



Paolo Limoli¹, Enzo Vingolo², Celeste Limoli¹, Marcella Nebbioso³

¹ Centro Studi Ipovisione di Milano, P.zza Sempione 3, 20145 Milano

² Ospedale A. Fiorini di Terracina, Dipartimento di Scienze e Biotechnologie Medico-Chirurgiche Sapienza Università di Roma

³ Dipartimento degli Organi di Senso, Centro di Elettrofisiologia Oculare, Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma

La rimodulazione della funzione visiva cellulo-mediata mediante Limoli Retinal Restoration Technique

Abstract: L'allungamento della vita media, in coesistenza con le patologie distrofiche della neuroretina, determina ricadute negative sulla qualità della vita della popolazione ipovedente. Gli autori affrontano la possibilità di rimodulare la vista attraverso le terapie cellulari in modo da potenziare il residuo visivo di tali pazienti e renderne più semplice la riabilitazione visiva.

La terapia cellulare, ricreando un microambiente retinico più adeguato, favorisce la vitalità cellulare della neuroretina, stabilizzandola nel tempo. Vengono descritti i principali meccanismi biomolecolari che sottendono l'azione delle terapie cellulari e si fa cenno alla Limoli Retinal Restoration Technique, tecnica studiata per azzerare i rischi potenziali legati alla chirurgia massimizzando l'azione di tre componenti cellulari mesenchimali: le cellule staminali mesenchimali, le cellule adipose stromali, le piastrine.

Keywords: Ipovisione, malattie neuroretiniche, terapia cellulare, cellule staminali mesenchimali, cellule stromali adipose, piastrine.

Background

I pazienti affetti da disabilità irreversibili della vista vengono definiti ipovedenti. Le cause possono essere malattie sistemiche come il diabete, le malattie degenerative o l'invecchiamento. Quando una patologia neuro-retinica distrugge un numero sensibile di elementi all'interno dei circuiti sensoriali si verifica la condizione di ipovisione.

Una volta che l'handicap visivo si è instaurato, la riabilitazione visiva costituisce attualmente l'unica proposta clinica per tali pazienti. Questa

si basa sull'utilizzo di strumenti ottici o elettronici che favoriscono una enfattizzazione del segnale di ingresso attraverso ingrandimento, miglioramento del contrasto e dell'illuminazione. In un numero ridotto di centri riabilitativi vengono offerte terapie basate su neuromodulazione, stimolazione della plasticità neuro-sinaptica, neuro-protezione, neuro-rigenerazione (Huang, and al. 2010).

In particolare, la "neuro-modulazione" del segnale visivo, viene utilizzata al fine di stabilizzare l'immagine sulla retina, sincronizzare i po-

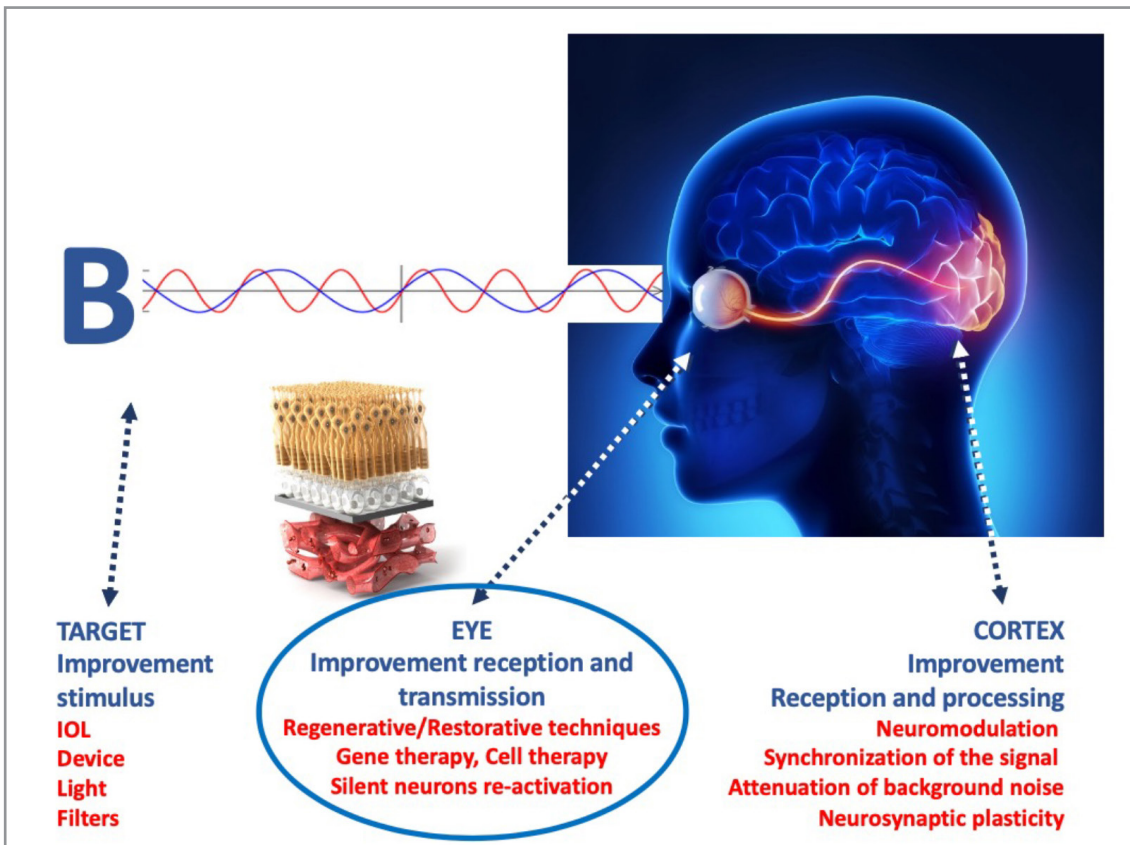


Figura 1 - Possiamo controllare l'evoluzione delle patologie della neuro-retina? Il miglioramento fisico dello stimolo, della sua ricezione e trasmissione da parte della retina, della ricezione e processazione da parte della corteccia cerebrale contribuiscono a ri-modulare la funzione visiva nel paziente ipovedente. Una maggiore attenzione deve essere data alle possibilità terapeutiche relative alla retina. Nuove linee terapeutiche, in particolare la cell therapy, sembrano in grado, attraverso fini processi di comunicazione intercellulare microambiente-dipendenti, di orientare la riparazione e la ripresa funzionale di tessuti danneggiati.

tenziali visivi in ingresso ed eliminare i rumori di fondo. La neuromodulazione è responsabile anche di una certa plasticità sinaptica a livello corticale, tale da ridurre la percezione del danno.

Tuttavia, la progressione del danno retinico associato normalmente alle patologie degenerative dell'occhio rimette in discussione l'approccio riabilitativo limitato a queste due componenti. Può essere utile integrarlo con terapie capaci di risvegliare i neuroni funzionalmente silenti o in grado di attutire, fermare o in alcuni casi invertire l'evoluzione della noxa patogena neuro-retinica (fig. 1).

Tali terapie nascono dalle recenti acquisizioni nel campo della biologia cellulare che permet-

tono una maggiore comprensione dei processi di danno e riparazione, degenerazione e rigenerazione, de-mielinizzazione e ri-mielinizzazione, perdita e recupero funzionale (Huang, and al. 2010).

Infatti, indipendentemente dalla natura della malattia degenerativa a carico della neuro-retina, una data sequenza di eventi molecolari sottostanti porta a cambiamenti morfologici, responsabili di un danno prima funzionale, poi anche strutturale, a carico dei circuiti neuro-retinici. È interessante notare come il sovvertimento strutturale ha come conseguenza l'ulteriore contrazione funzionale delle cellule residue con innesco di un circolo vizioso che porta ad accelerare la progressione della pato-

logia neuro-retinica.

La disfunzione molecolare può interessare inizialmente sia le cellule neurali che le cellule ganglionari (RGC) o i fotorecettori (coni o bastoncelli). Oppure cellule di supporto, come le cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) o le cellule di Müller.

Con il progredire della malattia, la disfunzione e successivamente la morte delle cellule della retina (RGC e fotorecettori o cellule RPE) porta a compromissione grave della visione: il risultato finale è la perdita permanente e irreversibile della vista o di una parte di essa.

Questi comportamenti disfunzionali sono supportati da diversi meccanismi patologici (Punzo, and al., 2012; Langmann, 2007) che possono essere così riassunti:

- *alterazioni del neurotrofismo*
- *ossidazione*
- *alterazioni del microcircolo*
- *apoptosi*
- *parainfiammazione e mutamento dell'immuno-modulazione*

Con la contrazione funzionale delle cellule interessate si registra l'insacco di una sequenza molecolare patologica a carico delle cellule coinvolte: queste divengono incapaci di neutralizzare le conseguenze dei processi foto-ossidativi, che avvengono normalmente in seguito ai processi metabolici cellulari o all'apporto dell'ossigeno circolante.

Ne consegue la liberazione di diverse specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente cellulare che a loro volta provocano per-ossidazione lipidica, ossidazione dei legami critici nelle catene proteiche e rottura in quelle del DNA, fino all'attivazione della nucleasi endogena che blocca l'espressione del gene Bcl2 con conseguente apoptosi cellulare.

L'accumulo di detriti cellulari e materiale lipofuscinico da origine a fenomeni para-infiammatori che favoriscono ulteriormente il danno cellulare, innescando un circolo vizioso che accelera la progressione complessiva del danno. In condizioni fisiologiche, le cellule retiniche sane possiedono un arsenale di sostanze ad azione protettiva, inclusi sistemi antiossidanti enzimatici, come le superossido-dismutasi (SOD), le catalasi e le glutatione-perossidasi che servono a bilanciare ossidanti e radicali liberi, riducendo al minimo i danni potenziali. Uno dei meccanismi più noti per bloccare o procrastinare i processi apoptotici è l'attivazione del gene Bcl2 che, tramite opportuni fattori di crescita, evita così il destino della morte, e questo indipendentemente dalla causa scatenante.

Esistono cellule come le cellule di Müller o le cellule RPE, in grado di produrre in condizioni di ipossia, fattori angiogenici e neurotrofici, come FGF e VEGF, per controbilanciare l'insulto, purché transitorio (Yafai, and al., 2013).

Quando si verifica lo squilibrio cellulare, per esempio per ragioni genetiche o circolatorie, e gran parte delle cellule iniziano ad andare incontro ai processi di apoptosi e morte, una diffusa componente para-infiammatoria si attiva in modo permanente e le alterazioni neuro-retiniche progrediscono.

Su questi meccanismi è possibile a nostro avviso applicare una terapia che miri a rallentare o prevenire la morte delle cellule della retina (Otani, and a., 2004; Guadagni, and al. 2015).

Una terapia che, pur non essendo risolutiva, possa portare una stabilizzazione o un miglioramento della funzione visiva, tale da cambiare le prospettive di vita del paziente ipovedente. I miglioramenti nella visione non devono essere necessariamente enormi per fare la differenza nella vita delle persone. I pazienti che

subiscono una degenerazione della loro vista spesso dicono: "se solo potessi vedere come un anno fa, sarei felice".

Patologie neurodegenerative della retina e terapia cellulo-mediata

La terapia rigenerativa in oftalmologia deve mirare a sostenere la funzione visiva. Perciò dovrà necessariamente essere applicata quando i pazienti usano ancora normalmente il proprio organo visivo senza attendere l'instaurarsi di quadri clinici ormai tardivi di fronte ai quali spesso siamo impotenti.

Pertanto, l'atteggiamento clinico dovrà essere meno fatalista e la diagnostica dovrà passare da un'analisi macroscopica (analisi dei fluidi, atrofia areolare o geografica, perdita del campo visivo, compromissione della BCVA) ad una analisi microscopica (riduzione del microcircolo, apoptosi cellulare, analisi genetica, destabilizzazione della fissazione).

Il concetto che dovrà penetrare è che sarà più facile conservare o promuovere la sopravvivenza e la funzione delle cellule malate piuttosto che ripristinare funzioni perdute dopo che le cellule sono scomparse in seguito all'instaurarsi della patologia (Karl and Reh; 2010).

Se l'obiettivo principale delle terapie rigenerative è quello di ripristinare o potenziare la visione nei pazienti affetti da patologie neurodegenerative della retina, qualunque essa sia, questo dovrà innanzitutto mirare a favorire la sopravvivenza dei corpi cellulari principalmente dello strato RPE, dei fotorecettori e delle cellule ganglionari, mantenere o ripristinare l'arborescenza dendritica con le appropriate connessioni sinaptiche, stimolare la rigenerazione assonale oltre la testa del nervo, rimielinizzare gli assoni mediante il supporto degli oligodendrociti, proteggere o ricostruire le connessioni RGC nella retina e nel cervello, e rico-

struire il corretto targeting degli assoni verso bersagli centrali multipli con il ripristino delle corrette mappe retinotopiche (Daftarian et al. 2010, Calkins, 2017).

Ovviamente l'efficacia di qualunque trattamento rigenerativo è inversamente proporzionale alla gravità e alla durata del danno, essendo in qualche modo facilitato, durante la progressione della malattia, dalla persistenza dei corpi neuronali retinici e del segmento assonale non mielinizzato.

La domanda a cui rispondere è se sia più efficace preservare o promuovere la sopravvivenza e la funzione delle cellule malate piuttosto che ripristinare le funzioni perse mediante la sostituzione delle cellule scomparse in seguito all'insorgenza della patologia (Jones et al., 2017).

In effetti, è ampiamente accettato che il potenziale terapeutico delle cellule staminali possa esprimersi anche attraverso l'espressione di un opportuno secretoma costituito da citochine ed esosomi rilasciati per via paracrina (Jones et al., 2017) finalizzato alla riparazione delle cellule retiniche.

In sintesi, più cellule residue sono presenti più la terapia è in grado di influenzare l'evoluzione della patologia neuroretinica.

Il successo dei risultati sulla rigenerazione neuro-retinica cellulo-mediata ottenuti negli studi preclinici incoraggiano quelli clinici (Tab. 1).

Si sono così registrati miglioramenti funzionali delle strutture ganglionari in corso di otticopatia glaucomatosa (Hu et al., 2017; Li et al., 2018; Wang et al., 2018; Limoli et al., 2021), nonché delle strutture fotorecettoriali nella degenerazione di Stargardt, nella dry AMD (Öner et al., 2018b; Kahraman et al., 2021; Limoli et al., 2016) o nella retinite pigmentosa (Limoli et al., 2020).

Sulla base di queste premesse *potremmo defi-*

TABELLA 1 - MAIN CLINICAL STUDIES EXPLOITING MSC FOR THERAPEUTIC PURPOSES IN RETINAL DISEASES

Disease	Institution	Cell Source	Delivery	WHO identifier	References
AMD (GA), RP and ischaemic retinopathy	University of Sao Paolo, Brazil	Autologous BMHSC	Intravitreal injection	NCT01068561 NCT01560715 NCT01518127 NCT01518842	Siqueira et al. 2011
AMD (GA), RP, RVO and DR	University of California, Davis, USA	Autologous BMHSC	Intravitreal injection	NCT01736059	Park et al. 2012-2015
AMD, Stargardt	University of California Los Angeles USA	Embryonic Stem Cells	Subretinal application	NCT01345006 NCT01344993	Schwartz et al. 2015-2018
RP	Erciyes University, Kayseri, Turkey	Autologous ADMSC	Subretinal application	Not registered	Oner et al. 2016
RP	Erciyes University, Kayseri, Turkey	Autologous PRP	Subtenon injection	Not registered	Arslan et al. 2018
AMD (GA), RP, OA, GON	Low Vision Research Centre, Milan, Italy	Autologous ADMSC And PRP	Suprachoroidal application	Not registered	Limoli et al. 2014-2021
AMD, Stargardt, RP	Erciyes University, Kayseri, Turkey	Eterologous UC-MSCs	Suprachoroidal application	Ministry of Health 56733164/203	Oner et al. 2018

RP: Retinitis Pigmentosa; AMD: Age related Macular Disease, GA: Geographic Atrophy, OA: Optic Atrophy; GON: Glaucomatous Optic Neuropathy; DR: Diabetic retinopathy; RVO Retinal Venous Occlusion; BMHSC: Bone Marrow Human Stem Cell; ADMSC: Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell; PRP: Platelet Rich Plasma; UC-MSC: Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell.

nire terapia cellulare, o terapia cellulo-mediata, qualsiasi modalità terapeutica basata sull'uso di innesti cellulari che mirano al neuroenhancement delle cellule compromesse, alla loro possibile riparazione o alla rigenerazione di alcuni elementi come recettori, componenti mitocondriali, fibre di connessione, fino anche alla loro sostituzione, purchè si verifichi una integrazione efficace con le residue strutture re-

tiniche (Chang et al., 2012; Huang et al., 2018; El-Kadiry et al., 2021).

Il secretoma mesenchimale a scopo terapeutico: dove prenderlo e perché usarlo

Le cellule normalmente impiegate negli studi preclinici e clinici al fine di terapie cellulo-mediate sono le cellule staminali embrionali (ESC), le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC),

le cellule staminali mesenchimali (MSC) tutte in grado di auto-rinnovarsi e mostrare multipotenza, ovvero la capacità di differenziarsi in tutte le cellule derivate da uno qualsiasi dei tre strati germinali.

Tuttavia, ESC e iPSC hanno generato molte polemiche su questioni etiche, immunologiche e oncologiche. Invece, l'uso di MSC sembra essere libero da queste preoccupazioni (Ding et al., 2017, Öner, 2018).

Le MSC, rispetto alle ESC e alle iPSC, pur avendo un potenziale di differenziazione minore, non inducono rischi di crescita incontrollata, non creano reazioni di rigetto, evitando l'impiego di farmaci immunosoppressori, non presentano problemi di tipo etico, non hanno costi importanti, non creano difficoltà di raccolta, specie se derivate dal tessuto adiposo, hanno una capacità immuno-modulatoria superiore, soddisfacendo le esigenze rilevate in medicina rigenerativa (Romanov et al., 2005; Lindroos et al., 2010; Öner et al., 2017a, Wong et al., 2015).

Per questi motivi abbiamo ritenuto opportuno utilizzare cellule mesenchimali nell'ambito della tecnica dai noi realizzata e proposta, definita Limoli Retinal Restoration Technique (LRRT). La nostra tecnica si basa, in sintesi, sulla costruzione di un impianto di cellule mesenchimali autologhe a livello del piano sovra-coroideale, finalizzato al neuroenhancement e alla valorizzazione delle cellule residenti della neuroretina in corso di malattia degenerativa (Limoli et al., 2014; 2016; 2018; 2019; 2020; 2021).

Le potenzialità rigenerative delle MSC sono infatti attribuibili alla capacità di mantenere e regolare il microambiente cellulare modulando la plasticità dei tessuti ospiti danneggiati attraverso la secrezione paracrina di sostanze biologicamente attive (Baddour et al., 2012; Liang et al., 2014; Zarbin, 2016; Gnechi et al., 2016; Zohu et al., 2019).

La secrezione non riguarda solo sostanze biologicamente attive ma anche microparticelle,

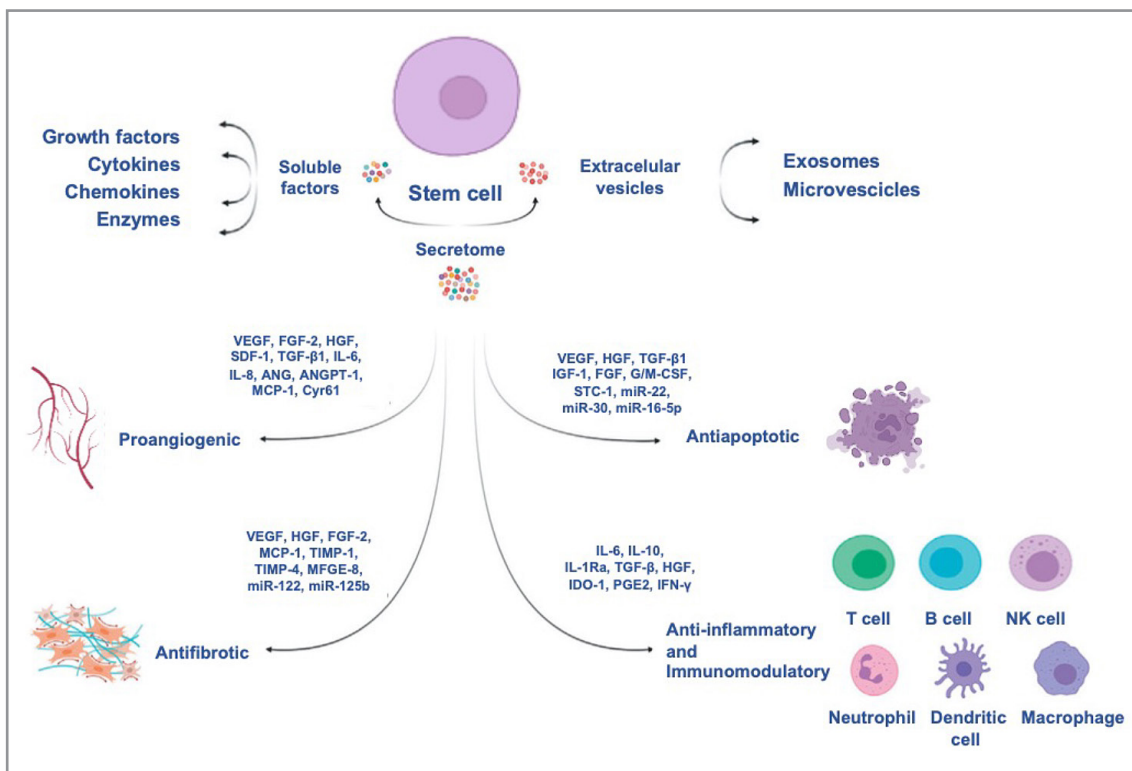


Figura 2 - Rappresentazione schematica del secretoma e dei suoi effetti terapeutici (Daneshmandi et al., 2020).

dette vescicole extracellulari, che nel loro insieme viene definito secretoma mesenchimale (Madrigal et al., 2014; Kusuma et al., 2017).

La composizione del secretoma è dinamica, dunque può modificarsi a seconda del tipo cellulare e degli stimoli microambientali. Tuttavia, in generale, è noto che il secretoma delle cellule staminali ha benefici terapeutici per la riparazione dei tessuti inclusi effetti proangiogenici, antiapoptotici, antifibrotici, antinfiammatori antiossidanti e immunomodulatori (Kyurkchiev et al., 2014; Tran and Damaser, 2015; Hofer and Tuan, 2016; Haque et al., 2018; Van Pham et al., 2018).

Il secretoma comprende varie proteine sieriche, fattori di crescita, fattori angiogenici, ormoni, citochine, proteine della Matrice Extracellulare (ECM), proteasi, mediatori lipidici e materiale genetico. È ampiamente classificato in fattori solubili (fattori di crescita, citochine, chemo-

chine ed enzimi) e vescicole extracellulari che trasportano mitocondri, lipidi, proteine e sottotipi di RNA e DNA (Fig. 2) (Witwer et al., 2019; Daneshmandi et al., 2020).

Un altro tipo di struttura cellulare usata nella nostra tecnica è la piastrina, che consideriamo mesenchimale essendo derivata dalla frammentazione dei megacariociti.

Le piastrine sono ben note per la loro azione emostatica, e per anni lo studio della loro funzione si è limitato alla sola azione pro-coagulativa. Tuttavia, sono anche in grado anche di rilasciare sostanze che promuovono la riparazione dei tessuti, l'angiogenesi e la modulazione dell'infiammazione (Jurk e Kehrel, 2005). Inoltre, inducono la migrazione cellulare e l'adesione nei siti di angiogenesi, nonché la differenziazione dei progenitori endoteliali in cellule endoteliali mature (Mishra et al., 2011). Le piastrine sono usate in medicina rigenera-

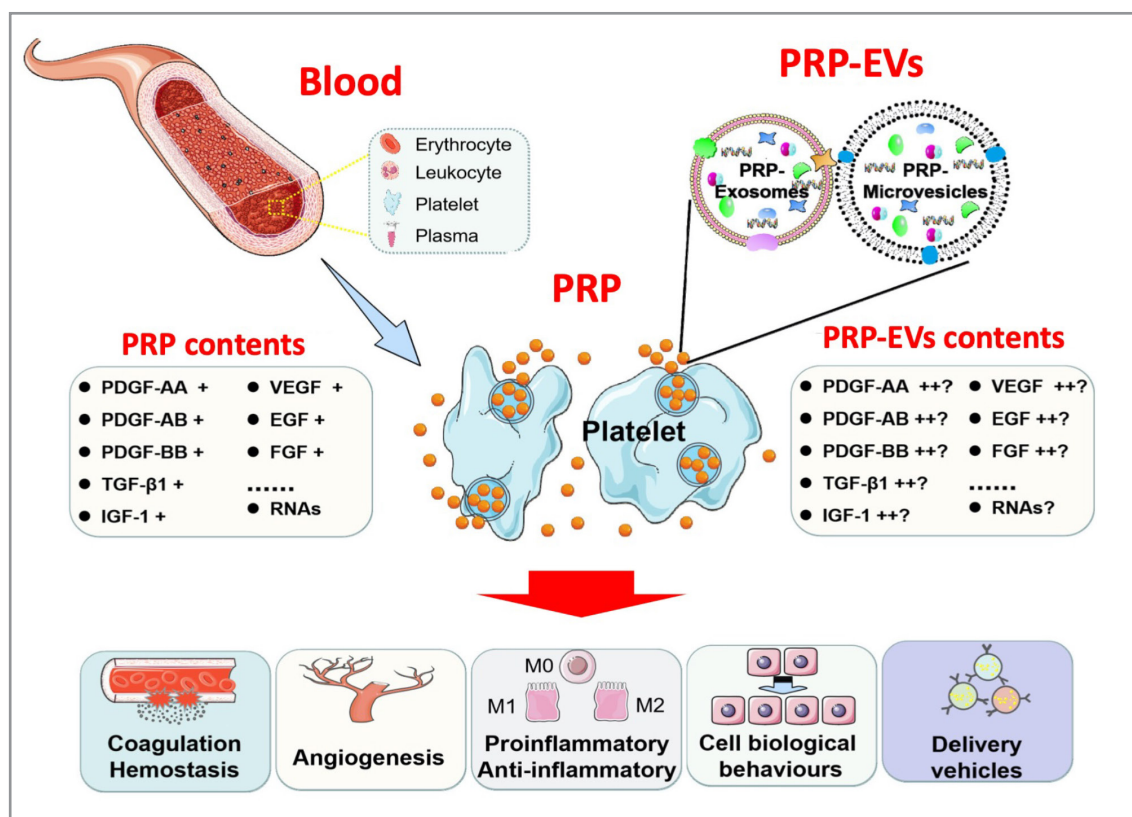


Figura 3 - Le vescicole extracellulari derivate dal plasma ricco di piastrine (PRP-EVs) sono alla base dei processi rigenerativi indotti (Wu et al., 2021).

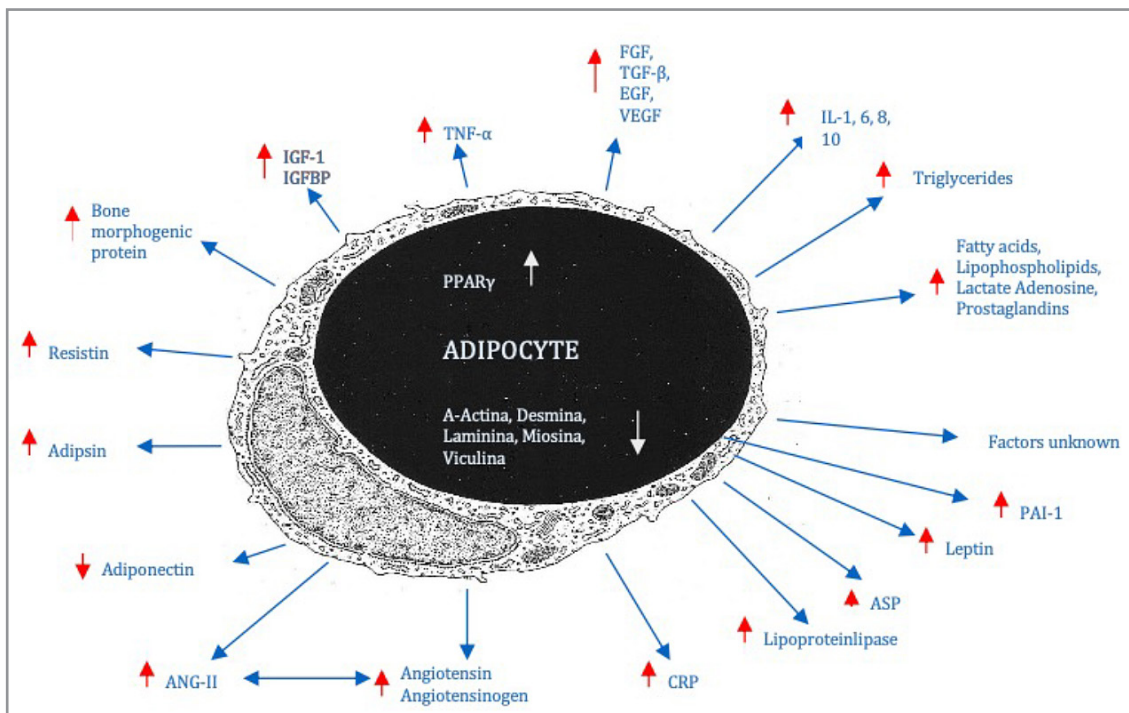


Figura 4 - Nell'immagine vediamo un adipocita e le sue principali caratteristiche secretorie. Il secretoma adipocitario è dotato fisiologicamente di innumerevoli effetti funzionali ottenibili per via paracrina.

tiva ad una concentrazione maggiore rispetto a quella normalmente riferita alla quota circolante nel sangue periferico. Per ottenerla, si utilizzano delle centrifughe che forniscono un plasma ricco di piastrine o PRP (Fig. 3).

La maggior parte degli studi concorda sul fatto che il razionale biomolecolare a sostegno delle terapie PRP si basa sul fatto che le piastrine sono fonte di molteplici biomolecole che favoriscono la riparazione e la rigenerazione dei tessuti (Lang et al. 2018).

In precedenza, si riteneva che la potente capacità riparativa del PRP derivasse principalmente dalle abbondanti quantità di fattori di crescita secreti. Tuttavia, studi recenti hanno rivelato che oltre ai fattori di crescita, un gran numero di vescicole extracellulari viene rilasciato dopo l'attivazione del PRP per partecipare alla regolazione della riparazione dei tessuti (Torreggiani et al. 2014; Tao et al., 2017; Guo et al., 2017).

Oltre a noi, in ambito oftalmologico, diversi

autori utilizzano tale secretoma, da solo o in associazione a MSC, in patologie oculari come glaucoma, AMD e retinite pigmentosa (Qureshi et al., 2009; Osborne et al., 2018; Lykov et al., 2018).

Un altro tipo di cellula mesenchimale che utilizziamo a fini rigenerativi è rappresentato dall'adipocita adulto o adipose stromal cell (ASC) (Figura 4).

L'adipocita considerato, fino ad un paio di decenni fa, solo un tessuto passivo per lo stoccaggio dell'energia in eccesso, sotto forma di grasso, possiede in realtà doti secretorie endocrine le cui attività appaiono interessanti in medicina rigenerativa.

È stato dimostrato che diversi ormoni, fattori di crescita e citochine sono effettivamente espressi nel tessuto adiposo bianco.

Le cellule stromali adipose, nell'ambito della tecnica di innesto sovracoroideale di cellule mesenchimali autologhe, sono ricavate dal grasso orbitale, supportate ab origine da pro-

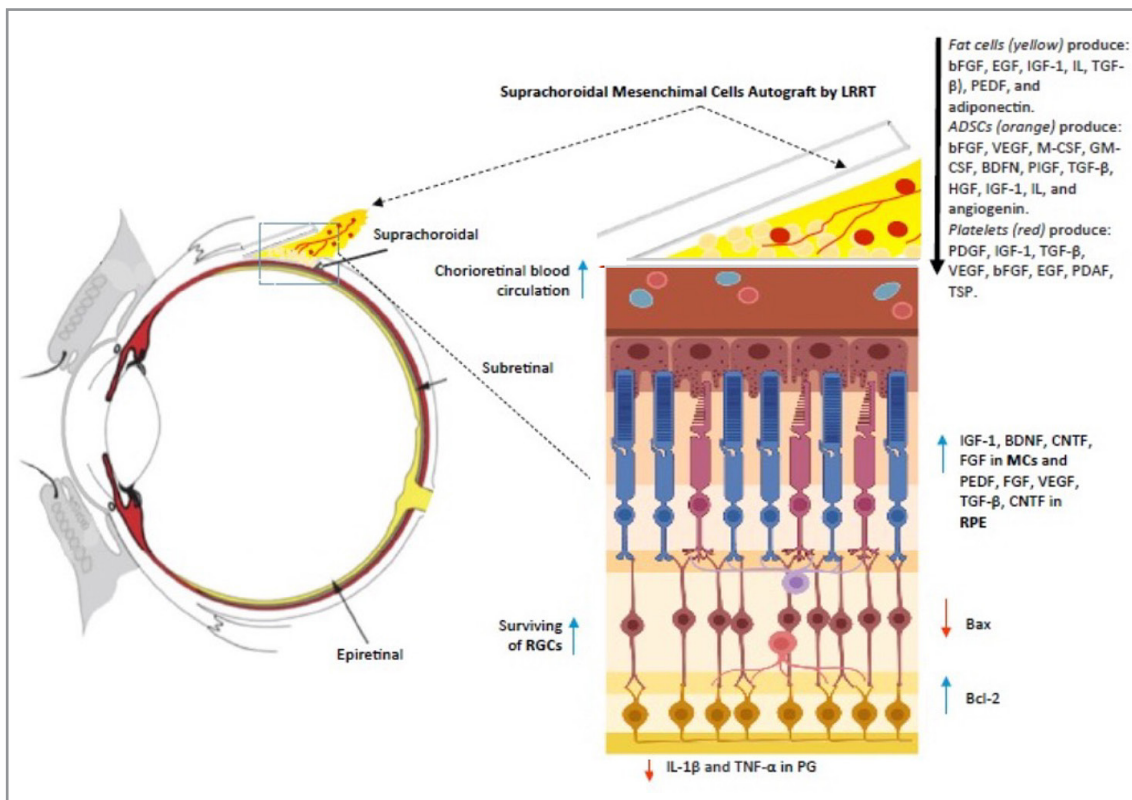


Figura 5 - Possibile effetto neuroprotettivo relativamente all'azione dei fattori di crescita prodotti dalle cellule mesenchimali impiantate nello spazio sovracoroideale secondo LRRT (riquadro piccolo sopra il bulbo) e increti nel flusso corioideale. Tali fattori agiscono direttamente sulle cellule retiniche o indirettamente, attraverso la mediazione delle cellule di Müller (MCs) e del RPE, con effetto angiogenico, neurotrofico, antinfiammatorio e antiapoptotico. Image courtesy of: P.G. Limoli – Centro Studi Ipovisione di Milano.

pri vasi nutrizionali, il che permette una buona sopravvivenza dell'impianto. Il grasso inserito nella tasca sclerale rappresenta poi una buona impalcatura in cui accogliere le AD-MSc e il PRP in modo da favorire il lento rilascio del loro secretoma nel letto corioideale.

Le caratteristiche delle cellule mesenchimali rende il loro innesto a fini terapeutici un metodo interessante ed efficace (Sluch and Zack, 2014; Mesentier-Louro et al., 2016).

Il loro innesto in sede sovracoroideale si propone di sfruttare in modo continuativo le qualità trofiche dei secretomi di tutte le suddette tipologie cellulari (adipociti orbitali, PRP, AD-MSc). L'utilizzo combinato di tali cellule permette, a nostro avviso, di migliorarne la sinergia e l'efficienza terapeutica nei confronti della retina, anche grazie ad una maggiore sopravvivenza

delle cellule stesse nella tasca sovracoroideale rispetto, per esempio, all'impianto di soli adipociti stromali (Fig. 5).

Possiamo così ottenere incrementi elettroretinografici e delle performance visive in AMD, RP e Otticopatie (Limoli et al. 2016; 2018; 2019; 2020; 2021; Öner et al., 2019).

Diversi sono i meccanismi terapeutici con cui le performance secretorie delle MSC permettono un significativo ripristino del sistema visivo in diverse patologie oculari (Ding et al., 2017; Mok et al., 2013; Kim et al., 2016; Zhao et al., 2016).

Nel complesso, il rilascio per via paracrina di citochine, fattori di crescita, vescicole extracellulari, esosomi, micro-organuli come mitocondri o molecole di RNA non codificante (ncRNA), induce un effetto trofico e stabilizzante sulle

cellule sofferenti la cui presenza è una caratteristica costante in molte patologie neurodegenerative della retina.

L'autotrapianto di cellule mesenchimali in sede sovra-coroideale ha come logica proprio lo sfruttamento del loro effetto biologico sulle cellule retiniche residue.

Le principali patologie retiniche target delle terapie basate sullo sfruttamento del secretoma mesenchimale, sono quelle dove esistono alterazioni della microdinamica vascolare, condizioni di iperossia o di parainfiammazione, dove vengono innescati meccanismi apoptotici e dove si apprezza una depressione dell'attività metabolica. Parliamo dell'85% delle patologie neuroretiniche.

Affinché le attività biomolecolari delle cellule impiantate abbiano luogo, è importante considerare che la retina deve conservare un numero ancora moderatamente considerevole di cellule residue al momento dell'autotrapianto.

Le modalità di interazione del secretoma mesenchimale con le cellule retiniche sono riassunte come segue:

1. *Attività emoreologica*
2. *Attività antiossidante*
3. *Attività antinfiammatoria*
4. *Attività anti-apoptotica*
5. *Attività neuro-protettiva*

Patologie neuroretiniche e Retinal Restoration Technique

Vediamo in modo estremamente sintetico alcuni risultati clinici ottenuti attraverso impianto sovracoroideale autologo ottenuto mediante Limoli Retinal Restoration Technique.

Degenerazione maculare correlata all'età e LRRT

L'AMD è una malattia multifattoriale che comprende una complessa interazione tra invec-

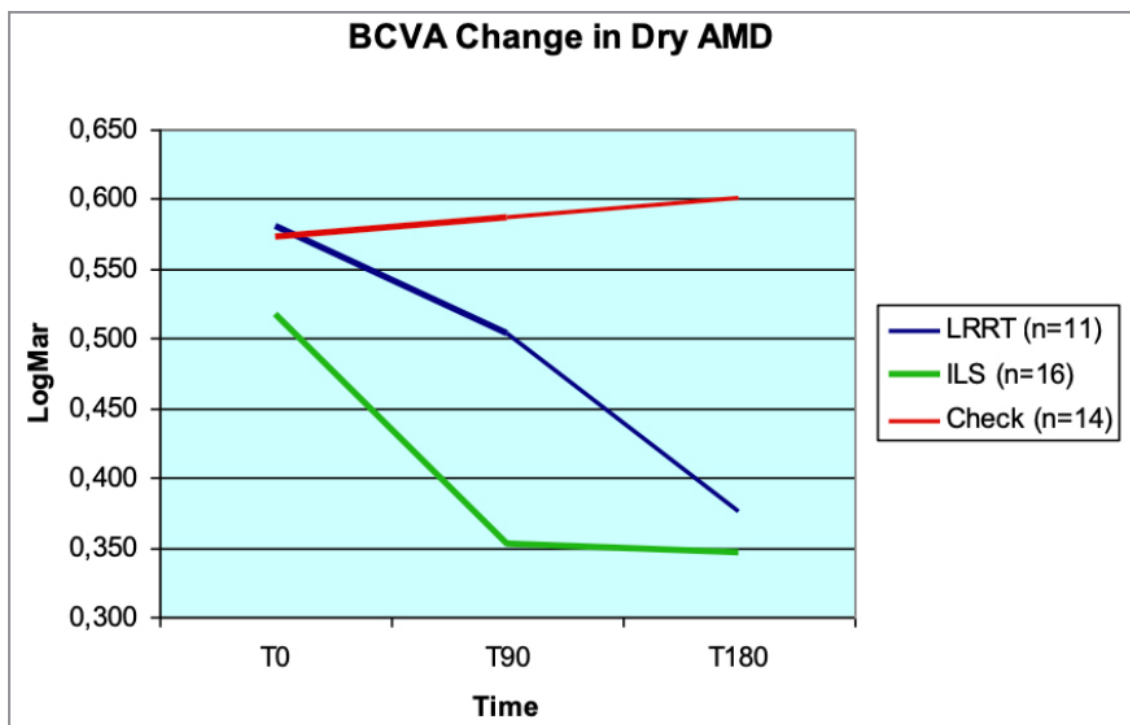
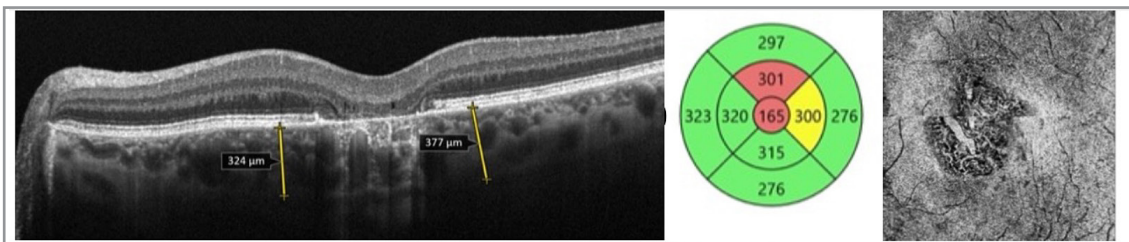


Figura 6 - La storia naturale della dry AMD evidenzia una flessione della BCVA graduale e continua (linea rossa nel grafico). Se viene effettuato un impianto di cellule mesenchimali, per esempio cellule adipose, in sede subsclerale (ILS) (linea verde nel grafico), o di cellule mesenchimali composte come nella nostra tecnica (LRRT) (linea blu nel grafico), si apprezza a 6 mesi una variazione positiva con incremento della BCVA (Limoli et al., 2018).



Dry AMD, con iniziale GA

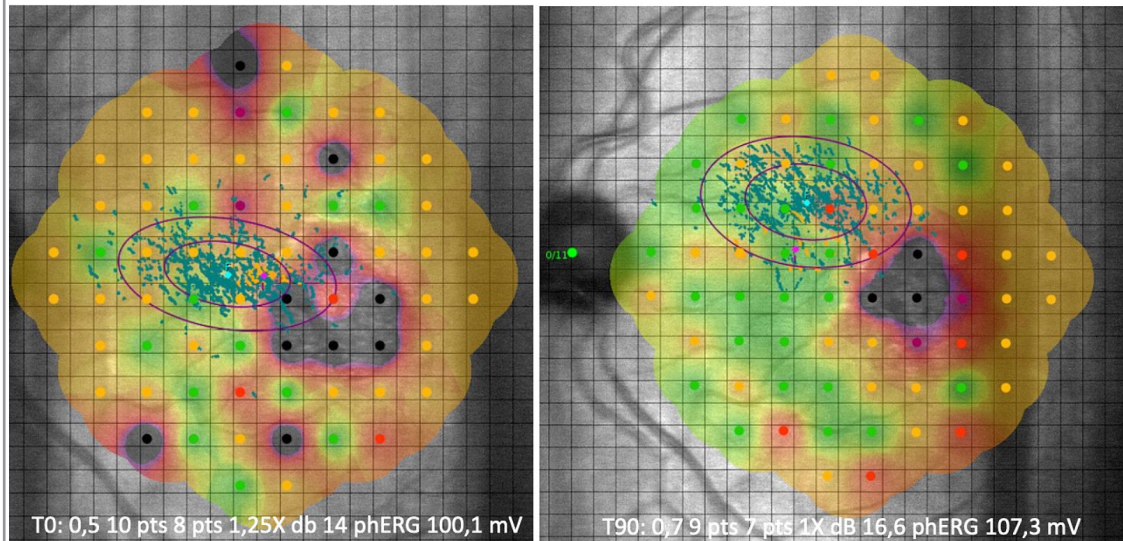


Figura 7 - Il caso rappresentato in figura riguarda un uomo di 70 anni con dry AMD. All'esame del fundus (immagine in alto a destra) si apprezza una ampia area di atrofia geografica temporalmente alla fovea con uno scotoma assoluto corrispondente evidenziato dalla microperimetria (in nero nella immagine in basso a sinistra) e una relativa perdita dei segmenti esterni e dello strato RPE evidenziata all'OCT (in alto a sinistra) Il resto della retina non evidenzia de-differenziazione dello strato RPE, anche se abbiamo una riduzione in alcuni tratti marcata della sensibilità (aree gialle, rosse e bordeaux nella stessa immagine). La BCVA è 0,5, il visus per vicino è 10 pts. L'occhio controlaterale è ormai compromesso (2/50 e 36 pts), non appare riabilitabile e il paziente teme di avere la medesima evoluzione nell'occhio residuo, avendo notato un rapido e progressivo deterioramento della visione anche nell'occhio sinistro. Viene sottoposto a terapie mediante dietary supplementation (DS), riabilitazione visiva e innesto sovracoroideale di cellule mesenchimali autologhe: i parametri elettro-retinografici migliorano come pure la BCVA, il visus per vicino e la sensibilità microperimetrica. Successivamente viene mantenuto programma terapeutico basato sulla neuro-modulazione e sulla dietary supplementation. Immagine per gentile concessione di: P. Limoli - Centro Studi Ipvisione di Milano.

chiamamento, fattori di rischio ambientale e suscettibilità genetica. L'infiammazione cronica, la deposizione di lipidi, lo stress ossidativo e il ridotto mantenimento della matrice extracellulare sono fortemente implicati nella patogenesi dell'AMD (Fleckenstein, et al., 2021). Nella forma secca di AMD si assiste ad una evoluzione relativamente lenta dove le terapie sono per lo più legate a trattamenti anti-ossidativi e antinfiammatori, basati sulla dietary supplementation. L'impianto di cellule stami-

nali mesenchimali, grazie agli effetti terapeutici del secretoma prodotto sulle cellule residue del neuroepitelio, permette il controllo della ossidazione attraverso incremento dell'attività metabolica, contiene i meccanismi apoptotici, regola i fenomeni infiammatori, migliora la microcircolazione neuro-retinica (Nittala, et al., 2021; Kashani, et al., 2020; Öner, et al. 2018; Park, et al., 2014; Schwartz, et al., 2015; Limoli, et al., 2016; 2018). Nella nostra esperienza, l'innesto di cellule

mesenchimali autologhe per via sovracoroideale (LRRT), ha influenzato positivamente nel tempo le condizioni delle cellule residue della retina in pazienti affetti da dry AMD, migliorandone le performance visive (Fig. 6, 7).

Otticopatia e LRRT

Le otticopatie sono innescate dall'espressione di una serie di fattori di rischio, quali l'aumento della pressione intraoculare, come si verifica nel glaucoma, l'ischemia, la compressione come nei tumori o nei traumi, le infiammazioni, le infezioni. La causa può essere anche genetica. La terapia si avvale quando possibile della rimozione dei fattori rischio.

Tuttavia, l'evoluzione dell'otticopatia difficilmente si ferma in modo completo con la rimozione dei fattori di rischio. I meccanismi attivati si influenzano in modo reciproco provocando

l'evoluzione del danno. La contrazione del microcircolo, a livello del nervo ottico, rallenta il metabolismo cellulare, che a sua volta rallenta o interrompe il trasporto intra-assonale, blocca i processi anti-ossidativi e l'espressione di fattori neuro-trofici, favorendo la formazione di un ambiente infiammatorio. Si crea alla fine apoptosi e morte cellulare che causano ulteriore infiammazione, favorendo la continua evoluzione della malattia.

Dunque, a prescindere dall'elemento scatenante la neuropatia e dalla sua rimozione è possibile che il deperimento neurale innescato continui ad evolvere fino a provocare atrofia ottica (Hickman, et al. 2002): la papilla ottica diviene pallida per la mancanza di microcircolo, le fibre appaiono assottigliate o quasi scomparse all'esame OCT e la trasmissione neuro-elettrica irreversibilmente compromessa, come si

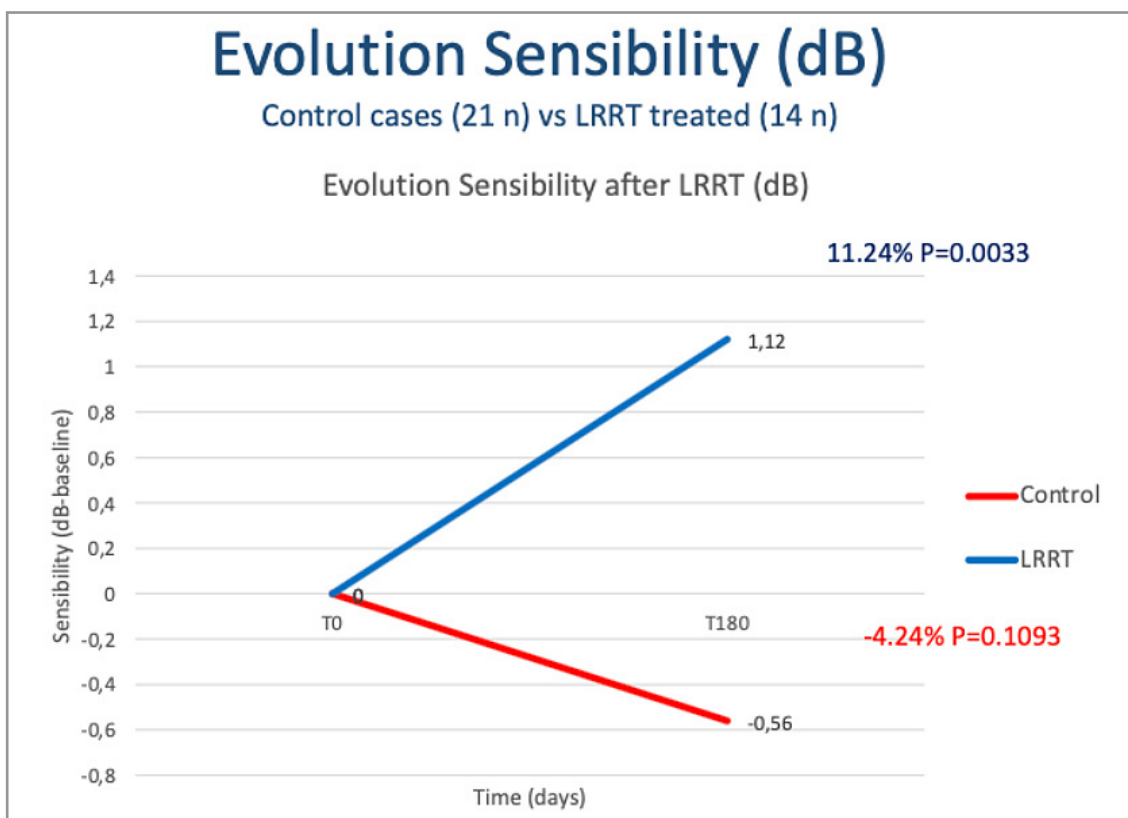


Figura 8 - il raffronto tra pazienti affetti da otticopatia glaucomatosa trattati o meno con innesto mesenchimale autologo secondo LRRT, dimostra la possibilità di un incremento significativo della sensibilità registrata con microperimetria a 6 mesi dall'intervento rispetto a quelli non trattati (Limoli et al., 2021).

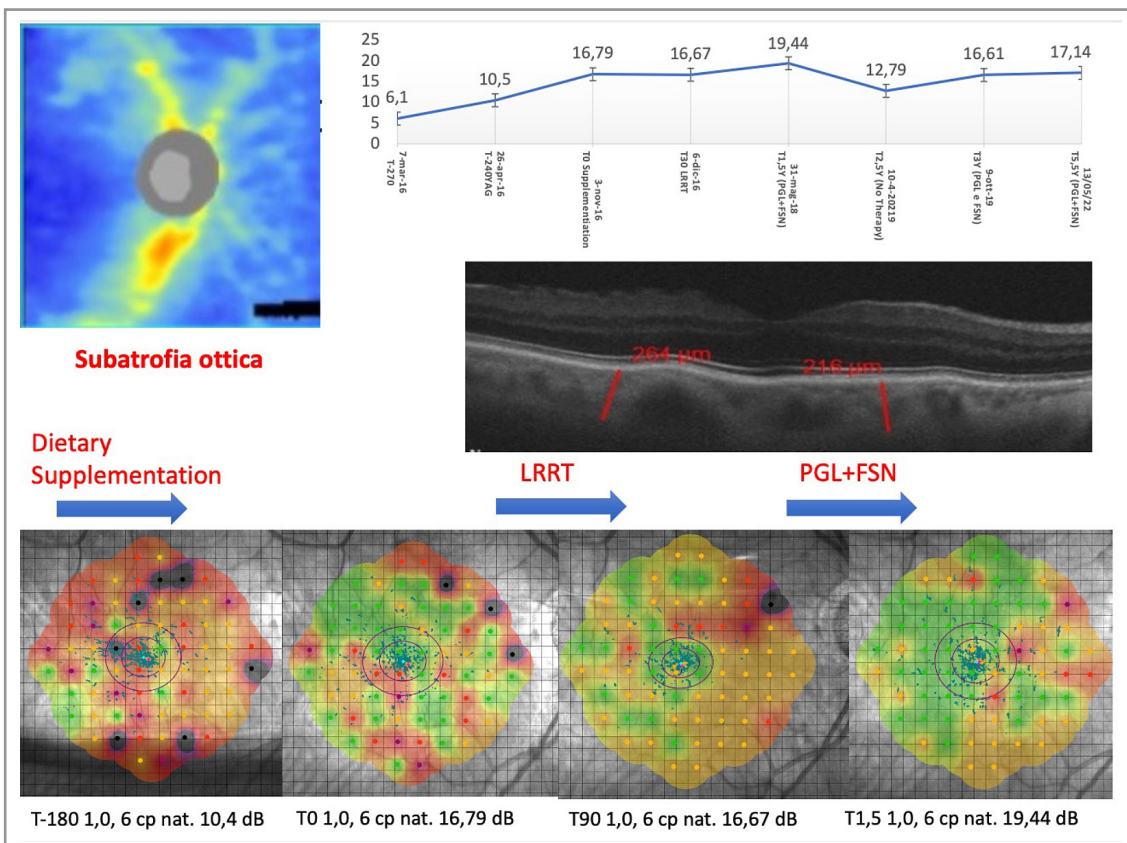


Figura 9 - Paziente maschio di 82 anni, monocolo funzionale e con vasculopatia diffusa. All'esame oftalmologico si evidenzia una subatrofia ottica su base vascolare con iniziali scotomi nell'area di Bjerrum e una riduzione generale della sensibilità rilevata con microperimetria pari a 10,4 dB, nonostante BCVA e capacità di lettura restino massimali. Prima viene applicata una terapia con dietary supplementation (DS) e neuromodulazione (FSN) che determina una consistente ripresa funzionale. Poi viene effettuato impianto di cellule mesenchimali autologhe. Il paziente effettua due cicli annui di neuromodulazione e una infiltrazione annua di secretoma piastrinico (Platelet Gel Loading o PGL) inserito nella tasca sclerale costruita per l'impianto iniziale. Evidenziamo una crescita della sensibilità ulteriore a 19,44 dB. Dopo un anno e mezzo dall'intervento il paziente interrompe le cure e registriamo un calo della sensibilità a 12,79 dB (vedi grafico in alto a dx). La ripresa del protocollo terapeutico ha permesso di rinforzare la sensibilità e stabilizzare BCVA e capacità di lettura, ancora a 88 anni. Immagine per gentile concessione di: P. Limoli - Centro Studi Ipvisione di Milano.

evince dai potenziali visivi evocati.

Nella nostra esperienza, l'innesto di cellule mesenchimali autologhe per via sovracoroideale (LRRT), ha influenzato positivamente nel tempo le condizioni del nervo ottico, migliorando le performance visive del paziente (Öner, et al., 2019, Limoli et al., 2021) (Fig. 8, 9).

Retinite pigmentosa e LRRT

La dizione "retinite pigmentosa" racchiude una serie di quadri clinici sostenuti da un elevato numero di alterazioni genetiche che, da sole o in associazione, determinano un danno a livel-

lo dei processi molecolari necessari alla creazione, conservazione, utilizzo o recupero della rodopsina. La conseguenza diretta è la perdita progressiva e totale dei bastoncelli (Pagon, 1988; Hartong et al., 2006; Hamel, 2006).

L'eziologia genetica della RP è alla base del danno e della successiva morte del bastoncello mentre la retina centrale, che contiene principalmente coni, rimane in condizioni relativamente buone fino alla fase avanzata della malattia. Questo determina la scarsa precocità diagnostica in questi pazienti che si accorgono della malattia spesso dopo la seconda o terza

decade di vita.

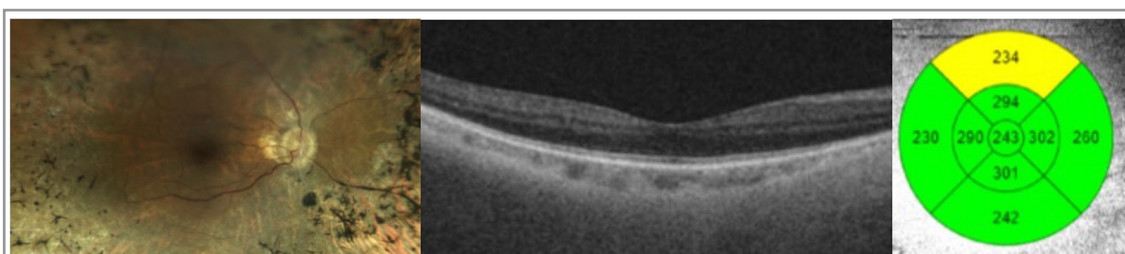
Tuttavia, le manifestazioni cliniche della RP non sono provocate solo dalla scomparsa dei bastoncelli ma anche dal coinvolgimento, sia pure in epoche successive, del sistema dei coni.

La perdita dei coni va oltre la genetica e coinvolge altri meccanismi biomolecolari, derivando da alterazioni dell'emodinamica, da effetti citotossici provocati dagli elevati livelli di ossigeno nella retina dopo la perdita dei bastoncelli, da compromessa risposta al maggiorato stress ossidativo, dall'assenza di specifici fattori di crescita prodotti dai bastoncelli.

Tuttavia, la complessità delle alterazioni mo-

lecolari evidenzia una serie di punti chiave potenzialmente sfruttabili da un punto di vista terapeutico al fine di rallentare o bloccare la progressione della malattia verso le sue fasi terminali, modulando il danno a carico dei bastoncelli e prevenendo o ritardando la morte dei coni (Otani et al., 2004; Liang et al., 2014; Guadagni et al., 2015).

L'applicazione precoce del secretoma mesenchimale mediato da cellule autologhe sembra influenzare positivamente, attraverso una migliore modulazione dell'ossidazione, dell'apoptosi e della para-infiammazione, l'evoluzione di tale grave ereditarietà (Öner, et al., 2016; Limoli, et al. 2019; 2020) (Fig. 10).



**RP autosomica recessiva, 75 aa.
Buona conservazione del foveal thickness (> 190 micron)
Buona prognosi post LRRT**

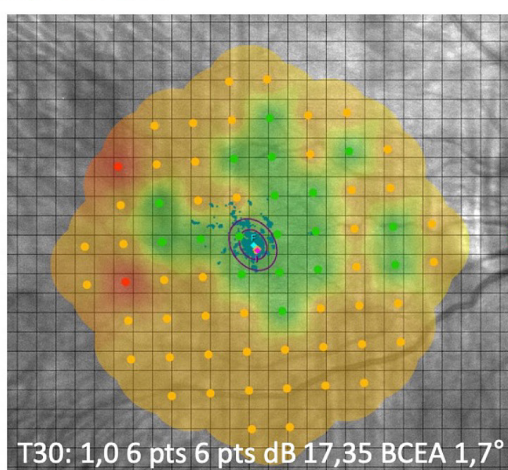
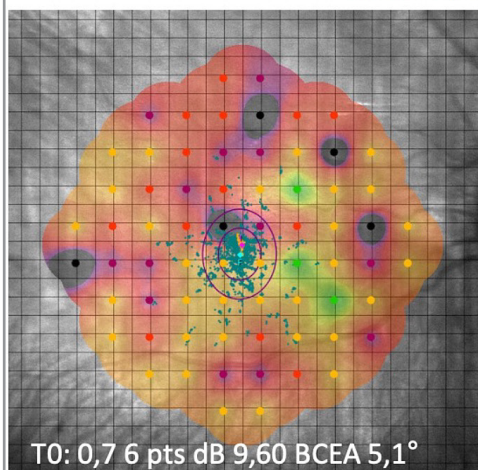
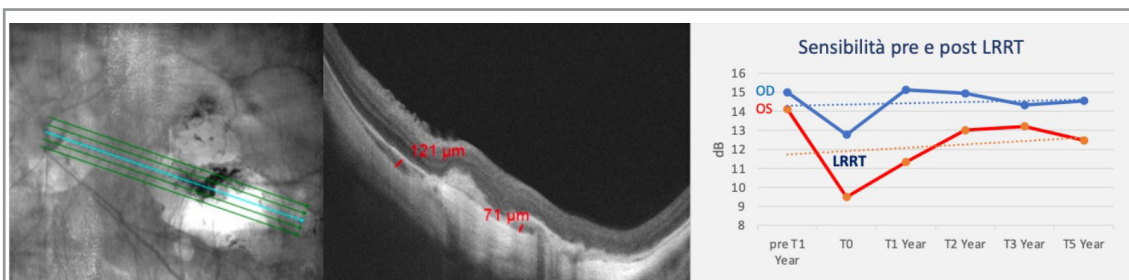


Figura 10 - Paziente di 75 anni con diagnosi di retinite pigmentosa autosomica recessiva. Nonostante un buon residuo visivo (7/10 e 6 pts) per una donna di 75 affetta da questa ereditarietà, la microperimetria appare piuttosto compromessa.

Tuttavia, l'OCT segnala un'ottima cellularità con spessori normali in ambito maculare, superiori a 190 micron. Viene eseguito innesto sovracoroideale di cellule mesenchimali autologhe con ripristino dei neuroni silenti e riattivazione metabolica maculare. La sensibilità e la fissazione appaiono quasi normali a 1 mese dal trattamento. Ricordiamo che il secretoma mesenchimale esprime la propria azione rigenerativa soprattutto su cellule residue ancora vitali. Immagine per gentile concessione di: P. Limoli - Centro Studi Ipovisione di Milano.



CRM + Esito MNV + Glaucoma 57 aa.

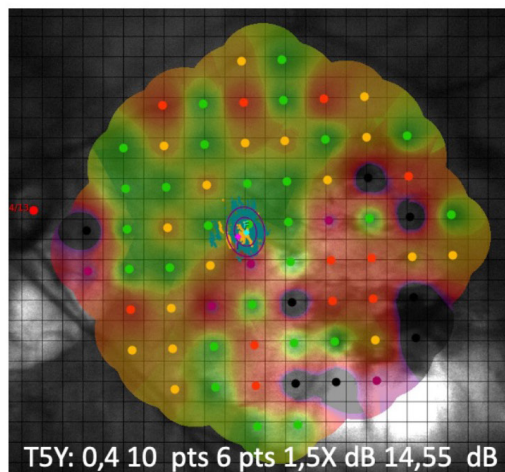
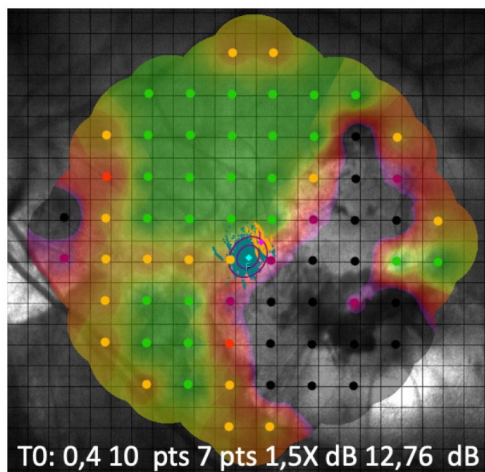


Figura 11 - Donna di 57 anni, medico, affetta da miopia elevata maggiore di 10 Diottrie, pseudofachica, capsulotomizzata, complicata da glaucoma cronico semplice ed episodi essudativi recidivanti tra il 2006 e il 2015 trattati ripetutamente sia con terapia fotodinamica che con terapia intravitreale antiVEGF alla ricomparsa dei fluidi. Il visus è molto compromesso in OD (0,2 e 26 cp) meno in OS (0,5 e 10 cp). La dottoressa segnala un peggioramento continuo della qualità e dell'acuità visiva. Viene prescritta una lieve ipercorrezione, supplementazione dietetica e prospettata la possibilità di impianto mesenchimale autologo a livello sovracoroideale (LRRT) che la dottoressa accetta dopo 1 anno dalla prima visita in seguito alla constatazione di un ulteriore aggravamento.

L'OCT (in alto a dx) evidenzia una marcata insufficienza coroideale, l'esito cicatriziale della/e precedente/i neovascolarizzazione/i, e uno stafiloma con papilla tiltata. L'obiettivo è di valorizzare il tessuto residuo e mantenerne la qualità nel tempo in modo da garantire alla paziente una migliore qualità della vita. In alto a destra viene riportato l'andamento della sensibilità dalla prima visita al quinto anno di terapia: si nota l'impatto positivo dell'intervento sulla sensibilità microperimetrica.

Miopia atrofica e LRRT

La miopia elevata comporta alterazioni degenerative a carico della retina quasi sempre con una forte componente atrofica.

Alla base esiste un'aberrazione del rimodelling sclerale che porta a diverse conseguenze sulla sclera: assottigliamento sclerale, perdita di tessuto sclerale, indebolimento delle proprietà meccaniche sclerali (McBrien and Gentle, 2003).

Il progressivo assottigliamento della sclera avviene a partenza dalle aree equatoriali con un

picco massimo al polo posteriore; alla lunga si verifica la formazione di uno sfiancamento sclerale o stafiloma posteriore (Ohno-Matsui, et al.; 2016).

Lo spessore coroideale in genere è sempre nettamente inferiore ai 250 micron riducendosi nei casi più gravi fino a 10 micron. Di conseguenza si altera il complesso PR/RPE /BrMb/CC (fotorecettore/Epitelio pigmentato/membrana di Bruch/coriocapillare).

Ovviamente nella miopia elevata, l'assottigliamento patologico della coroide contribuisce in

modo particolarmente determinante alla forte riduzione dell'acuità visiva (Shao, et al., 2014; Wang, et al., 2015).

La riduzione della componente trofica e le criticità anatomiche comportano apoptosi a carico delle cellule RPE, come dimostrato dalle basse concentrazioni di PEDF nelle miopie elevate (Ogata, et al.; 2005) nonché a carico dei fotorecettori e delle cellule ganglionari.

La soppressione dei VEGF endogeni riveste un effetto apoptotico nei confronti di cellule di Müller, fotorecettori e cellule amacrine (Saint-Geniez, et al., 2008).

Nella nostra esperienza, basata sulla somministrazione cellulo-mediata di secretoma mesenchimale, si è osservata un'azione neurotrofica su retine distrofiche affette da miopia elevata anche in presenza di esiti neovascolari o di oticopatie glaucomatose coesistenti (Fig. 11).

Quando intervenire con LRRT: aspetti prognostici e diagnostici avanzati

In generale la tecnica utilizzata per riparare una retina in sofferenza deve essere semplice, completamente priva di rischi, indolore, la sede di impianto non deve esporre la neuro-retina a rischi e complicanze, le cellule impiegate non devono esporre le cellule retiniche residue o la persona a ulteriori rischi, la retina oggetto del trattamento deve avere una significatività cellulare e non presentare condizioni essudative o acute in atto.

Le patologie oggetto di tale terapia, come abbiamo visto negli esempi precedentemente descritti, possono essere tutte quelle con evoluzione distrofico-infiammatoria o distrofica-atrofica.

Più in dettaglio, nell'approcciarci alle terapie cellulari dobbiamo innanzitutto rispondere ad una serie di domande in modo da poter fare la migliore valutazione possibile del caso.

Il paziente ripone molte aspettative circa la

propria prognosi visiva.

Quindi, sia pure con l'inevitabile margine di imprecisione, dobbiamo dare al paziente una reale prospettiva di miglioramento. Nel migliore dei casi si tratta di un incremento dei parametri funzionali: a volte solo per alcuni mesi o pochi anni; a volte il benessere retinico ottenuto prosegue per molti anni.

Altre volte, in presenza di patologie evolutive, può essere sufficiente una stabilizzazione per un dato periodo di tempo o semplicemente un rallentamento rispetto alla storia naturale della malattia (Nittala 2021).

Al fine di valutarne l'efficacia dei trattamenti basati sull'erogazione di secretoma mesenchimale cellulo-mediato è importante considerare alcuni elementi chiave:

1. *la tecnologia con cui realizziamo l'impianto e sede di impianto*
2. *la tipologia delle cellule utilizzate,*
3. *la patologia neuro-retinica,*
4. *il suo grado di evoluzione.*

1) Tecnologia e sede di impianto

La letteratura ha evidenziato come le cellule mesenchimali impiantate agiscano essenzialmente attraverso una azione biologica per via paracrina piuttosto che attraverso la sostituzione di cellule retiniche scomparse.

Per questo la tecnica e la via di somministrazione devono favorire la massima interazione tra il secretoma mesenchimale prodotto dall'impianto e le cellule della neuro-retina, nel rispetto dei punti chiave sopra elencati. Per raggiungere questo scopo sono stati esplorati diversi approcci inserendo queste cellule nello spazio sub-tenoniano, nello spazio intravitale, in quello sottoretinico e in quello sovracoroideale.

La somministrazione sovracoroideale da noi

utilizzata richiede l'apertura di una tasca sclerale che, attraverso una sclerectomia profonda, esponga la superficie esterna dello strato corioideale su cui appoggiare le cellule da impiantare (Limoli Retinal Restoration Technique o LRRT) (Limoli, et al., 2016). La continuità delle strutture corioretiniche non viene interrotta in alcun modo e non abbiamo praticamente mai complicazioni retiniche (Öner and Sevim, 2017). La somministrazione sovra-corioideale con tale tecnica può prevenire le complicanze vitreoretiniche riportate dopo somministrazione intravitreale e sottoretinica (Öner, 2018).

LRRT si limita a creare una tasca tra sclera e corioide, che accoglie cellule mesenchimali autologhe, capaci di riversare nel flusso corioideale il secretoma mesenchimale prodotto. Il flusso corioideale lo distribuisce da lì a tutte le componenti retiniche. La corioide provvede già alla distribuzione di ossigeno e materiali nutrizionali per la retina e alla rimozione di prodotti catabolici. Noi sfruttiamo dunque una via fisiologica per distribuire il secretoma prodotto

L'impianto sovracorioideale di cellule mesenchimali derivate dal cordone ombelicale con tecnica LRRT (Kahraman and Öner, 2020), ha dimostrato di elevare nel tempo l'attività neuro-elettrica in pazienti con retinite pigmentosa. Gli autori hanno osservato i migliori risultati quando la terapia con MSC è eseguita in uno stadio in cui la maggior parte dei fotorecettori è ancora viva o presente.

Gli stessi autori (Kahraman, et al. 2021) hanno analizzato le performance visive a 5 anni dall'impianto sovracorioideale evidenziando un miglioramento dell'acuità visiva, un miglioramento del campo visivo e un miglioramento delle registrazioni mfERG. In alcuni occhi è stato dimostrato un ispessimento della corioide all'esame OCT. La nostra esperienza si basa su quest'ultima modalità di impianto che utilizza-

mo nel modo descritto da oltre dieci anni.

LRRT ci sembra interessante perché priva di complicanze di rilievo, pur richiedendo un intervento di circa 30 minuti. Il vantaggio ci sembra dato soprattutto dalla mancanza di interruzione della struttura corio-retinica, il che rende l'intervento praticabile su qualunque tipologia neuro-retinica.

2) Cellule utilizzate

Le cellule utilizzate sono totalmente autologhe, azzerando problemi etici e oncologici. Il loro costo, appartenendo tali cellule al paziente, è di fatto inconsistente, rendendo la procedura economicamente abbordabile.

Le cellule utilizzate sono, come abbiamo visto, capaci di influenzare l'ambiente retinico e la matrice extracellulare attraverso la secrezione di fattori di crescita o di microvescicole ricche di microRNA, mitocondri e altri fattori solubili. L'utilizzo riparativo degli impianti cellulari mesenchimali può essere fatto in qualunque momento dall'inizio della patologia neuro-retinica.

3) Patologie trattabili

In genere il nostro target è dato da tutte le patologie a carattere distrofico-atrofico, dove non ci siano aspetti acuti: tali patologie possono trarre giovamento dall'impianto cellulare mesenchimale. In genere, questa tecnica può essere usata con successo nelle dry AMD non avanzate, negli esiti relativamente recenti di neuriti ottiche, nelle otticopatie glaucomatose, nelle degenerazioni maculari di Stargardt, nelle retiniti pigmentose non terminali, nelle Cone dystrophy, nelle miopie degenerative.

4) Quando operare

Se accettiamo l'idea che l'azione esercitata dall'impianto cellulare si caratterizza nell'interazione tra le componenti bio-solubili del se-

Rod-cone ERG depending to Retinal Thickness

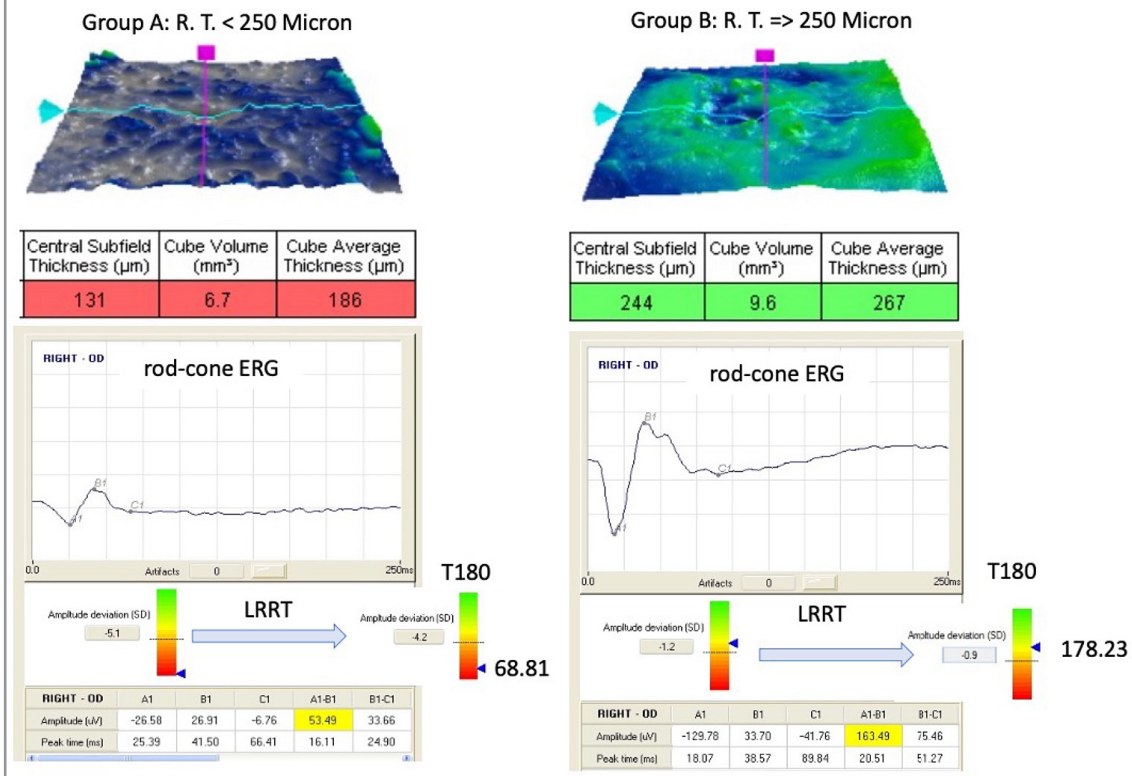


Figura 12 - la registrazione del rod-con ERG in una retina assottigliata dalla malattia (nella figura a sx) ha dei valori più bassi rispetto ad una retina più spessa (nella figura a dx) indicando un crollo dell'attività metabolica generale delle cellule retiniche dovuta all'evoluzione della patologia neuro-retinica. Abbiamo utilizzato un cut-off di 250 micron, quale spessore maculare medio nella dry AMD, in grado di evidenziare in modo indiretto il numero delle cellule residue e da qui valutare gli effetti della terapia cellulare sulla funzione visiva (Limoli et al., 2016).

cretoma prodotto e le cellule retiniche residue, più queste ultime sono numerose, maggiore sarà l'effetto esercitato (Fig. 12).

In precedenti pubblicazioni abbiamo visto come il numero delle cellule ottenibile in modo indiretto dagli spessori registrati con OCT, può rappresentare un parametro prognostico interessante. Quando lo spessore medio di una retina affetta da dry AMD è uguale o inferiore a 250 micron, a 6 mesi dall'intervento il paziente percepisce un miglioramento delle proprie capacità visive nel 26.3% se lo spessore medio è superiore a 250 micron, nel 73.7% (Limoli et al., 2016).

Se andiamo a verificare alcuni parametri funzionali il gruppo sotto i 250 micron evidenzia

un incremento della BCVA del 5,32% che, considerando il livello iniziale più scadente, non è a volte nemmeno percepibile dal paziente. Se però il paziente ha ancora una retina dallo spessore medio superiore ai 250 micron, l'incremento medio della BCVA è del 25,08%, con un sensibile incremento assoluto, considerando il miglior livello funzionale (Limoli et al., 2016) (Fig. 13).

Anche nella retinite pigmentosa osserviamo un comportamento simile. Questa volta abbiamo usato il foveal thickness per valutare la cellularità residua. In tale patologia il paziente arriva all'osservazione quasi sempre negli stadi medio-avanzati, quando lo stroma extra-foveale si è atrofizzato. Quindi le cellule residue

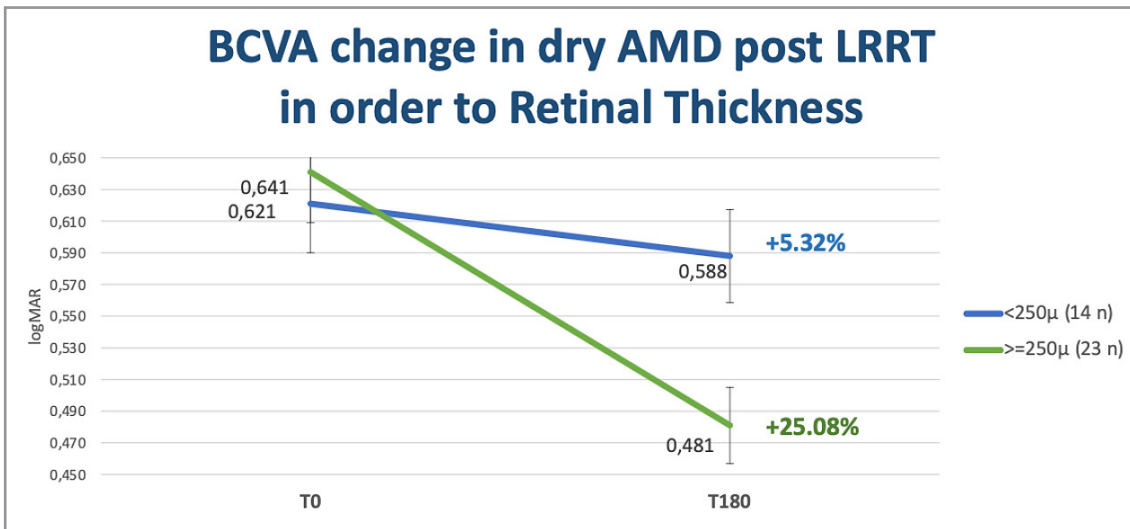


Figura 13 - Utilizzando come parametro funzionale la BCVA, osserviamo, a 6 mesi dall'impianto sovra-coroideale, un incremento maggiore nei pazienti dove la dry AMD mostra uno spessore medio dello stroma retinico superiore ai 250 micron (Limoli et al., 2016). Image courtesy of: P. Limoli – Centro Studi Ipvisione di Milano.

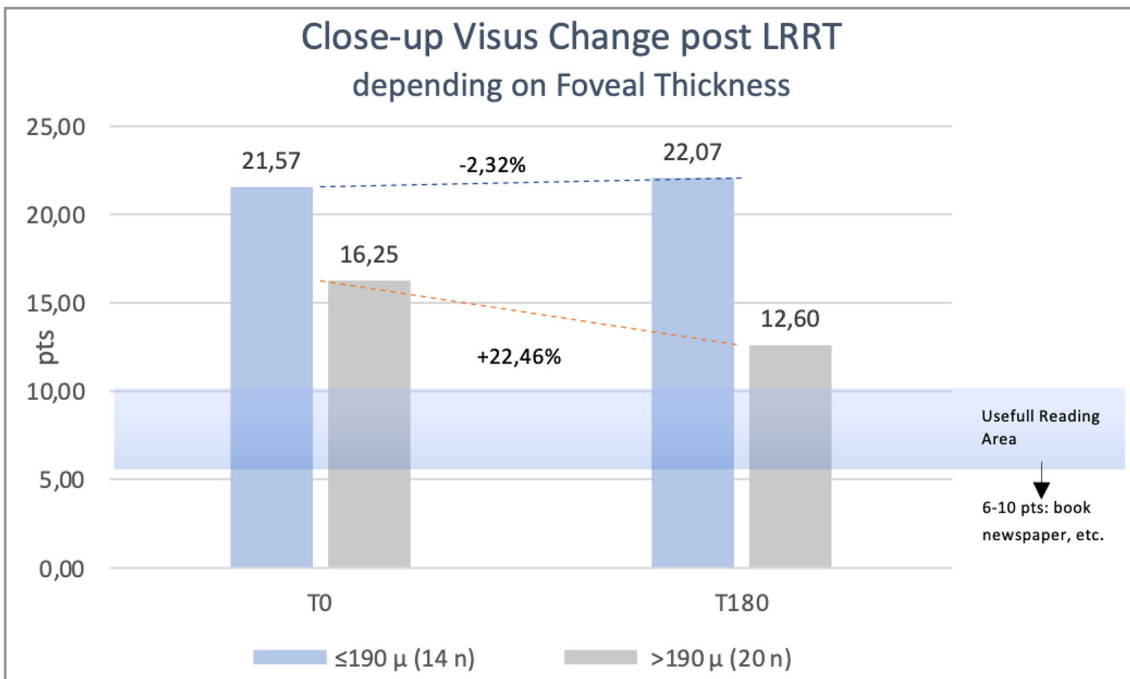


Figura 14 - Utilizzando come parametro funzionale la capacità di lettura espressa in corpi di stampa (pts), che esprime il livello della sensibilità dell'area foveale, osserviamo, a 6 mesi dall'impianto sovra-coroideale, un incremento maggiore nei pazienti dove la retinite pigmentosa lascia uno spessore foveale superiore ai 190 micron (Limoli et al., 2019, 2020).

sono concentrate nell'area foveale. Abbiamo scelto come cut-off uno spessore di 190 micron al di sopra del quale abbiamo considerato gli occhi come dotati di una cellularità accettabile, al di sotto gli occhi sono considerati come dotati di una cellularità più compromessa.

In tutti i casi dove lo spessore foveale è superiore abbiamo un incremento delle performance visive maggiore rispetto ai pazienti con uno spessore foveale medio uguale o inferiore ai 190 micron (Limoli et al., 2019, 2020) (Fig. 14). Dunque, al fine di contenere l'evoluzione della

patologia, è importante che l'input rigenerativo possa esplicitarsi prima del quadro finale di una data patologia, quando sono ancora presenti la maggior parte delle cellule target (Karl and Reh, 2010; Qin, et al.; 2021).

Conclusioni

Molti, dei principali opinion leaders del settore, ritengono che l'oftalmologia sarà l'area medica che risentirà maggiormente dell'impatto della medicina rigenerativa nei prossimi anni, e questo lo comprendiamo già adesso dal moltiplicarsi di pubblicazioni scientifiche sull'argomento.

Risultati promettenti derivati da modelli animali sono stati pubblicati nelle principali riviste accademiche, e diverse aziende stanno entrando in studi clinici mid-stage per diverse patologie degenerative a carico della macula, soprattutto quelle legate all'età.

Potenzialmente ogni tipo di patologia degenerativa presenta tale indicazione in uno stadio precoce della malattia, a prescindere dalla causa scatenante. Più nel dettaglio, il nostro target terapeutico è rappresentato da dry AMD, otticopatie (otticopatie subatrofiche, otticopatie glaucomatose, forme ischemiche), eredodistrofie retiniche (RP, Stargard, Cone dystrophy, ecc.), miopia degenerativa, retinopatia diabetica.

Possiamo proporre un trattamento cellulare a tutti i pazienti affetti da una patologia neuro-retinica non stabilizzata con le normali cure e la cui progressione rischia di creare una condizione di ipovisione più profonda fino alla cecità legale.

Nella nostra esperienza clinica, l'impianto sovracoroideale di cellule mesenchimali autologhe secondo la LRRT ha dimostrato il suo potenziale terapeutico, influenzando positivamente diversi parametri funzionali. Il contatto

diretto dell'autotrapianto con la coroide migliora l'incremento dei fattori bioattivi (citochine ed esosomi) prodotti dalle cellule mesenchimali nel flusso coroidale e quindi ne favorisce la diffusione attraverso il tessuto retinico e infine nel corpo vitreo.

Possiamo ottenere l'aumento della microcircolazione corioretinica e un maggior trofismo dei fotorecettori e delle cellule ganglionari direttamente, attraverso l'integrazione tra i fattori di crescita e i recettori di membrana, e indirettamente attraverso le interazioni con le cellule di Müller e del RPE,

È ragionevole ritenere che l'interazione tra secretoma mesenchimale e cellule retiniche possa portare a un miglioramento dei parametri funzionali in corso di patologie atrofiche retiniche, ma anche prevenire e/o ritardare la progressione di queste ultime.

I parametri funzionali sembrano migliorare maggiormente nei soggetti che hanno un maggior numero di cellule residue.

Indirettamente le condizioni trofiche dei fotorecettori o delle cellule ganglionari residue possono essere valutate attraverso l'analisi tomografica degli spessori retinici, utilizzabili come criterio prognostico al fine di prevedere la risposta terapeutica del trapianto di cellule LRRT.

Il riabilitatore della visione e il chirurgo oftalmico dovrebbero essere congiuntamente consapevoli della cellularità della retina, al fine di progettare un percorso terapeutico-riabilitativo efficace.

REFERENCES

1. Baddour JA, Sousounis K, Tsonis PA. (2012). Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Research*; 96(1):1-29. doi: 10.1002/bdrc.21006. Review. PMID: 22457174
2. Calkins, D.J. (2017). The challenge of regenerative therapies for the optic nerve in glaucoma. *Experimental Eye Research*; 157: 28–33. doi:10.1016/j.exer. 2017.01.007.
3. Chang, E.E.; Goldberg, J.L. (2012) *Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement*. *Ophthalmology* 119:979–986
4. Daftarian, N.; Kiani, S.; Zahabi, A. (2010). Regenerative therapy for retinal disorders. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 5, 250-264.
5. Daneshmandi, L.; Shah, S., Jafari, T.; Bhattacharjee, M.; Momah, D.; Saveh-Shemshaki, N.; Lo, K.W.; Laurencin, C.T. (2020). Emergence of the Stem Cell Secretome in Regenerative Engineering. *Trends Biotechnol.* 8(12):1373-1384. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.04.013. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32622558; PMCID: PMC7666064.
6. Ding, S.L.S.; Kumar, S.; and Mok, P.L. (2017). Cellular Reparative Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells for Retinal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*; 18, 1406; doi:10.3390/ijms18081406
7. El-Kadiry, A.E.; Rafei, M.; Shammaa, R. (2021). Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Front Med (Lausanne)*;8:756029. doi: 10.3389/fmed.2021.756029. PMID: 34881261; PMCID: PMC8645794.
8. Gneccchi, M.; Danieli, P.; Malpasso, G.; Ciuffreda, M.C. (2016). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. *Methods Mol Biol.* 1416:123–146.
9. Guadagni, V.; Novelli, E.; and Strettoi, E. (2015). Environmental enrichment reduces photoreceptor degeneration and retinal inflammation in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; vol. 56, no. 7, pp. 4261–4261.
10. Guo, S.C.; Tao, S.C.; Yin, W.J.; Qi, X.; Yuan, T.; Zhang, C.Q. (2017). Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model. *Theranostics*; 7(1): 81- 96.
11. Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 1: 40. Published online 2006 October 11. doi: 10.1186/1750-1172-1-40
12. Haque, N.; et al. (2018) Secretome: pharmaceuticals for cell-free regenerative therapy In *Stem Cell Drugs - a New Generation of Biopharmaceuticals*, pp. 17–35, Springer
13. Hartong, D.T.; Berson, L.; Dryja, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet*; 368:1795–1809.
14. Hofer, H. R.; Tuan, R. S. (2016). Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Research & Therapy*; 7(1),131.
15. Hu, Z.L.; Li, N.; Wei X, Tang L, Wang TH, Chen XM (2017). Neuroprotective effects of BDNF and GDNF in intravitreally transplanted mesenchymal stem cells after optic nerve crush in mice. *International Journal of Ophthalmology.* 10:35–42.
16. Huang, H.; Chen, L.; Sanberg, P. (2010). Cell Therapy: From Bench to Bedside Translation in CNS Neurorestoratology. *Era. Cell Med.* 1(1): 15–46.
17. Huang, H.; Young, W.; Chen, L.; et al. (2018). *Clinical Cell Therapy Guidelines for Neurorestoration (IANR/CANR 2017)*. *Cell Transplant*;27(2):310-324. doi:10.1177/0963689717746999
18. Jones, M. K.; Lu, B.; Girman, S.; Wang, S. (2017). Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 58, 1-27.
19. Kahraman, N. S., & Öner, A. (2020). Umbilical cord derived mesenchymal stem cell implantation in retinitis pigmentosa: a 6-month follow-up results of a phase 3 trial. *International journal of ophthalmology*, 13(9), 1423–1429. <https://doi.org/10.18240/ijo.2020.09.14>
20. Kahraman, N.S.; Gonen, Z.B.; Sevim, D.G.; Öner, A. (2021). First Year Results of Suprachoroidal Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cell Implantation in Degenerative Macular Diseases. *Int J Stem Cells.* 2021 Feb 28;14(1):47-57. doi: 10.15283/ijsc20025. PMID: 33122468; PMCID: PMC7904524.
21. Karl, M.O.; Reh, T.A. (2010).Regenerative medicine for retinal diseases: activating the endogenous repair mechanisms. *Trends Mol Med.* 2010 April; 16(4): 193–202. Published online 2010 March 19. doi: 10.1016/j.molmed.2010.02.003
22. Kashani, A. H., Uang, J., Mert, M., Rahhal, F., Chan, C., Avery, R. L., Dugel, P., Chen, S., Lebkowski, J., Clegg, D. O., Hinton, D. R., & Humayun, M. S. (2020). Surgical Method for Implantation of a Biosynthetic Retinal Pigment Epithelium Monolayer for Geographic Atrophy: Experience from a Phase 1/2a Study. *Ophthalmology. Retina*, 4(3), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.09.017>
23. Kim, K.S.; Park, J.M.; Kong, T.H.; Kim, C.; Bae, S.H.; Kim, H.W.; Moon, J. (2016). Retinal angiogenesis effects of TGF-β1 and paracrine factors secreted from human placental stem cells in response to a pathological environment. *Cell Transplantation*; 25, 1145–1157. [CrossRef] [PubMed]

24. Kusuma, G.D.; et al. (2017) Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect. *Stem Cells Dev.* 26, 617–631 [PubMed: 28186467]
25. Kyurkchiev, D.; Bochev, I.; Ivanova-Todorova, E.; Mourdjeva, M.; Oreshkova, T.; Belemezova, K.; Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(5),552–570.
26. Lang, S.; Loibl, M.; Herrmann, M. (2018). Platelet-rich plasma in tissue engineering: hype and hope. *Eur Surg Res*; 59(3–4): 265–275.
27. Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81: 1345–1351
28. Li, X.; Zhao, S.; Wang, L. (2018). Therapeutic effect of adipose-derived stem cell transplantation on optic nerve injury in rats. *Molecular Medicine Reports*. 17:2529–2534.
29. Liang X.; Ding Y.; Zhang, Y.; Tse HF.; and Lian Q. (2014). Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspective. *Cell Transplantation*, Vol. 23, 1045–1059. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368913X667709> E-ISSN 1555-3892 www.cognizantcommunication.com
30. Limoli, P.G., Limoli, C., Morales, M. U., & Vingolo, E. M. (2020). Mesenchymal stem cell surgery, rescue, and regeneration in retinitis pigmentosa: clinical and rehabilitative prognostic aspects. *Restorative neurology and neuroscience*, 38(3), 223–237. <https://doi.org/10.3233/RNN-190970>
31. Limoli, P.G., Limoli, C., Vingolo, E. M., Scalinci, S. Z., & Nebbioso, M. (2016). Cell surgery and growth factors in dry age-related macular degeneration: visual prognosis and morphological study. *Oncotarget*, 7(30), 46913–46923. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10442>
32. Limoli, P.G., Vingolo, E. M., Limoli, C., & Nebbioso, M. (2020). Antioxidant and Biological Properties of Mesenchymal Cells Used for Therapy in Retinitis Pigmentosa. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 983. <https://doi.org/10.3390/antiox9100983>
33. Limoli, P.G., Vingolo, E. M., Limoli, C., Scalinci, S. Z., & Nebbioso, M. (2018). Regenerative Therapy by Suprachoroidal Cell Autograft in Dry Age-related Macular Degeneration: Preliminary In Vivo Report. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (132), 56469. <https://doi.org/10.3791/56469>
34. Limoli, P.G., Vingolo, E.M., Morales, M.U., Nebbioso, M., Limoli, C. (2014). Preliminary Study on Electrophysiological Changes After Cellular Autograft in Age-Related Macular Degeneration. *Medicine*, 93(29), e355.
35. Limoli, P.G.; Limoli, C.; Morales, M.U.; Vingolo, E. M. (2020). Mesenchymal Stem Cell Surgery, rescue, and regeneration in retinitis pigmentosa: clinical and rehabilitative prognostic aspects. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2020;38(3):223-237. <https://doi.org/10.3233/RNN-190970>. PMID: 32310198; PMCID: PMC7504992.
36. Limoli, P.G.; Limoli, C.; Vingolo, E.M.; Franzone, F.; Nebbioso, M. (2021). Mesenchymal stem and non-stem cell surgery, rescue, and regeneration in glaucomatous optic neuropathy. *Stem Cell Research & Therapy* (2021) 12:275 <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02351-4>
37. Limoli, P.G.; Limoli, C.; Vingolo, E.M.; Scalinci, S.Z.; Nebbioso, M. (2016). Cell surgery and growth factors in dry age-related macular degeneration: visual prognosis and morphological study. *Oncotarget*, 7(30),46913-46923.
38. Limoli, P.G.; Vingolo, E.M.; Limoli, C.; Nebbioso, M. (2019). Stem Cell Surgery and Growth Factors in Retinitis Pigmentosa Patients: Pilot Study after Literature Review. *Biomedicine*; 7(4): 94. 30. doi: 10.3390/biomedicine7040094 PMCID: PMC6966474 PMID: 31801246
39. Lindroos, B.; Suuronen, R.; Miettinen, S. (2010). The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7, 269–291.
40. Lykov, A.P.; Poveschenko, O.V.; Surovtseva, M.A.; Stanishevskaya, O.M.; Chernykh, D.V.; Arbeneva, N.S.; Bratko, V.I. (2018). Autologous Plasma Enriched with Platelet Lysate for the Treatment of Idiopathic Age-Related Macular Degeneration: A Prospective Study. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*; 73(1):40–48.
41. Madrigal, M.; Rao, K.S.; Riordan, N.H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*; 12(1):260.
42. McBrien, N.A.; Gentle, A. (2003). Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22 (3), 307–338.
43. mesenchymal stromal cell (msc)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *J Extracell Vesicles*; 8(1):1609206.
44. Mesentier-Louro, L.A.; Zaverucha-do-Valle, C.; Rosado-de-Castro, P.H.; Silva-Junior, A.J.; Pimentel-Coelho, P.M.; Mendez-Otero, R.; Santiago, M.F. (2016). Bone marrow derived cells as a therapeutic approach to optic nerve diseases. *Stem Cells International*. 2016:5078619. doi: 10.1155/2016/5078619.
45. Mok, P.L.; Leong, C.F.; Cheong, S.K. (2013). Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells. *The Malaysian journal of pathology*; 35, 17–32. [PubMed]

46. Nittala, M. G., Uji, A., Velaga, S. B., Hariri, A. H., Naor, J., Birch, D. G., Spencer, R., Leng, T., Capela, A., Tsukamoto, A., Ip, M., & Sadda, S. R. (2021). Effect of Human Central Nervous System Stem Cell Subretinal Transplantation on Progression of Geographic Atrophy Secondary to Nonneovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology. Retina*, 5(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2020.06.012>
47. Ogata, N., Imaizumi, M., Miyashiro, M., Arichi, M., Matsuoka, M., Ando, A., & Matsumura, M. (2005). Low levels of pigment epithelium-derived factor in highly myopic eyes with chorioretinal atrophy. *American journal of ophthalmology*, 140(5), 937–939. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.05.037>
48. Ohno-Matsui, K., Lai, T. Y., Lai, C. C., & Cheung, C. M. (2016). Updates of pathologic myopia. *Progress in retinal and eye research*, 52, 156–187. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.12.001>
49. Öner A., Gonen ZB, Sevim DG, Kahraman NS, and Unlu M. (2018b). Suprachoroidal Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Implantation in Patients with Dry-Type Age-Related Macular Degeneration and Stargardt's Macular Dystrophy: 6-Month Follow-Up Results of a Phase 2 Study. *CELLULAR REPROGRAMMING* Volume 20, Number 6, Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/cell.2018.0045
50. Öner A., Sevim DG. (2017). Complications of stem cell-based therapies in retinal diseases, *Stem Cell Res Open Lib*, 1(1): 1-7.
51. Öner, A. (2018). Stem Cell Treatment in Retinal Diseases: Recent Developments. *Turkish journal of ophthalmology*, 48(1), 33–38. <https://doi.org/10.4274/tjo.89972>
52. Öner, A., (2018). Stem Cell Treatment in Retinal Diseases: Recent Developments. *Turkish Journal of Ophthalmology*, 48(1), 33-38
53. Öner, A., Gonen, Z. B., Sevim, D. G., Sinim Kahraman, N., & Unlu, M. (2019). Six-month results of suprachoroidal adipose tissue-derived mesenchymal stem cell implantation in patients with optic atrophy: a phase 1/2 study. *International ophthalmology*, 39(12), 2913–2922. <https://doi.org/10.1007/s10792-019-01141-5>
54. Öner, A.; Gonen, Z.B.; Sinim, N.; Cetin, M.; Ozkul, Y. (2016). Subretinal adipose tissue-derived mesenchymal stem cell implantation in advanced stage retinitis pigmentosa: a phase I clinical safety study. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0432-y>
55. Osborne, A.; Sanderson, J.; and Martin, K.R. (2018). Neuroprotective Effects of Human Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Derived Growth Factor on Human Retinal Ganglion Cells. *Stem Cells*. 36(1): 65–78. doi: 10.1002/stem.2722.
56. Otani, A.; et al. (2004). Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *Journal of Clinical Investigation*; 114:765–774. doi:10.1172/JCI200421686. [PMC free article] [PubMed]
57. Pagon, R.A. (1988). Retinitis pigmentosa. *Survey of Ophthalmology*; 33, 137–177.
58. Park, S. S., Bauer, G., Abedi, M., Pontow, S., Panorgias, A., Jonnal, R., Zawadzki, R. J., Werner, J. S., & Nolta, J. (2014). Intravitreal autologous bone marrow CD34+ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(1), 81–89. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15415>
59. Punzo, C.; Xiong, W.; & Cepko, C.L. (2012). Loss of daylight vision in retinal degeneration: are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *The Journal of biological chemistry*, 287(3), 1642–1648. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.304428>
60. Qin, S., Dong, N., Yang, M., Wang, J., Feng, X., & Wang, Y. (2021). Complement Inhibitors in Age-Related Macular Degeneration: A Potential Therapeutic Option. *Journal of immunology research*, 2021, 9945725. <https://doi.org/10.1155/2021/9945725>
61. Qureshi, A.H.; Chaoji, V.; Maignel, D.; Faridi, M.H.; Barth, C.J.; Salem, S.M.; Singhal, M.; Stoub, D.; Krastins, B.; Ogihara, M.; Zaki, M.J.; Gupta, V. (2009). Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: insights into integrin signaling. *PLoS One*, 22(6), 490–495.
62. Romanov, Y. A.; Darevskaia, A. N.; Merzlikina, N. V.; Buravkova, L. B. (2005). Mesenchymal Stem cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Characterization, and Differentiation Potentialities. *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 3,158-163.
63. Saint-Geniez, M.; Maharaj, A. S.; Walshe, T. E.; Tucker, B. A.; Sekiyama, E.; Kurihara, T.; Darland, D. C.; Young, M. J.; & D'Amore, P. A. (2008). Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller
64. Schwartz, S. D., Regillo, C. D., Lam, B. L., Elliott, D., Rosenfeld, P. J., Gregori, N. Z., Hubschman, J. P., Davis, J. L., Heilwell, G., Spira, M., Maguire, J., Gay, R., Bateman, J., Ostrick, R. M., Morris, D., Vincent, M., Anglade, E., Del Priore, L. V., & Lanza, R. (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet (London, England)*, 385(9967), 509–516. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)

65. Shao, L.; Xu, L.; Wei, W.B.; Chen, C.X.; Du, K.F.; Li, X.P.; Yang, M.; Wang, Y.X., You, Q.S.; Jonas, J.B. (2014) Visual acuity and subfoveal choroidal thickness: the Beijing Eye Study. *Am J Ophthalmol.* 2014 Oct;158(4):702-709.e1. doi: 10.1016/j.ajo.2014.05.023. Epub 2014 May 27. PMID: 24878308.
66. Singh, M. S., Park, S. S., Albin, T. A., Canto-Soler, M. V., Klassen, H., MacLaren, R. E., Takahashi, M., Nagiel, A., Schwartz, S. D., & Bharti, K. (2020). Retinal stem cell transplantation: Balancing safety and potential. *Progress in retinal and eye research*, 75, 100779. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100779>
67. Sluch, V.M.; Zack, D.J. (2014) Stem cells, retinal ganglion cells and glaucoma. *Developments in Ophthalmology*; 53:111–12.
68. Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2013). Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*, 140, 2457–2461.
69. Tao, S.C.; Yuan, T.; Rui, B.Y.; Zhu, Z.Z.; Guo, S.C.; Zhang, C.Q. (2017). Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway. *Theranostics*. 2017; 7(3): 733- 750.
70. Torreggiani, E.; Perut, F.; Roncuzzi, L.; Zini, N.; Baglio, S.R.; Baldini, N. (2014). Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity. *Eur Cells Mater*; 28: 137- 151; discussion 151.
71. Tran, C.; Damaser, M.S. (2015). Stem cells as drug delivery methods: application of stem cell secretome for regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev* 82, 1–11 [PubMed: 25451858]
72. Van Pham, P.; et al. (2018) Evolution of stem cell products in medicine: future of off-the-shelf products In *Stem Cell Drugs - a New Generation of Biopharmaceuticals*, pp. 93–118, Springer
73. Wang, L.J.; Liu, L.P.; Gu, X.L.; Wang, M.; Liu, L.M. (2018). Implantation of adipose-derived stem cells cures the optic nerve injury on rats through inhibiting the expression of inflammation factors in the TLR4 signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 22:1196–1202.
74. Wang, S.; Wang, Y.; Gao, X.; et al. (2015). Choroidal thickness and high myopia: a cross-sectional study and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 15, 70. <https://doi.org/10.1186/s12886-015-0059-2>
75. Witwer, K.W.; Van Balkom, B.W.M.; Bruno, S.; Choo, A.; Dominici, M.; Gimona, M.; Hill, A.F.; De Kleijn, D.; Koh, M.; Lai, R.C.; Mitsialis, S.A.; et al. (2019). Defining Fleckenstein, M., Keenan, T., Guymer, R. H., Chakravarthy, U., Schmitz-Valckenberg, S., Klaver, C. C., Wong, W. T., & Chew, E. Y. (2021). Age-related macular degeneration. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00265-2>
76. Wong, S.P., Rowley, J.E., Redpath, A.N., Tilman, J.D., Fellous, T.G., Johnson, J.R. (2015). Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther*; 151:107–120.
77. Yafai, Y.; Iandiev, I.; Lange, J.; Yang, X. M.; Wiedemann, P., Bringmann, A., & Eichler, W. (2013). Basic fibroblast growth factor contributes to a shift in the angioregulatory activity of retinal glial (Müller) cells. *PloS one*, 8(7), e68773.
78. Zarbin, M. (2016). Cell-based therapy for degenerative retinal disease. *Trends in Molecular Medicine*, 22,115–34. 10.1016/j.molmed.2015.12.007.
79. Zhao, P.T.; Zhang, L.J.; Shao, H.; Bai, L.L.; Yu, B.; Su, C.; Dong, L.J.; Liu, X.; Li, X.R.; Zhang, X.M. (2016). Therapeutic effects of mesenchymal stem cells administered at later phase of recurrent experimental autoimmune uveitis. *International Journal of Ophthalmology*; 9(10):1381-1389.
80. Zhou, Y.; et al. (2019) The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity. *J. Clin. Med* 8, 1025