



**scienza attiva<sup>®</sup>**

## **Uso terapeutico delle cellule staminali per la riparazione della cornea**

**Prof. Paolo Rama**

**Ospedale San Raffaele - Milano**

### **Introduzione**

Le cellule staminali sono l'origine di tutti i tessuti e organi del nostro corpo. Il loro potenziale proliferativo ha fatto intravedere la possibilità di rigenerare tessuti ed organi in laboratorio con cellule della stessa persona, eliminando così la necessità di donatori e il rischio di rigetto. Nonostante l'idea diffusa che le cellule staminali possano guarire tutte le malattie, sono poche attualmente le vere applicazioni delle cellule staminali: la pelle, il sangue e poco altro (*Ezhkova 2010*). Per quanto riguarda l'occhio, in questo momento siamo in grado di isolare, coltivare e innestare cellule staminali dell'epitelio corneale, lo strato esterno della cornea, le cosiddette cellule staminali limbari (*Rama 2010*). Questa tecnica non sostituisce il trapianto della cornea, ma è indicato per trattare quelle malattie corneali (deficit delle cellule staminali limbari) in cui manca l'epitelio corneale, come ad esempio dopo un ustione. Per le malattie della retina e del nervo ottico non è invece ancora possibile prevedere se gli studi in corso consentiranno di utilizzare le cellule staminali per rigenerare i tessuti malati.

### **La cornea**

La cornea rappresenta la parte anteriore, trasparente, dell'occhio. E' dotata di notevole resistenza e flessibilità ed ha l'aspetto di una calotta sferica. Ha un diametro orizzontale maggiore di quello verticale (rispettivamente 12 e 11,5 mm) ed uno spessore che varia da circa 0,5 mm nella zona centrale, a circa 0,7 mm nella porzione periferica. Assieme al cristallino ha funzioni di lente convergente e il suo potere refrattivo è di circa 45 diottrie. La parte periferica della cornea, detta limbus, ha una larghezza di circa 1 mm e prosegue nel tessuto sclerale (fig 1).

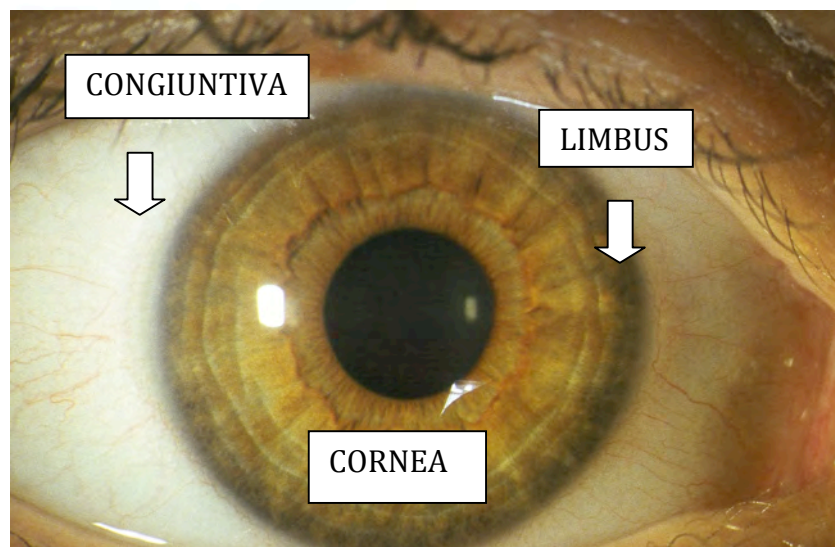


Fig 1: cornea normale

Istologicamente la cornea è composta da 5 strati: l'epitelio, la membrana di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e l'endotelio (fig 2).

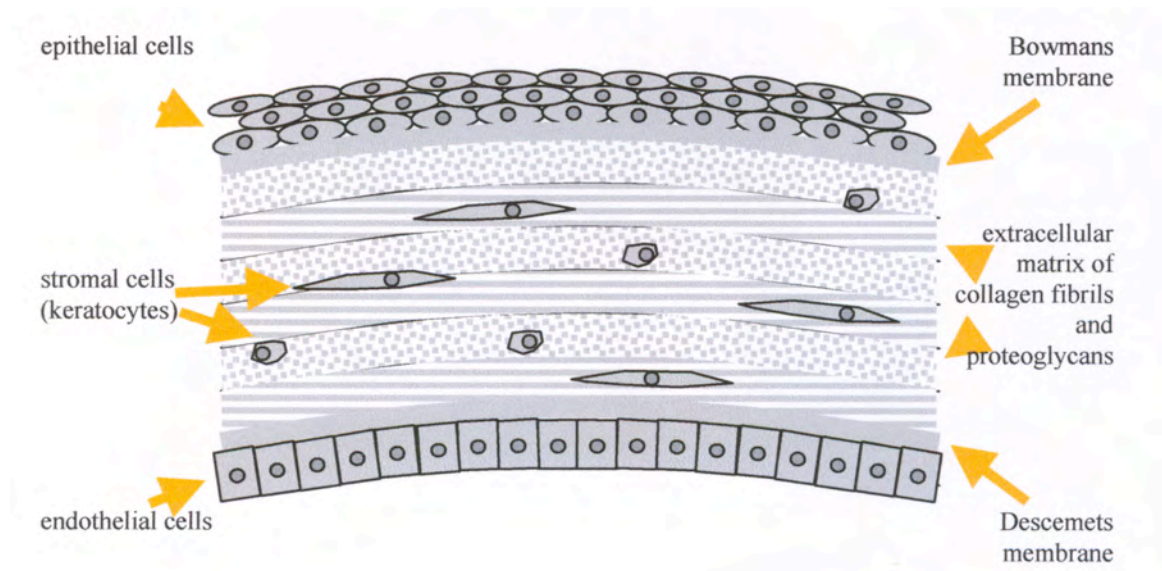
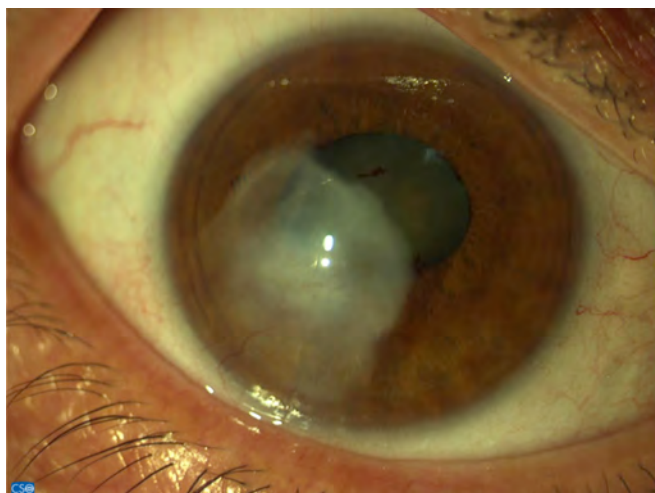


Fig 2: anatomia della cornea

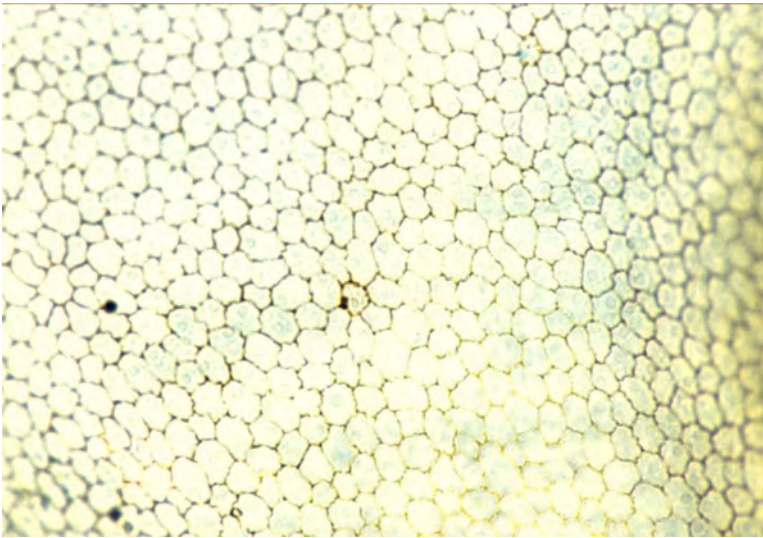


**L'epitelio** è stratificato, squamoso e non cheratinizzato e comprende un singolo strato di cellule basali, due o tre strati di cellule alari e due strati di cellule squamose di superficie. Le cellule epiteliali hanno un'emivita di alcuni giorni e rigenerano costantemente lo strato esterno grazie ad un regolare processo di moltiplicazione delle cellule nello strato basale, stratificazione e loro migrazione in superficie e degenerazione con distacco nel film lacrimale alla fine. Essendo dotato di una eccellente capacità riparativa, l'epitelio raramente forma cicatrici. L'area limbare è costituita da un epitelio formato da circa 10 strati cellulari; nel suo strato basale si trovano le cellule staminali che sostengono il normale ricambio dell'epitelio e la risposta riparativa in caso di traumi. **La membrana di Bowman**, al di sotto dell'epitelio, è uno strato di collagene, privo di cellule. Se danneggiato può riparare con tessuto cicatriziale e lasciare opacità permanenti (leucomi superficiali). **Lo stroma** è il principale costituente della cornea, occupando circa il 90% del suo spessore. È composto da strati di fibre di collagene orientate in un complesso ordine che garantisce la trasparenza della cornea: quando questa regolarità viene persa, come può avvenire in corso di diversi eventi patologici, la cornea diventa opaca (leucoma corneale) [fig 3].



**Fig 3: opacità corneale (leucoma) esito di infezione erpetica**

Tra le fibre, immersi nella matrice composta da condroitin solfato e cheratan solfato, si trovano i **cheratociti**, cellule fibroblastiche molto specializzate che regolano la sintesi e la disposizione delle fibre collagene, quindi fondamentali per la trasparenza della cornea. **La membrana di Descemet**, situata sulla faccia posteriore della cornea, tra stroma ed endotelio, è composta da fibrille di collagene che formano un reticolato. Sulla Descemet poggia l'ultimo strato corneale, l'**endotelio**, composto da un singolo strato di cellule esagonali, che nell'insieme appaiono come un mosaico [fig 4]. L'endotelio umano ha scarse capacità rigenerative per cui la perdita cellulare viene compensata dall'allargamento delle cellule adiacenti e dalla migrazione di cellule dalla periferia, dove la densità è molto maggiore che al centro, avendo la funzione di servire da "deposito" di cellule per le necessità.



**Fig 4: endotelio umano. Si osserva il regolare mosaico di cellule esagonali**

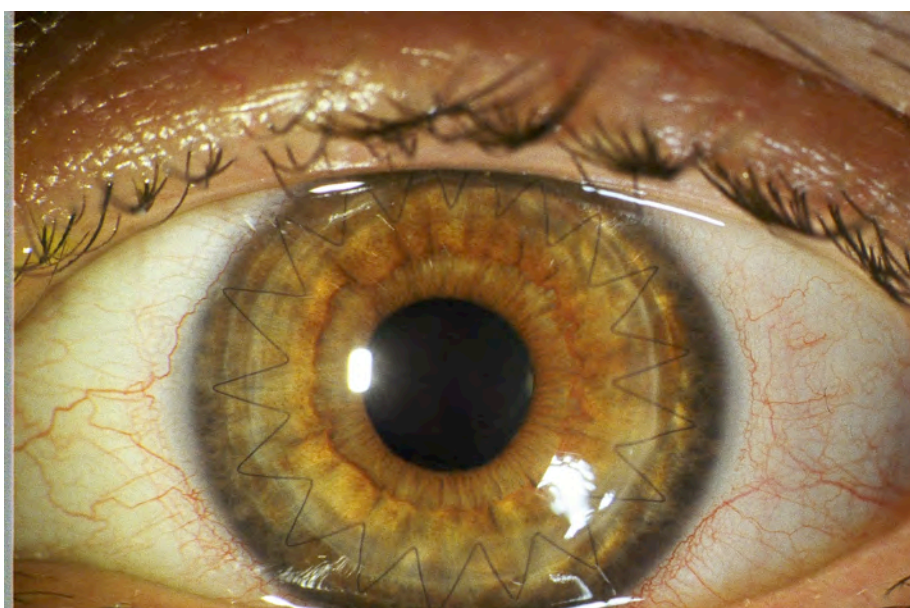
L'innervazione della cornea è prevalentemente di tipo sensitivo ed è costituita dalle terminazioni dei nervi ciliari lunghi che derivano dal ramo naso-ciliare della branca oftalmica del trigemino. Prima di raggiungere la cornea, le fibre nervose perdono la guaina mielinica, ed arrivate all'epitelio, anche la guaina di Schwann. L'endotelio e la membrana di Descemet non sono innervati.





## Il trapianto di cornea

Il trapianto di cornea consiste nella sostituzione di una parte del tessuto corneale patologico, di solito la sua porzione centrale, con un innesto omologo da donatore non-vivente. Viene definita cheratoplastica perforante, il trapianto di cornea a tutto spessore, cheratoplastica lamellare quello invece in cui si innesta solo una parte della cornea, anteriore o posteriore (fig 5). La cheratoplastica, introdotta verso la fine dell'800, è andata affinandosi nel corso degli anni arrivando ad essere, verso gli anni '80, una tecnica di routine a basso rischio di rigetto e con alte percentuali di successo.



**Fig 5: immagine di un trapianto di cornea (cheratoplastica perforante) dopo tre mesi dall'intervento, con la sutura continua a "sopraggitto" bene evidente**

Il lembo di cornea innestato del donatore si integra gradualmente con la cornea ricevente del paziente. L'epitelio ricevente migra dal tessuto circostante il trapianto e sostituisce completamente quello del ricevente: di solito questo processo si completa nell'arco 1-2 mesi. Il fatto che il tessuto donatore sia ricoperto di cellule del ricevente spiega l'alta percentuale di successo di questo tipo di trapianto e il basso rischio di rigetto, tale da non richiedere l'immunosoppressione, che al contrario è d'obbligo nei trapianti d'organo.

Se il limbus è compromesso viene a mancare l'apporto di nuovo epitelio. Se si esegue un trapianto di cornea in questi casi (malattie con deficit limbare, ad esempio le ustioni; vedi Fig. 6) il lembo di cornea innestato non potrà essere ricoperto di epitelio corneale e la congiuntiva migrerà per coprire la superficie, causando l'opacizzazione della cornea innestata e quindi il fallimento dell'intervento (Fig. 7).

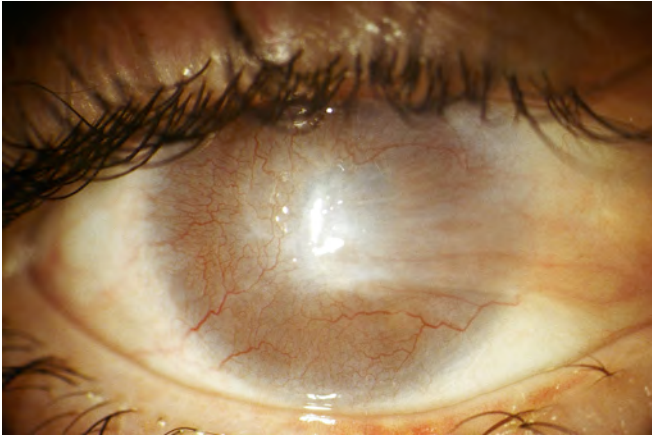


Fig 6: in questo caso la cornea è completamente ricoperta da un tessuto vascolarizzato di origine congiuntivale come risposta cicatriziale ad una ustione



Fig 7: trapianto di cornea fallito per la mancanza di cellule staminali dell'epitelio corneale (deficit limbare) in un paziente ustionato

## **Le cellule staminali della cornea**

Le cellule epiteliali corneali sono costantemente rinnovate durante tutto l'arco della vita, esattamente come avviene per la pelle: le cellule superficiali si sfaldano nel film lacrimale e nuove cellule vengono generate per rimpiazzare quelle perse. **Questo equilibrio viene garantito dalle cellule staminali presenti nello strato basale dell'epitelio del limbus, la zona di transizione tra cornea e congiuntiva bulbare (Fig 8)**. Oltre a ripopolare l'epitelio corneale, queste cellule fungono da barriera giunzionale, evitando che la congiuntiva invada la cornea. Una disfunzione o un deficit delle cellule staminali limbari comporta problemi all'epitelio corneale con comparsa di difetti epiteliali cronici, migrazione dell'epitelio congiuntivale a coprire le aree prive di epitelio corneale con formazione di un panno neovascolare (Fig 6).

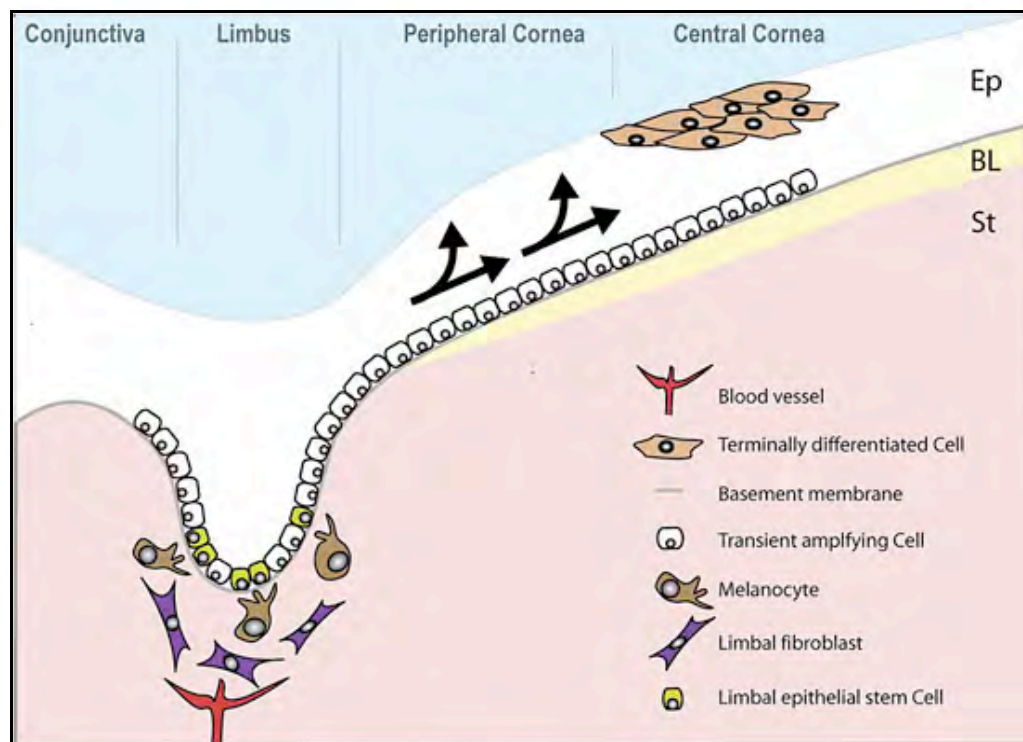


Fig 8: schema del limbus e del turn-over dell'epitelio corneale

### Le malattie delle cellule staminali della cornea (deficit libare)

Diverse condizioni possono determinare un danno alle cellule staminali corneali: ustioni chimiche o fisiche, malattie immunitarie e infiammatorie come la sindrome di Stevens-Johnson, il pemfigoide oculare cicatriziale, la reazione graft-versus-host, danni iatrogeni chirurgici o da abuso di farmaci, abuso di lenti a contatto, gravi cheratiti infettive. Infine, condizioni come l'aniridia e la cheratopatia neurotrofica possono portare ad una ipofunzione e perdita progressiva di queste cellule.

### Cosa si faceva in passato per il deficit libare

Già alla fine degli anni '60 Strampelli e Barraquer proponevano di trattare i danni corneali monolaterali negli ustionati con un innesto di porzioni di limbus prelevate dall'occhio sano, metodica successivamente standardizzata da Kenyon alla fine degli anni '80 (*Kenyon 1989*). Questo tipo di intervento non ha però mai riscosso una grande popolarità, per il potenziale rischio per l'occhio sano e per la mancanza di ogni altra soluzione in caso di fallimento dell'innesto.

### La coltura delle cellule staminali background

Nel 1975 Rheinwald e Green, due biologi americani del Massachusetts Institute of Technology di Cambridge, pubblicavano nella prestigiosa rivista "Cell" un lavoro in cui dimostravano la **possibilità di coltivare cellule staminali** dell'epidermide in opportune condizioni controllate (*Reinwald and Green 1975*). Nove anni dopo Gallico, un chirurgo plastico americano della Division Plastic Surgery di Boston, in collaborazione con l'ideatore della procedura, Howard Green, eseguiva con successo i primi due innesti di epidermide coltivata in due gravissimi ustionati (*Gallico 1984*).





Dopo questi primi interventi la metodica ha trovato conferma ed oggi la procedura di innestare epidermide coltivata è entrata nella routine nel trattamento delle ustioni e nel trattamento di altre malattie della pelle che richiedono la ricostruzione di vaste aree di cute (*De Luca 2006*).

### **La coltura delle cellule staminali dell'epitelio corneale**

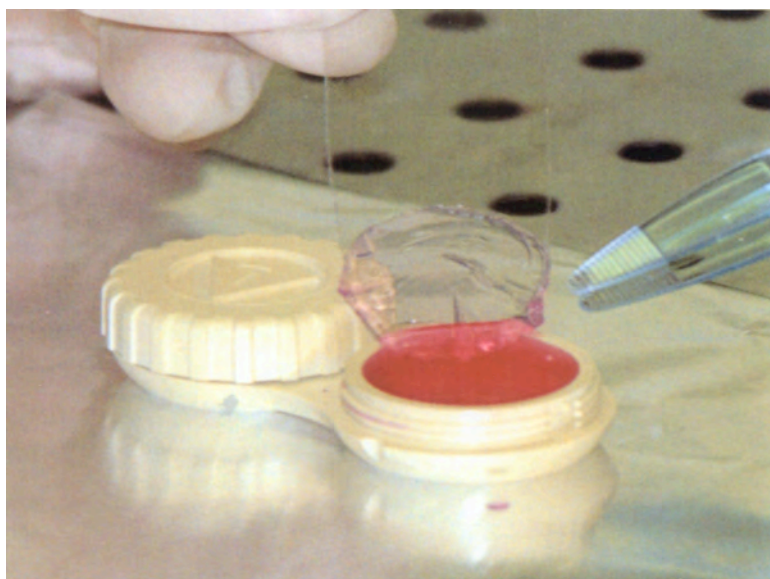
Nel 1997 i ricercatori italiani Pellegrini e De Luca assieme agli oculisti Traverso e Zingirian pubblicavano nella rivista "The Lancet" i primi due casi di ricostruzione del limbus con innesto di cellule staminali limbari coltivate prelevate dall'occhio contro-laterale non affetto (*Pellegrini 1997*). La tecnica proposta riproduceva esattamente la metodica presentata anni prima da Green e coll. per la ricostruzione della pelle. Il limite del lavoro rimaneva la difficoltà e scarsa riproducibilità della procedura che ne avrebbe impedito la diffusione.

L'introduzione successiva della fibrina come supporto per le cellule coltivate ha consentito di risolvere questi problemi (*Pellegrini 1999*) e nel 2001 Rama e coll. pubblicavano nella rivista Transplantation i risultati di 18 innesti di cellule staminali limbari coltivate su fibrina (*Rama 2001*). I risultati sulla sopravvivenza a lungo termine delle cellule staminali innestate sono stati poi recentemente pubblicati nella rivista New England Journal of Medicine (*Rama 2010*).

### **L'intervento di innesto di cellule staminali limbari coltivate**

La procedura inizia con un piccolo prelievo superficiale di limbus (2 mm<sup>2</sup> di dimensioni, circa 100 micron di profondità) che viene fatto, senza ricovero, in sala operatoria, in anestesia locale.

Il prelievo viene fatto nell'occhio contro-laterale non affetto da malattia; in caso di danni bilaterali, è sufficiente una zona non danneggiata di pochi millimetri dove eseguire la biopsia e poi estrarre le cellule staminali per la coltura. L'occhio non viene bendato e il paziente può tornare a casa e riprendere tutte le normali attività mentre il tessuto prelevato viene inviato al laboratorio, che svolgerà tutta la procedura di isolamento e coltura delle cellule staminali. Il rischio per l'occhio donatore è molto basso, tenendo conto della sede periferica e delle dimensioni del prelievo. Anche quando la biopsia è stata ripetuta più volte non abbiamo mai osservato alcun problema. Dopo circa due settimane le cellule staminali, preparate su un foglietto di fibrina, molto simile a una grande lente a contatto morbida, vengono inviate al chirurgo che eseguirà l'innesto.

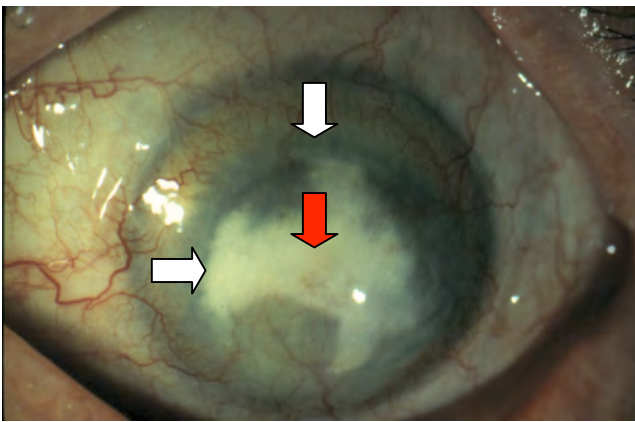


**Fig 9: come si presenta al chirurgo il lembo di fibrina con le cellule staminali coltivate**

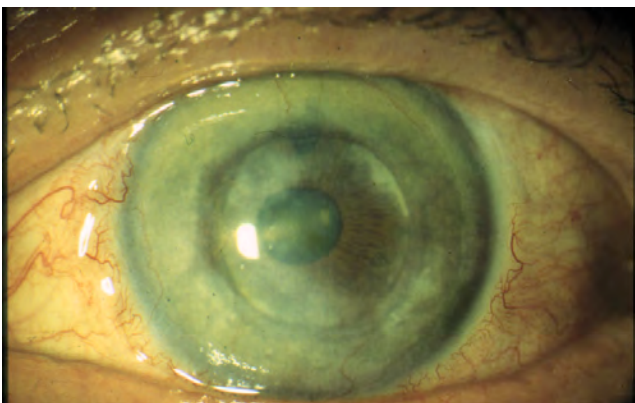




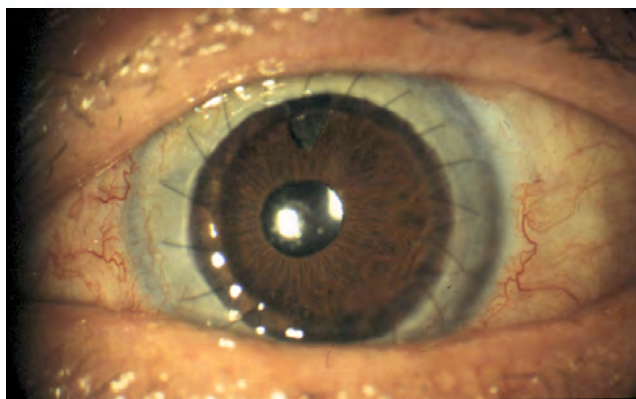
L'intervento di innesto delle cellule staminali coltivate prevede la rimozione dello strato vascolarizzato che ricopre la cornea e il successivo posizionamento del foglietto di fibrina, contenente le cellule coltivate, sulla superficie corneale. Se l'ustione è stata superficiale a volte la cornea sottostante può essere trasparente: in questo caso l'intervento è risolutivo. Se al contrario il danno è stato profondo, con la formazione di un leucoma stromale, in un secondo tempo si renderà necessaria il trapianto di cornea tradizionale, lamellare o perforante, per sostituire il tessuto opaco. Dopo questo innesto il trapianto di cornea avrà buone probabilità di successo perché le cellule staminali innestate saranno in grado di sostenere l'apporto di nuovo epitelio Fig 10 a,b e c). L'osservazione che, a distanza di anni, i lembi di cornea innestati con gli interventi di cheratoplastica erano perfettamente trasparenti con un epitelio stabile è stata una ulteriore conferma che le cellule staminali coltivate hanno mantenuto le loro caratteristiche e le loro capacità nel tempo (*Rama 2010*).



**Fig 10a:** paziente con deficit limbare secondario a ustione e opacità stromale (freccia rossa). Si intravedono i bordi (freccie bianche) di un precedente trapianto di cornea fallito per la mancanza delle cellule staminali limbari.



**Fig 10b:** dopo l'innesto delle cellule staminali l'epitelio corneale appare in buona salute, riconoscibile dalla mancanza di nevasi. Permane l'opacità profonda che andrà trattata con un trapianto di cornea tradizionale



**Fig 10c:** dopo il trapianto di cornea la trasparenza è perfetta e l'epitelio si mantiene stabile grazie alle cellule staminali precedentemente innestate

## I limiti e le prospettive future

Gli ottimi risultati ottenuti, pubblicati nel New England da Rama, riguardano innesti autologhi, cioè eseguiti con cellule coltivate dello stesso paziente. Ci sono però casi di lesioni bilaterali in cui non è possibile isolare cellule staminali del paziente stesso. In questi casi alcuni Autori propongono l'**innesto limbare omologo**, cioè con **cellule di un donatore**. In passato sono stati utilizzati donatori consanguinei viventi e donatori deceduti. A differenza del precedente, questo tipo di procedura presenta il problema del rigetto, che è molto alto, essendo l'epitelio la prima linea di difesa dell'organismo verso il mondo esterno, quindi con un forte controllo immunitario. I risultati a breve termine di questi interventi sono stati riportati buoni ma la sopravvivenza a lungo termine, nonostante l'immunosoppressione sistemica, rimane un dilemma. Se infatti si preleva l'epitelio della cornea centrale a distanza di anni dopo un innesto limbare omologo, non si trova alcuna cellula del donatore (*Henderson 2001, Daya 2005*), questo a significare che l'epitelio omologo non può sopravvivere al rigetto. I successi riportati potrebbero essere spiegati con un effetto di stimolo delle cellule staminali innestate su cellule sopravvissute del paziente, indipendente quindi dalla sopravvivenza delle cellule staminali del donatore (*Pellegrini 2004*).

**Le prospettive future** per il trattamento del deficit limbare bilaterale totale sono diverse: una prima possibilità potrebbe essere quella di modulare in modo più specifico la risposta immunitaria verso le cellule staminali del donatore, o attraverso l'utilizzo di farmaci più specifici e meno tossici o modificando gli antigeni delle cellule trapiantate in modo da non farle riconoscere dal sistema immunitario. Un'altra strada potrebbe essere quella di utilizzare cellule staminali prelevate da altri distretti nello stesso paziente, quindi senza rischio di rigetto. Sono già state utilizzate cellule staminali della mucosa orale (*Nishida 2004*), dell'epidermide e cellule mesenchimali: i risultati sono ancora molto preliminari e non è possibile prevedere se potrà rappresentare una possibile soluzione in futuro. Infine le cellule embrionarie potrebbero rappresentare una sorgente di cellule staminali, ma in attesa di sapere se verrà regolamentato il loro uso, si sta guardando con molte speranze alle cellule riprogrammate, le cosiddette iPC, cellule adulte riportate ad un potenziale di cellula embrionaria attraverso l'inserimento di specifici geni (*Takahashi 2007, Nishikawa 2008*).



## **Conclusioni**

Le malattie che comportano un danno delle cellule staminali del limbus, non solo portano alla perdita della trasparenza della cornea, ma impediscono anche di poter recuperare la vista con un trapianto di cornea. La coltura e l'innesto di cellule staminali limbari è una valida soluzione oggi: i risultati sono buoni e stabili nel tempo e l'intervento è riconosciuto dal sistema sanitario nazionale e rimborsato con uno specifico DRG. La possibilità di coltivare cellule staminali apre inoltre nuovi orizzonti per la terapia delle malattie genetiche e per il trattamento delle malattie da deficit limbare bilaterale, che sono ancora oggi un problema senza una valida soluzione.

## **Bibliografia di riferimento:**

- Daya SM, Watson A, Sharpe JR, et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 2005;112:470-7.
- De Luca M, Pellegrini G and Green H. Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts. *Regen Med* 2006;1:45-57.
- Ezhkova E and Fuchs E. An eye to treating blindness. *Nature* 2010;466:567-568
- Gallico GG, Connor NE, Compton CC et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984;311:448-451.
- Henderson TR, Coster DJ, Williams KA. The long term outcome of limbal allografts: the search for surviving cells. *Br J Ophthalmol* 2001;85:604-9.
- Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-722.
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004;351:1187-1196.
- Nishikawa S, Goldstein RA and Nierras NR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9:725-729.
- Pellegrini G, Traverso CE, Zingirian M et al. Long-term restoration of damaged corneal surface with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990-993.
- Pellegrini G, Golisano O, Paterna P et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999;145:769-781.
- Pellegrini G. Changing the cell source in cell therapy? *N Engl J Med* 2004;351:1170-2.
- Rama P, Bonini S, Lambiase A et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72:1478-1485.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010; 363:147-55.
- Reinwald JG and Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-344.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.