



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 2015
Enti della Ricerca Scientifica

Ente¹:



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, e.mail):

dott.ssa Daniela Andreatta tel. 041 9656452 e.mail amm@fbov.it

Attività: MEDICINA RIGENERATIVA DELLA CONGIUNTIVA

Data di inizio progetto: 1 gennaio 2018

Data di fine progetto: 30 giugno 2018

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	€ 8.292,03	

¹ 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.)	€ 15.925,71	
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi, missioni ecc.)		
Elaborazione dati		
Spese amministrative		
Altro (indicare quali)		
TOTALE	€ 24.217,74	€ 12.122,29

Data 31 luglio 2018

Il Legale Rappresentante



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

Il Legale Rappresentante



Relazione scientifica
Fondi 5 per mille ANNO 2015
Enti della Ricerca Scientifica

Medicina rigenerativa della congiuntiva
(1 gennaio – 30 giugno 2018).

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'obiettivo di questo progetto è quello di offrire una nuova opzione terapeutica a questi pazienti 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

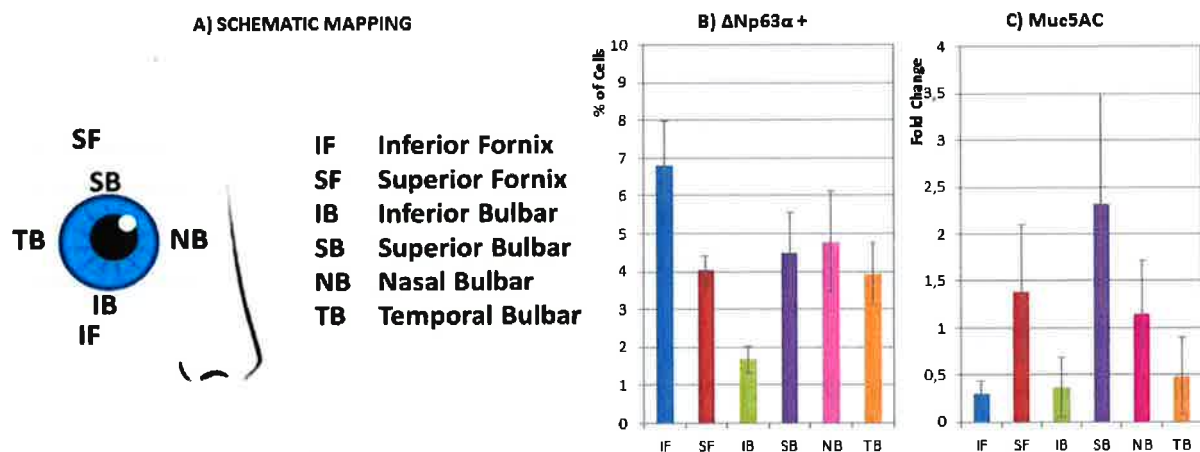
1. Isolamento e selezione di cellule staminali congiuntivali.

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 (FI), Fornice Superiore (SF), Bulbare Inferiore (IB), Bulbare Superiore (SB), 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/cm²; co-coltura con Feeder Layer (3T3-J2 murine cell letalmente irradiate e piastrate alla concentrazione di 40.000/cm²) coltivate con terreno standard K (Pellegrini et al).

L'analisi delle cellule così estratte e messe in coltura è stata eseguita mediante test cellulari, e confermati poi mediante test molecolari più specifici. Questi ultimi test hanno permesso di confermare una maggior concentrazione di cellule staminali (maggiore espressione del marcatore $\Delta Nq\beta 63$) nel FI, e di cellule GOBLET nel SB. L'elevato valore di $\Delta nq\beta 63$ 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 biottico: la biopsia viene piastrata sul supporto, i cheratinociti escono dalla biopsia si espandono tutto attorno
- tecnica della sospensione cellulare: isolamento delle cellule dalla biopsia tramite sistemi enzimatici, raccolta delle cellule estratte e loro piastramento sul supporto

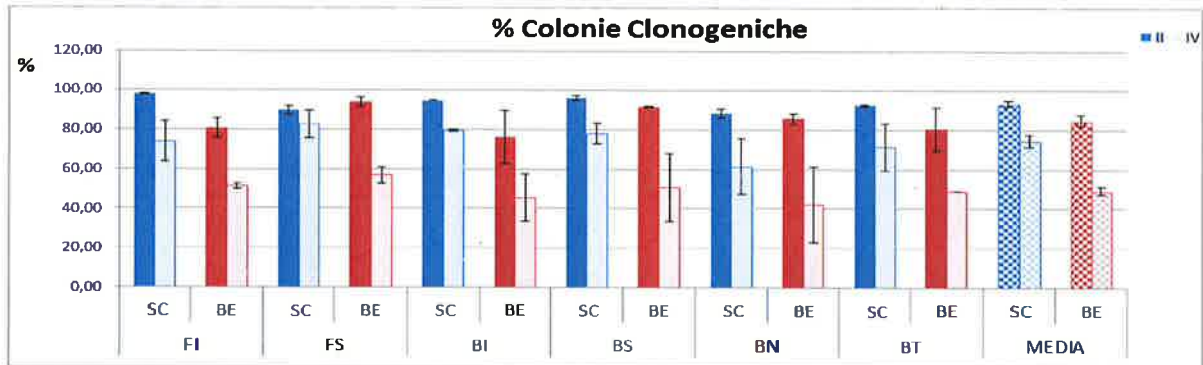
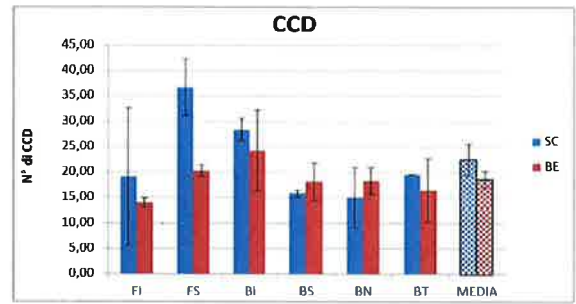
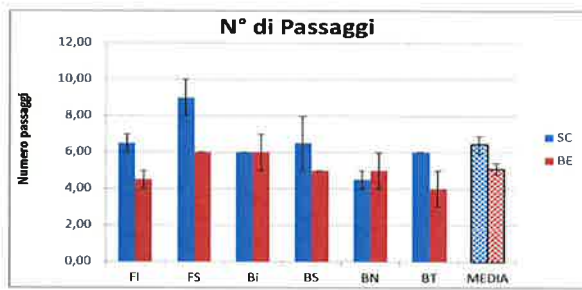
Nella pratica clinica della ricostruzione in vitro di epiteli limbus-corneali, entrambi i approcci sono ampiamente utilizzati con successo: Pedrotti 2015 e Zakaria 2014 ne rappresentano probabilmente l'esempio con più applicazioni cliniche.

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).

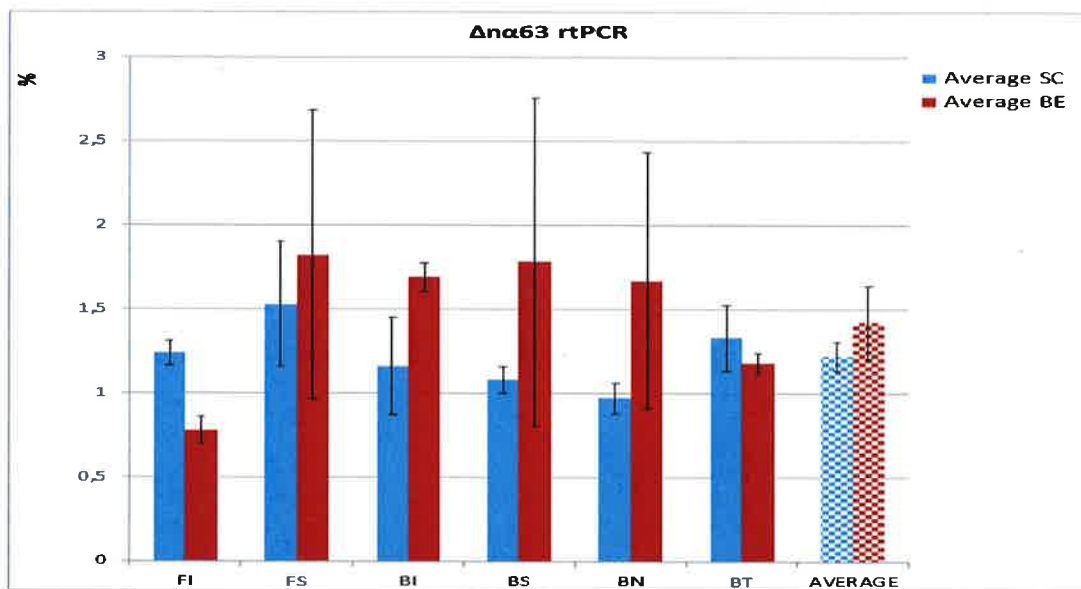
Tutte e 12 le biopsie sono state divise a metà e processate secondo le due tecniche. Al fine di rendere le due tecniche confrontabili, biopsie e cellule sono state piastrate sullo stesso supporto in plastica. Le colture primarie di cellule congiuntivali sviluppate dall'applicazione delle due tecniche 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 ottuneuto, percentuale di colonie clonogeniche e Totali ottenute) e rPCR di marcatori della staminalità ($\Delta n\alpha p63$).

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.



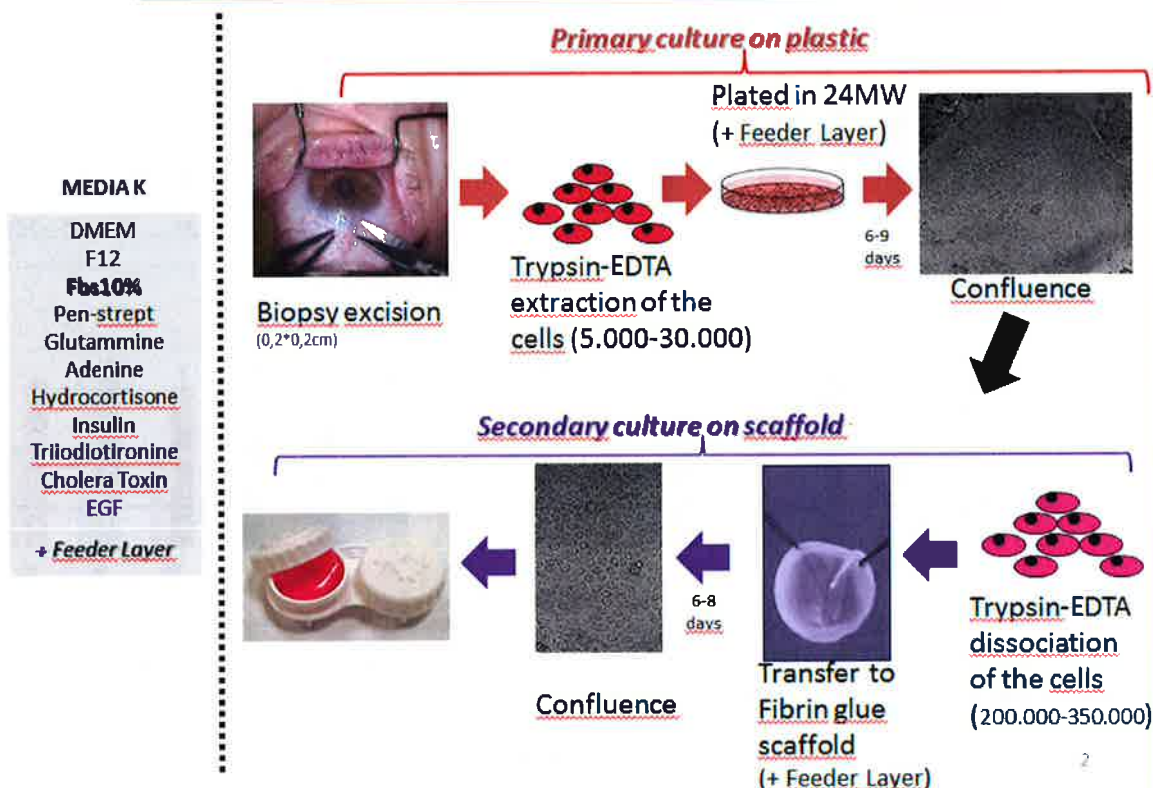
L'analisi in rtPCR di marcatori della staminalità ($\Delta ncp63$) non ha introdotto dati significativi nel confronto delle due tecniche rispetto a quanto evidenziato nell'analisi precedente.



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 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:

FBOV CELL FACTORY PRODUCTION (GMP CERTIFIED) – LIMBAL GRAFT



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

FL = Feeder Layer

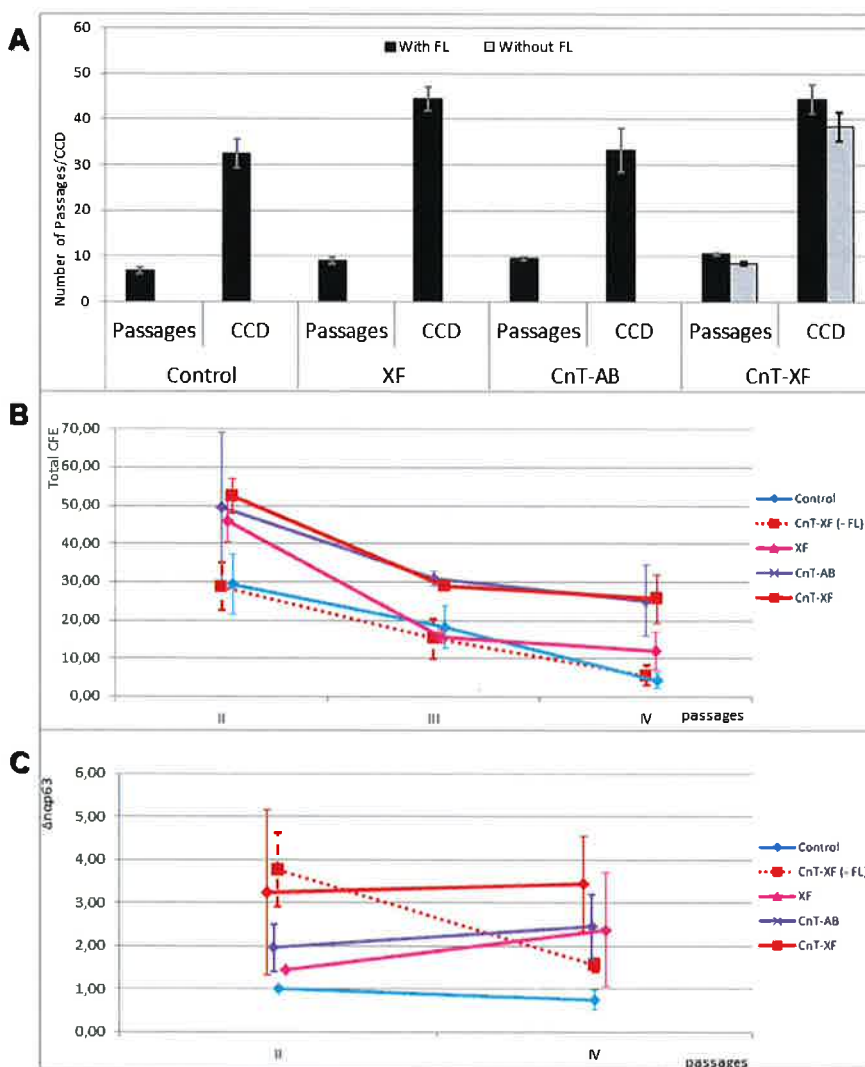
Saggi cellulari, molecolari e biochimici sono stati allestiti al fine di evidenziare le prestazioni dei nuovi protocolli e di confrontarle con quelle ottenute dagli standard di nota efficacia (K).

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 condizione (test di seguito illustrati);

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

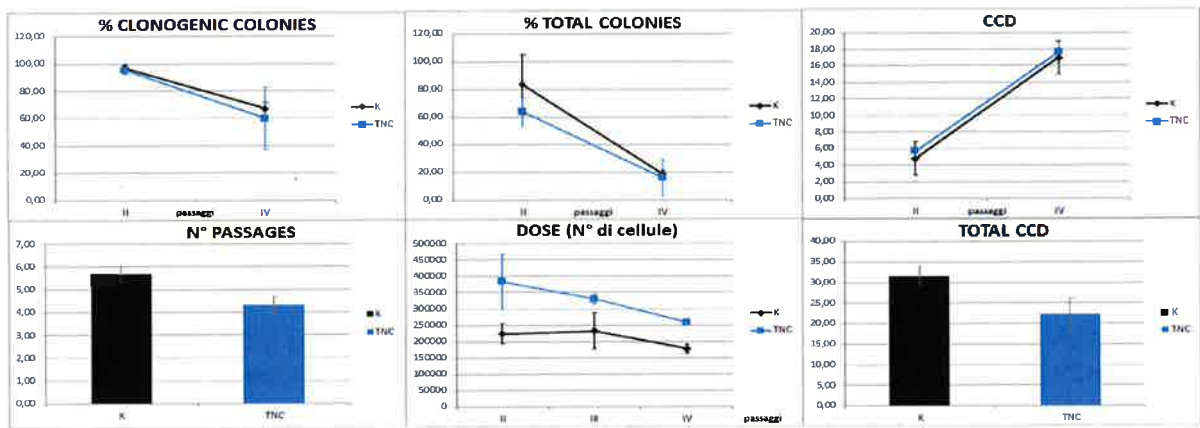
I dati ottenuti dai tradizionali saggi cellulari (Life Span Test – A, B) e molecolari (Real Time PCR del marcatore di staminalità $\Delta nq63$, C) in uso evidenziano un andamento tendenzialmente positivo per tutti i mezzi testati:



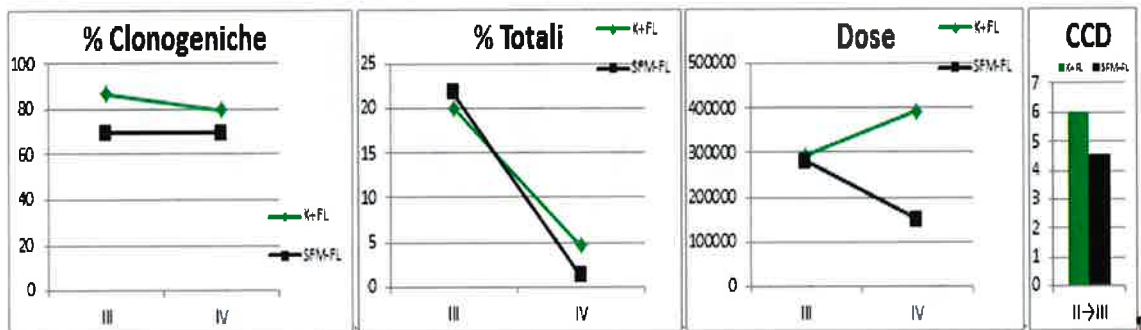
Tali test incoraggiano pertanto l'uso di terreni animal free per test in vitro su plastica evidenziando performance in alcuni casi sovrapponibili o addirittura migliori al controllo (K) non animal free per la maggior parte delle condizioni testate.

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



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:

Condi- tion	TYPE OF MEDIUM	
	MEDIUM	SIERO
K	DMEM, Glutammine 2%, Penniciline-Streptomicine	Calf Serum 10%
T1	DMEM, Glutammine 2% , Penniciline-Streptomicine	TNCBIO XF 10%
T2	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	Calf Serum 10%
T3	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	Calf Serum 1%
T4	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	TNCBIO XF 10%
T5	CnT-20 medium, Penniciline-Streptomicine	TNCBIO XF 1%
T6	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)

Tox Test 2 16/3 24/4	TYPE OF MEDIUM		TYPE OF CELLS
	MEDIUM	SERUM	B: 3T3 NIH
			I passage day 5
K	K (DMEM+Glu+PS)	K (Calf 10%)	
T1	K (DMEM+Glu+PS)	TNC 10%	
T2	CNT	Calf 10%	
T3	CNT	Calf 1%	
T4	CNT	TNC10%	
T5	CNT	TNC1%	

It grow, slower and slower and with different morphology

Figura II)

Tox Test 4 20/0 4	TYPE OF MEDIUM		TYPE OF CELLS		
	MEDIUM	SERUM	D HUMAN less Pen-Strept		
			END I passage	END II passage	END III passage
K	K (DMEM+Glu+PS)	K (Calf 10%)	Day 2 260.000	Day 5 185.000	Day 8 7000
T1	K (DMEM+Glu+PS)	TNC 10%	Day 4 113.000 Sub confl.	Day 6 35.000???	Day 7 No confl. No more grow
T2	CNT	Calf 10%	Day 4 400.000	Day 6 262.500	Day 8 7000
T3	CNT	Calf 1%	Day 4 150.000 Sub confl.	Day 10 147.000	Day 7 No confl. No more grow
T4	CNT	TNC 10%	Day 4 97.500 Sub confl.	Day 10 No confl. Safing passage	Day 7 No confl. No more grow
T5	CNT	TNC 1%	Day 4 115.000 Sub confl.	Day 10 No confl. Safing passage	Day 7 No confl. No more grow
T6	CNT	AB 1%	Day 2 285.000	Day 12 No confl. Safing passage	Day 7 no confl. Safing passage

DIFFERENT MORPHOLOGY

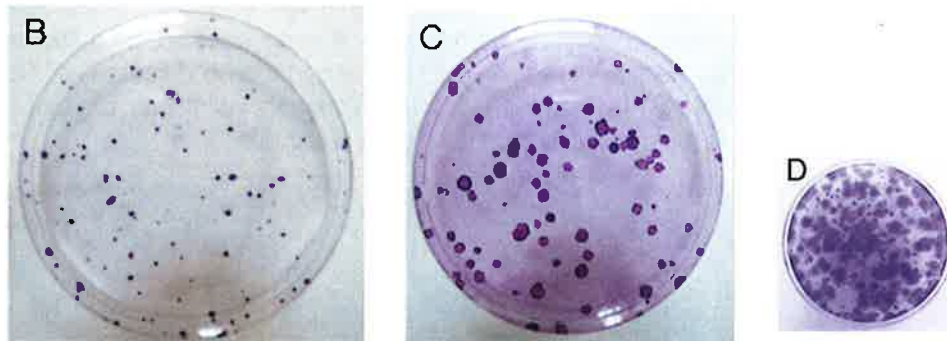
DIFFICULTIES IN GROWING

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 epitelii 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 scaffolds 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.

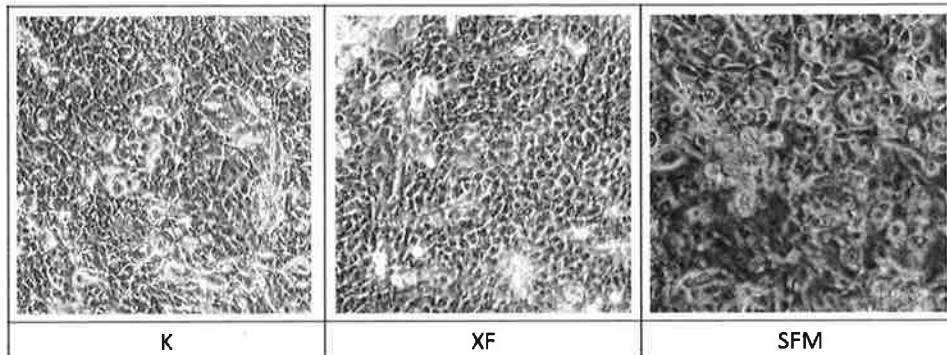
Queste schematicamente le condizioni testate:

	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 molti 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).



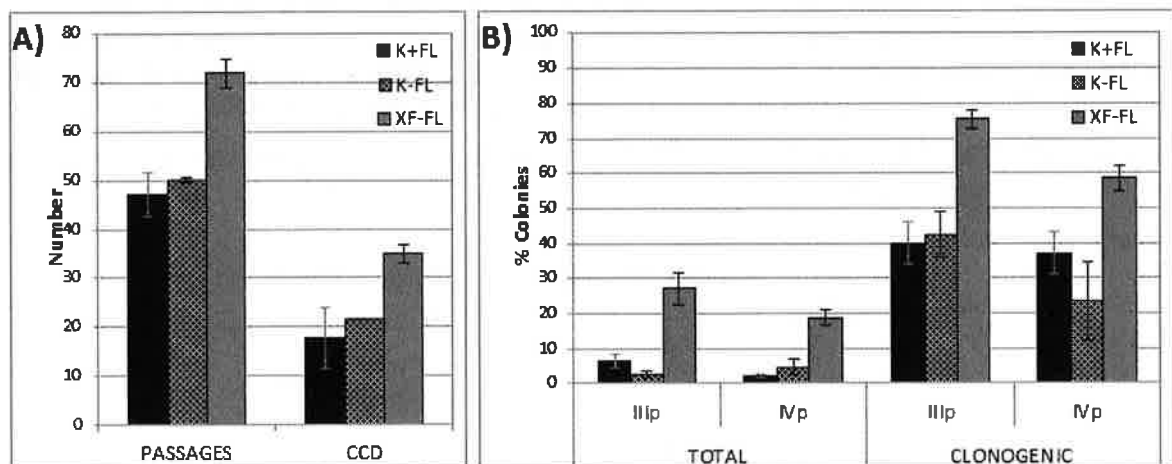
Esempio analisi morfologia al microscopio ottico di colture su membrana amniotica utilizzando diversi terreni

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.

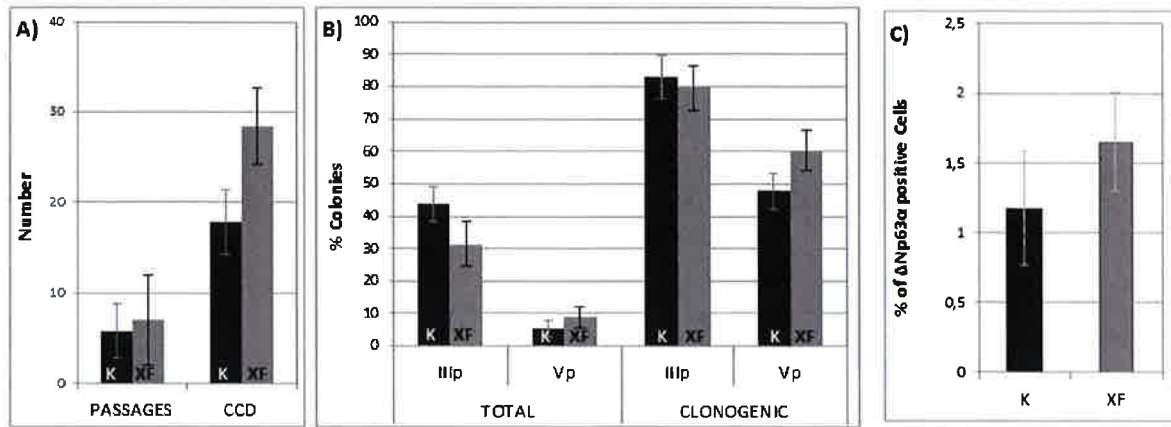
(1.b.) identificazione del protocollo di crescita ottimale,
scelta del terreno di crescita delle cellule,
analisi cellulare

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:

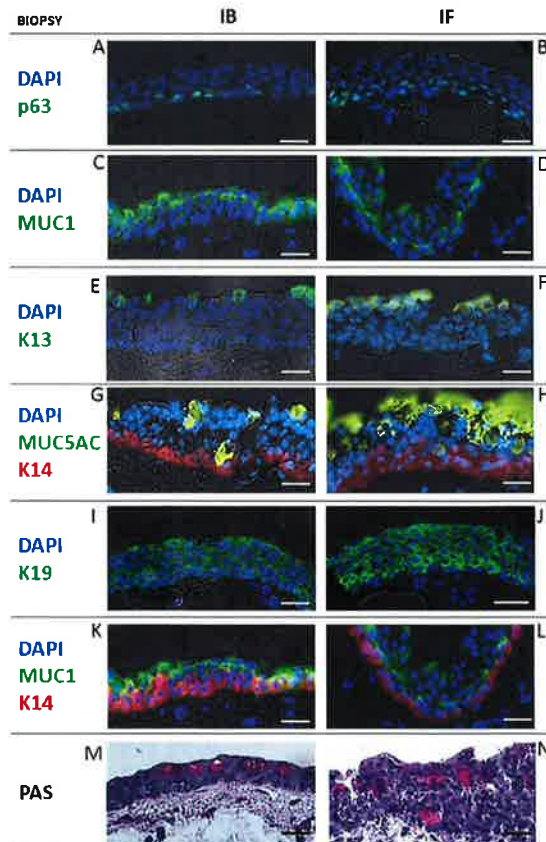


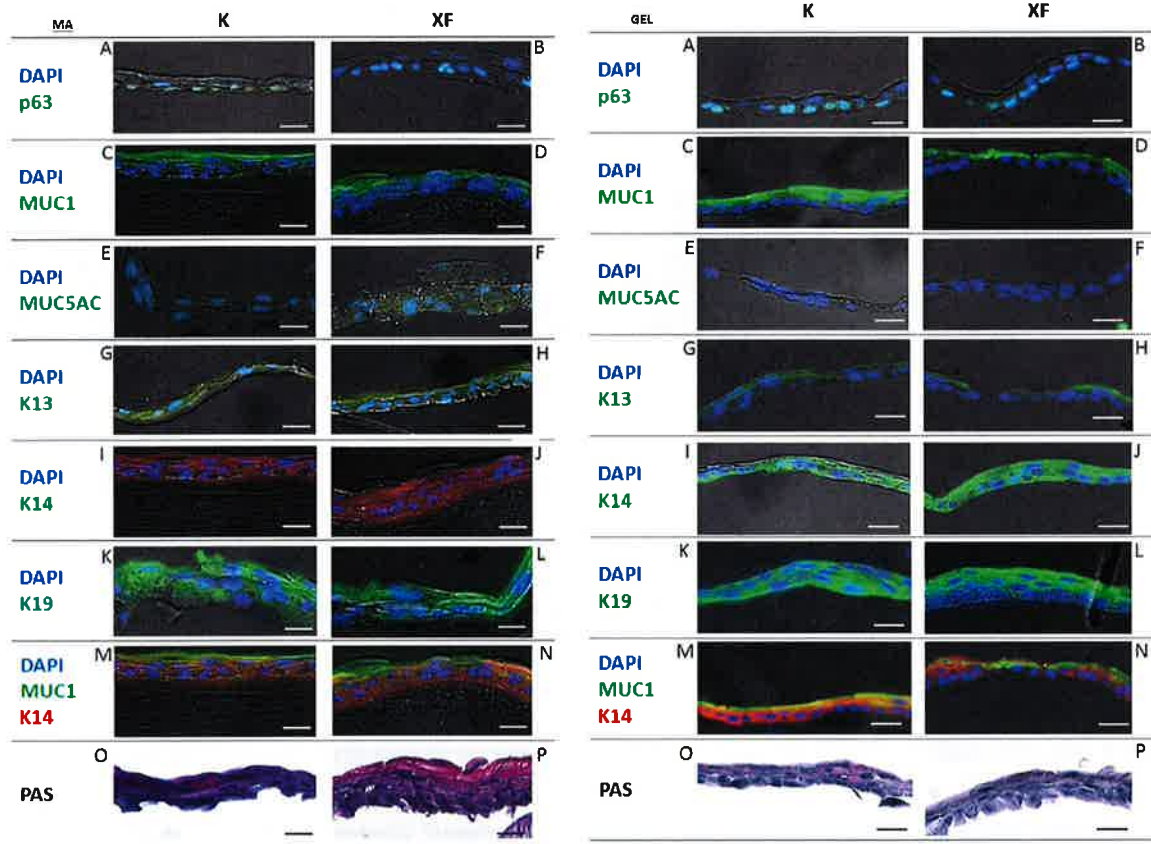
In entrambi i casi, la condizioni animal free XF ha evidenziato migliori capacità proliferative rispetto al Controllo.

(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).

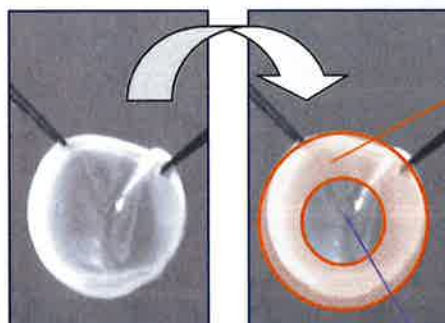
L'analisi eseguita ha messo in evidenza come i lembi ottenuti esprimono gli stessi marcatori del tessuto di origine, sia quando coltivati nel terreno di Controllo k che quando generati del terreno animal free XF-FL. Qui di seguito un esempio, una biopsia congiuntivale confrontata con il graft ottenuto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





(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:

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.

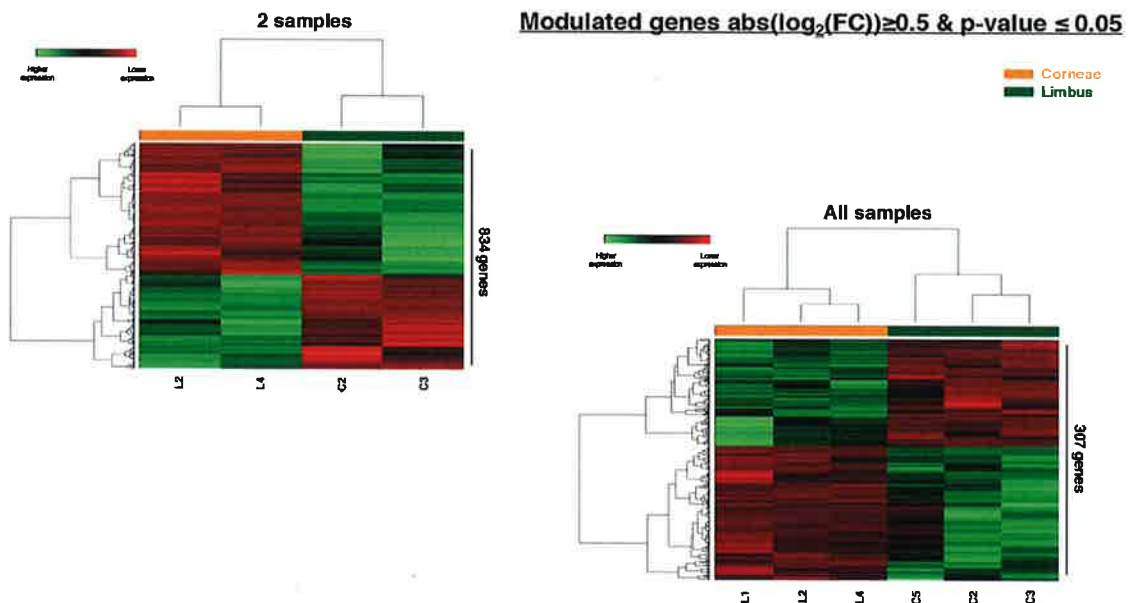
4. Identificazione di marcatori specifici dell'epitelio congiuntivale umano.

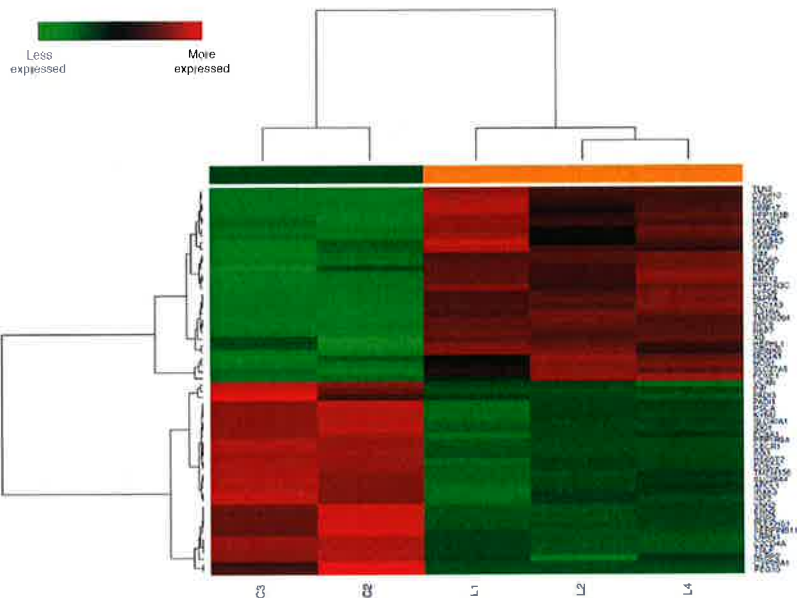
A) rt-PCR and Wester Blotting analyses

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 cornea).





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

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
	Gene	TPM (G)	TPM (G)	TPM (G)	TPM (G)	TPM (G)	TPM (G)	Mean count	log2(FPKM)	Raw p-value	Adjusted p-value	Category
1	FOXA1	367488	289327	283874	161175	264371	273521	155622886	-3.0322863	3.4E-45	1.9E-41	TOP 30 Conjunctiva
2	PSCA	332317	4818	424557	203947	277828	331891	282124455	-2.63920724	1.9E-25	2.7E-22	TOP 30 Conjunctiva
3	FOXC2	132744	753158	233888	73921	18977	18312	262246632	-2.16289521	1.1E-24	6.37E-22	TOP 30 Conjunctiva
4	FOXC1	172405	402184	47234	88392	12307	1149	120122457	-1.93839298	2.17E-24	1.0E-23	TOP 30 Conjunctiva
5	PADI3	10283	8184	10485	22074	3153	33978	60232835	-2.31255038	1.1E-31	1.4E-28	TOP 30 Conjunctiva
6	SERPIN1	72824	78747	831014	8842076	308828	638208	327257492	-1.99190387	6.4E-32	9.4E-28	TOP 30 Conjunctiva
7	FOXA1	37824	12459	33077	998057	17882	23045	486023481	-2.50722818	6.81E-22	3.3E-20	TOP 30 Conjunctiva
8	PIP	24549	21019	654536	198607	65812	61049	592927822	-3.2014817	2.2E-23	2.4E-20	TOP 30 Conjunctiva
9	SIX1	81265	93080	13932	17456	670386	2094	659371853	-1.98129777	2.6E-34	6.7E-12	TOP 30 Conjunctiva
10	IDO1	89176	89637	24216	19818	13787	1406	26789828	-1.8418928	3.24E-11	1.32E-16	TOP 30 Conjunctiva
11	SIX1	12473	84791	929744	8490707	88827	6282023	318784256	6.12628770	1.4E-10	2.0E-104	TOP 30 Conjunctiva
12	TSLP	15087	644791	8565973	11859	848322	828218	301828232	-2.60118648	1.04E-23	2.30E-26	TOP 30 Conjunctiva
13	KIAA199	5189	62532	31832	19362	11648	14192	806519468	-1.80948032	1.2E-36	2.3E-23	TOP 30 Conjunctiva
14	IDO1	144235	33847	0	0.02824	0.1818	0.16268	662819273	-2.29845259	6.50E-26	1.8E-21	TOP 30 Conjunctiva
15	EPRE2	18861	224566	241732	88843	823589	628656	17418350	-2.8911468	2.8E-24	1.84E-21	TOP 30 Conjunctiva
16	PEG3	132212	12494	18917	821867	84881	81121	263184732	-2.34581683	3.2E-18	1.84E-15	TOP 30 Conjunctiva
17	SIX1	30181	25295	625708	625187	352591	812730	59812689	-2.45760961	9.87E-23	8.8E-25	TOP 30 Conjunctiva
18	HSBP2	28738	308818	3815304	827689	602321	86318	247281073	-1.71288564	7.8E-25	6.40E-23	TOP 30 Conjunctiva
19	DYRK1A	287832	934573	892839	8127263	895341	801868	55392488	-2.1824955	6.2E-15	1.77E-12	TOP 30 Conjunctiva
20	FOXC2	281536	280482	3482866	418953	838858	828932	324927223	-2.50722818	3.2E-18	1.8E-18	TOP 30 Conjunctiva
21	IDO1	254823	24442	643868	47846	61328	8287783	263086443	-2.278657029	1.40E-11	5.3E-17	TOP 30 Conjunctiva
22	CCRA1	244425	28247	32334	827889	889846	8464828	198888888	-2.82848581	4.2E-23	3.7E-25	TOP 30 Conjunctiva
23	VCAN	23497	303372	118331	0.0893	862124	827784	481042149	-2.389726378	3.8E-28	2.49E-23	TOP 30 Conjunctiva
24	PADI3	204286	513621	33973	83078	88389	828828	877772243	-1.888487954	6.30E-19	1.84E-18	TOP 30 Conjunctiva
25	IRAK2	178827	2388	8378893	819785	828452	819522	305018957	-1.9118023	1.0E-14	2.8E-12	TOP 30 Conjunctiva
26	TNFRSF8	163788	18439	41601	814781	82589	830142	873405595	-1.846275068	1.4E-18	2.3E-26	TOP 30 Conjunctiva
27	CCDC4	145682	124183	6048801	88902176	802784	80283	718888158	-2.744327173	3.10E-23	1.6E-20	TOP 30 Conjunctiva
28	LRRI1	128871	18932	6038181	828811	86701	885378	482883958	-2.64388181	4.30E-17	1.80E-14	TOP 30 Conjunctiva
29	SIX1	8876191	157769	6038272	816928	887958	818842	81122938	-2.233864154	3.7E-11	1.7E-15	TOP 30 Conjunctiva
30	PPP1R9A	628991	9273068	6063805	8692028	818828	8378758	49488222	-1.93789877	7.1E-11	7.9E-11	TOP 30 Conjunctiva

Selezione dei 10 geni più espressi

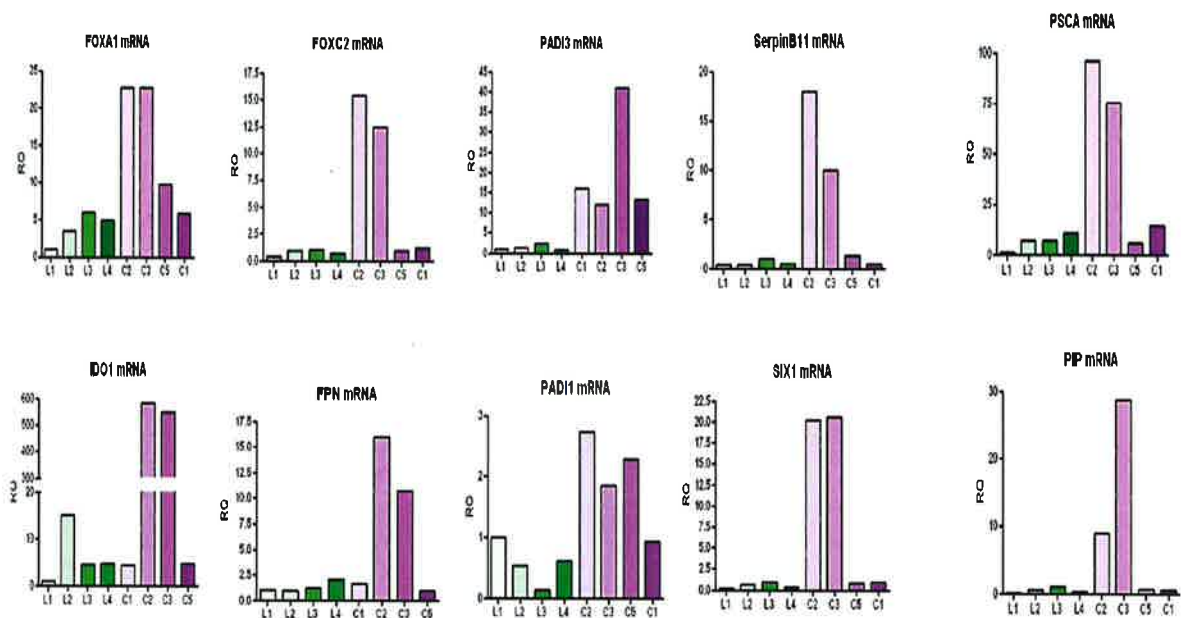
I 30 geni selezionati nell'analisi precedente sono stati validati tramite analisi in Real Time PCR (livello di mRNA del gene). Tale analisi ha permesso di selezionare tra i 30 geni, i 10 maggiormente espressi nei campioni congiuntivali rispetto a quelli limbus-cornea.

Tali geni sono risultati:

FOXA1, FOXC2, PADI3, IDO1, FPN, PADI1, SerpinB11, PSCA, SIX1, PIP

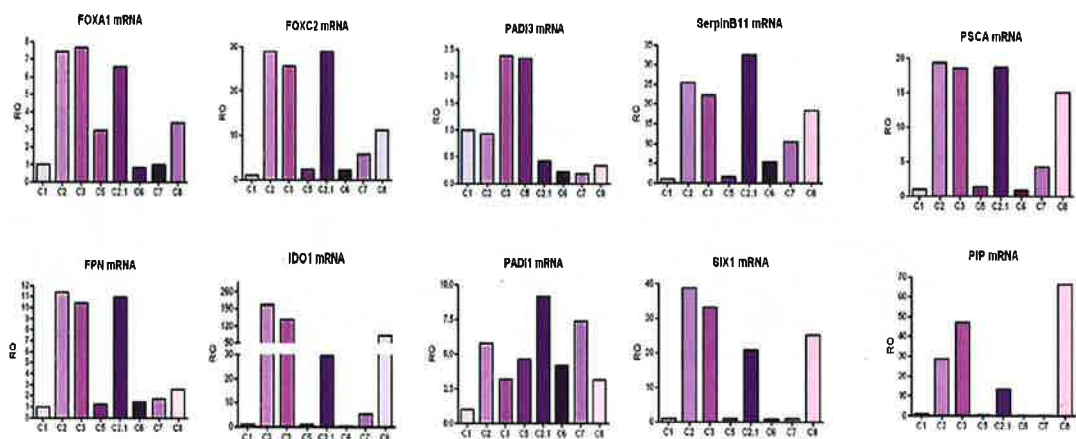
L'espressione di questi geni è stata testata su 4 differenti colture primarie congiuntivali provenienti da donatore. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti su 4 differenti strainings limbus-corneali provenienti da 4 donatori diversi.

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 trance 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 DNA-binding proteins. These hepatocyte nuclear factors are transcriptional activators for liver-specific transcripts such as albumin and transthyretin, and they also interact with chromatin. Other 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. *Gastroenterology* 2009

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.

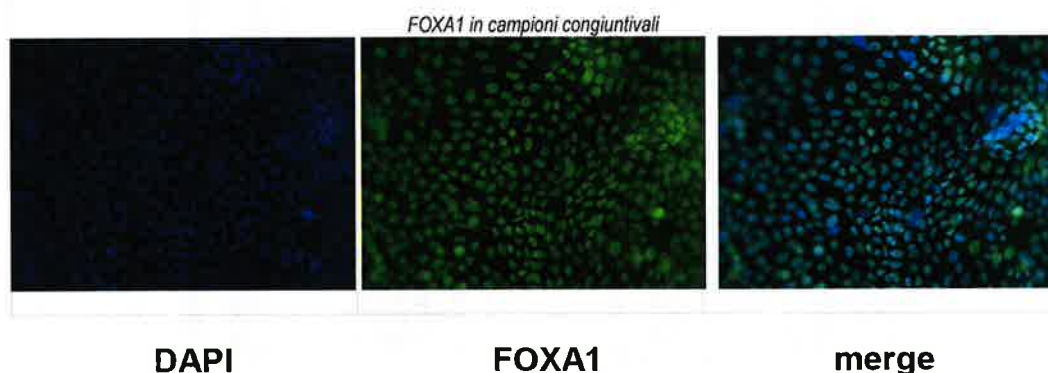
B) Messa a punto di un protocollo per immunofluorescenza di FOXA1

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	OK
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	

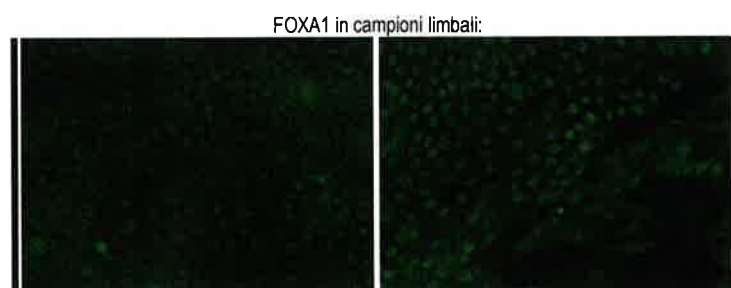
Le 6 condizionale sono state ripetute sia su Citocentrifugati cellulari (cellule dissociate) che su Chamber Slide (quindi su colonie di cellule ossia su colture cellulari stoppate in fase di crescita e quindi prima del raggiungimento della confluenza). Le 6 condizionale sono inoltre state ripetute su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



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 inficiare 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.



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

Data 31 luglio 2018

Il Rappresentante Legale



Il Responsabile della ricerca



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

Il Rappresentante Legale



Il Responsabile della ricerca