



**Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca**  
**Direzione Generale per il Coordinamento, la Promozione e la Valorizzazione della**  
**Ricerca**  
**Uff. V.**

**Rendiconto di spesa**  
**Fondi 5 per mille ANNO 2017**  
**Enti della Ricerca Scientifica**

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

Referenti (nominativo, telefono, email): dott.ssa Daniela Andreatza  
tel. 041 9656452 email [amm@fbov.it](mailto:amm@fbov.it)

**Attività**

**RIGENERAZIONE DELL'ENDOTELIO CORNEALE A PARTIRE DA CELLULE: una nuova prospettiva per la cheratoplastica endoteliale di tipo DMEK**

**Data di inizio progetto: 1 settembre 2019**

**Data di fine progetto: 30 giugno 2020**

<b>VOCI DI SPESA</b>	<b>COSTO COMPLESSIVO</b>	<b>QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE</b>
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	10.702,12	5.000,00

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

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, ecc.)	12.775,25	9.413,39
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi, missioni ecc.)	135,80	-
Elaborazione dati		
Spese amministrative		
Altro (indicare quali)		
<b>TOTALE</b>	<b>23.613,17</b>	<b>14.413,39</b>

Il progetto è finanziato anche dai fondi 5xMille anno 2017 per gli Enti della Ricerca Sanitaria (Ministero della Salute 2017 – contributo pari ad € 106.051,70 =).

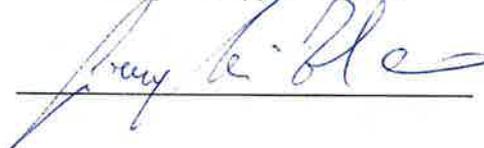
Data 7 luglio 2020

Il Legale Rappresentante



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

Il Legale Rappresentante



**RIGENERAZIONE DELL'ENDOTELIO CORNEALE A PARTIRE DA CELLULE – UNA  
NUOVA PROSPETTIVA PER LA CHERATOPLASTICA ENDOTELIALE DI TIPO DMEK  
(1 settembre 2019 – 30 giugno 2020)**

## **ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO**

### Introduzione

L'endotelio corneale è il quinto e più profondo strato della cornea. Si tratta di un singolo strato di cellule piatte e dalla forma esagonale, con nuclei allungati orizzontalmente. Le sue cellule sono strettamente adese tra loro grazie a interdigitazioni che si dipartono dalle porzioni laterali delle loro membrane plasmatiche, coadiuvate da giunzioni serrate e giunzioni comunicanti. Il compito dell'endotelio corneale è essenzialmente quello di fungere da filtro posteriore per gli strati superiori della cornea ed è inoltre il principale responsabile della idratazione corneale. Le cellule endoteliali corneali (HCEncs) hanno una modesta capacità mitotica e il loro numero diminuisce gradualmente con l'età del soggetto. I danni all'endotelio corneale sono quelli che maggiormente portano alla richiesta di trapianto. In particolare una delle maggiori cause di disfunzione corneale è la distrofia di Fuch's. Riducendosi il numero di cellule endoteliali funzionanti, si rompe l'equilibrio che regola le funzioni barriera e pompa e inizia l'eccessiva idratazione della cornea. Il fluido edematoso distacca le lamelle corneali e si accumula in sacche. La separazione delle fibrille di collagene porta ad un annebbiamento della cornea, perdita della trasparenza e quindi inevitabilmente della vista.

Il trattamento d'elezione è la cheratoplastica endoteliale che negli ultimi anni ha soppiantato la cheratoplastica perforante che prevede la sostituzione di tutti gli strati della cornea. I due principali tipi di interventi di cheratoplastica endoteliale sono la DSAEK (Descemet stripping automated endothelial keratoplasty) e la DMEK (Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty), introdotta da Melles nel 2006. Quest'ultima rappresenta l'ultima evoluzione della cheratoplastica endoteliale e prevede la sostituzione della sola membrana di Descemet con l'endotelio corneale (10-20 micron) senza la presenza di stroma. Negli ultimi anni, però, le tecniche di biologia cellulare hanno portato allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'amplificazione di cellule *in vitro*. Nonostante sia noto che le HCEncs non si rigenerino *in vivo*, è stato ampiamente dimostrato che in opportune condizioni di crescita *in vitro* sono in grado di replicare ed essere propagate. Questo è stato dimostrato sia a partire da cornee di donatori giovani (Peh et al., 2015) che anziani (Parekh et al., 2017). Recentemente inoltre, proprio il nostro gruppo ha dimostrato che l'endotelio corneale periferico che non viene trapiantato in seguito all'ottenimento di lenticoli per cheratoplastica endoteliale può dare origine a colture di cellule endoteliali di ottima qualità. Il motivo è che la densità è elevata (oltre 2200 cellule/mm<sup>2</sup>) e le porzioni periferiche dell'endotelio sono ricche di cellule con maggiore capacità proliferativa rispetto a quelle della porzione centrale (Parekh et al., 2019A; Parekh et al., 2019B). La coltura

di cellule endoteliali corneali, opportunamente cresciute su una matrice biocompatibile, permetterebbe pertanto di ottenere membrane endoteliali del tutto simili a quelle ottenute da cornea di donatore per il trapianto di tipo DMEK. Il prossimo step nel campo del trapianto di cornea sarebbe quindi, di utilizzare membrane ottenute da cellule invece che da donatore, permettendo una maggiore inclusione di pazienti che sono in lista d'attesa per una chirurgia di tipo DMEK. Essendoci già in commercio e avendo noi stessi sviluppato dei *device* per il trasporto e il *loading/unloading* di membrane per DMEK, lo sviluppo clinico verrebbe notevolmente accelerato. Ad oggi, un solo studio clinico ha dimostrato la capacità delle cellule corneali endoteliali di avere una efficacia clinica. In questo caso le cellule sono state iniettate in camera anteriore come una sospensione cellulare, con i pazienti che sono dovuti restare per varie ore a testa supina in modo da permettere alle cellule iniettate di ripopolare l'endotelio corneale. Nonostante i risultati abbiano dimostrato un beneficio clinico, molti hanno però criticato tale strategia, chiedendosi quale fosse il destino delle cellule che non si sono integrate nella matrice endoteliale. Pensiamo pertanto che l'utilizzo di uno scaffold in cui le HCEncs possano crescere permetta di avere un prodotto che (1) è più facilmente controllabile dal punto di vista di *safety* e (2) può essere trasferito al paziente con sistemi di *delivery* già ampiamente validati dal punto di vista clinico.

### Scopo del progetto

Lo scopo del progetto è la messa a punto di un protocollo di crescita delle cellule corneali endoteliali su scaffold biocompatibile e possibilmente degradabile in seguito a digestione enzimatica, in modo tale da ottenere una membrana facilmente arrotolabile in un device per DMEK. Questo permetterebbe al chirurgo di avere a disposizione un prodotto di terapia cellulare pre-caricato e ready-to-go per la successiva chirurgia.

### Risultati

Nella prima fase del progetto sono state testate diverse condizioni di coltura *in vitro* delle cellule ottenute da donatore. Sono state utilizzate cornee che sono risultate non idonee per il trapianto e caratterizzate da una bassa densità cellulare (circa 1500 cell/mm<sup>2</sup>). Le cellule sono state isolate con due step consecutivi: DMEK della porzione tissutale endotelio-membrana di Descemet e digestione enzimatica per degradare la membrana di Descemet. Le cellule sono poi state esaminate sia valutando la morfologia, sia analizzando l'espressione di marcatori proteici d'identità quali ZO-1, proteina delle giunzioni cellulari che mantiene le cellule adese tra loro e la pompa Na/K, necessaria per mantenere la capacità di regolare il trasporto di soluti con gli strati superiori e l'idratazione della cornea. Più del 60% delle colture non ha dato esito positivo. Nonostante la creazione di un pool di cellule proveniente da più donatori per sopperire alla bassa densità cellulare, le cellule non sono state in grado di rigenerare lo strato endoteliale atteso. Nella fase successiva, per migliorare la qualità delle colture, è stato deciso di scegliere cornee da donatori che avessero una maggiore densità cellulare (non inferiore a 1800cell/mm<sup>2</sup>). Sono state poi modificate alcune condizioni di crescita riguardanti le superfici di crescita *in vitro* (usati supporti di grandezze diverse) e i reagenti per alcune fasi del protocollo di isolamento e di coltura delle cellule, come la fase di digestione enzimatica, la fase di adesione e il terreno di coltura delle cellule. Questi cambiamenti hanno permesso di migliorare notevolmente la qualità delle colture cellulari e hanno permesso di affinare ulteriormente il protocollo utilizzato.

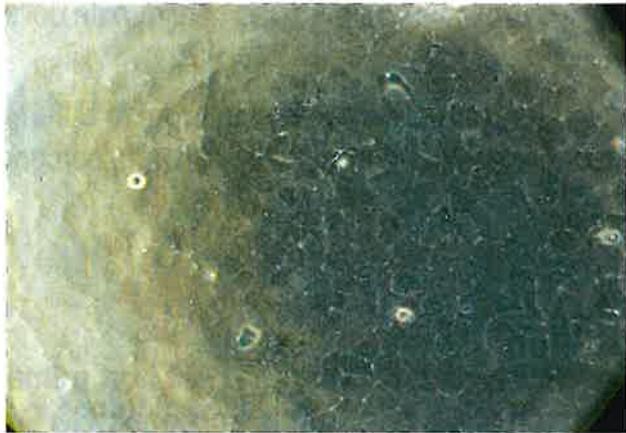


Figura 1

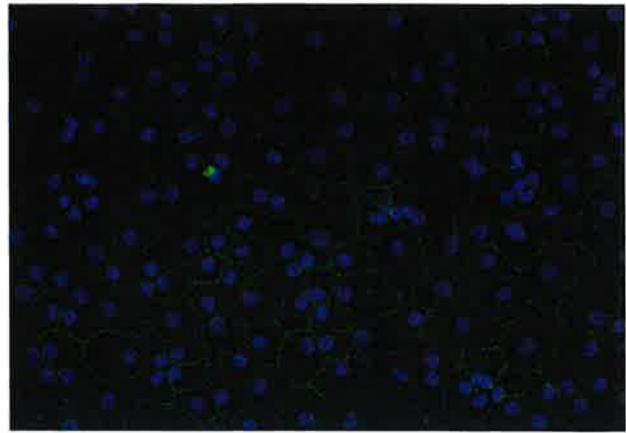


Figura 2

Come è possibile osservare nella figura 1, con il nuovo protocollo è possibile ricostruire in vitro un endotelio molto simile a quello fisiologico. La morfologia è regolare e le cellule sono ben adese formando uno strato uniforme. In media le cellule estratte impiegano dai 5 ai 7 giorni per ricostruire lo strato visibile in figura 1 e fino ad oggi sono state processate circa 120 cornee da donatore. Anche la valutazione dei marcatori proteici precedentemente citati ha dato esito positivo. Come è possibile notare in figura 2 (marcatore proteico Zo-1) e figura 3 (marcatore proteico pompa Na/K), le cellule, una volta ricostituito lo strato endoteliale, esprimono correttamente entrambe le proteine. Sull'onda di questo risultato, per la crescita delle cellule è stato usato anche un supporto di origine biologica, lo scaffold corneale. Si tratta di una cornea non idonea al trapianto in cui è stato rimosso solo lo strato delle cellule endoteliali. Come riporta la figura 4, le cellule sono cresciute e sembrano aver colonizzato la superficie, nonostante in alcuni punti non sembrano aver aderito correttamente a causa della

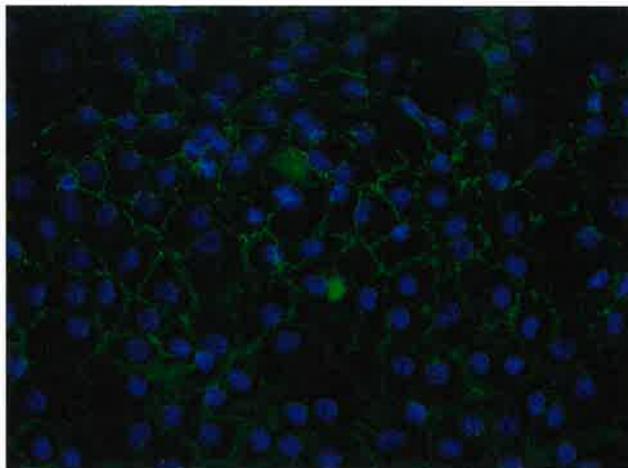


Figura 3

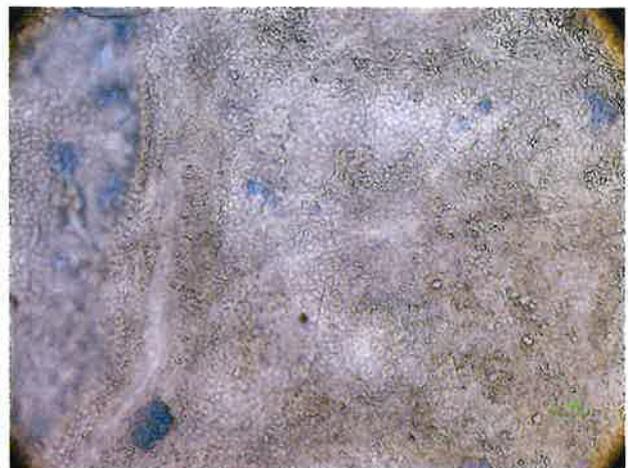


Figura 4

irregolarità strutturale della cornea scaffold.

### PROSPETTIVE PER I PROSSIMI MESI

L'obiettivo nei prossimi mesi sarà quello di riuscire a mantenere in coltura le cellule di endotelio e riuscire ad amplificarle per aumentare ulteriormente il numero. Per questo motivo lo step successivo è quello di riuscire a portare avanti le colture cellulari per un periodo più lungo senza che queste subiscano delle alterazioni nella morfologia e nella funzionalità. Verrà ampliato

anche il pannello di marcatori proteici analizzati, introducendo le proteine tag2 e ki67, quest'ultima molto importante perché potrebbe dare informazioni sulla capacità di queste cellule di proliferare e moltiplicarsi.

Verranno vagliate anche nuove soluzioni per poter far crescere le cellule su supporti differenti tra cui anche gli scaffold biologici ottenuti da cornea che non sono idonee al trapianto, cercando di correggere l'irregolarità strutturale di quest'ultimi.

#### Bibliografia

- Peh GS, et al. **The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach.** Sci Rep. 2015;5;
- Parekh M, et al. **Human corneal endothelial cell cultivation from old donor corneas with forced attachment.** Sci. Rep. 2017;7:142.
- Parekh M, et al. **Culturing Discarded Peripheral Human Corneal Endothelial Cells From the Tissues Deemed for Preloaded DMEK Transplants.** Cornea. 2019 Jun 3. (In Press). A
- Parekh M, et al. **Increasing donor endothelial cell pool by culturing cells from discarded pieces of human donor corneas for regenerative treatments.** J of Ophth. 2019 (In Press). B

Data 7 luglio 2020

Il Responsabile del Progetto



Il Legale Rappresentante

