



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

Fondi 5 per mille ANNO 2015 - Enti della Ricerca Sanitaria  
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

ENTE<sup>1</sup>:



Sede Legale: Padiglione Rama - Via Paccagnella, 11 - 30174 Zelarino VE  
Iscrizione nel Registro Regionale delle Persone Giuridiche al n. 83 (VE/299)  
C.F. 02320670272 P.I. 03068370273

**Titolo del progetto**

**MEDICINA RIGENERATIVA DELLA CONGIUNTIVA**

**OBIETTIVO DEL PROGETTO**

L'obiettivo di questo progetto è quello di offrire una nuova opzione terapeutica a pazienti affetti da deficit bilaterale di cellule staminali limbo-corneali sviluppando un protocollo di trapianto autologo di foglietti di congiuntiva prodotti in vitro a partire da cellule staminali prelevate dagli stessi pazienti. A tal fine il progetto ha visto approfondire le conoscenze a livello cellulare e molecolare delle cellule staminali dell'epitelio congiuntivale, la cui scarsa caratterizzazione molecolare e funzionale attualmente impedisce l'utilizzo di queste cellule in protocolli clinici di terapia cellulare avanzata.

**ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO**

**1. Isolamento e selezione di cellule staminali congiuntivali.**

Pochi dati sono disponibili ad oggi in letteratura riguardo la composizione cellulare della superficie congiuntivale e la sua distribuzione di cellule staminali congiuntivali. Il primo studio è stato condotto da Pellegrini et al. nel 1999. I risultati suggeriscono una uniforme distribuzione di cellule staminali congiuntivali nelle diverse aree della superficie congiuntivale bulbare e del fornice. Un forte limite di questo studio è il ridotto numero (n=1) di donatori sul quale è stata compiuta l'analisi. Nel 2015, Stewart e colleghi hanno invece evidenziato come, in donatori giovani, le aree del fornice inferiore e della superficie congiuntivale bulbare in posizione nasale abbiano una maggiore percentuale di cellule staminali congiuntivali.

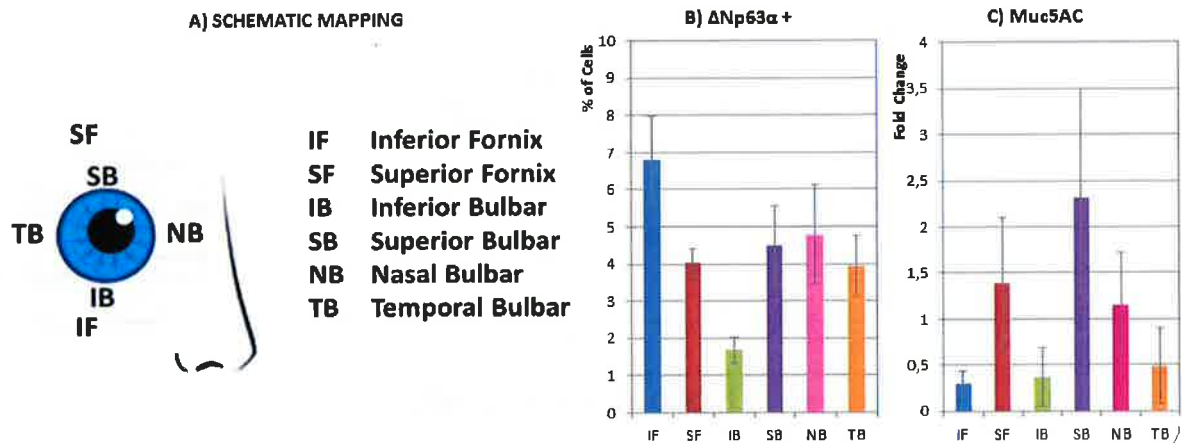
Un punto importante della nostra ricerca risulta pertanto quello di approfondire questo punto e quindi di mappare la superficie congiuntivale al fine di individuare il sito ottimale per il prelievo di biopsie da usare come starting material per la realizzazione di graft congiuntivali, ossia individuare il sito le cui cellule, coltivate secondo le nostre condizioni di coltura, abbiano la più alta capacità auto-rigenerativa. Il mapping della superficie congiuntivale ha previsto l'analisi di 37 biopsie provenienti da 14 differenti donatori, più precisamente 9 donatori viventi (pazienti ospedalizzati sani sottoposti ad interventi chirurgici della superficie oculare) e 5 donatori non viventi (prelievo eseguito in fase di prelievo di cornea). Sei le aree prescelte per il prelievo: Fornice Inferiore (IF), Fornice Superiore (SF), Bulbare Inferiore (IB), Bulbare Superiore (SB),

<sup>1</sup> Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

## Nasale Bulbare (NB) e Bulbare Temporale (TB).

Per tutti i campioni le cellule congiuntivali sono state estratte e messe in coltura secondo il protocollo standard in uso nel laboratorio, ossia in breve: 3-4 cicli di tripsinizzazione (Trypsin-EDTA enzyme) consecutivi, raccolta delle cellule e messa in coltura; piastramento alla concentrazione standard di circa 15.000/cm<sup>2</sup>; co-cultura con Feeder Layer (3T3-J2 murine cell letalmente irradiate e piastrate alla concentrazione di 40.000/cm<sup>2</sup>) coltivate con terreno standard K (Pellegrini et al).

L'analisi delle cellule così estratte e messo in coltura è stata eseguita mediante test cellulari, e confermati puoi mediante test molecolari più specifici. Questi ultimi test hanno permesso di confermare una maggior concentrazione di cellule staminali (maggior espressione del marcatore  $\Delta Np63$ ) nel FI, e di cellule GOBLET nel SB. L'elevato valore di  $\Delta Np63$  nei fornici inferiori potrebbe, quando possibile, propendere per la scelta di quest'area rispetto alle altre.



## 2 Ottimizzazione delle condizioni di coltura di cellule staminali congiuntivali.

### 2 a . Tecnica di colture cellulari: sospensione cellulare o espianto?

Due principali approcci sono utilizzati in letteratura per l'espansione in vitro di cellule staminali epiteliali (Baylis 2011):

- tecnica dell'espianto biotico: la biopsia viene piastrata sul supporto, i cheratinociti escono dalla biopsia si espandono tutto attorno
- tecnica della sospensione cellulari: isolamento delle cellule dalla biopsia tramite sistemi enzimatici, raccolta delle cellule estratte e loro piastramento sul supporto

Nella pratica clinica della ricostruzione in vitro di epitelio limbus-corneali, entrambi i approcci sono ampiamente utilizzati con successo: Pedrotti 2015 e Zakaria 2014 ne rappresentano probabilmente l'esempio con più applicazioni cliniche.

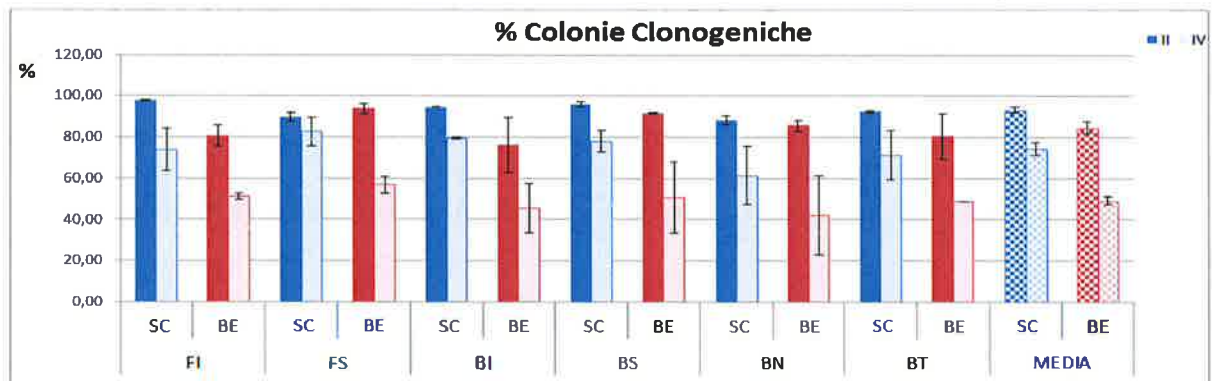
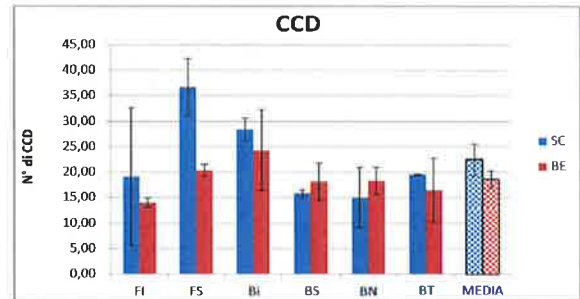
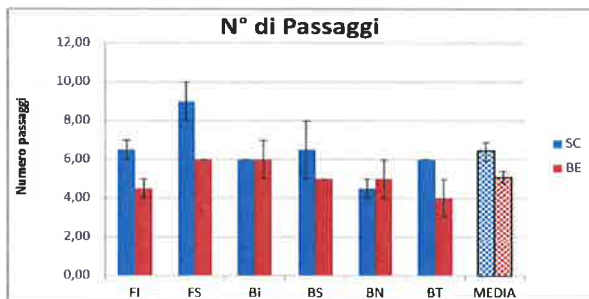
Nel pensare un nuovo prodotto per terapie cellulari a base di cellule staminali della congiuntiva e della mucosa boccale, si è pensato di investigare i vantaggi legati alla scelta di uno piuttosto che dell'altro dei due approcci. Tale analisi è stata effettuata utilizzando campioni congiuntivali e cercando pertanto anche allo stesso tempo di capire se la scelta di uno o dell'altra tecnica sia vincolata dalla zona di prelievo della biopsia. A tale proposito, sono state prelevate 12 biopsie congiuntivali provenienti da 2 donatori non viventi; per ciascuno donatore sono state prelevate 6 biopsie provenienti ciascuna dalle 6 zone descritte nel paragrafo 1, ossia Fornice Inferiore (IF), Fornice Superiore (SF), Bulbare Inferiore (IB), Bulbare Superiore (SB), Nasale Bulbare (NB) e Bulbare Temporale (TB).

Tutte e 12 le biopsie sono state divise a metà e processate secondo le due tecniche. Al fine di rendere le due tecniche confrontabili, biopsie e cellule sono state piastrate sullo stesso supporto in plastica. Le colture primarie di cellule congiuntivali sviluppate dall'applicazione delle due tecniche sono state mantenute secondo i protocolli standard di riferimento specifici di quella tecnica (Pedrotti 2015 e

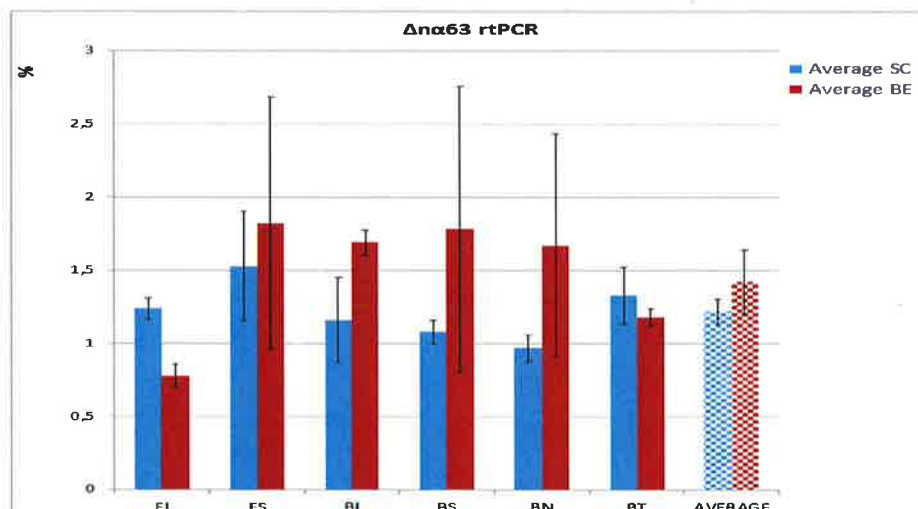
Zakaria 2014 rispettivamente).

Una volta raggiunta la confluenza della coltura primaria, le cellule sono state analizzate secondo i due test standard in uso nel nostro laboratorio ossia Life Span Test (analisi del numero di passaggi-amplificazioni seriali eseguiti dalle cellule, Cumulative Cell Doubling ottunento, percentuale di colonie clonogeniche e Totali ottenute) e rtPCR di marcatori della staminalità ( $\Delta\alpha\text{p}63$ ).

I dati ottenuti dai life span test e di seguito illustrati sono coerenti nelle due ripetizioni eseguite e non evidenziano differenze significative fra le due tecniche; osservando i valori assoluti ottenuti si denota che la condizione SC (tecnica della sospensione cellulare) presenta performance simili o non significativamente maggiori rispetto la condizione BE (tecnica dell'espianto biottico), per entrambe le ripetizioni e per tutti le aree analizzate. Non sono inoltre evidenti aree di prelievo particolarmente vantaggiose per nessuna delle due tecniche.



L'analisi in rtPCR di marcatori della staminalità ( $\Delta\alpha\text{p}63$ ) non ha introdotto dati significativi nel confronto delle due tecniche rispetto a quanto evidenziato nell'analisi precedente.

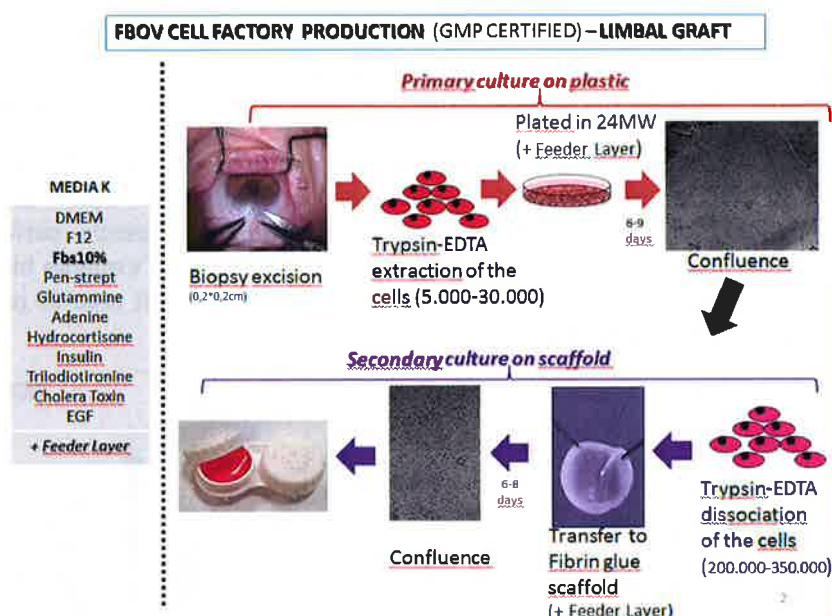


Ulteriori ripetizioni sarebbero necessarie per approfondire l'argomento ed evidenziare eventuali sottili differenze. Tuttavia i dati raccolti da questa analisi preliminare, non evidenziano nessun aspetto per cui una delle due tecniche sia da preferirsi all'altra.

Tali osservazioni ha indotto i nostri studi a proseguire con l'applicazione della tecnica della

*[Handwritten signature]*

sospensione cellulare per la quali il team di FBOV ha maturato comprovata esperienza. Il protocollo GMP Certified in uso nella Cell Factory Veneziana può essere così schematicamente riassunto:



Ossia:

- estrazione delle cellule dalla biopsia mediante più cicli di tripsinizzazione;
- piastramento delle cellule raccolte in uno o più pozzetti di una Multiwell 24 in co-cultura con Feeder Layer murino;
- mantenimento della coltura fino a confluenza delle cellule; trasferimento delle cellule sullo scaffold (Gel di fibrina) sempre in co-cultura con del nuovo Feeder Layer;
- mantenimento del graft fino a confluenza e trasferimnto in sala operatoria del prodotto.

## 2 b . Individuazione di nuovi protocolli animal-free

Nella pianificazione di un nuovo prodotto di cellule staminali in clinica farmaceutica, si evidenzia la necessità di trovare nuovi protocolli animal-free da confrontare con gli approcci standard comunemente in uso. I dati provenienti dalla letteratura evidenziano infatti il protocollo in uso nella Cell Factory Veneziana (K) come quello avente gli standard più alti di crescita per colture epiteliali; tuttavia esso include l'uso di siero fetale bovino e la cocoltura con fibroblasti murini letalmente irradiati (Feeder Layer). Punto importante del progetto è stato pertanto quello di individuare dei nuovi protocolli animal-free per colture congiuntivali e di mucosa boccale.

Molteplici formulazioni che si è ritenuto opportuno testare:

N°	MEDIA TESTATI (SIGLA)	COMPOSIZIONE		FL +/-	RIFERIMENTI LETTERARI
		BASIC MEDIUM	EVENTUALI SUPPLEMENTI		
1	K (controllo)	DMEM/F12	FBS, ormoni e varie	+	Pellegrini et al
2	CnT-10%XF	CnT-20 medium	10 % XFserum	+/-	Nuova formula
3	CnT-1%XF	CnT-20 medium	1 % XFserum	+/-	
4	CnT-AB	CnT-20 medium	1% AB serum	+/-	Zakaria
5	XF	Medium K supplementato	-FBS e + 10% XFserum	+	Nuova formula
6	SFM COMBO	Keratinocyte-SFM Medium	-	+/-	ThermoFisher

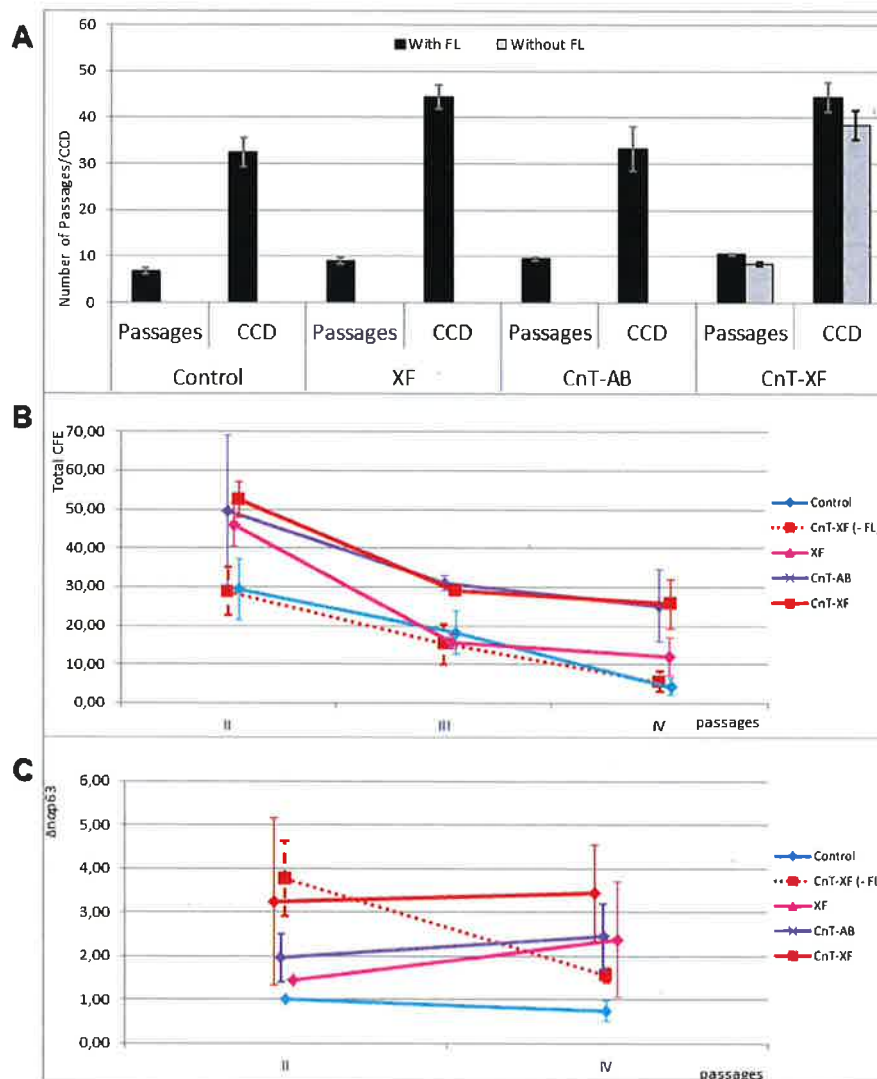
Saggi cellulari, molecolari e biochimici sono stati allestiti al fine di evidenziare le prestazioni dei nuovi protocolli e di confrontarle con quelle ottenute dagli standard di nota efficacia (K).

La messa a punto del protocollo ideale di cultura delle cellule epiteliali animal free e non, ha inoltre necessariamente previsto 2 steps:

screening su plastica delle differenti condizioni (test di seguito illustrati);

allestimento di graft utilizzando diversi terreni e supporti (vedi punto 3).

I dati ottenuti dai tradizionali saggi cellulari (Life Span Test – A, B) e molecolari (Real Time PCR del marcatore di staminalità  $\Delta nap63$ , C) in uso evidenziano un andamento tendenzialmente positivo per tutti i mezzi testati:

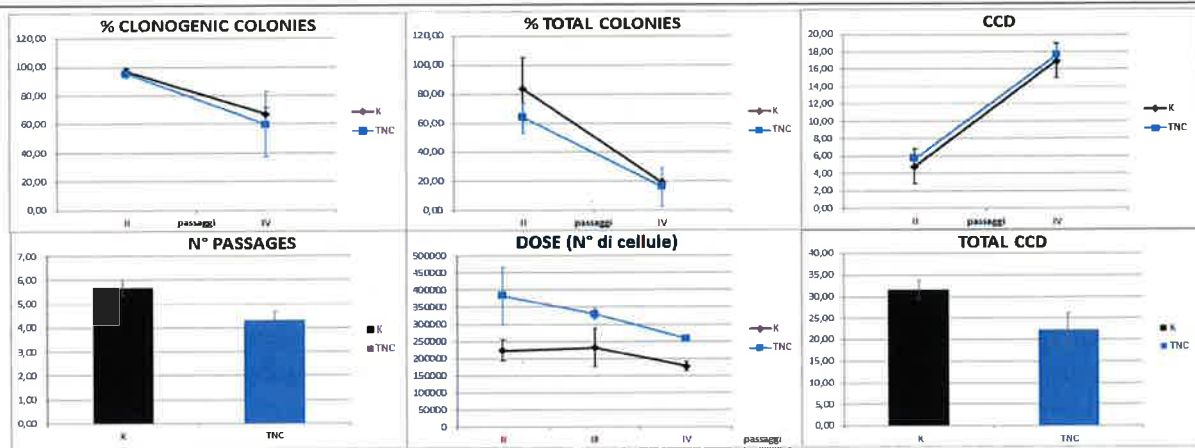


Tali test incoraggiano pertanto l'uso di terreni animal free per test in vitro su plastica evidenziando performance in alcuni casi sovrapponibili o addirittura migliori al controllo (K) non animal free per la maggior parte delle condizioni testate.

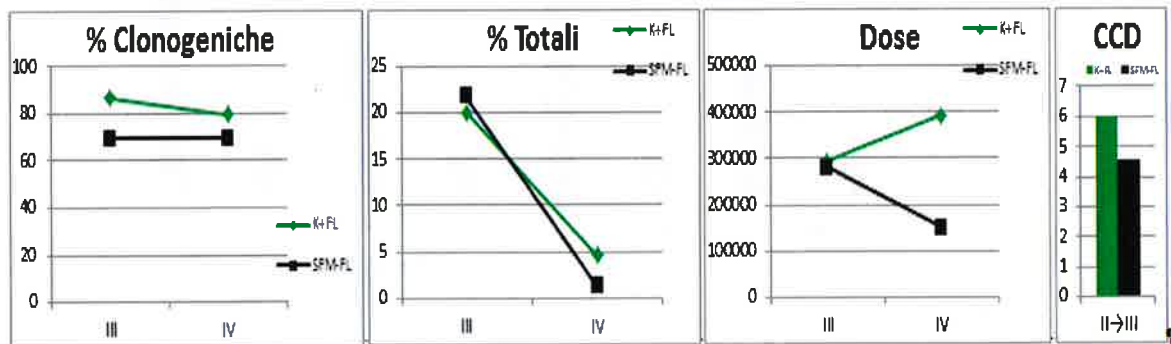
Tuttavia è stato dimostrato che tale dato si presenta solo quando i test in vitro vengono eseguiti ad elevate concentrazioni cellulari. Qualora tali test vengano eseguiti a basse concentrazioni, la condizione standard non animal free (controllo K) è quella che garantisce lo sviluppo di una coltura cellulare con miglior capacità di crescita e di proliferazione nel tempo:

Esempio: Life Span Test con terreno XF e cellule congiuntivali a basse concentrazioni

Handwritten signature and initials in blue ink.



Esempio: Life Span Test con terreno KSFM e cellule congiuntivali a basse concentrazioni



Tale dato è molto importante in quanto il protocollo rigenerativo oggetto dello studio non sempre prevede uno starting material (numero di cellule stratte dalla biopsia e da cui sviluppare l'epitelio da innestare) elevato. Al fine di ovviare a tale problema ne consegue che la prima fase di cultura del protocollo dovrà necessariamente avvenire mediante utilizzo delle condizioni tradizionali; il secondo step del protocollo può invece proseguire utilizzando condizioni animal free dal momento che il numero di cellule a disposizione per la lavorazione non è limitato in questa fase.

Questi test hanno permesso di raccogliere alcune ulteriori importanti informazioni:

- **Variazioni sulla morfologia cellulare.**  
Le cellule crescono con caratteristiche differenti a seconda del mezzo utilizzato. Le colture mantenute nel terreno standard e nel terreno XF (sempre in co-cultura con il Feeder Layer), crescono formando colonie che tendono poi gradualmente a fondersi e a formare un unico pavimentoso epitelio;  
Le cellule coltivate nelle altre condizioni crescono invece senza formare colonie, ma si distribuiscono uniformemente sulla superficie disponibile fino a formare un epitelio contiguo. Ispetto al controllo tutte queste condizioni, evidenziano una discreta mortalità in sospensione (dato non misurabile).
- Tutte le LESC coltivate nei differenti mezzi xeno-free presentano un Feeder layer atipico e sofferente rispetto al controllo (cellule più allungate con distacco prematuro).

Si è ritenuto pertanto opportuno eseguire un test di tossicità di tali terreni sulle colture di fibroblasti murini utilizzate per l'allestimento del Feeder Layer. E' inoltre sembrato interessante a questo punto capire se la tossicità di questi mezzi fosse specifica per il tipo cellulare utilizzato (3T3-J2 murine), oppure estesa a tutti i fibroblasti murini. Oppure, più in generale ancora, riguardasse tutti i più tipi cellulari fibroblastoidi indipendentemente dalla specie di origine.

Al fine di investigare questo abbiamo effettuato un test di tossicità utilizzando 3 tipi cellulari:

- (I) La linea cellulare di controllo 3T3-J2 (per la quale erano noti dai test precedenti dei segni di tossicità del Feeder Layer da queste generato)
- (II) una linea cellulare NIH-3T3

(III) fibroblasti umani, ricavati da colture di cheratinociti limbus-cornea

Sono state testate tutte le formulazioni di media riportate in tabella seguente:

Condition	TYPE OF MEDIUM	
	MEDIUM	SIERO
<b>K</b>	DMEM, Glutammine 2%, Penniciline-Streptomicine	Calf Serum 10%
<b>T1</b>	DMEM, Glutammine 2% ,Penniciline-Streptomicine	TNCBIO XF 10%
<b>T2</b>	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	Calf Serum 10%
<b>T3</b>	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	Calf Serum 1%
<b>T4</b>	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	TNCBIO XF 10%
<b>T5</b>	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	TNCBIO XF 1%
<b>T6</b>	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	Siero Umano AB 1%

Le formulazioni tester T sono state testate sia alla concentrazione standard di Penniciline-Streptomicine (P/S) del controllo K (ossia 50 ug/ml) che alla concentrazione ridotta di 10 ug/ml. Il siero fetale bovino infatti contiene albumina che inibiscono l'azione P-S, pertanto l'uso di P/S al 100% nelle condizioni Tester esenti da siero e quindi da albumina si è supposto potesse essere una causa di tossicità.

Il confronto fra i diversi terreni è stato effettuato sulla base dell'analisi di parametri quali la vitalità cellulare, la morfologia cellulare e il numero di passaggi.

Per tutte le condizioni teste, le cellule NIH hanno mostrato segni di tossicità al primo passaggio (figura II) di seguito illustrata), in modo simile alle cellule 3T3-J2 (Figure I). Le cellule umane hanno evidenziato invece una maggiore proliferazione, seppure molto lenta e con basso numero di passaggi in coltura (Figure III)).

E' possibile pertanto concludere che i mezzi testati hanno confermato una selettività maggiore per le colture di cheratinociti umani rispetto al terreno standard con l'effetto benefico di ridurre nel prodotto finale la "contaminazione" del Feeder Layer (fibroblasti murini 3T3-J2 irradiati) nonché la contaminazione spontanea endogena di fibroblasti stromali come richiesto dalle normative GMP. Questi dati vanno a vantaggio dei terreni animal/xerum free.



Figura I)

*[Handwritten signature]*

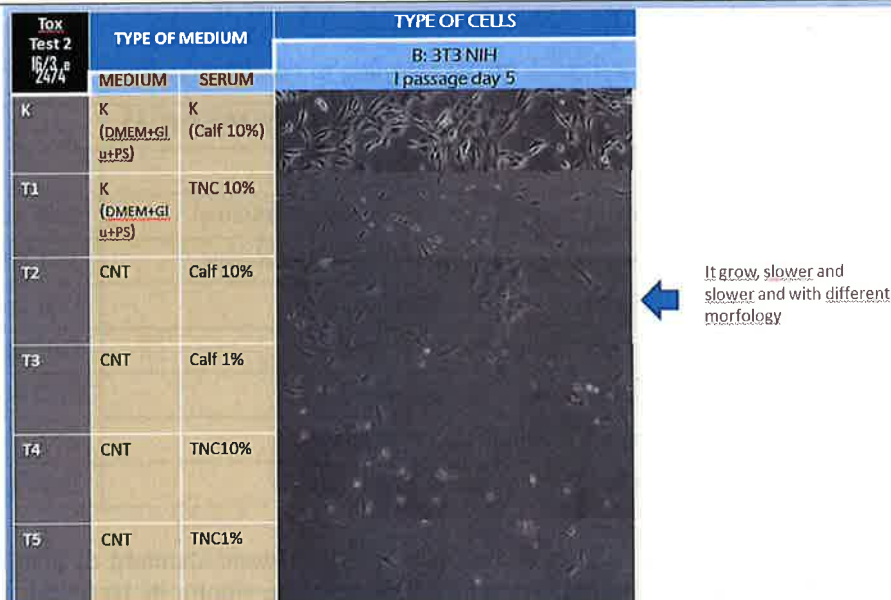


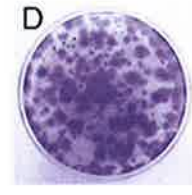
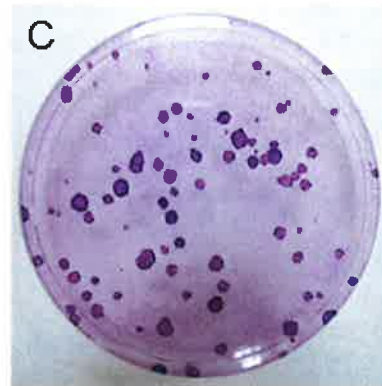
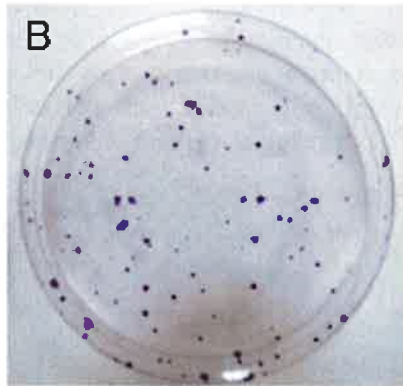
Figura II)



Figura III)

- I controlli di qualità delle CFE non possono essere coltivate con questi terreni.
- Le CFE coltivate con i terreni testati presentano delle “anomalie” rispetto alle rispettive CFE coltivate con il protocollo standard (Fig seguente). Tali variazioni riguardano più aspetti:
- il numero totale di colonie cresciute
  - la morfologia della CFE: per molte delle condizioni testate le cellule non crescono a colonie come nel controllo (fig C seguente) ma si distribuiscono sulla superficie (fig D seguente)
  - minor numero di colonie differenziate, difficile distinguere fra colonie clonogeniche ed abortive (fig C-D seguente).





Esempi di CFE:

CFE mantenuta in XF medium (N° 5)

CFE mantenuta in K medium (N° 1)

CFE in medium N° 2,3,4,6

E' stato pertanto dedotto che i controlli di qualità delle CFE non possono essere coltivate con questi terreni: per alcune condizioni non si possono distinguere le singole colonie (fig D), per quelle condizioni dove ciò sia possibile non è possibile distinguere tra colonie abortive e clonogeniche (fig B). Ne consegue che qualora la CFE sia piastrata nei terreni test, essa perde di significato e che volendo usare questo tipo di terreni, differenti e nuovi test di controlli di qualità delle culture dovranno essere pertanto pensati, oppure dovranno essere mantenute nel terreno standard per non poter essere analizzate.

### 3. Utilizzo e validazione di scaffold per uso clinico (gel di fibrina GEL, membrana amniotica AM).

In pazienti affetti da Deficit Staminale Limbare (LSCD) monolaterale, le cellule staminali limbo-corneali sono fatte crescere su membrana amniotica (AM) e/o gel di fibrina (GEL). Sia la membrana amniotica che il gel di fibrina possono pertanto essere considerati dei modelli standard per la realizzazione di epiteli congiuntivali. Entrambi però presentano dei problemi: il gel di fibrina non è un materiale poroso e questo potrebbe provocare il ristagno di residui di sangue una volta che il lembo viene appoggiato sopra lo stroma durante l'intervento chirurgico di trapianto di cellule staminali; la membrana amniotica è nota per essere un tessuto molto eterogeneo (considerando che proviene da differenti fonti) difficilmente utilizzato in lavorazioni di tipo GMP. Obiettivo di questa parte del progetto sarà dunque quello di identificare quale tra questi due scaffold sia il migliore per la crescita di cellule epiteliali della congiuntiva/mucosa boccale. Tale studio è avvenuto in più stadi: identificazione del protocollo di crescita ottimale studio della crescita cellulare su scaffold tramite valutazione di morfologia cellulare, tempi di crescita (punto 1a), parametri cellulari (punto 1b) e livello di stratificazione e valutazione istologica dello scaffold (punto 1c).

Le colture secondarie ottenute dal test preliminari di screening su plastica, sono state piastrate in parallelo su AM e/o su GEL umano denudato con o senza FL.

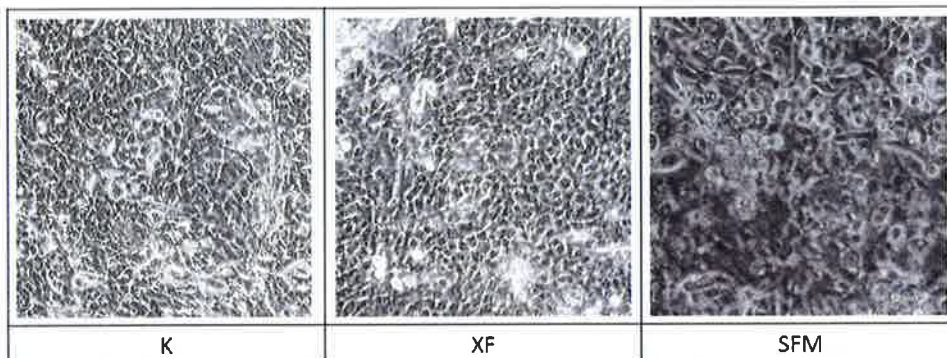
Queste schematicamente le condizioni testate:

	Supporto	Mezzo di coltura	Feeder layer
K (controllo)	GEL	K (controllo)	+ FL
K (controllo)	AM	K (controllo)	+ e - FL
Tester	GEL	XF	+ e - FL
Tester	AM	XF	+ e - FL
Tester	AM	CnT-XF	+ e - FL
Tester	AM	CnT-AB	+ e - FL
Tester	AM	KSFM	+ e - FL

(1.a.) identificazione del protocollo di crescita ottimale,  
scelta del terreno di crescita delle cellule,  
analisi morfologica

L'esame giornaliero al microscopio ottico della cultura ha permesso fin da subito evidenziare alcuni problemi con alcune delle condizioni testate. Pur aumentando la concentrazione di semina delle cellule, le culture in CnT e SFM presentano numerosi problemi a sviluppare il graft: le cellule hanno difficoltà ad aderire allo scaffold, mantengono una forma arrotondata invece che squamosa, affaticano a crescere tanto che in colti casi non riescono a raggiungere la confluenza. E questo

indipendentemente dalla presenza o assenza del FL. Al contrario le condizioni di controllo e la condizione Tester XF crescono in tempi standard, nello specifico la condizione XF+FL raggiunge la confluenza mediamente con un giorno di anticipo rispetto al controllo su Gel e alla rispettiva condizione -FL. Le condizioni XF+FL e quella -FL non evidenziano particolari differenze e conservando entrambe la classica struttura squamosa e pavimentosa (Figura di seguito).



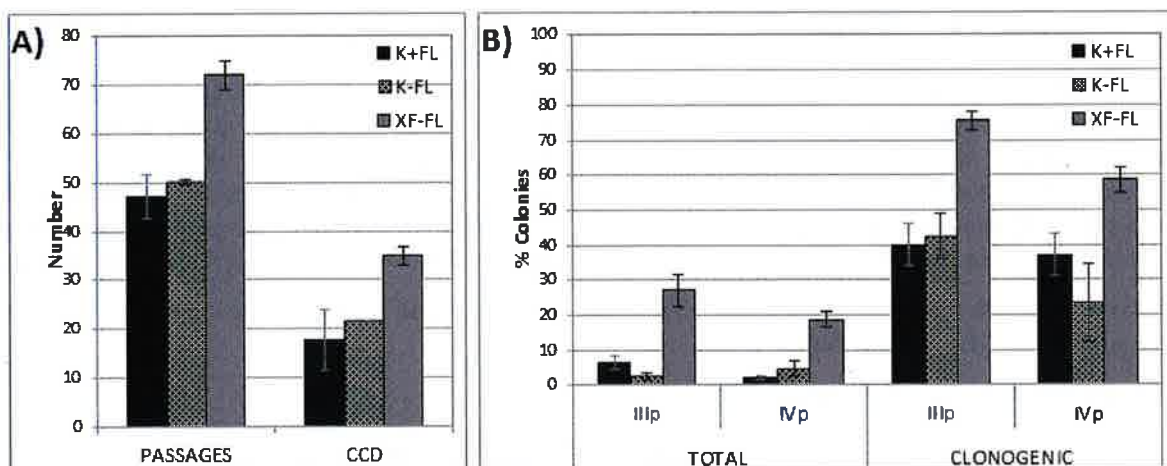
Esempio analisi morfologia al microscopio ottico di colture su membrana amniotica utilizzando diversi terreni

Per questo motivi tutti i test successivi eseguiti per valutare le proprietà dell'epitelio generato sono stati eseguiti solo su lembi generati da colture coltivate nella condizione XF.

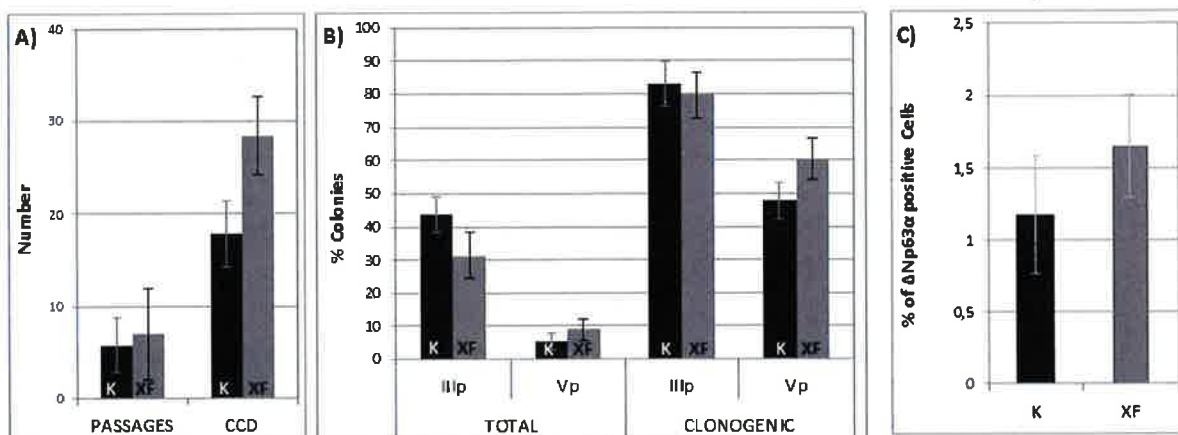
(1.b.) identificazione del protocollo di crescita ottimale,  
scelta del terreno di crescita delle cellule,  
analisi cellulare

Per i lembi ottenuti al punto precedente (solo XF e Controllo K), le cellule sono state dissociate dallo scaffold e analizzate mediante Life Span Test.

Sono stati analizzati sia gli scaffold generati su MA:



che quelli generati su GEL:



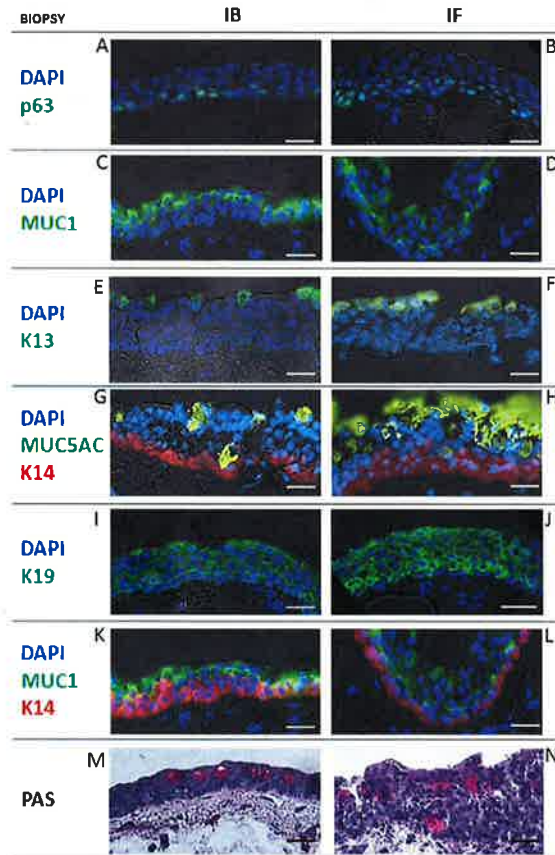
In entrambi i casi, la condizioni animal free XF ha evidenziato migliori capacità proliferative rispetto

al Controllo.

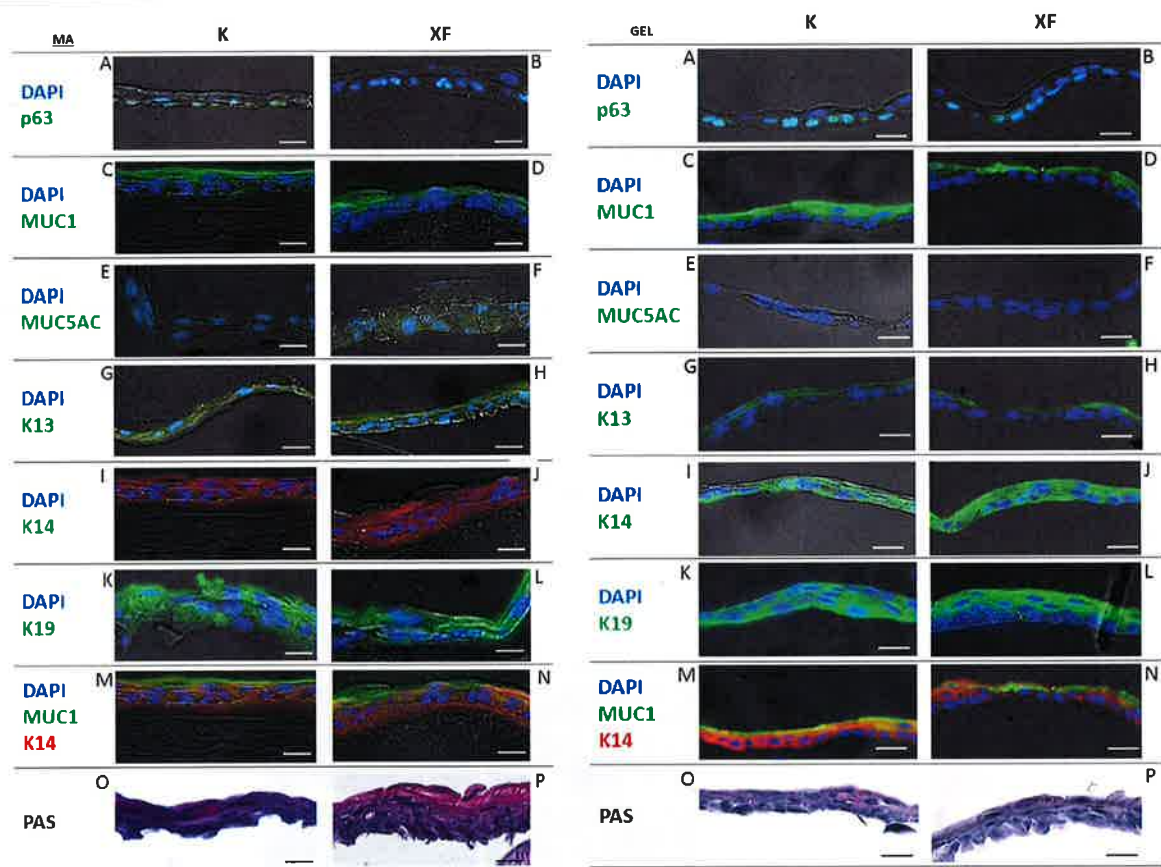
(1.c.) identificazione del protocollo di crescita ottimale,  
scelta del terreno di crescita delle cellule,  
analisi istologica

Per i lembi ottenuti al punto 1.a. (solo XF e Controllo K), sono state eseguite delle sezioni istologiche ed eseguite delle immunofluorescenze al fine di definire l'identità dei lembi così generati. I dati ottenuti dalle sezioni dei graft di AM e GEL sono stati confrontati con quanto presenti in natura da sezioni di biopsie dello stesso tessuto ottenute da donatori (BIOPSY).

L'analisi eseguita ha messo in evidenza come i lembi ottenuti esprimono gli stessi marcatori del tessuto di origine, sia quando coltivati nel terreno di Controllo k che quando generati del terreno animal free XF-FL. Qui di seguito un esempio, una biopsia congiuntivale confrontata con il graft ottenuto in vitro da cellule dello stesso tessuto (nello specifico: p63 e K14 basali, K13 e Muc1 superficiali, K19 tutto spessore):

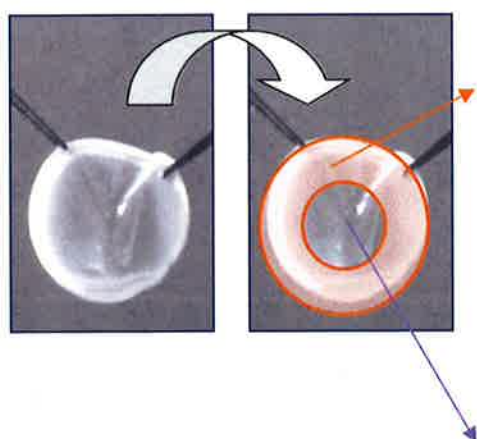


Handwritten signature or initials in blue ink.



(2) identificazione del protocollo di crescita ottimale, scelta dello scaffold di crescita delle cellule

I test allestiti hanno subito messo in evidenza il persistere di alcune difficoltà già note in letteratura nella standardizzazione del protocollo di preparazione del graft mediante uso della AM. Sono stati nello specifico identificati tre ostacoli principali. Il primo è causato dalla variabilità intrinseca dell'AM: ogni lotto differisce, in termini di spessore, trasparenza e fragilità dei tessuti. E' stato quindi difficile monitorare l'adesione cellulare e l'attività proliferante e avere un controllo giornaliero della morfologia cellulare. Il secondo problema principale era la presenza di piccoli buchi nelle AM che potevano interferire con la crescita omogenea delle cellule e infine con l'integrità della superficie. Il terzo ostacolo è che non è possibile "sacrificare" parte del prodotto per i controlli qualità necessari dalle linee guida GMP: la fragilità della MA non consente tagliare il preparato in due porzioni senza danneggiare inevitabilmente il prodotto finito da innestare. Cosa facilmente applicabile quando si lavora invece con il GEL, come già previsto nel protocollo approvato ed in uso nella Cell Factory veneziana per l'allestimento di graft limbus-corneali. Come illustrato nella figura di seguito, mediante uso di un punch biopsy è possibile tagliare il lembo in due parti ed utilizzarne una (il ring esterno) come controcampione per l'allestimento di controlli di qualità:



**RING ESTERNO DEL LEMBO**

Digestione del ring con enzima dispase, dissociazione delle cellule con enzima tripsin-EDTA e allestimento di entrambi i seguenti tests:

- *test cellulare "life span test"*  
(risultati disponibili e di seguito illustrati)
- *controlli molecolari di P63 tramite rt-PCR* (test in corso)

## BOTTONE CENTRALE DA INNESTARE:

*Controlli Istologici* del graft (test in fase di allestimento).

Per concludere, la variabilità batch-to-batch, la presenza di buchi mentre le cellule crescono e le difficoltà di eseguire test di controllo della qualità prima di rilasciare l'innesto rendono impossibile standardizzare un prodotto fatto di cellule congiuntivali coltivate su uno scaffold AM. A causa di questi problemi, abbiamo deciso di proseguire l'indagine qui descritta utilizzando il GEL come scaffold preferenziale per l'allestimento di graft congiuntivali e di mucosa boccale. Precedenti applicazioni cliniche, infatti, hanno dimostrato che la variabilità da lotto a lotto del GEL è ridotta al minimo (poiché si tratta di prodotti farmaceutici), la trasparenza non è un problema e i test di controllo della qualità prima del trapianto possono essere facilmente eseguiti, senza alcun danno al prodotto finale.

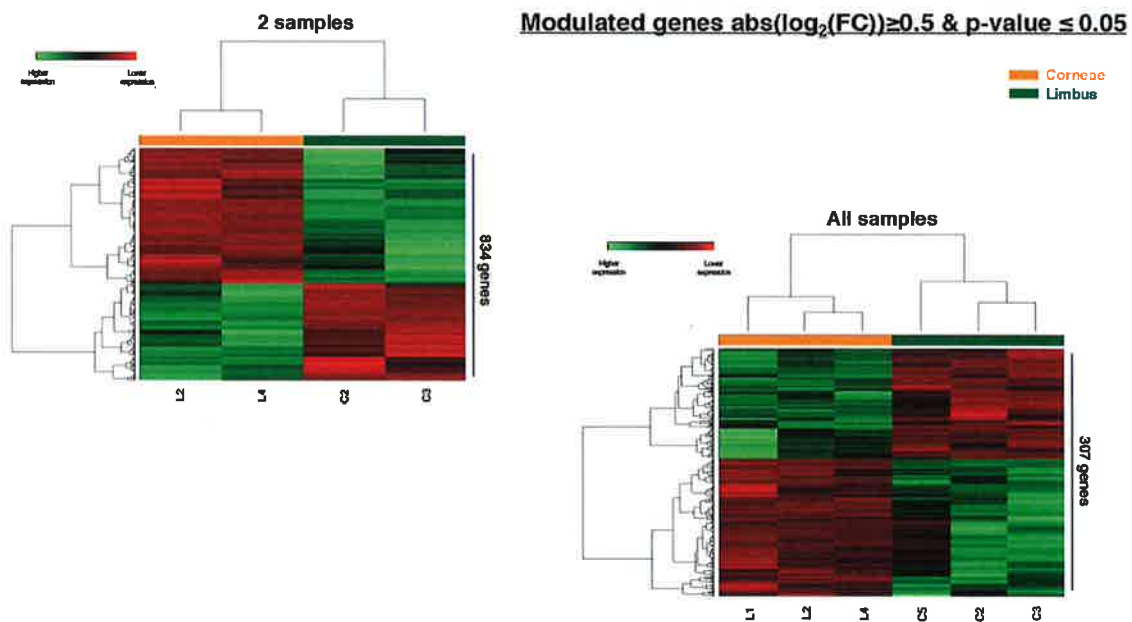
### 4. Identificazione di marcatori specifici dell'epitelio congiuntivale umano.

#### A) rt-PCR and Wester Blotting analyses

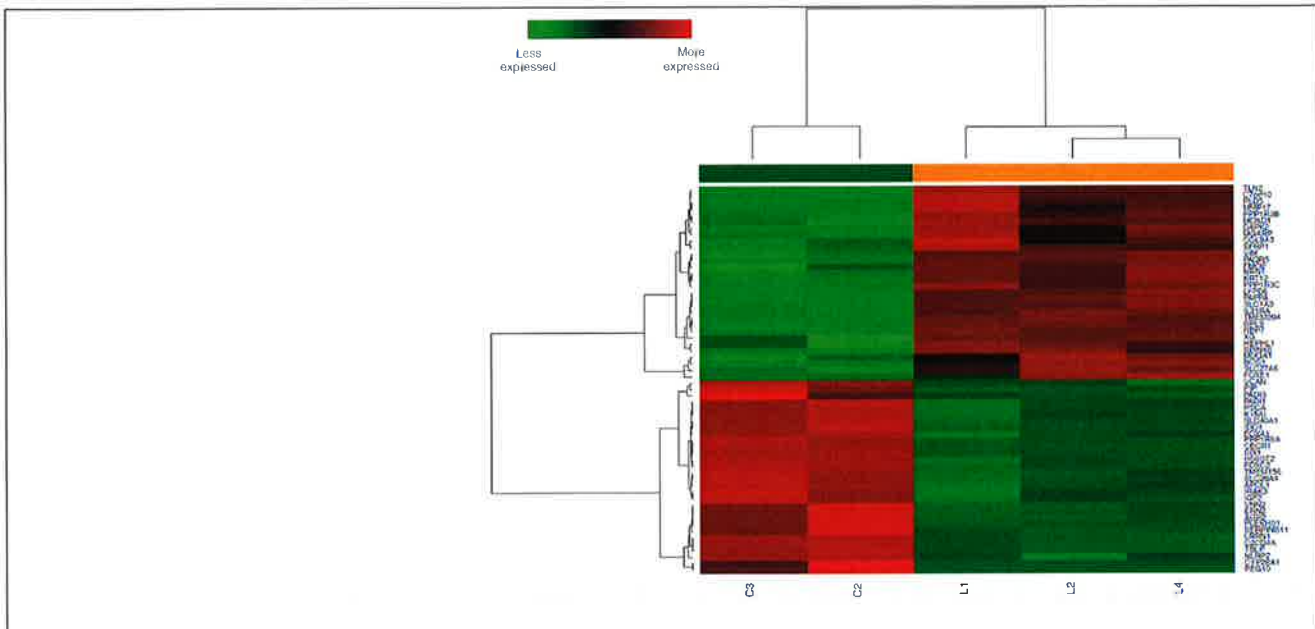
Lo scopo di questa parte del progetto è quello di individuare un nuovo marcatore molecolare che consente l'identificazione univoca delle cellule epiteliali congiuntivali mediante analisi molecolari e, se possibile, anche mediante analisi immunologiche, andando ad ovviare a problemi di falsi negativi che spesso caratterizzano i più noti marcatori attualmente conosciuti.

#### Test preliminare: RNA-Seq screening differenziale di 30 geni

Al fine di individuare un nuovo marcatore molecolare per l'identificazione univoca delle cellule epiteliali congiuntivali, abbiamo condotto una RNA-Seq screening differenziale di trascritti. Sono stati analizzati trascritti provenienti da 4 campioni congiuntivali differenti. I dati ottenuti sono stati confrontati con i trascritti provenienti da colture limbus-cornea (utilizzati per entrambi donatori non viventi di cornee).



Handwritten signature and initials.



Questa analisi ha rivelato almeno 30 geni selettivamente espressi nelle cellule dell'epitelio congiuntivale:

3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
2	Gene	FPKM_C1	FPKM_C2	FPKM_C3	FPKM_C4	FPKM_C5	FPKM_C6	Mean count	log2(FC)	Raw p-value	Adjusted p-val	Categori
7	PSCA	181488	288427	252614	114173	244371	373521	155623395	-1.1922841	3.4E-43	1.0E-41	TOP 30 Conjuntiva
15	APOL2	232317	19195	421037	283847	277820	331684	2821224455	-2.35500724	1.0E-33	2.12E-32	TOP 30 Conjuntiva
45	APOL1	620743	753690	238160	788421	118717	183132	2562516632	-2.92990331	1.0E-24	6.17E-22	TOP 30 Conjuntiva
12	KIF11	121405	482134	847311	889782	123077	11181	1091724437	-1.02819326	2.17E-25	1.00E-20	TOP 30 Conjuntiva
17	PADI1	212483	15384	118455	22974	2183	323728	684203505	-2.20225738	1.0E-03	1.93E-30	TOP 30 Conjuntiva
18	SERPINC1	123073	297117	350944	8543075	339829	632240	3272014012	-1.10690187	6.48E-02	6.48E-29	TOP 30 Conjuntiva
111	FOXA1	121624	124893	34077	198067	147822	23045	6962034881	-2.29722958	6.83E-03	3.00E-20	TOP 30 Conjuntiva
144	PIP	24844	26103	1648535	198687	83892	81043	3928317622	-1.2011897	2.82E-03	2.18E-30	TOP 30 Conjuntiva
181	INFP2	112381	939308	135072	174164	870398	2084	1502778543	-1.98193777	2.60E-01	6.78E-12	TOP 30 Conjuntiva
219	VXRC	189786	838437	242216	128916	137127	1104	1878818289	-1.8161828	3.24E-11	1.93E-18	TOP 30 Conjuntiva
249	SOX1	522473	827966	8287474	8450717	838227	8282203	319174256	-1.15229713	1.01E-10	2.01E-104	TOP 30 Conjuntiva
252	TSLP	731087	644731	1268373	112128	848822	888286	301831282	-2.50118449	1.04E-01	2.10E-24	TOP 30 Conjuntiva
276	KIAA159	51334	605332	11932	15962	13618	14182	836858468	-1.605118032	1.29E-31	2.92E-33	TOP 30 Conjuntiva
278	IDO1	444235	338417	0	8282214	838109	1142816	1083819273	-1.201845269	6.60E-05	1.83E-21	TOP 30 Conjuntiva
279	EPAN2	361881	224186	3473732	188165	322389	6386648	176319808	-2.895911469	2.86E-21	1.84E-21	TOP 30 Conjuntiva
317	PEO3	332312	124494	188917	821987	838481	810721	251154732	-2.4301910	3.27E-11	1.24E-15	TOP 30 Conjuntiva
404	SILCAH1	31818	28218	1228708	828187	828421	842730	831512581	-2.45710881	8.07E-09	6.80E-23	TOP 30 Conjuntiva
428	HES5F2	295338	30818	828204	827989	840231	848316	147721073	-2.17818654	7.88E-08	6.00E-23	TOP 30 Conjuntiva
479	CYP26A1	281832	834273	582639	8182243	806341	8083852	583842496	-2.1824356	4.21E-16	1.77E-12	TOP 30 Conjuntiva
482	FOXO2	281832	260452	848288	848503	830859	828982	128022723	-2.20128018	3.02E-11	1.93E-18	TOP 30 Conjuntiva
483	IBF2	254823	344812	341988	818164	43728	43728	251066483	-2.575097029	1.40E-11	5.92E-17	TOP 30 Conjuntiva
505	CECR1	248425	252417	323314	837989	838918	141810	298188888	-2.26090681	4.88E-09	3.72E-28	TOP 30 Conjuntiva
507	VCAH1	233497	320372	819321	848953	848304	8227734	191041459	-2.283723319	3.85E-05	2.18E-21	TOP 30 Conjuntiva
510	PADI3	184284	81121	18775	850771	848318	828282	187172213	-1.884481864	6.00E-11	1.88E-10	TOP 30 Conjuntiva
551	IRAK3	171827	23018	1376033	883785	838182	831822	308018857	-1.8118133	1.01E-14	2.33E-12	TOP 30 Conjuntiva
558	TMEM165	18170	18139	17691	141227	142893	834012	873406853	-1.84827066	1.43E-04	2.38E-09	TOP 30 Conjuntiva
578	CZCHD4	43882	124181	8068101	828176	8271931	80389	710888188	-2.7432273	3.00E-03	1.85E-20	TOP 30 Conjuntiva
678	LRRH1	128671	19392	8028781	828811	818701	8185018	182633989	-1.84080181	4.20E-17	1.80E-14	TOP 30 Conjuntiva
715	SILCB44	897881	137473	8082172	8308024	8087866	818042	81229013	-2.20888124	2.71E-18	1.37E-15	TOP 30 Conjuntiva
728	PPP1R3A	828581	822084	8003683	8422218	8018528	8071786	48482212	-1.937848577	2.10E-13	7.95E-11	TOP 30 Conjuntiva

### Selezione dei 10 geni più espressi

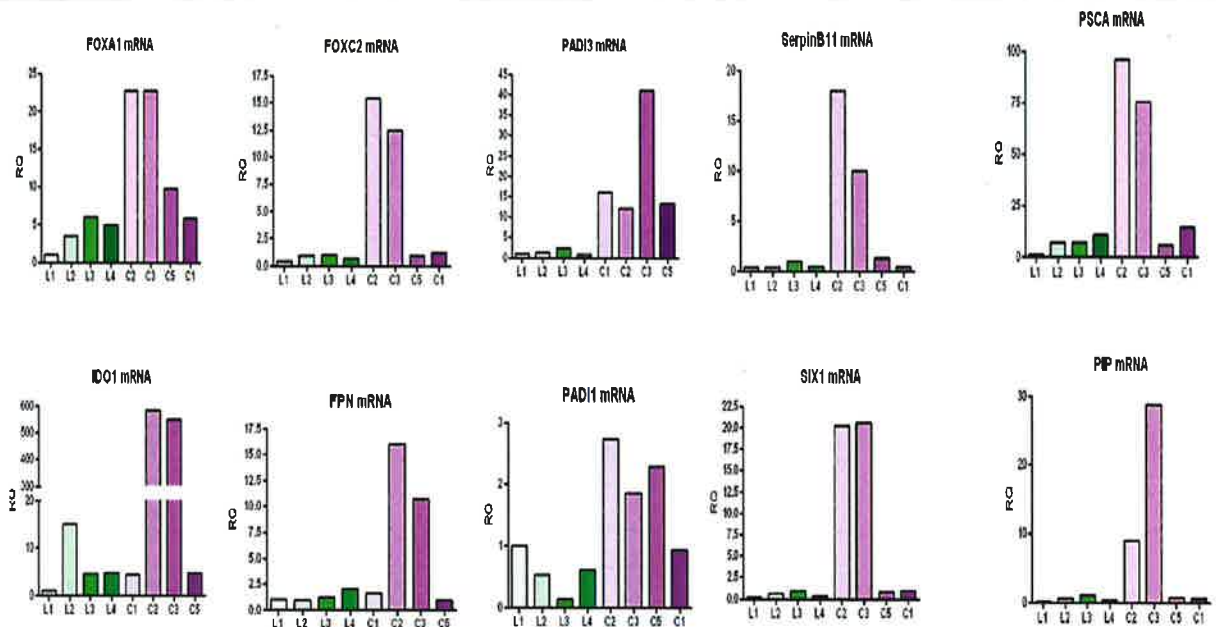
I 30 geni selezionati nell'analisi precedente sono stati validati tramite analisi in Real Time PCR (livello di mRNA del gene). Tale analisi ha permesso di selezionare tra i 30 geni, i 10 maggiormente espressi nei campioni congiuntivali rispetto a quelli limbus-cornea.

Tali geni sono risultati:

FOXA1, FOXO2, PADI3, IDO1, FPN, PADI1, SerpinB11, PSCA, SIX1, PIP

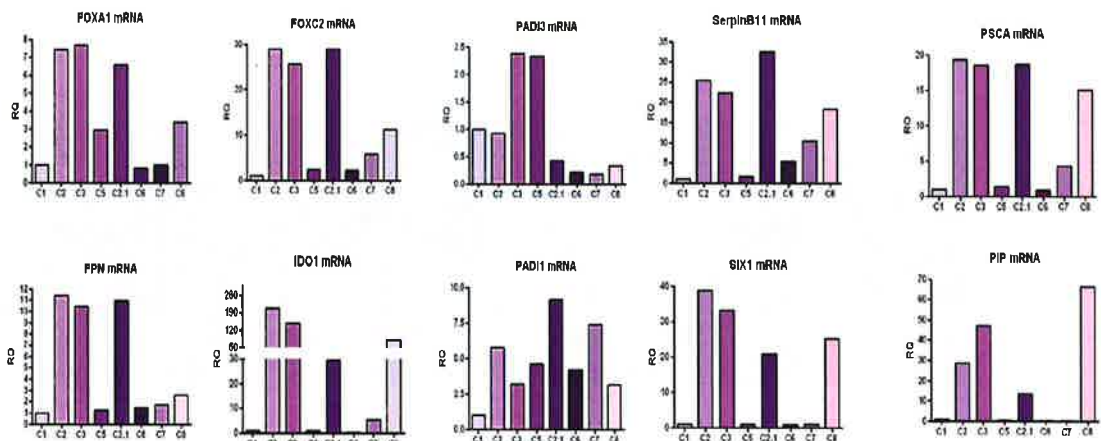
L'espressione di questi geni è stata testata su 4 differenti colture primarie congiuntivali provenienti da donatore. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti su 4 differenti strainings limbus-corneali provenienti da 4 donatori diversi.

Va ricordato che le colture limbus-corneali allestite presentano sempre una contaminante congiuntivale dovuta all'impossibilità di isolare chirurgicamente il fronte limbale. Nell'allestire questi test di identità ci si aspettava pertanto di trovare sempre una bassa espressione di marcatori congiuntivali anche sui campioni limbus-corneali.



### Analisi su nuovi campioni e selezione da 10 a due geni putativi

Per confermare il dato precedentemente ottenuto, è stata eseguita nuovamente una Real Time PCR analysis su 4 nuovi campioni congiuntivali. I dati ottenuti sono stati correlati a quelli ottenuti dai 4 campioni congiuntivali analizzati nella precedente trince di esperimenti.



Al fine di validare il dato ottenuto tramite RT-PCR, i 4 nuovi campioni congiuntivali sono stati poi ulteriormente analizzati anche tramite Western Blotting analisi (dato non mostrato).

Tra i 10 possibili top candidati identificati nello screening RNAseq e validati tramite ad RT-PCR analysis e western blotting (da una lista allargata di 30 candidati), siamo riusciti alla fine ad identificare 1 putativo marcatore di cellule congiuntivali che meriterebbe uno studio più approfondito, ossia:

**FOXA1- forkhead box A1** (fattore di trascrizione): This gene encodes a member of the forkhead class of DNAbinding proteins. These hepatocyte nuclear factors are transcriptional activators for liverspecific transcripts such as albumin and transthyretin, and they also interact with chromatin. Others functions:  
 -Transcription factor binding -Epithelial cell maturation -Gland development -Goblet cell development (Diuya et al. 2011)  
 - "Forkhead box transcription factors Foxa1 and Foxa2 are important regulators of Muc2 mucin expression in intestinal epithelial cells" Maria Van de Sluis et al. Biochem Biophys Res Commun 2008  
 - "Foxa1 and Foxa2 Control the Differentiation of Goblet and Enteroendocrine L- and DCells in Mice" Diaza Z. et al. Gastronenterology 2009

*SP*

A questo punto ulteriori studi si rendono necessari per confermare l'affidabilità di questo marcatore e la sua possibile applicazione ad ampio spettro. Sarebbe infatti assai interessante se espressione selettiva/preferenziale dell'anticorpo FOXA1 vista per analisi molecolare (RNA, Proteina) venisse confermata anche tramite altri saggi quali quello immunologico.

### B) Messa a punto di un protocollo per immunofluorescenza di FOXA1

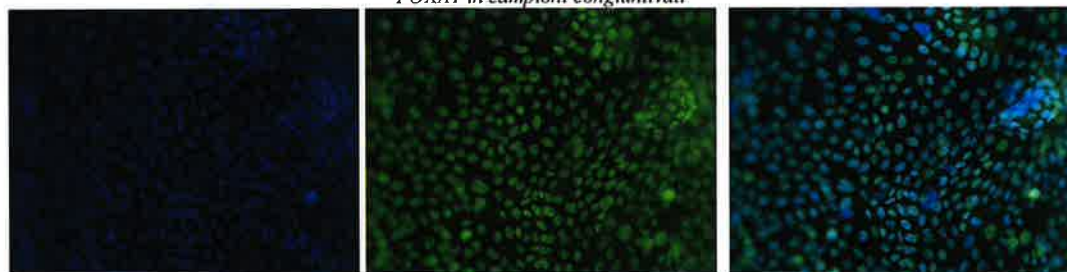
Abbiamo testato le seguenti condizioni a 3 variabili incrociate (fissaggio, concentrazione primario, condizioni di incubazioni del primario):

Condizione	VARIABILI TESTATE			RISULTATI
	Fissazione	Diluizione Ac	Incubazione Ac	
1 controllo	pfa	1:500	+4°C Over Night	Tanto sporco (come in esperimenti precedenti)
2	pfa	1:500	1h 37°C	<b>OK</b>
3	pfa	1:100	+4°C Over Night	Tanto sporco
4	metanolo	1:500	+4°C Over Night	Non funziona
5	metanolo	1:500	1h 37°C	
6	metanolo	1:100	+4°C Over Night	

Le 6 condizioni sono state ripetute sia su Citocentrifugati cellulari (cellule dissociate) che su Chamber Slide (quindi su colonie di cellule ossia su colture cellulari stoppate in fase di crescita e quindi prima del raggiungimento della confluenza). Le 6 condizioni sono inoltre state ripetute su una strain di cellule congiuntivali e su una di cellule limbal.

La condizione ideale è risultata la 2: perfetto staining nucleare sui campioni congiuntivali. La specificità è stata confermata su 3 differenti campioni di colture congiuntivali.

*FOXA1 in campioni congiuntivali*



**DAPI**

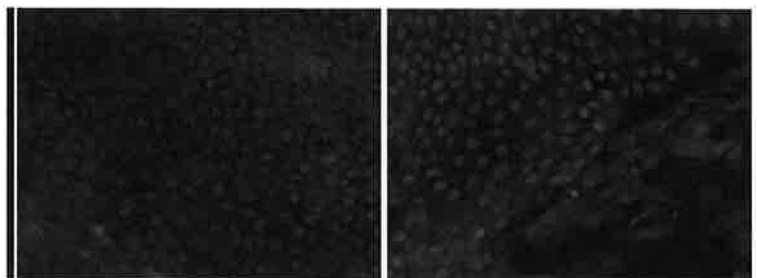
**FOXA1**

**merge**

Permangono ancora dei dubbi sullo staining su colture limbus-corneali: tutte e tre le strains testate hanno evidenziato una parziale positività all'anticorpo che andrebbe ad inefficiare l'ipotesi iniziale di specificità di FOXA1 per le cellule congiuntivali! Da considerare tuttavia che le colture limbus-corneali da noi utilizzate non sono colture "pure": la tecnica manuale di isolamento della biopsia limbale non può mai garantire la presenza di tracce di tessuto congiuntivale. Questo potrebbe giustificare la contaminante osservata (o per lo meno in parte).

Tuttavia va anche aggiunto che la contaminante osservata sembra presentare 2 differenti tipi di espressione, una nucleare e una citoplasmatica.





Espressione citoplasmatica di FOXA1

Espressione nucleare di FOXA1

Test immunohistologici su sezioni di cornea sono ancora in corso per la verifica della specificità di questo anticorpo.

## 6. Determinazione di test per Controllo Qualità del prodotto finito

Una volta definito lo scaffold ideale (paragrafo 3) ed individuate le condizioni di coltura più opportune (paragrafo 2), è stato necessario definire quali fossero i test di Controllo Qualità. Come anticipato (paragrafo 3.2), un contro-campione del lembo viene lasciato in laboratorio per l'allestimento dei test richiesti ossia:

- (I) Identità del prodotto
- (II) Potency
- (III) Identificazione e quantificazione di eventuali contaminanti

È stato deciso che la tecnica da utilizzare è quella di immunofluorescenza utilizzando marcatori specifici da applicare su citocentrifugati cellulari ottenuti dalle cellule dissociate dal lembo contro-campione (come descritto in paragrafo 3) e confrontati con l'espressione ottenuta da citocentrifugati di cellule di linee cellulari usate come controllo.

### I. Identità del prodotto

In attesa di definire nuovi e più specifici marcatori congiuntivali (paragrafo 5), l'espressione dei tradizionali marcatori congiuntivali è stata verificata e quantificata. I test condotti hanno evidenziato la seguente espressione dei marcatori testati: K19  $98.5 \pm 0.5\%$ ,  $p > 0.05$ , K13 ( $9.2 \pm 3\%$   $p = 0.014$ ) e Mucl ( $16.2 \pm 2.4\%$   $P = 0.037$ ). K19 risulta pertanto essere il marcatore ideale per l'identificazione dell'identità cellulare.

### II. Potency

La valutazione della *potency* delle cellule congiuntivali verrà determinata mediante quantificazione del contenuto di cellule staminali. La determinazione delle cellule staminali avverrà attraverso quantificazione dell'espressione della proteina p63 quale "marcatore delle cellule staminali epiteliali". La determinazione della percentuale di cellule "p63 bright" verrà determinata confrontando l'espressione dei campioni con quella ottenuta da una linea di cheratinociti umani immortalizzati usata come controllo positivo. L'analisi verrà eseguita mediante microscopio \_\_\_\_\_. Il software permetterà di determinare l'intensità massima di ogni cellula e di confrontare l'espressione ottenuta dal controllo positivo con quella del campione. Sarà così possibile definire l'espressione dei campioni (intesa come percentuale di cellule che esprimono un "p63 bright"). Sono attualmente ancora in corso i test relativi alla raccolta dati dell'espressione di p63 dei campioni.

### III. Identificazione e quantificazione di eventuali contaminanti

Due le principali tipi di contaminanti che si ritiene opportuno investigare:

- a. Fibroblasti umani congiuntivali provenienti dalla biopsie ed espansi in coltura

*[Handwritten signature]*  
SA

b. Fibroblasti murini letalmente irradiati proveniente dal residuo della cocoltura con Feeder Layer murino.

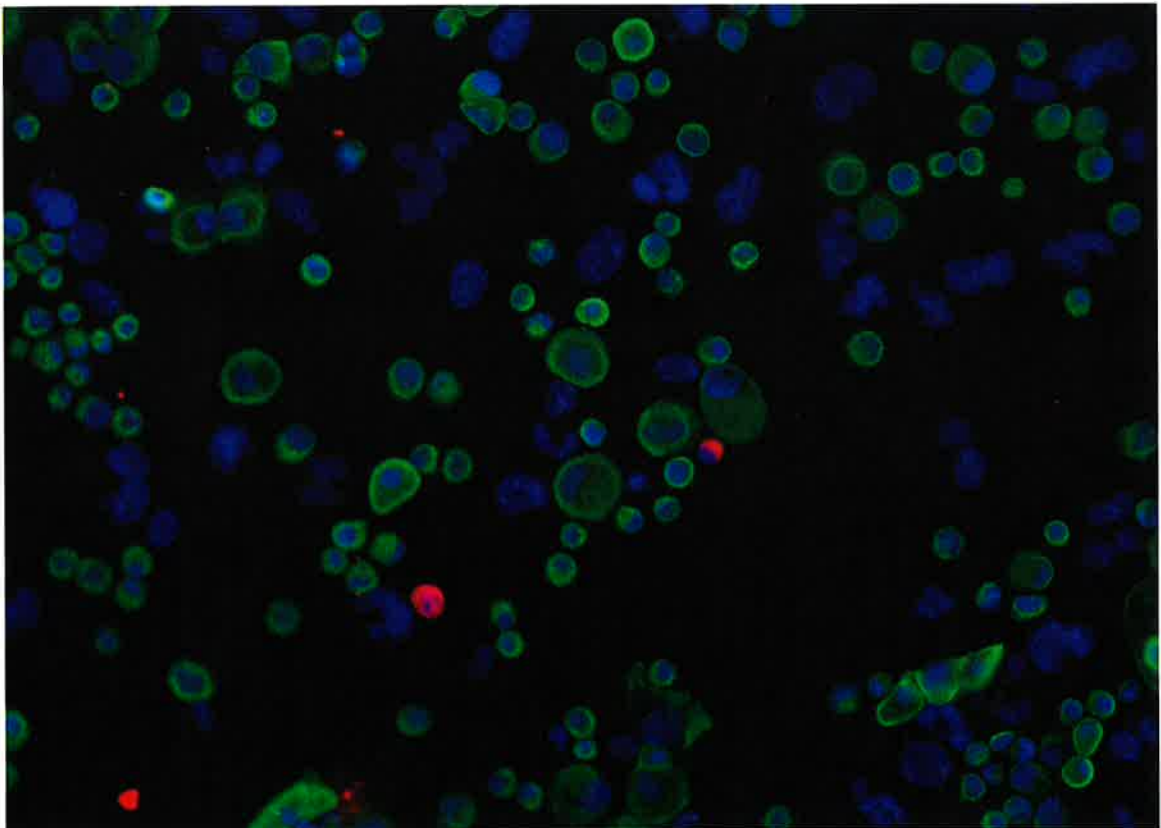
Per la verifica della contaminante di fibroblasti umani congiuntivali sono stati testati differenti marcatori storicamente noti in letteratura per la determinazione di fibroblasti umani di diversa natura ma non ancora testati per l'identificazione specifica di fibroblasti congiuntivali:

- $\alpha$ SMA
- CD34
- Nestin
- Vimentin
- Sox2
- Sox10

I citocentrifugati cellulari allestiti dai controcampioni sono stati confrontati con l'espressione ottenuta citocentrifugati da una linea di fibroblasti umani congiuntivali (controllo positivo) e con quella ottenuta da una linea di cheratinociti immortalizzati (controllo negativo). Poiché alcuni di questi marcatori danno segnali differenti a seconda della maturità in coltura dei fibroblasti, i controcampioni sono stati comparati sia all'espressione di fibroblasti umani a basso passaggio, sia all'espressione di fibroblasti umani ad alto passaggio.

I test allestiti finora stanno indirizzando la scelta verso l'anticorpo Nestin: Nestin sembra infatti non essere espresso dalle cellule del Feeder layer e da quelle epiteliali (linea immortalizzata) ed essere invece fortemente espresso dal 95-100% dalle cellule fibroblastoidi umane. Se questo venisse confermato la contaminante delle cellule del Feeder Layer verrebbe rilevata come le cellule negative sia al marcatore dei cheratinociti congiuntivali K19 che al marcatore Nestin dei fibroblasti congiuntivali: allestendo una doppia colorazione K19/Nestin sarà possibile determinare in un'unica sessione sia l'identità (% di cellule positive per K19) che la contaminante di fibroblasti congiuntivali endogeni (% di cellule positive per nestin) che la contaminante del Feeder Layer (% di cellule negative sia per K19 che per nestin). In aggiunta, per quanto riguarda la determinazione delle cellule murine, la morfologia granulare del nucleo delle cellule del Feeder Layer fa da controverifica.

I test finora descritti e da confermare hanno portato ad oggi ad un risultato di questo tipo, dove in verde sono marcati i cheratinociti congiuntivali, in rosso le cellule fibroblastoidi umane mentre le cellule negative rappresentano la presenza di una contaminante di Feeder Layer:



Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

**Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate**

Bertolin M, Breda C, Ferrari S, Van Acker SI, Zakaria N, Di Iorio E, Migliorati A, Ponzin D, Ferrari B, Lužnik Z, Barbaro V. Optimized Protocol for Regeneration of the Conjunctival Epithelium Using the Cell Suspension Technique. Cornea. 2018 Jun 19. doi: 10.1097/ICO.0000000000001670. [Epub ahead of print]

Data 27 settembre 2018

Il Responsabile del Progetto

  
\_\_\_\_\_

Il Legale Rappresentante

  
\_\_\_\_\_

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

  
\_\_\_\_\_

