology of pigmentary dispersion syndrome with glaucoma. *Am J Ophthalmol*.1975;80:857-62
 49. Potash SD, Tello C, Libman J, Ritch R. Ultrasound biomicroscopy in pigment dispersion syndrome. *Ophthalmology* 1992;99:1096-103
 50. Haynes WL, Johnson AT, Alward WL. Effects of jogging exercise on patients with the pigmentary dispersion syndrome and pigmentary glaucoma. *Ophthalmology* 1996;103:1693-5
 51. Gandolfi SA, Vecchi M. Effect of a YAG Laser iridotomy on intraocular pressure in pigment dispersion syndrome. *Ophthalmology* 1996;103:1693-5
 52. Ungaro N, Sangermani C, Vecchi M, Cimino L, Tardini M, Gandolfi SA. Yag laser iridotomy in pigment dispersion syndrome:10 years later. *ARVO* 2004 paper#4293
 53. Reistad C, Shields MB, Campbell D et al. The influence of peripheral iridotomy on the intraocular pressure in patients with pigmentary glaucoma.
 54. Birt CM. Intraocular pressure spike after Yag laser iridotomy in patient with pigment dispersion. *Can J Ophthalmol* 2004;39:234-9
 55. Benedict TWG. *Abhandlungen zur dem Gebiete der Augenheilkunde*. Breslau: L. Freunde,1842
 56. Sheffield VC, Stone EM, Alward WL,et al. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nature Genetics* 1993;4:47-50
 57. Clepet C, Dauwerse HJG, Desmaze C, Ommen GJB, Weissenbach J, Morissette J. A 10 cM YAC contig spanning GLC1A, the primary open-angle glaucoma locus at 1q23-25. *European Journal of Human Genetics* 1996;4:250-9
 58. Kubota R, Noda S, Wang Y, et al. A novel myosin-like protein (Myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics*1997;41:360-9
 59. Sarfarazi M. Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Human Molecular Genetics* 1997;6:1667-77
 60. Vasconcellos JP, Melo MB, Costa VP, et al. Novel mutation in the MYOC gene in primary open glaucoma patients. *J Med Genet* 2000;37:301-3
 61. Clark AF, Steely HT, Dickerson JE, et al. Glucocorticoid induction of the glaucoma gene Myoc in human and monkey trabecular meshwork cells and tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

2001;42:1769-80

62. Polansky JR, Juster RP, Spaeth GL. Association of the myocillin mt.1 promoter variant with the worsening of glaucomatous disease over time. *Clin Genet* 2003;64:18-27
63. Colomb E, Nguyen TD, Bechetoille A, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the TIGR/MYOCILIN gene promoter with the severity of primary open-angle glaucoma. *Clin Genet* 2001;60:220-5
64. Wirtz MK, Samples JR, Rust K, et al. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus maps to 7q35-36. *Arch. Ophthalmology* 1999;117:237-40
65. Andersen J. S.;Pralea A.M.;Del Bono E.A.;Haines J.L.;Gorin M.B.;Schuman j. S.;Mattox C.G.;Wiggs J.L.:A gene responsible for the pigment dispersion syndrome maps to chromosome 7q35-36. *Arch. Ophthalmol.* 115:384-388,1997
66. Mandelkorn R.M.;Hoffman M.E.;Olander K.W.;Zimmerman T.;Harsha D.: Inheritance and the pigmentary dispersion syndrome. *Ann.Ophthal.* 15:577-582,1983
67. Anderson M.G.;Smith R.S.;Hawes N.L.;Zabala A.;Chang B.;Wiggs J.L.;John S.W.M.: Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nature Genet.* 30:81-85,2002
68. John S.W.;Smith R.S.;Savinova O.V.;Hawes N.L.;Chang B.;Turnbull D.;Davisson M.;Roderick T.H.;Heckenlively J.R.: Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest.Ophthal.Vis.Sci.* 39:951-962,1998
69. Paglinawan C.;Haines J.L.;Del Bono E.A.;Schuman J.;Stawski S.;Wiggs J.L.: Exclusion of chromosome 1q21-q31 from linkage to three pedigrees affected by the pigment-dispersion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 56:1240-1243,1995
70. Richter C.U.;Richardson T.M.;Grant W.M.: Pigmentary dispersion syndrome and pigmentary glaucoma: a prospective study of the natural history. *Arch.Ophthal.* 104:211-215,1986
71. Siddiqui Y.;Ten Hulzen R.D.;Cameron J.D.;Hodge D.O.;Johnson D.H.: What is the risk of developing pigmentary glaucoma from pigment dispersion syndrome?. *Am.J.Ophthal.* 135:794-799,2003
72. Sugar H.S.: Pigmentary glaucoma. A 25-year review. *Am.J.Ophthal.* 62:499-507,196