

Terapia cellulare e rigenerazione retinica

Una nuova frontiera terapeutica?

INFORMAZIONI AI PAZIENTI

Centro Studi Ipovisione

Resp. Dott. Paolo Limoli

Piazza Sempione 3 - 20145 MILANO ITALIA

Tel. 02 3315865 – 3318996

Via 4 Aprile 9 – 90139 PALERMO ITALIA

Tel. 0916176551

www.paololimoli.it

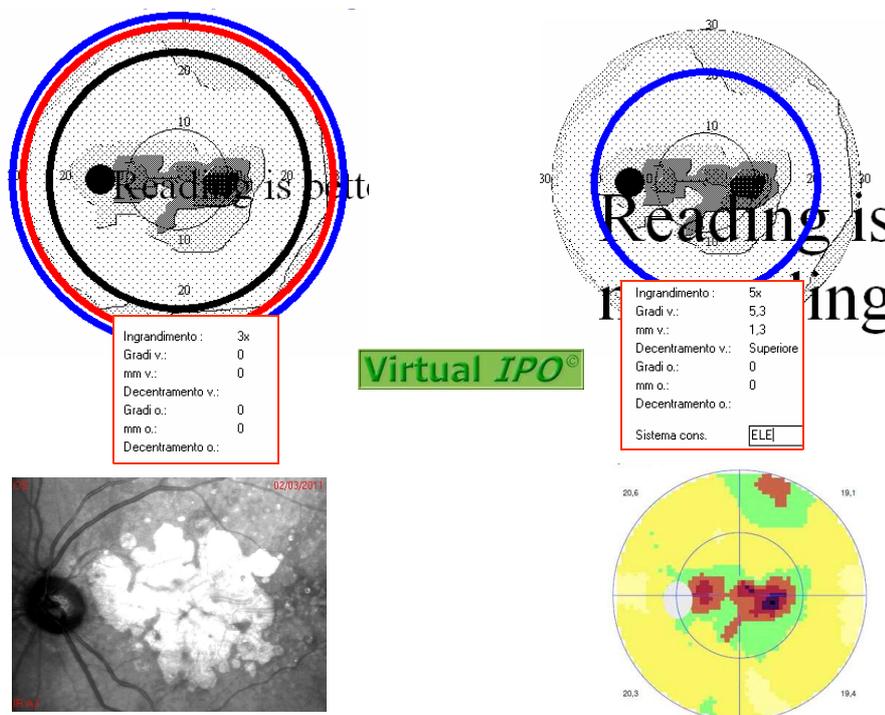
Ad uso esclusivo dei pazienti dello studio

INFORMAZIONI TECNICHE

La macula (lutea) è la parte più centrale della retina e quella più importante, in quanto più ricca di *cellule fotorecetrici*. Su questa zona si focalizzano le immagini e vengono trasformate in impulsi neuroelettrici. Tali cellule inviano poi le informazioni ricevute alla corteccia occipitale attraverso le *cellule bipolari* e le fibre nervose prodotte dalle *cellule gangliari*.

L'80% delle patologie degenerative è dovuto a fenomeni atrofici a carico delle strutture cellulari sopra ricordate.

La più frequente tra le cause di atrofia retinica è la degenerazione maculare secca che consiste in una graduale, lenta, atrofia del tessuto coinvolto. Compaiono lesioni caratteristiche denominate drusen, che sono accumuli di detriti cellulari situati al di sotto della retina, tra epitelio pigmentato retinico e membrana di Bruch. La presenza di queste lesioni rimane spesso a lungo asintomatica. Alle drusen seguono alterazioni atrofiche dell'epitelio pigmentato retinico e della coriocapillare ad esse adiacenti. All'atrofia dell'epitelio pigmentato si associa *in breve tempo* una corrispondente atrofia dei fotorecettori e quindi una perdita visiva tanto più grave quanto più estese e centrali sono le lesioni maculari. Tale patologia è variamente denominata: degenerazione secca, areolare, atrofia geografica, dry AMD. L'atrofia geografica è responsabile del 20% dei casi di cecità legale da degenerazione. Alcuni autori la considerano una eredodistrofia senile.



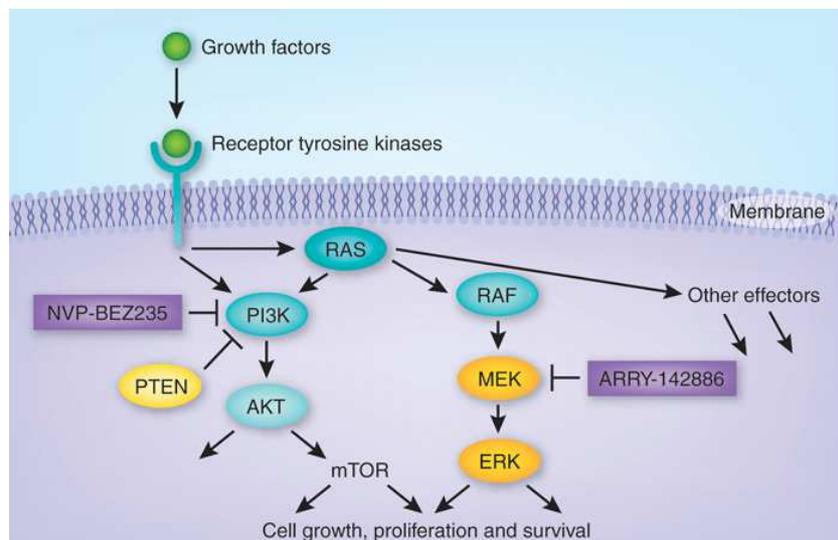
Altre atrofie della retina sono rappresentate dall'eredodistrofie: con tale nome si intende un complesso di patologie ereditarie dove, per alterazioni genetiche, la retina è priva o carente di quei sistemi enzimatici efficaci nel riparare e mantenere la perfetta efficienza delle cellule nervose. Ne deriva una atrofia vuoi dell'epitelio pigmentato e dunque dei fotorecettori, vuoi delle cellule gangliari e dunque delle fibre nervose che costituiscono il nervo ottico. In genere colpisce già nelle prime decadi di vita.

Tali patologie sono, la retinite pigmentosa, la degenerazione di Stargart, la distrofia dei cono, l'otticopatia di Leber tanto per citare le più frequenti.

Nell'ambito delle atrofie dei tessuti nervosi oculari dobbiamo ricordare anche le subatrofie ottiche, che possono avere differenti origini: tossiche, ischemiche, infiammatorie, glaucomatose. La morte delle fibre nervose, avvenuta per varie cause, determina l'instaurarsi di un circolo vizioso per cui le fibre vitali, adiacenti a quelle morte, finiscono per essere coinvolte nel processo apoptotico (cioè di conseguente morte cellulare) e dunque cessano di vivere anch'esse, determinando una progressiva perdita della funzione visiva.

Esistono evidenze che in molteplici patologie genetiche la turba metabolica causa morte cellulare per apoptosi. L'apoptosi è correlata alla frammentazione del DNA nucleare per l'attivazione di una nucleasi endogena. Questa morte cellulare può essere evitata o comunque procrastinata, attivando il gene Bcl2. I fattori di crescita hanno, fra le altre molteplici peculiarità, la capacità di attivare l'espressione del gene Bcl2, evitando così il destino di morte, e questo indipendentemente dalla causa innescante.

I fattori di crescita penetrano nelle cellule attraverso specifici recettori il cui numero varia in rapporto alle condizioni metabolico-funzionali cellulari. Sono stati individuati recettori ad alta o bassa affinità, con effetti opposti.



Il fattore di crescita in seguito all'interazione con il recettore di membrana della cellula bersaglio, finisce per innescare una cascata di eventi in grado di interagire con l'assetto genetico nucleare.

L'osservazione secondo cui l'apoptosi può essere manipolata tramite i fattori di crescita ha supportato la loro somministrazione nella degenerazione tapeto-retinica.

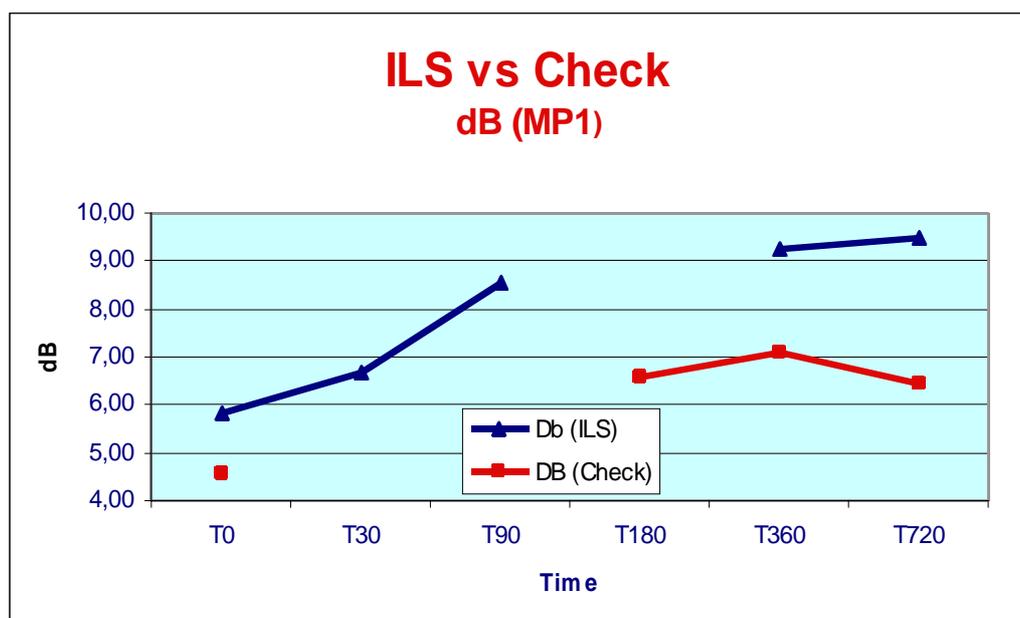
Le iniezioni intravitreali di fattori di crescita (BDNF, CNTF, bFGF) proteggono la retina dall'ischemia indotta da ipertono, da fototraumatismo, ritardano la degenerazione fotorecettoriale nei topi r-d e nei topi mutanti O344 transgenici per la rodopsina. Sono sempre più numerosi i lavori sperimentali che ne supportano la validità.

In altri termini, *tale modalità di trattamento ha il vantaggio di risultare efficace indipendentemente dalla mutazione genica in causa.*

Purtroppo l'effetto dei fattori di crescita esogeni ha durata relativamente breve (circa 30 giorni) e l'esecuzione di iniezioni intravitreali espone a rischi flogistici ed emorragici.

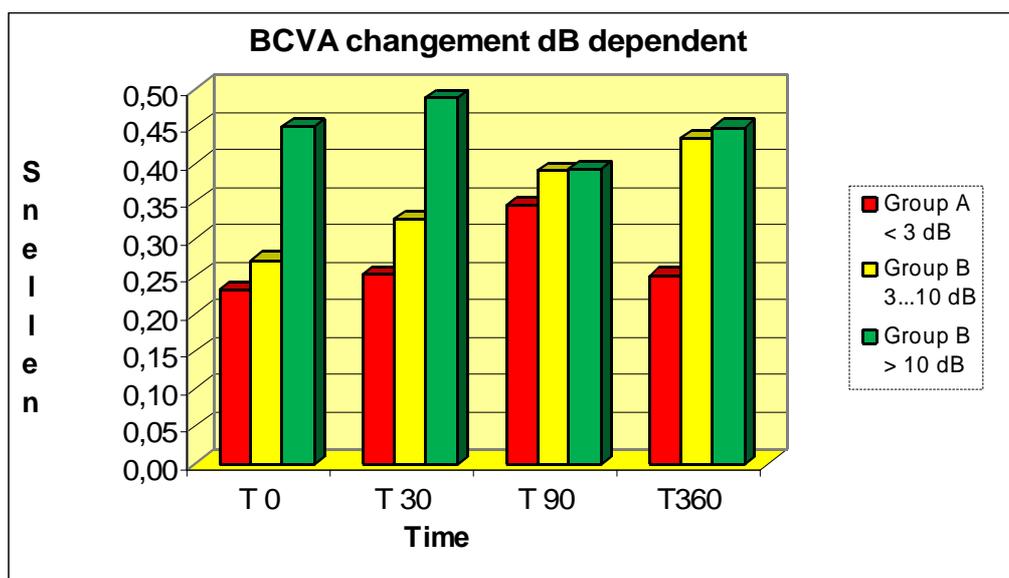
Al di là dell'uso di un corretto stile di vita e dell'integrazione di antiossidanti e sostanze neurotrofiche, l'unica terapia negli ultimi dieci anni che ha mostrato validità dopo l'insorgenza della malattia atrofica, per bloccare o rallentare l'evoluzione, è stato l'impianto di lipociti subsclerali. Il razionale si basa sull'effetto rigenerativo che l'incresione nella coroide (il tessuto vascolare che avvolge la retina) di *fattori di crescita* prodotti dagli *adipociti* ha sull'epitelio pigmentato e sulla retina stessa.

Da questi risultati clinici si evince l'importanza dei *fattori di crescita* nelle malattie atrofiche dei tessuti nervosi oculari e della peculiarità che hanno nella genesi dei fattori di crescita gli *adipociti*.



ARVO 2011 – USA: Adipocities Subscleral Implant. Growth Factors may be considered a new therapeutic approach to atrophic retinal pathology? Limoli et coll.

Nel momento in cui un paziente, che ha già effettuato un trattamento mediante impianto di lipociti subsclerali, comincia a non avere l'effetto desiderato sulla vitalità neurocitica, possiamo utilizzare un concentrato di fattori di crescita che provengono da due fonti molto ricche, e che per giunta sono autologhe, vale a dire prodotte dallo stesso paziente: *le piastrine e le cellule adipose*,



ARVO 2012 – USA: Prognostic Standard in Grown Factors Therapy. Limoli et coll.

Il gel piastrinico

Il gel di piastrine è un gel biologico ottenuto dalla combinazione di due componenti del sangue: il plasma ricco di piastrine, contenente numerosi ed importanti fattori di crescita capaci di stimolare meccanismi cellulari implicati nella riparazione e nella rigenerazione tessutale (angiogenesi, chemiotassi dei macrofagi, proliferazione e migrazione dei fibroblasti e sintesi di collagene), e trombina, quale reagente.

Le piastrine attivate, sotto forma di gel, elaborano, immagazzinano e rilasciano numerosi fattori di crescita (PDGF, TGFalfa e beta, IGF I e II, EGF, VEGF) capaci tra l'altro di stimolare la replicazione delle cellule di origine mesenchimale ed esplicano azione chemiotattica verso polimorfonucleati, monociti e macrofagi. Tra le diverse metodiche impiegate nella riparazione dei tessuti, una nuova tendenza è rappresentata dall'utilizzo di gel piastrinico e fattori di crescita. Il gel piastrinico è una metodica che consente l'utilizzo di fattori di crescita nella forma di Plasma ricco di piastrine (PRP, Platelet Rich Plasma) per accelerare i processi di guarigione iniziali (attraverso bFGF, PDGF e IGF) e tardivi (attraverso EGF, VEGF, TGF-b, IGF), nell'osso e nei tessuti molli.

Le piastrine elaborano, conservano e rilasciano numerosi fattori di crescita. Concentrando le piastrine o il lisato leuco-piastrinico in sede della lesione si ottiene la liberazione in loco di grandi quantità di fattori di crescita e altri mediatori chimici. Numerosi sono i fattori di crescita noti, tra questi è meglio conosciuta l'attività del PDGF (plated Derived Growth Factor) che ha azione mitogena e antiangiogenetica, regola inoltre l'attività di altri fattori di crescita come: TGF- β , IGF 1 e 2, EGF, VEGF.

Il **gel piastrinico autologo** (quando proviene dallo stesso organismo) è una sostanza ricchissima di fattori di crescita (**PdGF, Tgf- β , Igf I/II, Fgfb, EGF**) che viene prodotta dal prelievo di sangue del paziente affetto da lesione. Il gel piastrinico contiene numerosi e importanti fattori di crescita capaci di stimolare diversi meccanismi cellulari tra cui l'angiogenesi, la chemiotassi dei macrofagi, la proliferazione e la migrazione dei fibroblasti e la sintesi del collagene.

Le piastrine sono paragonabili a dei laboratori-magazzini cellulari che elaborano, immagazzinano e quindi rilasciano (se attivate) numerosi fattori di crescita (**growth factors o GFs**), capaci di stimolare la replicazione delle cellule di origine mesenchimali come fibroblasti, osteoblasti e cellule

endoteliali esercitando peraltro, un'azione chemiotattica verso macrofagi, monociti e polimorfonucleati.

Pertanto, rilasciati localmente, i GFs innescano vari **meccanismi di rigenerazione tessutale**.

Questa capacità delle piastrine ad intervenire nei meccanismi di riparazione tessutale ha costituito il presupposto teorico all'utilizzo del **gel di piastrine (PG)** in diverse circostanze, tutte accomunate dall'esigenza di attivare un processo di riparazione tessutale.

Riparazione, rigenerazione e guarigione dei tessuti sono fenomeni biologici di estrema complessità in cui intervengono diversi fattori che interagiscono fra loro: età, metabolismo (es. diabete), sede e tipo di lesione, infezioni, infiammazione. La riparazione dei tessuti dipende dalla velocità di crescita delle cellule, dalla capacità del tessuto di riorganizzare la vascolarizzazione. Per poter crescere e riorganizzarsi in tessuto nuovo e coerente, le cellule devono "colloquiare" tra loro scambiandosi informazioni biochimiche mediante "messaggeri molecolari" che vengono prodotti dalle cellule coinvolte nella rigenerazione. Quest'ultime sono sensibili ai fattori di crescita e rispondono migrando nella giusta sede, moltiplicandosi e producendo matrice extracellulare di sostegno.

Quali siano i meccanismi più reconditi mediante i quali il gel di piastrine esplica i suoi benefici effetti non è del tutto noto. Questi effetti, di sicuro, sono legati al lento e costante rilascio locale dei fattori di crescita contenuti in abbondanza nei granuli alfa delle piastrine, e all'azione di tutta una serie di mediatori chimici.

Di questi fattori conosciamo bene il:

- **PDGF (platelet derived growth factor)** che esplica azione mitogena ed angiogenetica, e coordina l'azione degli altri fattori di crescita (stimolazione dei fibroblasti e degli osteoblasti, induzione della differenziazione cellulare, catalizzatore degli effetti dei fattori di crescita su altre cellule come i macrofagi), aumenta la produzione del tessuto di ricostruzione, accelera la guarigione delle ulcere croniche.
- **TGF- β (transforming growth factor-beta)** ha azione chemiotattica, di stimolazione dei fibroblasti e degli osteoblasti e d'inibizione degli osteoclasti.
- **L'IGF I e II (insulin like growth factor I e II)** esercitano prevalente azione sugli osteoblasti.
- **L'EGF (epidermal growth factor)** stimola le cellule epiteliali e mesenchimali.

Gli adipociti e i proadipociti

Il tessuto adiposo è un tessuto connettivo propriamente detto di origine mesenchimale, formato da cellule dette adipociti, deputate a sintetizzare, accumulare e cedere lipidi.

E' noto che gli adipociti, innestati tra sclera e coroide, grazie alla loro attitudine, una volta dislocati in ambiente eterotopico, a produrre una importante quantità di fattori di crescita in particolare di bFGF, possono essere utilizzati nel contenimento dell'evoluzione delle patologie atrofiche del retina.

E' altrettanto noto che il **tessuto adiposo** umano adulto è un'importantissima sorgente di cellule staminali mesenchimali (ASCs, Adipose-Derived Stem Cells) che, con opportune tecniche di bioingegneria, quando vengono messe in coltura assieme a stimolatori specifici verso una determinata linea cellulare, possono essere indirizzate a produrre non solo tessuto adiposo ma anche vasi sanguigni, cartilagine, osso.

Le ASCs sono inoltre capaci in tal modo di differenziarsi in progenitori di **cellule neuronali che possono essere utilizzate nella rigenerazione di un tessuto neuronale danneggiato o perduto**. Risultati positivi ottenuti su modelli animali in vivo ha generato ottimismo in campo di rigenerazione tissutale nervosa; l'utilizzo di cellule staminali adulte, ottenute dal tessuto adiposo sono una potenziale fonte di progenitori cellulari neuronali che possono avere un'importanza fondamentale nelle applicazioni cliniche neurologiche.

Le cellule adipose, in particolar modo quelle progenitrici, sono peraltro una ricca fonte di fattori di crescita. In particolare esprimono e secernono citochine ematopoietiche come il fattore stimolante le colonie macrofagi che (M-CSF), il fattore stimolante le colonie granulocitarie e macrofagiche (GM-CSF); fattori anti-apoptotici, fattori di crescita angiogenici come il VEGF, il PlGF, il bFGF, l'angiogenina; TGF-beta e il fattore di crescita epatocitario. In condizioni di ipossia le cellule aumentano notevolmente la secrezione del VEGF che determina l'aumento del numero delle cellule endoteliali (quelle dei vasi sanguigni) e la diminuzione del tasso apoptotico.

Secernendo fattori di crescita, gli adipociti riescono a controllare e stimolare la rigenerazione delle cellule della cute danneggiate, favoriscono e velocizzano la guarigione delle ferite, ulcere e difetti cutanei, migliorano la pigmentazione della pelle e promuovono la crescita dei capelli attraverso l'attivazione delle cellule vicine. L'ipossia migliora le funzioni rigenerative degli adipociti tramite l'incremento della secrezione dei fattori di crescita. L'utilizzo di cellule autologhe spongiose dell'osso iliaco in combinazione con adipociti, colla di fibrina e materiali di supporto biodegradabili, hanno mostrato la formazione di nuovo osso ottenuto una continuità del cranio quasi completa.

L'utilizzo di innesti di grasso con cellule adipose progenitrici isolate dall'innesto stesso è divenuta un'alternativa all'aumento chirurgico dei tessuti molli, nei casi di perdita di tessuto mesenchimale, dovuti a traumatismi, resezioni tumorali o insulti vascolari. Ultimamente tale tecnica viene utilizzata anche per l'aumento del seno in chirurgia estetica riportando buoni risultati. La rigenerazione del tessuto adiposo è molto promettente nella ricostruzione del seno in pazienti che hanno subito una mastectomia per cancro della mammella. Studi clinici hanno dimostrato che gli adipociti hanno impiego anche in gastroenterologia, in quanto sono stati usati per il trattamento delle fistole in pazienti affetti da morbo di Crohn, determinandone la chiusura. La perdita o il difetto di altri tessuti come la cartilagine, può essere trattata con adipociti ad esempio nei difetti acquisiti per trauma o resezioni tumorali. Possono essere utilizzati anche nel trattamento delle articolazioni artritiche o partecipare alla ricostruzione articolare come nell'artrite reumatoide.

Cosa possiamo fare per voi

Presso il Centro Studi Ipovisione dopo dieci anni di esperienza nell'uso di fattori di crescita mediate dal tessuto adiposo orbitario abbiamo messo a punto la tecnica più semplice per utilizzare le proprietà dei fattori di crescita derivati dalle piastrine e delle cellule progenitrici degli adipociti, modificando la precedente tecnica, denominata Retinal Regeneration Technique o LRRT.

La terapia si basa sull'innesto in sede sovracoroideale di un peduncolo adiposo vascolarizzato di origine orbitaria, e sulla iniezione di gel piastrinico, o di adipociti provenienti dalla frazione

vascolare adiposa del lipoaspirato addominale, o un mix di entrambi, nel peduncolo adiposo impiantato in sede sovra coroideale e nella tasca sclerocoroideale .

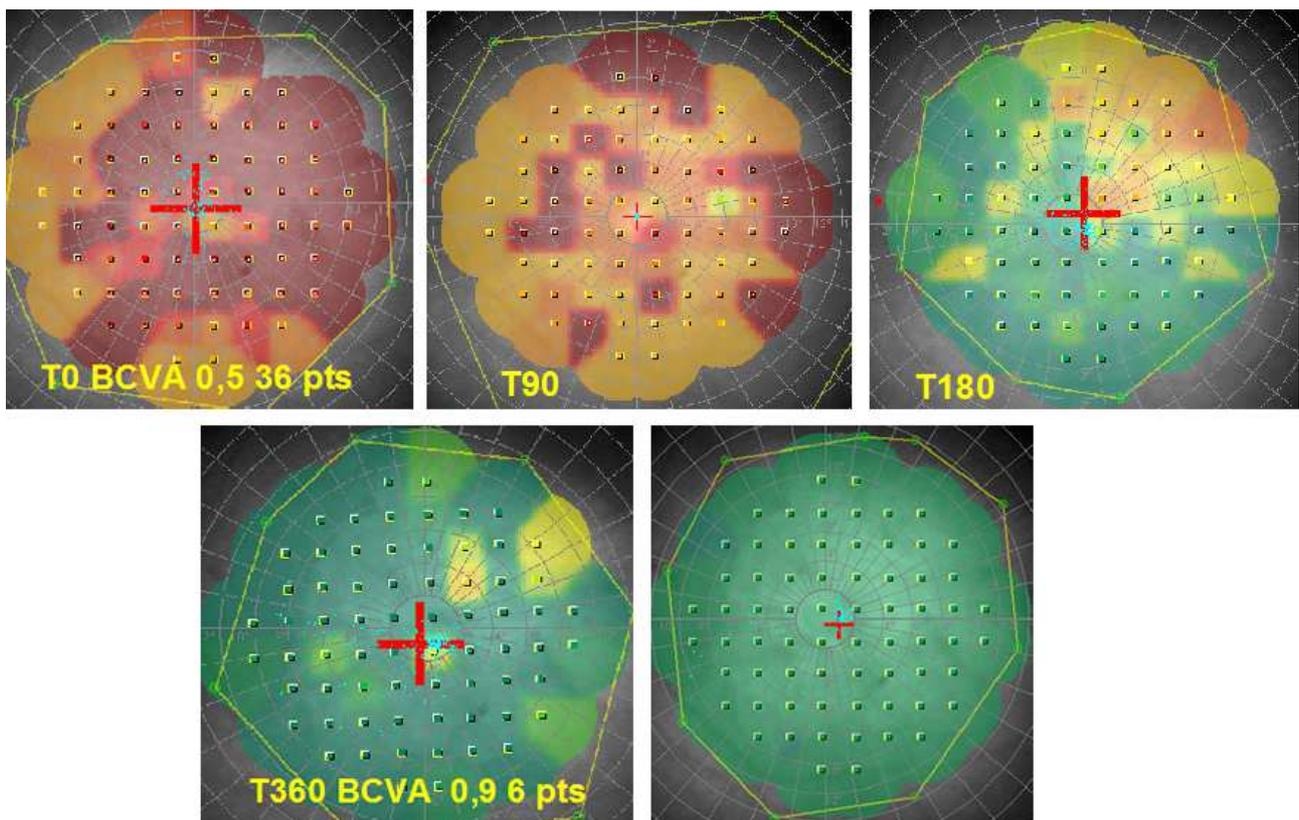
L'origine autologa non consente reazioni di rigetto: si tratta di spostare i fattori di crescita da un punto all'altro dell'organismo stesso dove è più alta la richiesta.

Il materiale biologico NON subisce manipolazioni extracorporee ma viene prelevato e innestato tra sclera e retina.

Impiantando tra retina e sclera tali elementi otteniamo un'azione nutrizionale sull'epitelio pigmentato, sulla retina e sul peduncolo stesso senza precedenti. L'azione terapeutica di tali cellule mira a mantenere vitale nel tempo il peduncolo adiposo dislocato sul piano coroideale e a ristabilire le condizioni per la vitalità delle cellule dell'epitelio pigmentato e dei fotorecettori: dunque la tecnica mira ad arrestare o rallentare per un certo periodo l'evoluzione della patologia atrofizzante.

Per questo motivo l'azione trofica deve essere idealmente esercitata su cellule ancora vitali.

I risultati sono tanto migliori quando maggiormente conservato è l'epitelio pigmentato e dunque è opportuno intervenire quando la malattia è si già conclamata ma possibilmente in uno stadio precoce, quando i fotorecettori sia pure non funzionanti presentano ancora segni di vitalità.



Nelle immagini possiamo notare la progressione dell'azione rigenerativa nel tempo (Tgiorni, visus per lontano in decimi e per vicino in pts) in un caso di degenerazione maculare di Stargart. Il risultato particolarmente importante è attribuibile alla quantità di cellule ancora vive al momento del trattamento.

Dunque una valutazione preventiva dell'occhio con strumentazioni sofisticate come lo tomografia ad alta velocità (OCT Spectral domain), l'elettroretinogramma e la microperimetria sono fondamentali per conoscere la qualità di queste cellule, individuare il momento migliore per attuare la terapia e dettare la prognosi della malattia e le possibilità terapeutiche dell'intervento.

Il monitoraggio attento della patologia da indicazione all'eventuale reiterazione del trattamento infiltrativo del peduncolo mediante il cosiddetto Platelet Gel Loading treatment (PGL) con il quale una opportuna soluzione di fattori di crescita derivati dal gel piastrinico può caricare il peduncolo che lo rilascia poi alla coroide, all'epitelio pigmentato e alla retina, oltre ad una loro azione diretta.

La cosa interessante è che con le modifiche apportate alla precedente tecnica è ora possibile reiterare l'innesto dei fattori di crescita periodicamente senza dover ripetere l'intervento, con una semplice iniezione esternamente al bulbo oculare. Così potremo contenere il decadimento funzionale dell'occhio tipico delle malattie atrofiche più sopra menzionate.

Bibliografia (ricerca anche su google o pubmed.com “adipose stem cells” o “growth factors”)

- Pelaez, O.: Retinosis pigmentaria. Experiencia cubana Editorial Cientifico Técnica. La Habana, 1997.
- Burgess W. Maciag T. (1989): The heparin binding (fibroblast) growth factor family Ann. Rev. Biochem. 575-606.
- Abraham J., Whang J.: Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organisation EMBO J 2523-8 (1986).
- Mascarelli F., Raulais D., Courtois Y.: Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments IENBO J. 8: 2265-2273 (1989).
- Sensenbrenner M.: The neurotrophic activity of fibroblast growth factors. Progress in neurobiology vol 421, pp683-704 (1993)
- Morrison R.S., Sharma A.: bFGF supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture.
- Sak-aguchi D.S., Janik L.M., Reh T.A.: Basic fibroblast growth factor induced transdifferentiation of retinal pigment epithelium: generation of retinal neurons and glia Dev Dyn 1997 Aug; 209(4): 387-98.
- Barritault D. et al.: Purification, characterization and biological properties of the eye-derived growth factor from retina: analogies with brain-derived growth factor J Neurosci, Res 477-490 (1982).
- Gargini C., Belfiore M.S., Bisti S., Cervetto L., Valter K, Storie J.: The impact of basic fibroblast growth factor on photoreceptor function and morphology Invest Ophthalmol Vis Sci 1999 Aug; 40(9): 2088-99.
- Li ZY, Chang J.H., Milam A.E.: A gradient of rod photoreceptors in the non-human primate retina Vis Neurosci 1997 Jul - Aug; 14(4): 671-9.
- Malecaze F., Mascarelli F., Courtois Y., Mathis A., Hicks D. Recepteurs au facteur de croissance des fibroblastes et retinopathie pigmentaire. Ophthalmologie 1992; 6: 170173.
- Fak-torovich E.G., Steinberg R.H., Yasumura D., Matthes M.T., LaVail N.M. Photoreceptor degeneration in inherited retina dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor Nature. 1990; 347(8): 6.
- Reuss B, von Bohlen und Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. Cell Tissue Res. 2003. 313: 139-157.
- Steiriberger RH., et al. Slowing by survival factors of inherited retinal degenerations in transgenic rats with mutant opsin genes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37(8): 5226.

- Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatologic Surgery*. 2008, 34, 1178– 1185.
- Limoli PG, Carpi R, Tassi F, Vingolo EM, D'Amato L, Giacomotti E, Solari S, Di Corato S, Prognostic Standard In Grown Factors Teraphy. *Proceedings of ARVO 2012 – USA*.
- Limoli PG, Carpi R, Tassi F, Vingolo EM, D'Amato L, Giacomotti E, Solari S, Di Corato S, Fattori di crescita autologhi mediante impianto subsclerale di lipociti: possiamo considerare la microperimetria un possibile standard prognostico? *Euvision 3/2012 (X anno)*.
- Limoli PG, Carpi R, Tassi F, Scalinci SZ, Tassi F, Vingolo EM, D'Amato L Giacomotti E, Salvatore S, Corradetti G. Fattori di crescita, impianto di lipociti subsclerali e patologie atrofiche della retina. *Viscochirurgia*. Anno XXVI, N. 3 • 2011, 56-59.
- Limoli PG, Carpi R, Tassi F, Vingolo E, 'Amato L, Giacomotti E, Solari R, Di Corato R L'impianto subsclerale di lipociti può essere considerato un'innovazione terapeutica nelle patologie atrofiche della retina? *Euvision 2/2011 (IX anno)*, 28-32.
- Limoli PG, Scalinci SZ, Tassi F. D'Amato L, Corradetti G. Degenerazione maculare atrofica e fattori di crescita. *Viscochirurgia*. Anno XXVI, N. 2 • 2011, 40-43.
- Limoli PG, Carpi R, Vingolo EM, D'Amato L, Giacomotti E, Tassi F, Costanzo P, Solari R, De Corato R. Adipocities Subscleral Implant: Grown Factors may be considered a new therapy of atrophic retinal pathology?. *Proceedings of ARVO 2011 – USA*.
- Limoli PG, Scalinci SZ, Tassi F, D'Amato L, Corradetti G. Degenerazione maculare atrofica e fattori di crescita. *Case Report*. *Ipovisione 37*, 4-11.