



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

**Rendiconto di spesa  
Fondi 5 per mille ANNO 2016  
Enti della Ricerca Sanitaria**

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:  
DEGENERAZIONE MACULARE DELLA RETINA: SVILUPPO DI  
UN APPROCCIO TERAPEUTICO BASATO SU INNESTO DI  
CELLULE DELL'EPITELIO PIGMENTATO RETINICO**

**Abstract dei risultati ottenuti:**

La degenerazione maculare legata all'età (DMLE), o degenerazione maculare senile (DMS), è una delle patologie più gravi che colpiscono l'occhio, e provoca il danneggiamento della macula, la parte centrale della retina, che è cruciale nel funzionamento dei fotorecettori e responsabile della visione dei dettagli. A causa della patologia, la visione centrale viene compromessa in modo grave, mentre la periferica può anche essere mantenuta. La DMS rappresenta la prima causa di ipovisione e cecità nei Paesi occidentali e colpisce principalmente i soggetti di età superiore ai 65 anni. In Italia, si stima che circa un milione di persone siano affette da questa malattia, di cui si distinguono due forme: la forma secca (o atrofica), che è la più diffusa, e la forma umida (o essudativa).

- DMLE secca o atrofica. È la forma più frequente (80-90% di tutti i casi); solo negli stadi più avanzati (10-20% dei casi) può causare una marcata riduzione della visione come conseguenza dell'atrofia centrale. Le alterazioni atrofiche sono solitamente precedute dalla presenza di drusen, ovvero accumuli di materiale di scarto del metabolismo dell'epitelio pigmentato retinico (lo strato più esterno della retina), e da alterazioni dell'epitelio pigmentato retinico stesso. Tende a peggiorare ma lentamente. Può però progredire nella forma più grave, la DMLE neovascolare.
- DMLE umida o neovascolare. Pur essendo meno frequente, è la forma più invalidante, responsabile dell'80-90% dei casi di marcata riduzione dell'acuità visiva nella DMLE. Spesso preceduta da drusen e da alterazioni dell'epitelio

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

pigmentato retinico (EPR), è caratterizzata dalla formazione di vasi anomali che causano perdite di fluido e/o sangue con conseguente danno alla retina. Lo stadio terminale è rappresentato da una cicatrice. L'evoluzione di questa forma può essere molto rapida (anche 48-72 ore).

L'Epitelio Pigmentato Retinico (EPR) è lo strato più esterno, interposto tra la membrana basale della coroide, la membrana di Bruch (lamina di soli 2-4  $\mu\text{m}$ , che è di pertinenza della coroide), e lo strato esterno dei fotorecettori (neuroretina ed il primo strato nervoso della retina formato da coni e bastoncelli. L'epitelio pigmentato è costituito da un unico strato di cellule epiteliali contenenti un pigmento di colore scuro (fuscina) che assorbe la luce, impedendone la diffusione. L'epitelio pigmentato è deputato a diverse altre funzioni: garantisce gli scambi di ossigeno e nutrienti (glucosio, aminoacidi ecc.) e metaboliti di scarto tra i fotorecettori e la coroide; fagocita le membrane dei dischi più esterni, garantendo un rinnovamento delle strutture recettoriali e costituisce la barriera emato-retinica, la quale modula gli scambi fra il sangue ed i tessuti retinici. Lo strato pigmentato della retina partecipa, inoltre, al metabolismo dei fotorecettori, immagazzinando e rilasciando vitamina A (retinale) per il rinnovo dei pigmenti visivi (nota: senza l'epitelio pigmentato, coni e bastoncelli non sarebbero in grado di rigenerare i fotopigmenti).

La membrana di Bruch è lo strato più interno della coroide posta direttamente sotto all'epitelio pigmentato retinico e rappresenta un filtro, costituito da fibre collagene ed elastiche, attraverso il quale avvengono gli scambi metabolici tra l'EPR e la coroide (la parte vascolare dell'occhio).

Durante l'invecchiamento le cellule dell'EPR non sono più in grado di metabolizzare e i prodotti di degradazione iniziano ad accumularsi a livello della membrana di Bruch, determinando dapprima un ispessimento diffuso, noto come deposito basale lineare (BDL) e successivamente dei depositi circoscritti, i drusen. L'ispessimento della membrana di Bruch determina un ostacolo alla permeabilità dei fattori nutritivi, che a sua volta causa sofferenza dei fotorecettori (insufficienza trofica nutrizionale); con un peggioramento dei depositi e della funzione della membrana di Bruch, dando origine alla degenerazione maculare atrofica. L'alterazione della membrana di Bruch scatena l'insorgere di un processo infiammatorio, con la liberazione di granuli enzimatici dai macrofagi che possono provocare rotture della membrana di Bruch, e dare l'avvio a uno stimolo vasoproliferativo con formazione di neovasi, i quali originano dalla coroide ed invadono gli strati retinici, determinando lo sviluppo della degenerazione maculare essudativa.

Le possibilità di cura attualmente disponibili per la degenerazione maculare senile atrofica è rallentare la progressione della malattia modificando il proprio stile di vita, riducendo i fattori di rischio e scegliendo una dieta molto ricca di frutta e verdura, eventualmente accompagnata dall'assunzione di integratori a base di zinco e vitamine antiossidanti (vitamina E, C e beta-carotene). Nel caso della forma essudativa sono possibili i seguenti tipi di trattamento: i farmaci diretti contro il fattore di crescita VEGF, coinvolto nella neovascolarizzazione, come Lucentis, Macugen e Avastin, che possono essere somministrati come monoterapia oppure in combinazione con la terapia fotodinamica, con somministrazione di un farmaco fotosensibilizzante che viene attivato da una luce di una determinata lunghezza d'onda. Inoltre, esistono le iniezioni intravitreali di triamcinolone, la fotocoagulazione laser, la traslocazione retinica, e non ultima, l'utilizzo di cellule staminali che potrebbero fornire nuove cellule funzionali di EPR da trapiantare in sostituzione di quelle degenerate e negli ultimi anni sono già stati valutati diversi protocolli clinici per valutarne la sicurezza e l'efficacia.

Lo scopo del progetto è la messa a punto di un device su cui applicare porzioni di membrana amniotica decellularizzata sulle quali verranno seminate cellule dell'EPR. Una volta validato tale device permetterà di trapiantare cellule dell'EPR nello spazio sub-retinico della macula, a stretto contatto con i fotorecettori malfunzionanti e sostituendo di fatto l'EPR danneggiato.

Il progetto si divide in 3 parti.

Come primo step, abbiamo proceduto con la realizzazione di un device intermedio che facilitasse la distensione della membrana amniotica affinché il successivo processo enzimatico risultasse ottimale. Questo device era inizialmente composto da tre elementi tenuti insieme da viti relativamente facile da montare in stato di sterilità e che consentiva alla membrana amniotica di essere ben tesa, parametro importante per il successo del trattamento con enzimi su tutta la superficie. In seguito a diverse prove, abbiamo riscontrato la possibilità di ridurre a 2 componenti il device, facilitando in questo modo il montaggio dello stesso e mantenendo inalterata la sua funzionalità.

Eseguito il processo enzimatico e controllata la trasparenza della membrana amniotica trattata o ultrathin (Fig.1), il tessuto è pronto per essere montato sul device finale, un anello costituito da materiale biodegradabile, la cui circonferenza è tale da coprire la zona affetta della macula (Fig.2).

In questo ultimo passaggio, stiamo effettuando ancora delle prove, per rilevare il metodo più agevole per il montaggio e allo stesso tempo limitando il rischio di danneggiamento della membrana ultrathin, che essendo molto sottile, risulta molto fragile.



Fig.1



Fig.2

Abbiamo iniziato inoltre, con le prime prove per la messa a punto del device responsabile dell'inoculo dell'anello veicolante le cellule dell'epitelio pigmentato nella retina tra lo strato dei fotorecettori e la coroide.

La seconda parte è la messa a punto dello scaffold. Una delle prime opzioni considerate come potenziale scaffold su cui far crescere le cellule dell'EPR è stata la membrana di Bruch's. Ottenere però delle membrane di Bruch's da bulbi oculari di donatore che siano integre e non degradate potrebbe però essere problematico. La membrana amniotica invece risulta più idonea ed inoltre è già utilizzata in oftalmologia come patch nei casi di ulcerazione corneale. Inoltre, in applicazioni di medicina rigenerativa è già estensivamente utilizzata per la crescita di cellule epiteliali corneali, congiuntivali e della mucosa orale per il trattamento di pazienti affetti da deficit di cellule staminali limbo-corneali. La membrana amniotica è stata acquistata dalla locale banca dei tessuti e, a differenza degli altri gruppi e usi, è stata trattata con protocolli di de-cellularizzazione in modo da standardizzare la variabilità tra lotto e lotto, aumentarne la trasparenza e ridurre lo spessore a 30  $\mu\text{m}$ .

Abbiamo iniziato testando il protocollo proposto da Zhang L e collaboratori (Zhang L et al. An ultra-thin amniotic membrane as carrier in corneal epithelium tissue-engineering. Scientific Reports 2016: 6: 21021), che prevede la rimozione dello strato epiteliale utilizzando prima l'EDTA 0.02% e, in caso di necessità, lo cell scraper per eliminare i residui dell'epitelio; per quanto riguarda la rimozione dello strato spongy, invece, il protocollo prevede l'uso dell'enzima Collagenasi IV.

Dopo diversi tentativi, abbiamo visto che l'EDTA eliminava faticosamente lo strato epiteliale, mentre l'utilizzo dello cell scraper provocava delle lesioni alla membrana

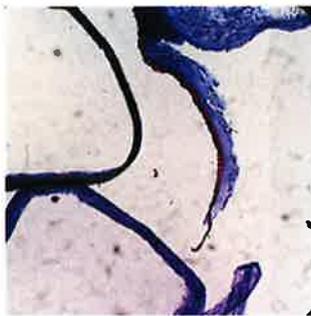
Handwritten blue ink marks, possibly initials or a signature, located in the bottom right corner of the page.

amniotica, per tale motivo, abbiamo deciso di cambiare protocollo di de-epitelializzazione e di impiegare l'enzima termolisina da *Geobacillus Stearothermophilus*, come proposto da Hopkinson A e collaboratori (Hopkinson A et al. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. Tissue engineering Part C Methods 2008, 14(4):371-81). Abbiamo rilevato, in questo caso, che l'enzima rimuove in modo efficace lo strato epiteliale, in quanto separa completamente le cellule epiteliali dalla membrana, evitando l'uso dello cell scraper.

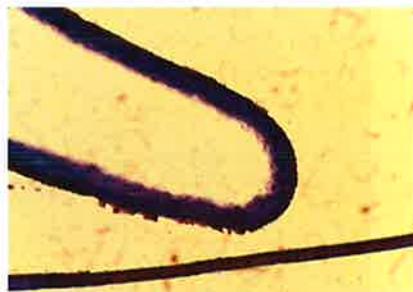
Continuando con gli esperimenti, però, abbiamo notato che la Termolisina tende a danneggiare la membrana basale (la basement membrane), che separa lo strato epiteliale dal resto della membrana amniotica, suggerendo una proteolisi aggressiva, considerazione descritta anche dal gruppo di Trosan P. (Trosan P et al. The enzymatic de-epithelialization technique determines denuded amniotic membrane integrity and viability of harvested epithelial cells. Plos One 2018, Mar 27;13(3).

L'articolo di Trosan P. propone, come valida alternativa alla Termolisina, l'utilizzo di EDTA 0.25% insieme all'enzima Tripsina 0.1% di origine porcina.

Abbiamo deciso, quindi, di effettuare alcune prove per testare l'alternativa e testare allo stesso tempo una riduzione del tempo di azione della termolisina (9minuti) come proposto dal ricercatore, confermando la validità di entrambi i trattamenti (Fig.3 e Fig.4).



(Fig. 3)



(Fig. 4)

Analizzando, però, a livello molecolare gli effetti delle due trattamenti sulle membrane amniotiche e confrontando i risultati ottenuti con una membrana di controllo (Fig.5), abbiamo notato che la Termolisina, con un tempo di incubazione minore, rimuove efficacemente lo strato epiteliale (Fig.6), mantenendo però intatta la membrana basale, fondamentale per l'adesione delle cellule di EPR, mentre la membrana trattata con la Tripsina/EDTA (Fig.7), presenta ancora cellule dell'epitelio e, allo stesso tempo, una membrana basale danneggiata.

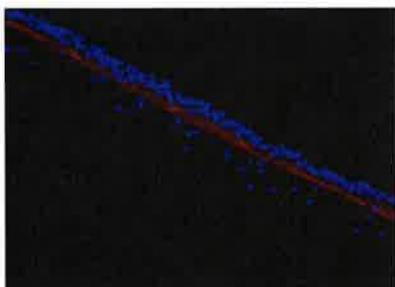


Fig.5 Controllo

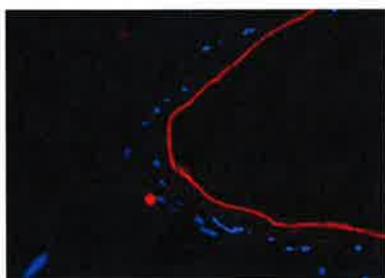


Fig.6 Termolisina

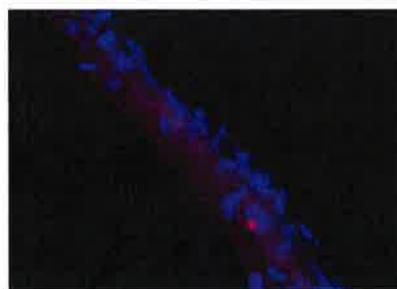


Fig.7 T/E

Per quanto riguarda invece l'enzima Collagenasi IV, abbiamo confermato la sua efficienza

nella rimozione dello strato spongy, ma che, a differenza dell'enzima Termolisina dove il tempo di reazione è fisso a 8 minuti + 8 minuti o 9 minuti in base al protocollo, e della coppia Tripsina/EDTA fisso a 30 minuti, il trattamento con la Collagenasi IV può variare da 60 minuti a 90 minuti, in base allo spessore dello strato spongy delle membrane amniotiche.

Alla fine del processo, comunque, le membrane risultano per lo più sottili e trasparenti, dove si può facilmente notare la differenza tra la parte trattata enzimaticamente e la parte non trattata (Fig.8 e Fig.9).



Fig.8



Fig.9

L'ultima, ma non meno importante parte è la messa a punto delle colture di cellule EPR. Inizialmente il progetto prevedeva l'utilizzo delle cellule MA09-hRPE, cellule di derivazione embrionale, sottoposte a protocolli di differenziamento in cellule dell'EPR. Tali cellule sono già state utilizzate negli USA per il trattamento della degenerazione maculare retinica. La scelta di tali cellule era stata motivata dal fatto che non sembrano dare segni di iperproliferazione, tumorigenicità o rigetto pertanto risulterebbero ideali per la crescita sullo scaffold di membrana amniotica e per il successivo trapianto.

Essendo però tali cellule preziose (ed economicamente dispendiose), gli esperimenti di messa a punto delle condizioni di crescita e dei terreni da sviluppare, sono stati eseguiti utilizzando una linea cellulare, la linea ARPE-19, che sembrava ideale per i nostri scopi di ricerca & sviluppo.

Dopo diverse settimane in coltura, però, tali cellule rimanevano morfologicamente fibroblastoidi e non sviluppavano la formazione di granuli di melanina tipici delle cellule EPR.

Consultando la letteratura, abbiamo osservato che la differenziazione (il passaggio da mesenchimali ad epitelio) delle ARPE-19 è una questione lunga ed articolata dove tanti fattori influiscono su questo processo, come per esempio, il tempo in coltura (Tian J et al., The expression of native and cultured RPE grown on different matrices. 2004 Apr 13, *Physiol Genomics*.;17(2):170-82.) od il terreno utilizzato (Ahmado A et al., Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. 2011 Sep 9, *Invest Ophthalmol Vis Sci*.;52(10):7148-59.).

Per tale motivo, per poter valutare se le cellule EPR differenziate siano in grado o meno di aderire sulla membrana ultrathin, abbiamo deciso di estrarre le EPR da 2 bulbi oculari da donatore e, dopo una settimana in coltura su plastica (multiwell), di piastrare le cellule su membrana amniotica (vedi Fig. 10).



Fig. 10

h  
SF

Come si può notare dalla foto le cellule hanno aderito e hanno mantenuto la differenziazione.

Avendo però ponderato l'importanza della linea cellulare ARPE-19, come controllo positivo nell'individuazione e successivamente nell'effettuazione dei controlli di qualità, abbiamo deciso di continuare a valutare varie condizioni di coltura per tali cellule, trovando infine il protocollo corretto per la loro differenziazione.

Il protocollo consiste nel piastrare ad alta densità le cellule su filtri Transwell (Fig.11), trattati precedentemente con laminina, una glicoproteina multifunzionale presente nella membrana di Bruch e nella membrana basale della membrana amniotica, in grado di favorire l'adesione delle cellule ARPE-19.

L'utilizzo di filtri Transwell è dettato dal fatto che formano due compartimenti separati, creando l'ambiente ideale per le cellule di EPR fino al raggiungimento della loro completa differenziazione.

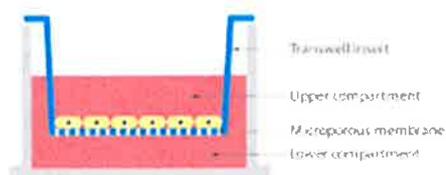


Fig. 11

La differenziazione delle cellule EPR si può analizzare attraverso molti fattori, il più evidente per esempio è la pigmentazione: i primi segni di pigmentazione si possono notare già dal secondo/terzo mese in coltura (Fig. 12), fino ad una pigmentazione più marcata che si raggiunge attorno ai quattro mesi in coltura (Fig. 13, Fig.14 e Fig. 15).



Fig. 12



Fig. 13



Fig.14



Fig.15

La pigmentazione si può rilevare anche mediante immunofluorescenza, valutando la presenza della proteina PMEL-17, una proteina integrale di membrana, espressa esclusivamente in cellule pigmentate (Fig.16).

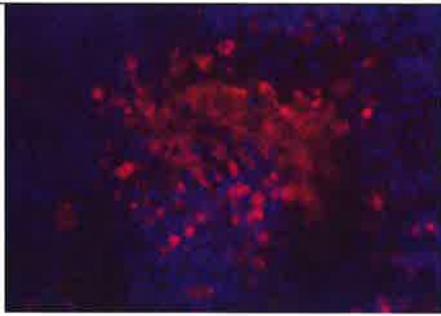


Fig. 16

Un secondo fattore che indica l'avvenuta differenziazione, è la formazione delle Tight Junctions, giunzioni fra cellule epiteliali adiacenti in una banda stretta, fondamentali per lo svolgimento di due funzioni vitali, in quanto formano una barriera in grado di limitare il passaggio di molecole e ioni attraverso lo spazio tra le cellule, che abbiamo documentato ricercando la proteina ZO-1, necessaria per la creazione di queste importanti giunzioni, Fig. 17.

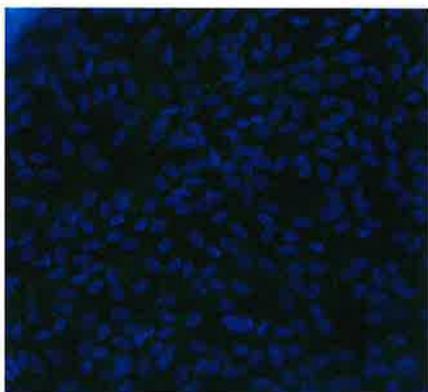


Fig. 17

Abbiamo eseguito, inoltre, i primi test per il rilevamento di marcatori specifici dell'epitelio retinico pigmentato, in particolare abbiamo analizzato la presenza della proteina RPE65 (Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein), una proteina espressa specificatamente dalle cellule di epitelio pigmentato retinico completamente differenziato, responsabile del ciclo del 11-cis-retinolo durante la fototrasduzione. (Fig.18).



Fig. 18

Ulteriori primi esperimenti sono stati effettuati per la valutazione della produzione di importanti fattori di crescita come il VEGF e PEDF, da parte delle cellule EPR, mediante test ELISA, confermando la secrezione di entrambi i fattori dalle cellule di EPR da donatore e dalle cellule di ARPE-19, mantenute in coltura per 4 mesi.

E' nostra intenzione ripetere tutti gli esperimenti sopracitati per convalidare i loro protocolli e di aggiungere nuovi controlli di qualità, per assicurare che le cellule EPR che abbiamo in coltura siano completamente differenziate e che svolgano tutte le funzioni che svolgono in vivo.

Tale ricerca è necessaria per garantire che le cellule che saranno trapiantate sui pazienti,

Handwritten signature or initials in blue ink.

siano cellule di epitelio pigmentato retinico completamente differenziate e non tumorigeniche.

Dal punto di vista cellulare, abbiamo scongelato e messo in coltura le cellule della linea embrionale Wa09 (H9), acquistata in sostituzione della linea MA09-hRPE, risultata essere non in vendita.

Questa linea cellulare sostitutiva è comunque valida per i nostri scopi perché è prodotta secondo normativa GMP ed è utilizzata dal gruppo guidato da Mark Humayun e David Hinton in un trial clinico in U.S.A, che hanno descritto i primi risultati nell'articolo di Amir H. Kashani et al "A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration". Science Translational Medicine. 2018, Apr 04.

La differenza fondamentale che, però, caratterizza tali cellule rispetto le cellule MA09-hRPE, è che sono cellule embrionali non differenziate e che, per essere utilizzate su pazienti, devono essere prima sottoposte a processi di differenziamento in cellule di EPR.

Le cellule Wa09 sono state messe in coltura e portate avanti per alcuni passaggi seguendo il protocollo fornito dalla ditta fornitrice, in quanto, come le cellule ARPE-19 e le cellule EPR, hanno bisogno di determinate condizioni per mantenerle embrionali indifferenziate, come l'utilizzo di particolari substrati per facilitare l'adesione e di terreni specifici (Fig. 19 e Fig. 20).



Fig.19

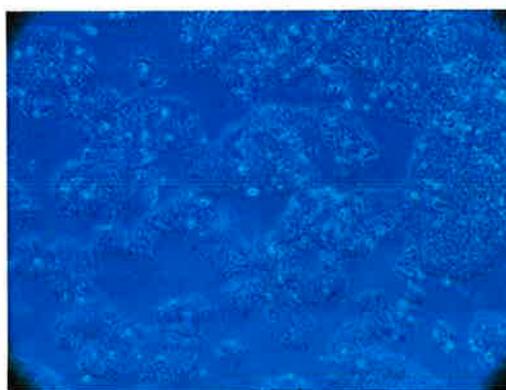


Fig.20

Una volta raggiunto il numero sufficiente di cellule embrionali Wa09, abbiamo congelato una parte per esperimenti e utilizzato il rimanente per iniziare a testare dei protocolli di differenziamento.

Tra i vari metodi di differenziamento proposti in letteratura, abbiamo deciso di focalizzarci su due in particolare, in quanto i ricercatori avevano utilizzato la nostra medesima linea cellulare embrionale:

- Hsiung et al. Retinal Pigment Epithelial cell conditioned medium enhanced the yield of RPE cells differentiated from human embryonic stem cells, J Clin Exp Pathol 2014, 5:2.;
- Biju et al. Survival and Functionality of hESC-derived retinal pigment epithelium cells cultured as a monolayer on polymer substrates transplanted in RCS rat, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016,57:2877-2887.

Entrambi i protocolli utilizzano la differenziazione "spontanea" delle cellule embrionali in cellule di epitelio pigmentato retinico, attuata attraverso l'uso di terreni di coltura "base", cioè privi di fattori di crescita particolari, lasciando che le cellule staminali embrionali si differenziassero a piacimento, andando però successivamente a selezionare, in diversi passaggi, solo le cellule ritenute EPR fino ad un completo differenziamento.

Le due differenze principali fra le due procedure consistono nell'utilizzo di diversi terreni di coltura associati a diversi substrati.

Nel protocollo di Hsiung et al. è utilizzato un terreno con siero Knock-out e con substrato il Matrigel, un preparato di membrana basale in soluzione estratta dal sarcoma di topo di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), composto da laminina, collagene IV, dall'entactina e dal proteoglicano eparan-solfato con aggiunti fattori di crescita), mentre nel protocollo di Biju

è utilizzato un terreno xeno-free con substrato la Vitronectina.

Noi, al momento stiamo testando i due terreni diversi, usando in entrambi i casi, lo stesso substrato, la laminina, il medesimo substrato che stiamo usando con le cellule ARPE-19, in quanto più economico dei substrati precedentemente elencati, riscontrando comunque nessun problema di adesione e crescita cellulare.

Nei primi test effettuati, è stato visto che il miglior risultato si ottiene con il protocollo suggerito da Hsiung et al., in quanto le cellule, dopo otto settimane in coltura, risultano a confluenza e dimostrano la presenza di cellule pigmentate a forma esagonale, con bassa mortalità (Fig.21). Nel secondo caso invece, con il protocollo di Biju et al., le cellule sono sofferenti e rivelano una bassa pigmentazione, forma fibroblastoide e soprattutto un'alta mortalità (Fig.22).

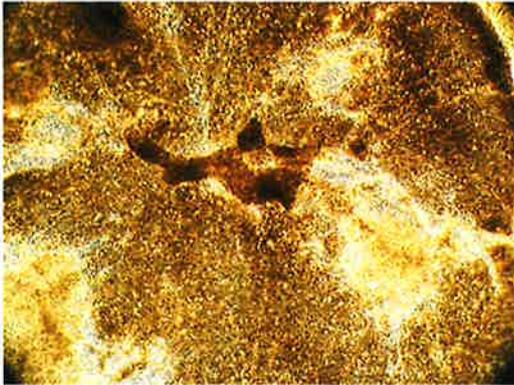


Fig. 21



Fig. 22

Sono state effettuate le prime prove di purificazione delle cellule ritenute RPE dalle cellule embrionali coltivate con il metodo proposto da Hsiung et al, non ottenendo, purtroppo, grandi risultati per il momento.

Questi esperimenti sono comunque preliminari e dovranno essere eseguiti ulteriori prove per mettere a punto tutti i passaggi appropriati di differenziazione delle cellule embrionali staminali e successivamente di purificazione delle cellule di epitelio pigmentato retinico.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

#### **Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate**

- Parekh M, Borroni D, Romano V, Kaye SB, Camposampiero D, Ponzin D, Ferrari S. Next-generation sequencing for the detection of microorganisms present in human donor corneal preservation medium. *BMJ Open Ophthalmology* 2019; 4: e000246. doi:10.1136/bmjophth-2018-000246

Data 1 agosto 2019

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

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

Il Legale Rappresentante

