

**Degenerazione maculare della retina - Sviluppo di un approccio terapeutico  
basato su innesto di cellule dell'epitelio pigmentato retinico  
(1 settembre – 31 dicembre 2018).**

**OBIETTIVO DEL PROGETTO**

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.

**ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO**

Introduzione

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 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 nevasi, 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.

#### Fasi del progetto

Il progetto si divide in 3 work packages (WPs):

*WP1: messa a punto del device.* 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).



Fig.1



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.

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.

*WP2: 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 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 ridurne lo spessore a 30  $\mu\text{m}$ .

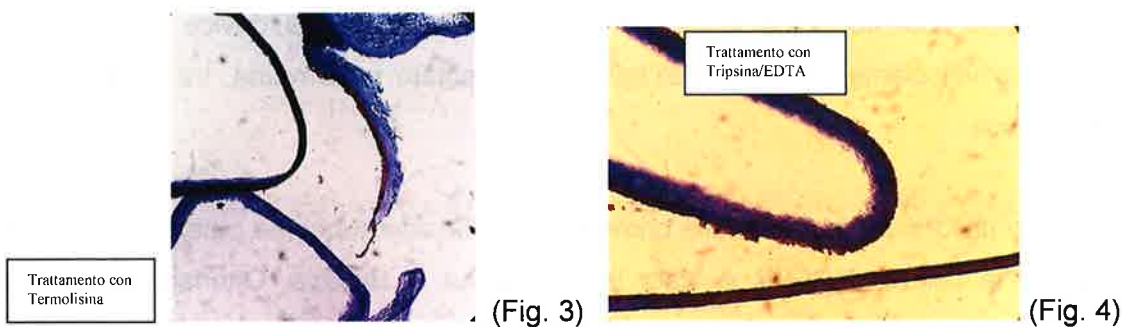
Abbiamo iniziato testando il protocollo proposto da Zhang L e collaboratori (Zhang L et al. An ultra-thin amniotic membrane as carrier in corneal epithelium tissue-engineering. Scientific Reports 2016: 6: 21021), che prevede la rimozione dello strato epiteliale utilizzando prima l'EDTA 0.02% e, in caso 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 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 il tempo di azione della termolisina (9minuti) proposto dal ricercatore, confermandone la validità (Fig.3 e Fig.4).



Per quanto riguarda l'enzima Collagenasi IV, abbiamo invece 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 del 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.5 e Fig.6).

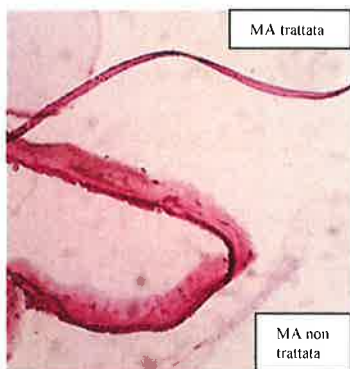


Fig. 5

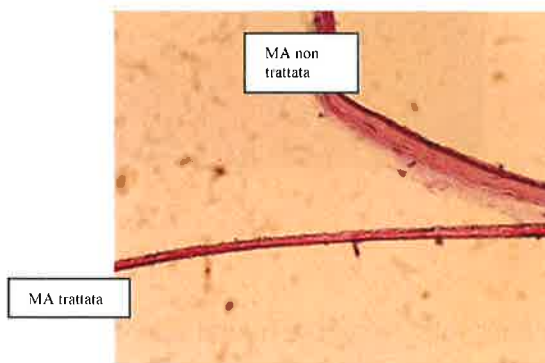


Fig.6

WP3: messa a punto delle colture di cellule dell'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. 7)

7  
SF





Fig.7

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

Sono iniziati, inoltre, i primi esperimenti per la definizione dei controlli di qualità per la valutazione dell'idoneità delle cellule utilizzate. Abbiamo iniziato con l'effettuazione di ELISA per la stima della produzione dei fattori di crescita come il VEGF, PEDF, confermando la secrezione delle molecole dalle cellule di EPR da donatore e dalle cellule di ARPE-19, mantenute in coltura per almeno 4 mesi.

Sono iniziati, inoltre, i primi esperimenti per il rilevamento delle Tight Junctions, giunzioni fra cellule epiteliali adiacenti in una banda stretta, fondamentali per lo svolgimento di due funzioni vitali: limitano il passaggio di molecole e ioni attraverso lo spazio tra le cellule. In particolare noi abbiamo ricercato la proteina ZO-1, necessaria per la creazione di queste importanti giunzioni, Fig 8.



Fig.8

Futuri esperimenti saranno mirati a rilevare la presenza di altri fondamentali marcatori come l'espressione di RPE 65 (essenziale per la rigenerazione dei pigmenti visivi), CRALBP (rigenerazione del Retinolo), e molti altri.

Abbiamo anche, nel frattempo, proceduto con l'acquisto delle cellule della linea embrionale, Wa09 (H9) in sostituzione della linea MA09-hRPE, in quanto abbiamo verificato che questa linea non è in vendita. La linea embrionale Wa09 è comunque valida per i nostri scopi perché è prodotta secondo normativa GMP ed è utilizzata in un trial clinico in U.S.A dal gruppo guidato da Mark Humayun e David Hinton.

I primi risultati di questo trial sono stati pubblicati 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 alle cellule MA09-hRPE, è che sono cellule embrionali non differenziate e che, per essere utilizzate su pazienti, dovranno essere prima sottoposte a processi di differenziamento in cellule di EPR.

Questo step aggiuntivo è essenziale per evitare di trapiantare nell'occhio del paziente delle cellule che possono risultare iperproliferanti e tumorigeniche.

Il Responsabile della Ricerca

Stepano Ferrara

Il Legale Rappresentante

[Firma illeggibile]

