



Realtà e Futuro nella Cura delle Malattie Retiniche

Dott. Giuseppe Trabucchi

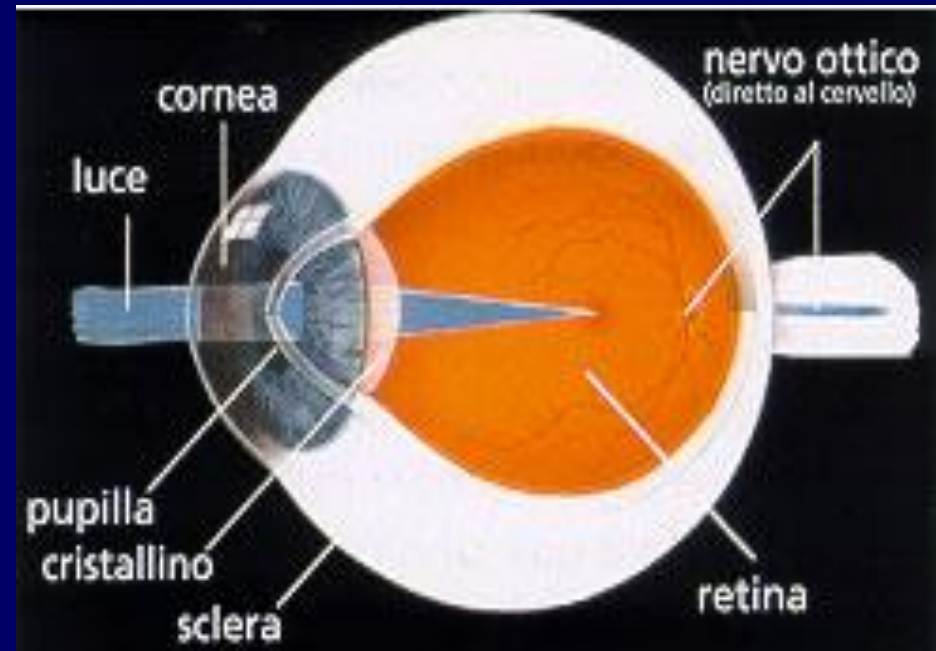
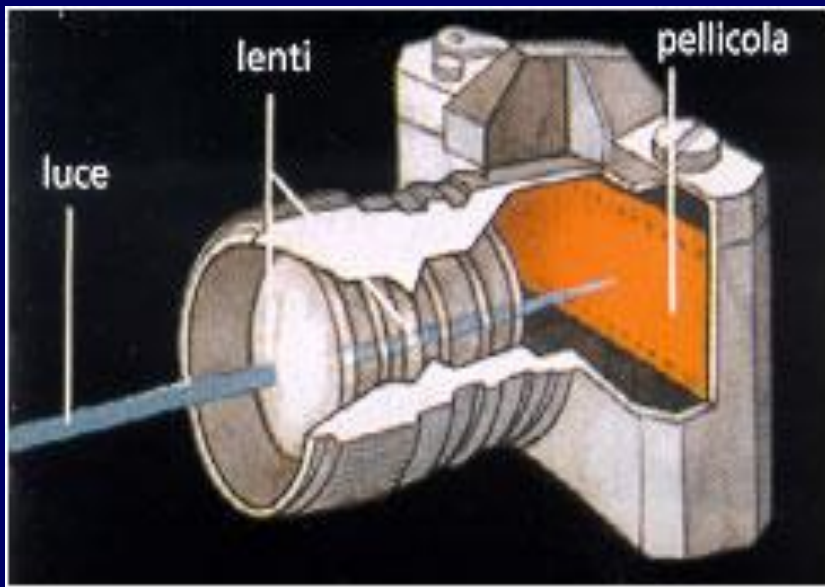
**Direttore: Unità Operativa di Oculistica
Ospedale Civile di Legnano**



Occhio e visione

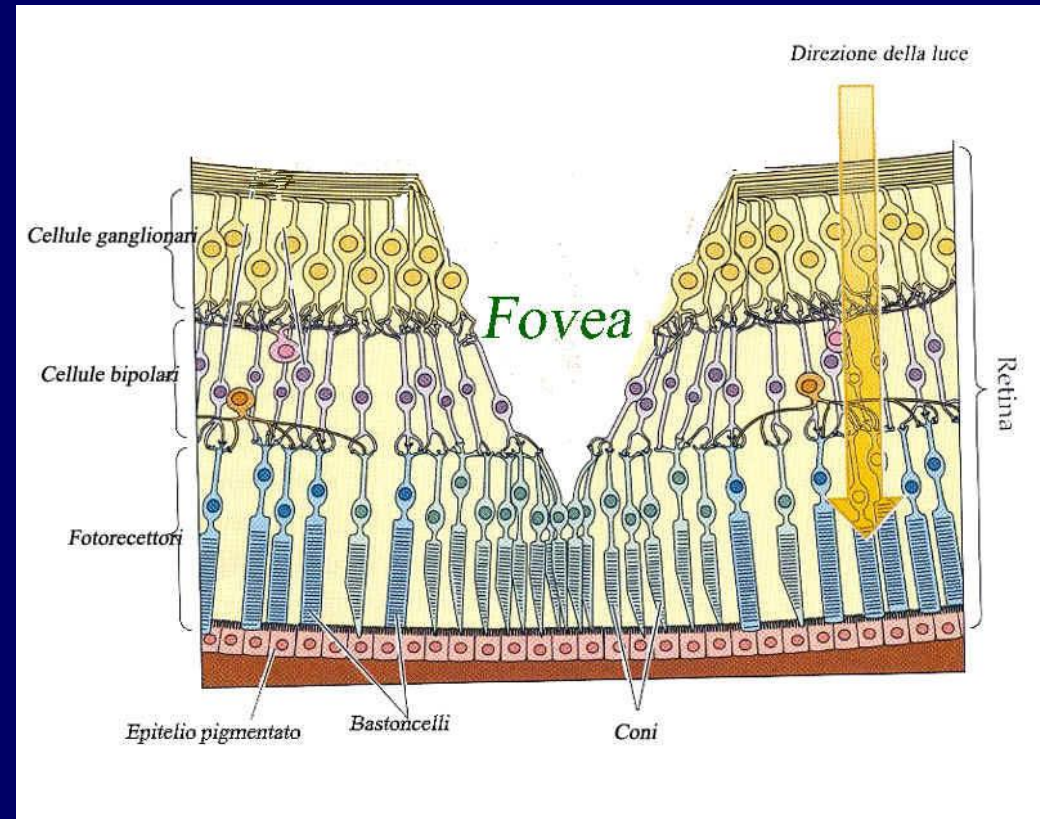
- L'occhio è l'organo della vista
- Il cervello (sistema nervoso centrale) elabora le “informazioni” che gli occhi raccolgono dal mondo esterno.

L'occhio: molto di più che una macchina fotografica



Genesi e trasmissione dell'impulso visivo

- **Retina**
- 10 strati retinici
- 3 popolazioni cellulari essenziali (*Fotorecettori, Cellule Bipolari, Cellule ganglionari*)
- Epitelio pigmentato retinico



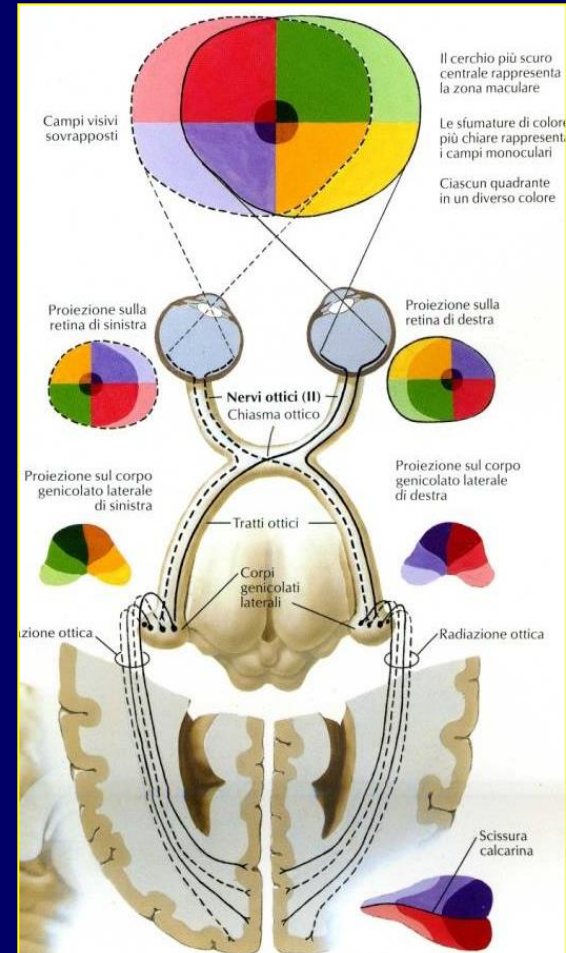
Conduzione ed Elaborazione dell'impulso visivo

RETINA

NERVO OTTICO

CORPI GENICOLATI LATERALI

CORTECCIA OCCIPITALE



Malattie Retiniche

- Esistono patologie dove le cellule retiniche non sono più in grado di tradurre il segnale visivo ed inviarlo al cervello per essere elaborato in immagine.
- Alcune di queste patologie possono portare alla condizione di ipovedente fino alla cecità.

Distrofie Retiniche

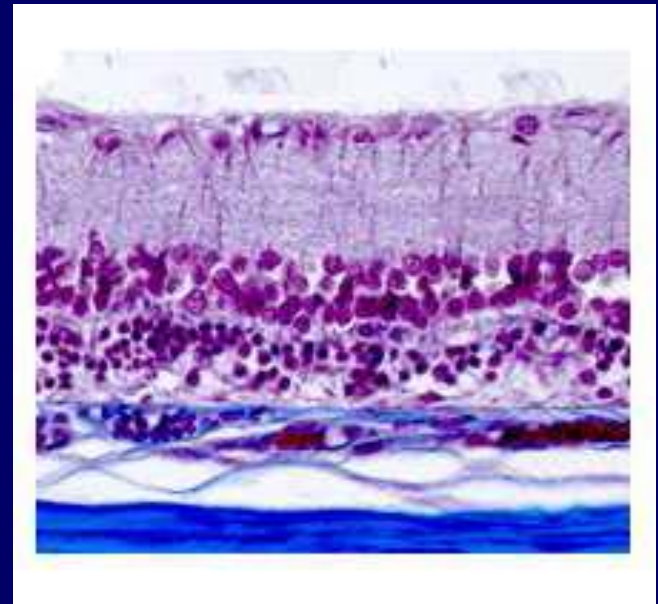
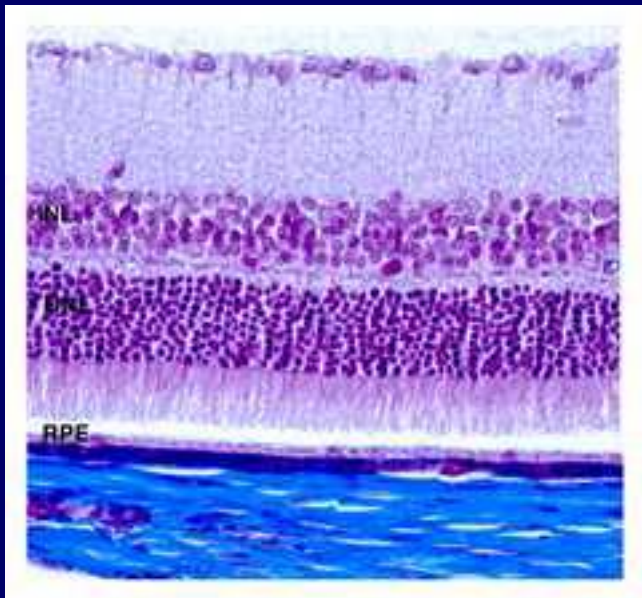
- Retinite Pigmentosa
- Distrofie maculari congenite
- Malattie degenerative della macula

Distrofie Retiniche

- Tutte queste malattie retiniche sono caratterizzate da una progressiva perdita dei fotorecettori (pur essendo mantenuta la vitalità delle cellule gangliari e quindi del nervo ottico).
- I pazienti sviluppano correttamente la vista ma a partire dalla 2 decade di vita si assiste ad una progressiva riduzione della percezione visiva fino alla cecità.

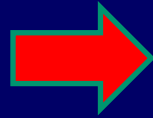
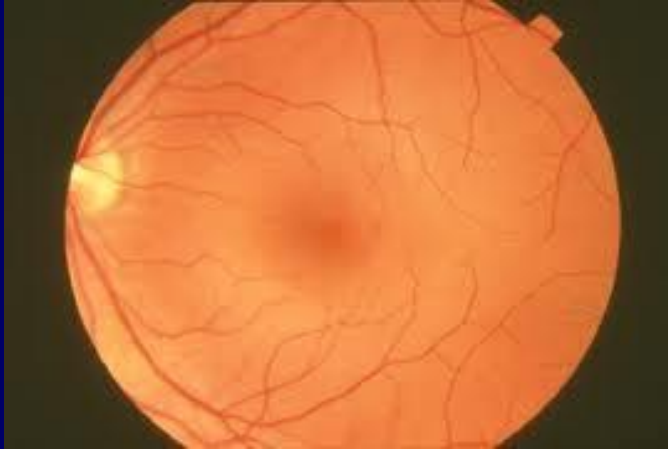
Malattie retiniche degenerative

- Destutturazione di cellule dei fotorecettori
- Spesso associata a perdita irreversibile della vista

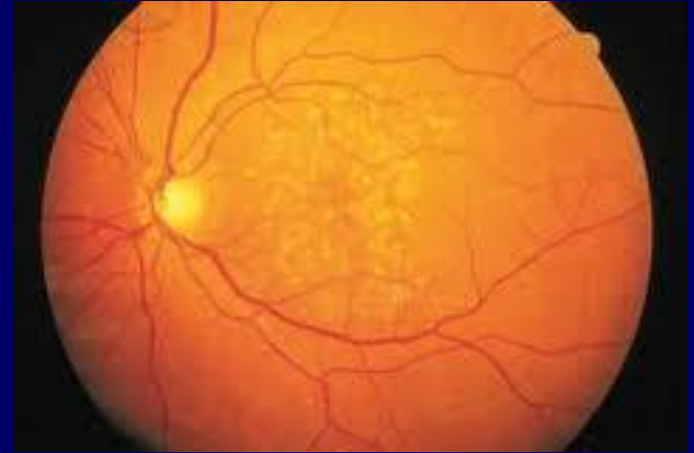


Progressiva degenerazione della Retina

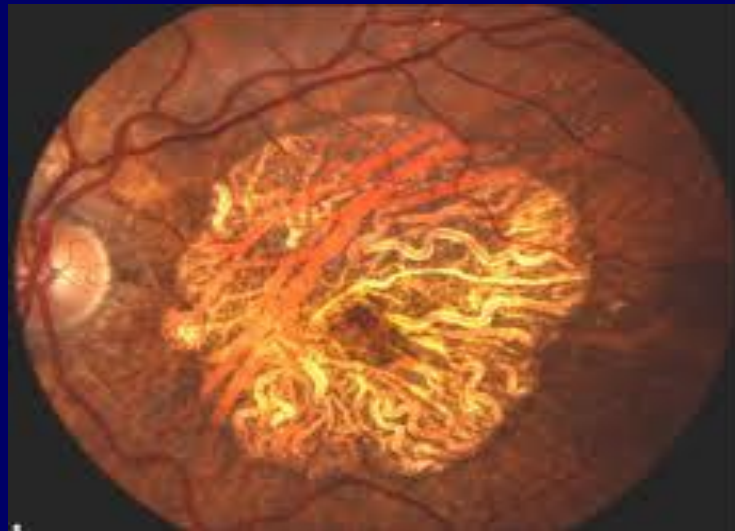
Retina Normale



Retina Distrofica



Retina Atrofica



Possibili Soluzioni

- Terapia Genica
- Rallentare la malattia: nuove terapie farmacologiche (nano molecole)
- By-pass della retina (Microchip)
- Rigenerare i fotorecettori (Cellule Staminali)

Terapia genica delle malattie retiniche

- La terapia genica è una procedura che permette di trasferire il materiale genetico da una cellula sana a una malata
- Curare una patologia in cui uno o più geni sono assenti o difettosi (mutati). Quindi, la prima tappa verso questo tipo di terapia è l'identificazione del gene o dei geni responsabili di una malattia genetica.

Malformazioni oculari

- **Anoftalmo-microftalmo-coloboma**: mutazioni a carico degli stessi geni definiti dall'acronimo "MAC":
- SOX 2 - OTX2 - PAX2 - PAX6
- si tratta di geni che attivano la trascrizione dell'mRNA in altri geni.
- Sindromi correlate: CHARGE-MLS- sdr Lenz - sdr Fraser

Patologie degenerative

- Malattia di Stargardt: ABCA4 (proteine transmembrana ATPasi dipendenti)
- Malattia di Best: VMD2 (cr11) formazione canali ionici nell'EPR
- Retinoschisi X linked: alterazione bilaterale delle cell Muller
- Pattern Distrophy: insieme di degenerazionni maculari da accumuli lipofuscini, RDS/periferina
- Acromatopsia: CNGB3-CNGA3-GNAT2

Patologie degenerative

- “cone-rod dystrophy”: compromissione fotonica. Aut Dom.
CRX, GUCA1A
- “rod-cone dystrophy”: compromissione scotopica (=retinite pigmentosa). Individuati 17 geni per forme AUT DOM: RHO-RDS/periferina, ROM 1...
18 geni per forme AUT REC:ABCA4, CRB1
2 geni per forme X linked: RP2, RPGR

SDR associate: Usher-Cohen-Refsum-Karns Sayre

Patologie degenerative

- Amaurosi congenita di Leber: compare entro i 2-3 mesi di vita con nistagmo e segni oculo-digitali. 8 geni codificati: CRB1, RPE65 (codifica per proteina coinvolta nel metabolismo dei retinoidi)...

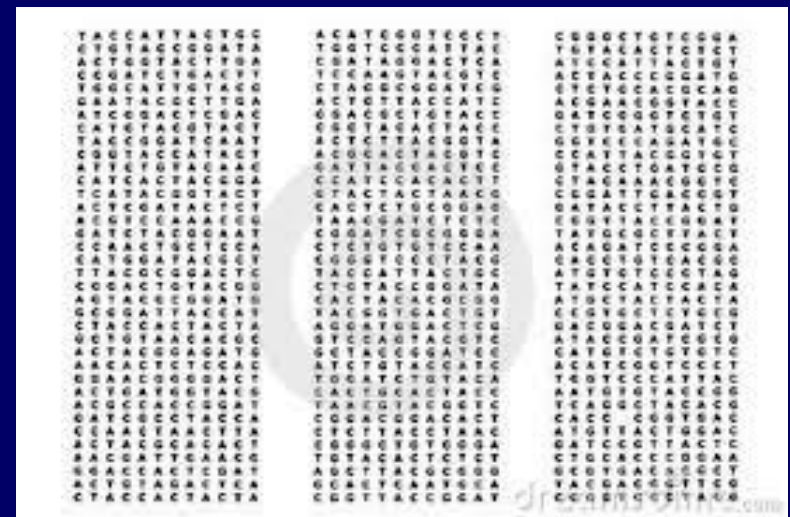
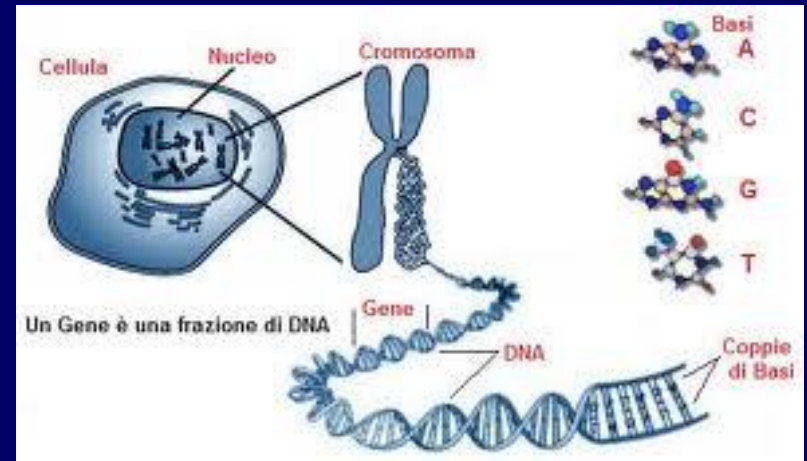
Sdr associate: Senior-Loken, Joubert, Saldino Mainzer

- ciliopatie: mutazioni dei geni codificanti il “cilium”(organulo presente in diversi organi: coclea. Sist. Vestibolare, sist. Olfattivo, spermatozoo). Determina RP associata a sordità=sdr Usher (MYO7A)e altre (Bardet Biedl- Senior Loken, Saldino Mainzer)

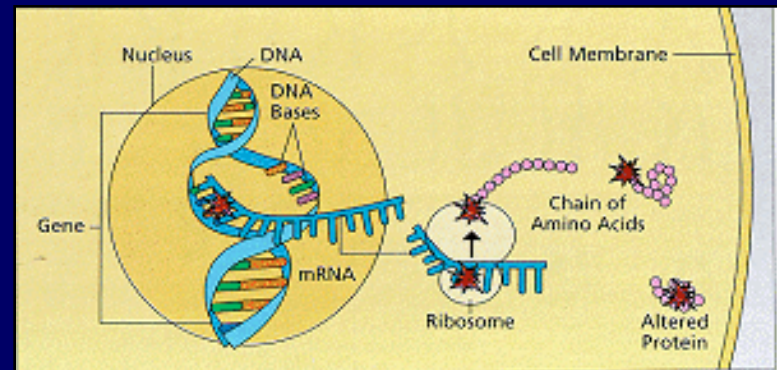
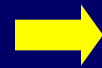
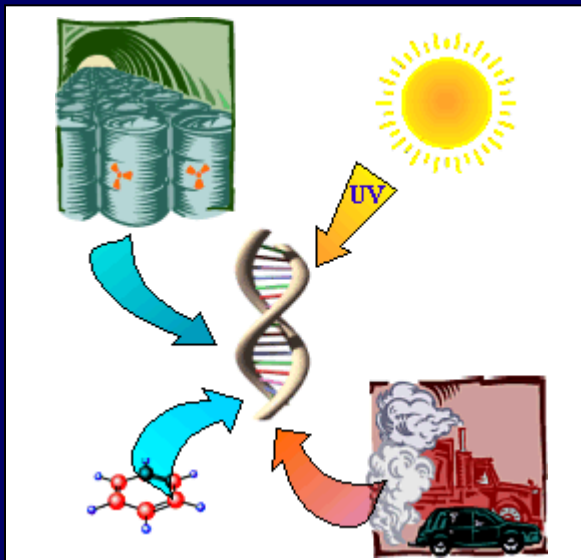
1953 – 2013: *il DNA compie 60 anni!*

"We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest."

*James D. Watson and Francis H. Crick,
Nature, April 25, 1953*

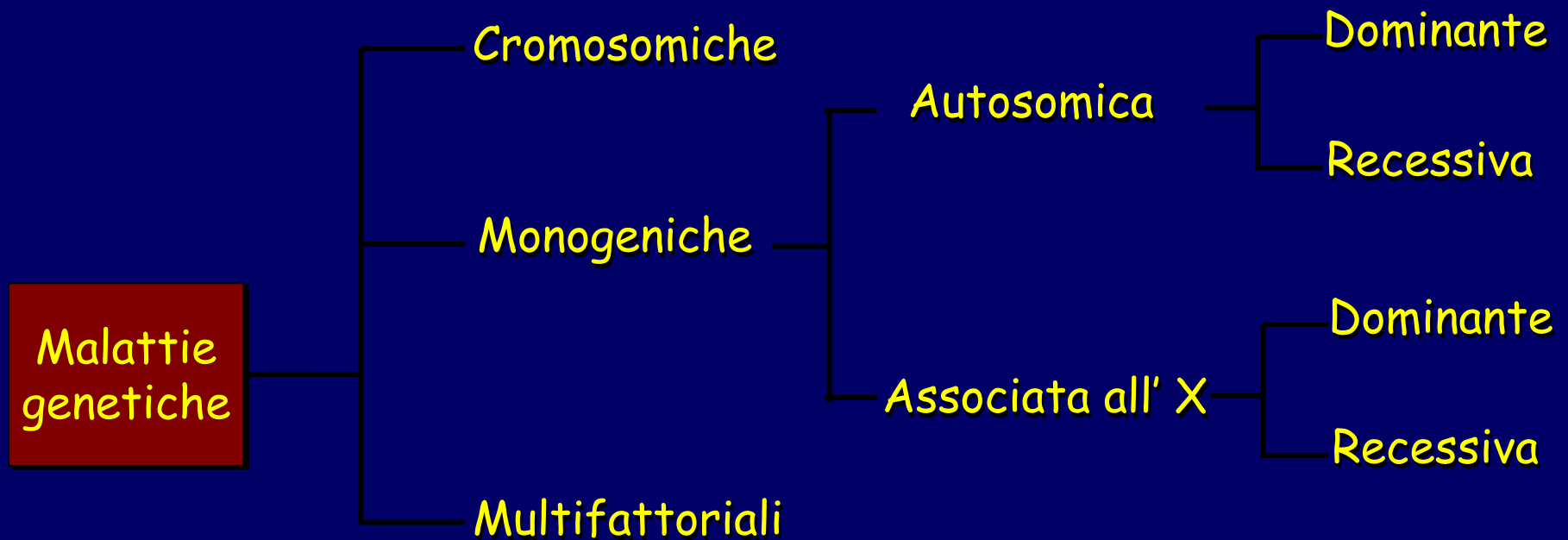


- Il patrimonio genetico della specie umana va incontro a continue modifiche
- Questo salvaguarda la capacità di adattamento all'ambiente.



Tuttavia, alcune di queste modifiche, o mutazioni, comportano malattie genetiche.

Classificazione delle malattie genetiche

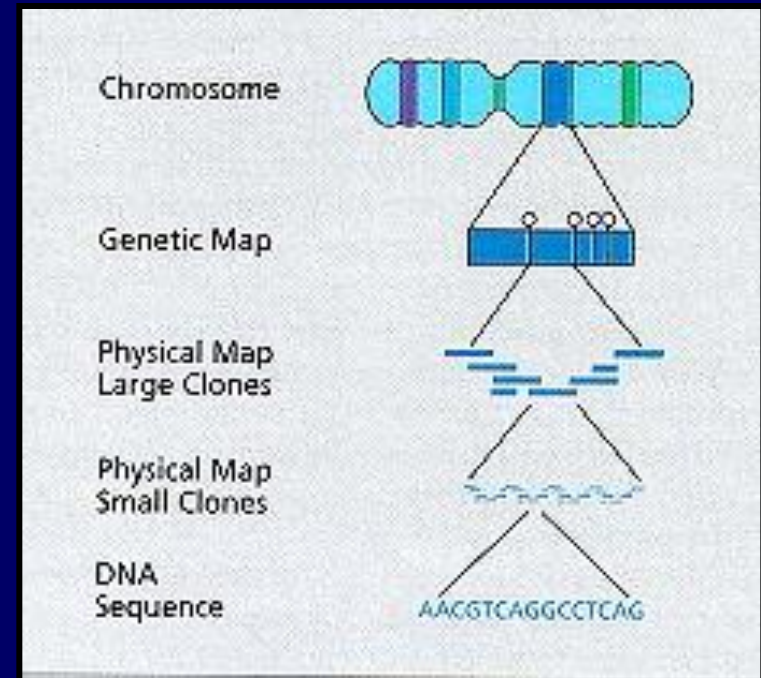


Cos' è il Progetto Genoma Umano?

Con il Progetto Genoma si è deciso di dare vita a un grande sforzo collaborativo su scala internazionale e di determinare una volta per tutte **l'intera sequenza nucleotidica del genoma umano.**

Le sequenze di DNA sono state divise in **frammenti** più piccoli ognuno dei quali è stato riprodotto in quantità sufficienti per la ricerca.

I frammenti sono stati distribuiti ai vari laboratori e suddivisi a loro volta in pezzi ancora più corti.



Si è potuto quindi sequenziare i nucleotidi.

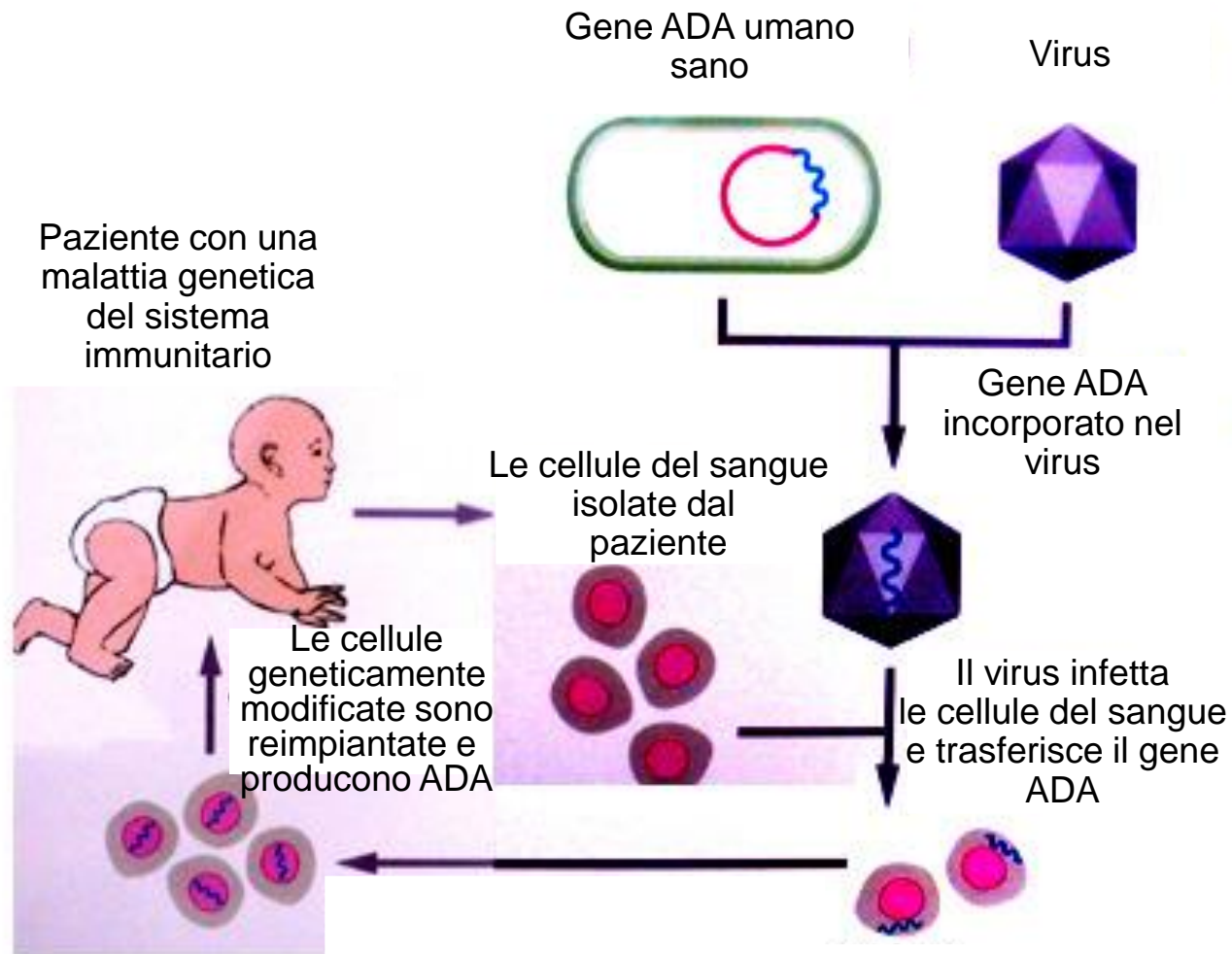
Che cos'è la terapia genica?

La terapia genica consiste:
nella sostituzione della **versione difettosa** di
un gene con **una funzionante** all'interno di
un organismo, in modo da rimediare alla
malattia genetica.

1990 Primo esperimento nell'uomo di terapia genica

Ashanti De Silva, una bambina di 4 anni affetta da una grave immunodeficienza, che deriva da una deficienza nell'**adenosina-deaminasi (ADA)**, un enzima necessario per il normale funzionamento del sistema immunitario.

Le cellule del sangue furono isolate dalla bambina, fatte crescere in laboratorio, ed il gene normale ADA vi fu introdotto attraverso un vettore, un virus reso innocuo. Le cellule "ingegnerizzate" furono poi reintrodotte nella paziente.



Terapia genica delle malattie retiniche

- Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness.

Genetics & Nature (2001)

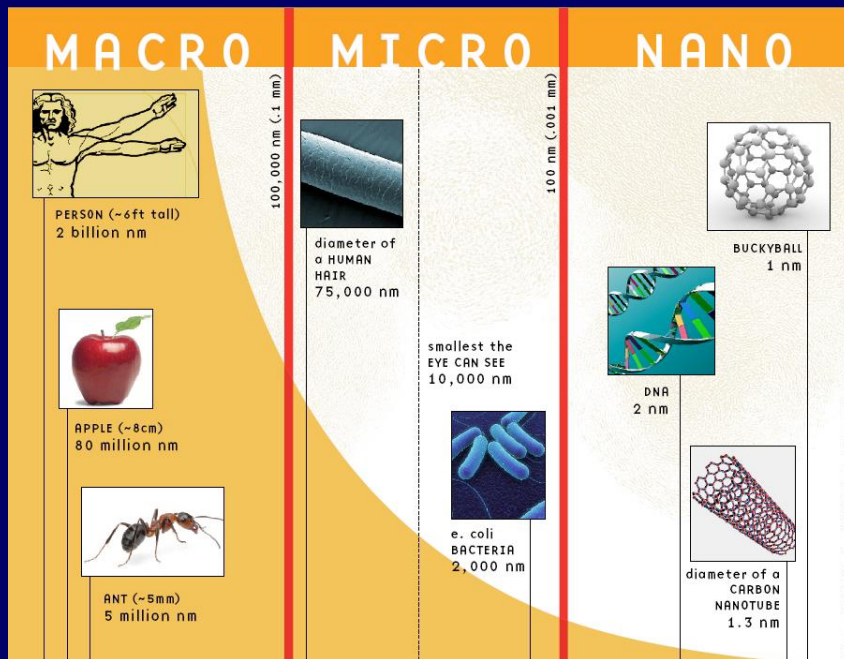
- Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber Congenital amaurosis.

New England Journal of Medicine (2012)

- Improved vector for genetheraphy in retinal diseases.

Nature (2013)

Nuove Terapie: Nanomedicina



- Il prefisso *nano* indica 10^{-9} , un nanometro equivale quindi ad un milionesimo di metro.
- La Nanomedicina opera sulla stessa scala dei meccanismi biologici.
- Una molecola di DNA ha un diametro pari a 2.5 nm
- L'emoglobina circa 5 nm
- Le cellule umane hanno un diametro di 10-20 μm

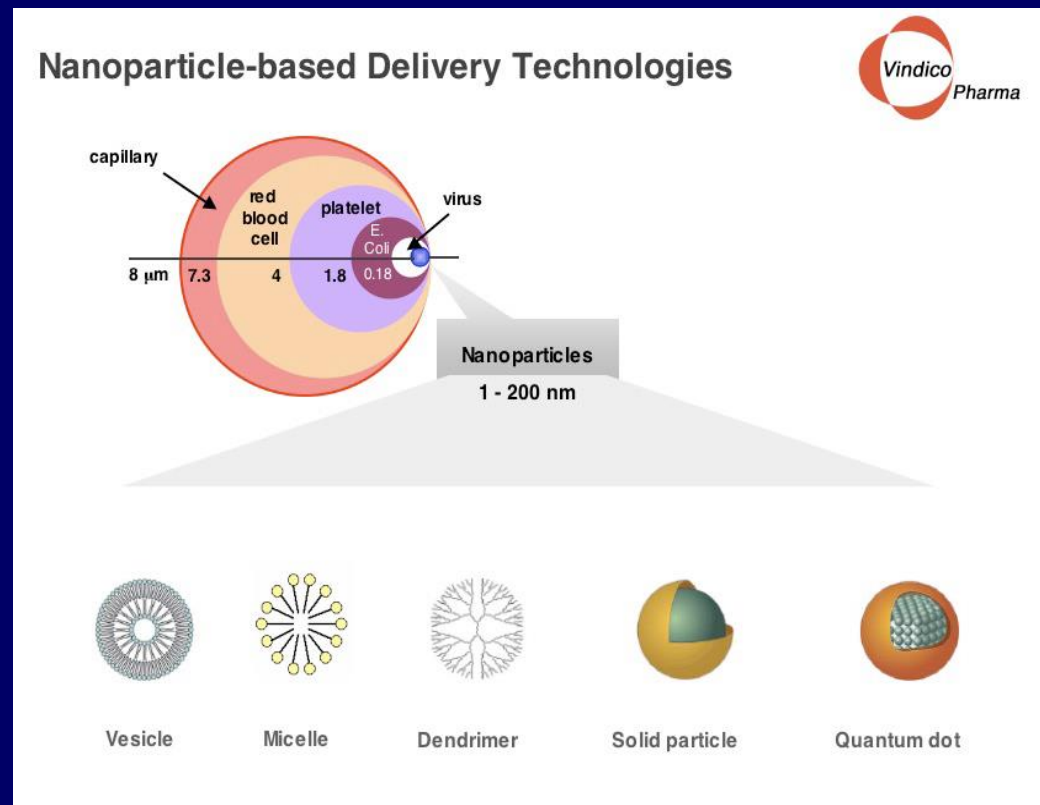
Nuove Terapie: Nanomedicina

Questa scienza mira a fornire un valido insieme di strumenti di ricerca e di dispositivi come:

- nanoparticelle
- micelle
- liposomi
- dendrimeri

Clinicamente utili nella:

- medicina rigenerativa
- imaging cellulare
- gene and drug delivery



Nuove Terapie: Nanomedicina

- **Veicolare i farmaci all'interno dei tessuti oculari**



Attraversamento di barriere tissutali.

- **Accelerare l'assorbimento**



Diminuire le somministrazioni



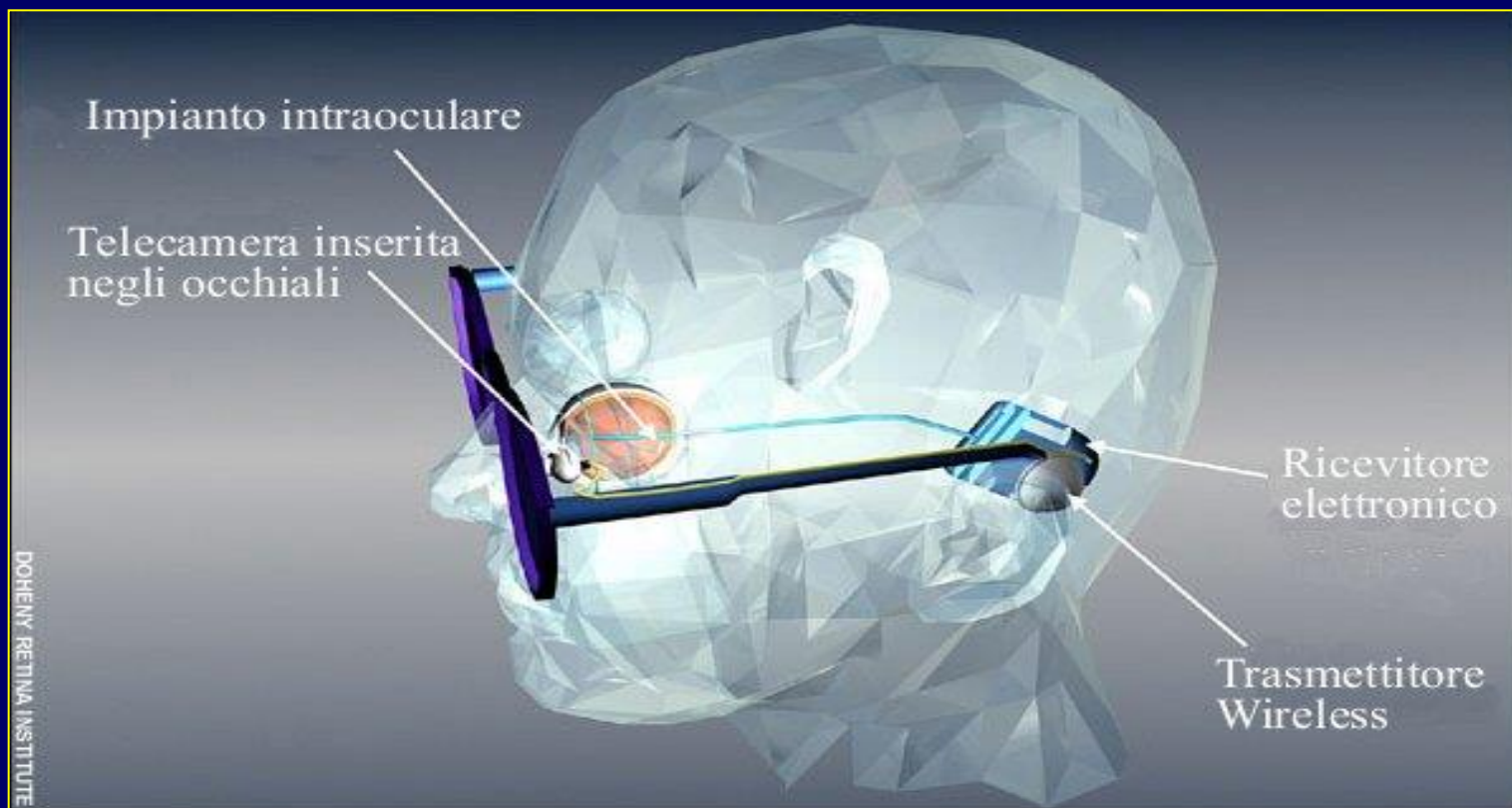
- **Permanenza più elevata del farmaco nel tessuto**

Nuove Terapie: Nanomedicina

- Nanomedicine in Ophthalmology: The New Frontier
American journal of Ophthalmology (2011)
- Nanomedicine therapy to treat neovascular disease in the retina.
Journal of angiogenesis research (2012)
- The potential of nanomedicine therapies to treat neovascular disease in the retina.
Current Opinion in Ophthalmology (2013)

Microchip Retinico

Apparato elettronico ed ottico che consente a chi è non vedente di recuperare parte della visione.



Microchip Retinico

2 TIPI di SISTEMI:

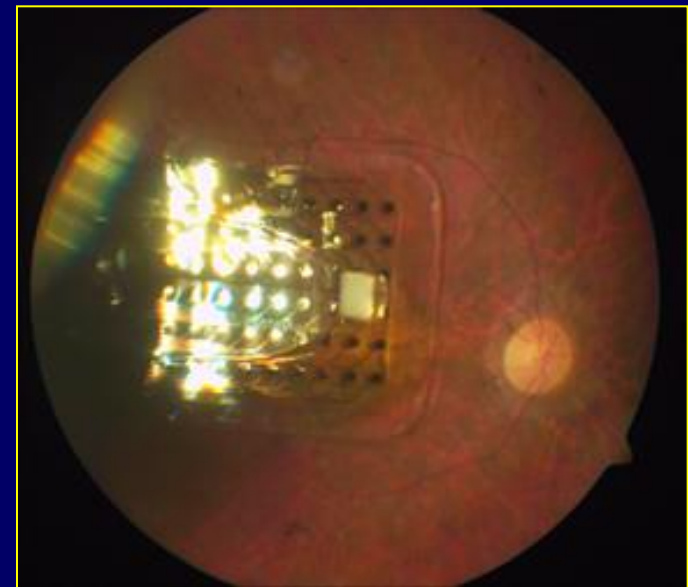
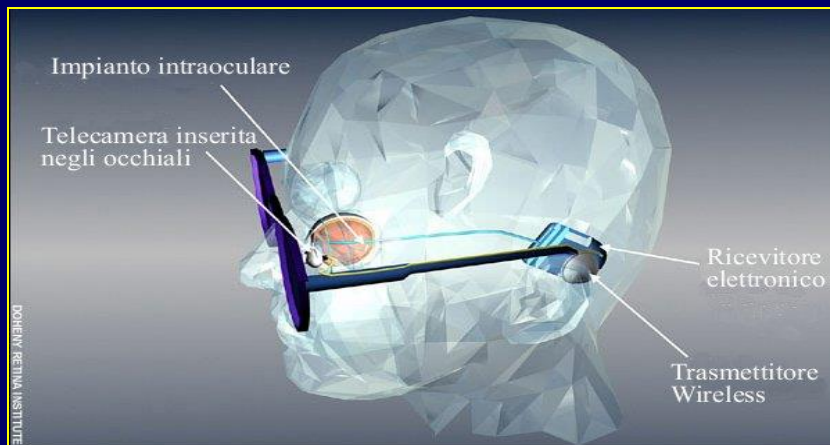
1. IMPIANTO EPIRETINICO

2. IMPIANTO SOTTORETINICO

Microchip retinico

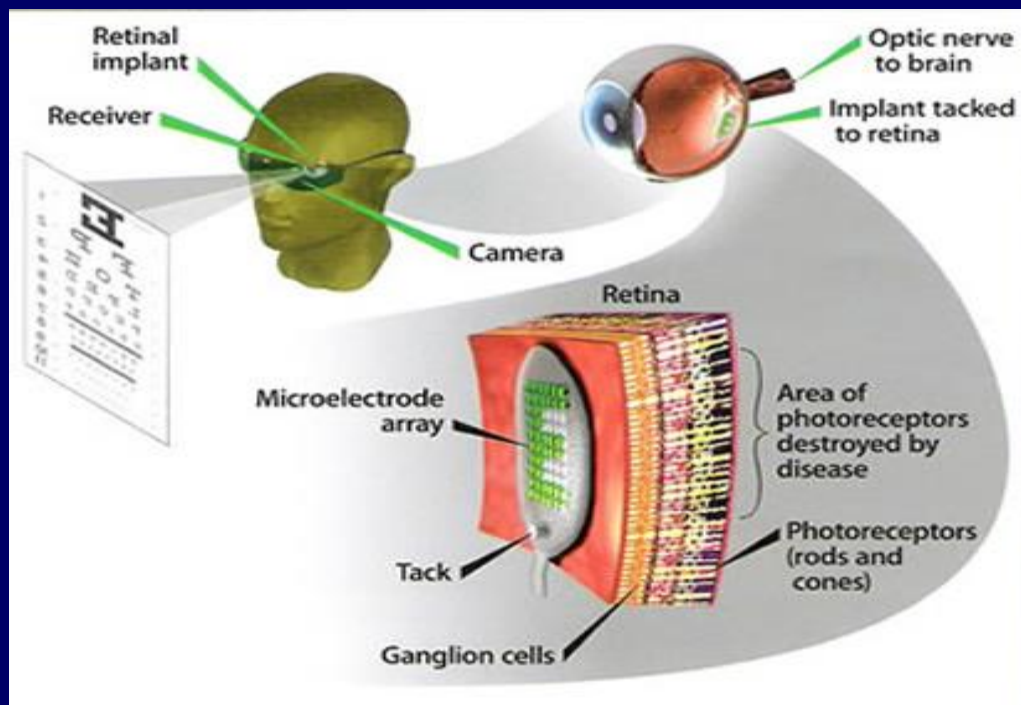
LA COMPOSIZIONE: IMPIANTO EPIRETINICO

- telecamera wireless montata su occhiali
- ricevitore (esterno o collocato nella parte anteriore dell'occhio)
- impianto retinico di un chip con sensori artificiali
- batterie



Microchip retinico

IL FUNZIONAMENTO: IMPIANTO EPIRETINICO



Microchip retinico

IL FUNZIONAMENTO: IMPIANTO EPIRETINICO

- La telecamera montata su occhiali trasmette tramite onde radio ad un dispositivo collocato nella parte anteriore dell'occhio (ricevitore);
- la telecamera invia impulsi elettrici al chip retinico;
- la retina invia impulsi al nervo ottico che permetterà il loro propagarsi fino alla corteccia cerebrale con successiva elaborazione dell'immagine



Microchip retinico

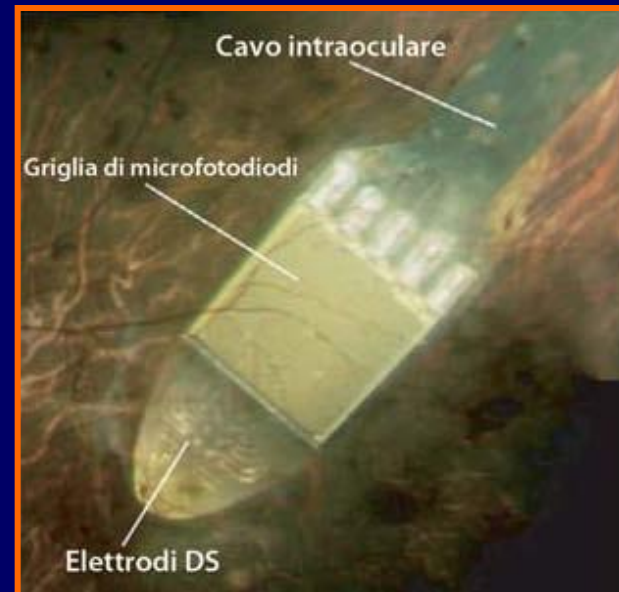
IL FUNZIONAMENTO: IMPIANTO EPIRETINICO



Microchip retinico

LA COMPOSIZIONE: IMPIANTO SOTTORETINICO

- chip collocato sotto la retina;
- alimentatore e trasmettitore/ricevitore esterni
- batterie



Microchip Retinico

IL FUNZIONAMENTO: IMPIANTO SOTTORETINICO

- il microchip sottoretinico invia direttamente l'impulso sensoriale senza la necessità di una telecamera di ricezione
- vantaggio: l'immagine può essere seguita tramite il movimento oculare e non tramite movimenti della testa necessari nel caso di telecamera montata su occhiali.

Microchip Retinico

LA VISIONE:

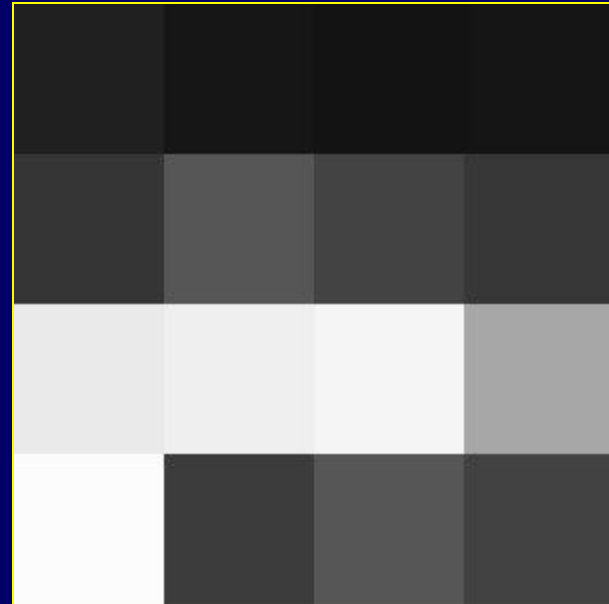
immagini si presentano per flash successivi e sono composte da tanti quadratini (pixel) in diverse tonalità di grigio



Immagine reale

Microchip retinico

LA VISIONE:



Microchip retinico

LA VISIONE:



Microchip retinico

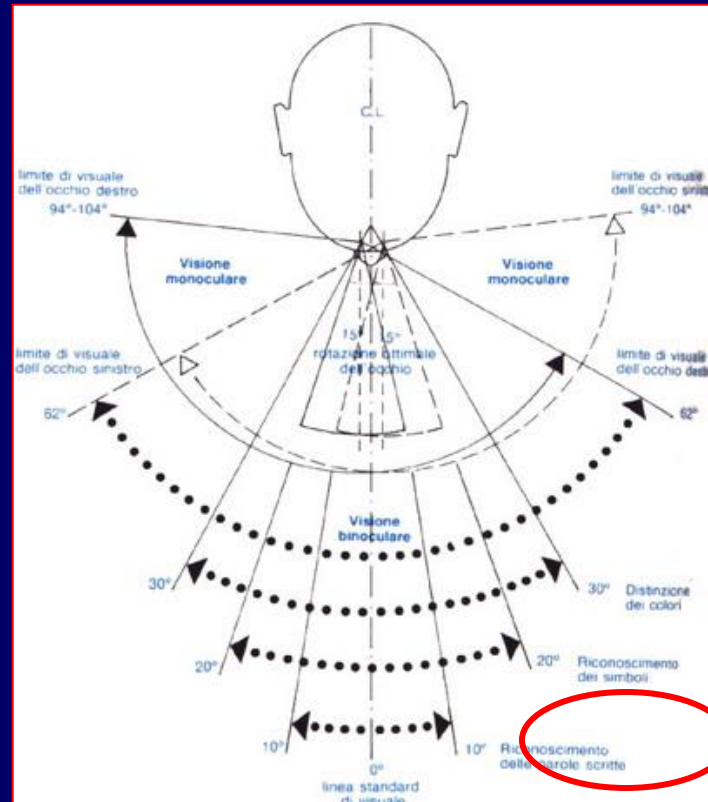
LA VISIONE:



Microchip retinico

IL CAMPO VISIVO:

Campo visivo di $11^\circ \times 11^\circ$



Microchip retinico

Caratteristiche Cliniche

- **necessaria l'integrità del nervo ottico**
- **parziale vitalità delle cellule retiniche**
- **condizioni oculari che non ostacolano l'impianto del chip retinico**

Microchip Retinico

GLI STUDI:

- Studio Argus II: promosso dall'americana Second Sight Medical Products



- Studio Alpha: sostenuto dalla tedesca Retina Implant



Microchip Retinico

STUDIO ARGUS II

- dal 2009: 15 pazienti in USA e 16 pazienti in Europa (Svizzera, Gran Bretagna, Francia).
- Impianto di chip epiretinico con telecamera posizionato su occhiali (64 pixel)
- riacquisita la capacità di muoversi in un ambiente conosciuto, di calpestare una riga bianca su di un pavimento nero, capacità di riconoscere gli oggetti e di individuare i contorni delle figure

Microchip Retinico

STUDIO ALPHA

- dal 2010: centro pilota presso l'Università di Tubinga (Germania), 4 centri Europei partecipano fra cui in Italia l'Università di Pisa (Prof. Stanislao Rizzo)
- impianto di dispositivo sottoretinico (1500 pixel)
- 11 pazienti riconoscono forme chiare da forme scure, 3 di questi pazienti riconoscono gli oggetti

Risultati Pratici

Performance Measurements



Performance Tests

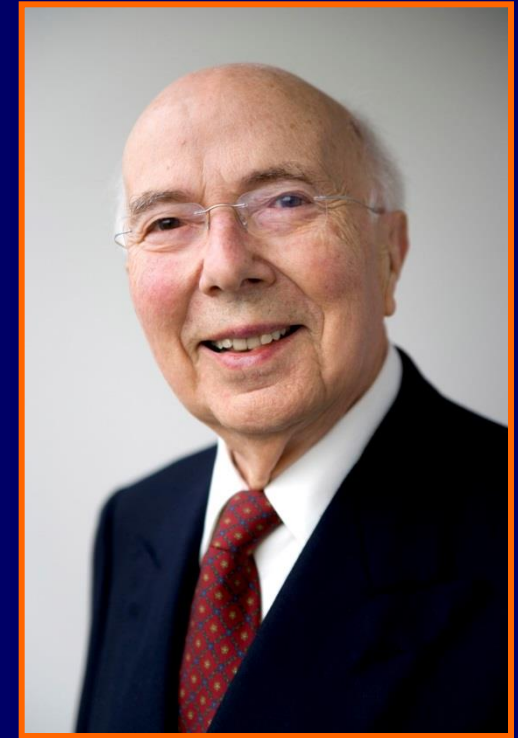
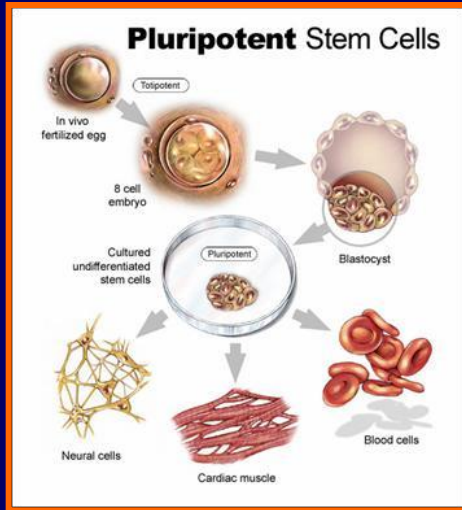


Microchip Retinico

IL FUTURO...

- impianto di dispositivi capaci di fornire una maggiore definizione delle immagini (pixel)
- applicazione di lente a contatto corneale capace di catturare la luce e l'immagine e trasmetterla ad un chip cerebrale, dispositivo bionico USA, in sperimentazione a Napoli e a Bologna.

Cellule Staminali



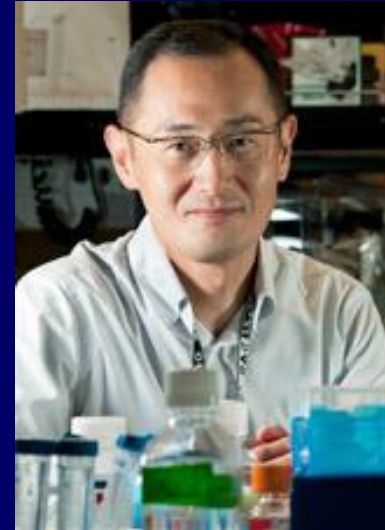
“ Cellule non specializzate, pluripotenti o totipotenti, in grado di dividersi dando origine contemporaneamente ad una cellula staminale (uguale alla cellula madre) ed a una cellula precursore di una progenie cellulare che alla fine darà a sua volta origine a cellule terminalmente differenziate (mature).”

Renato Dulbecco

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012



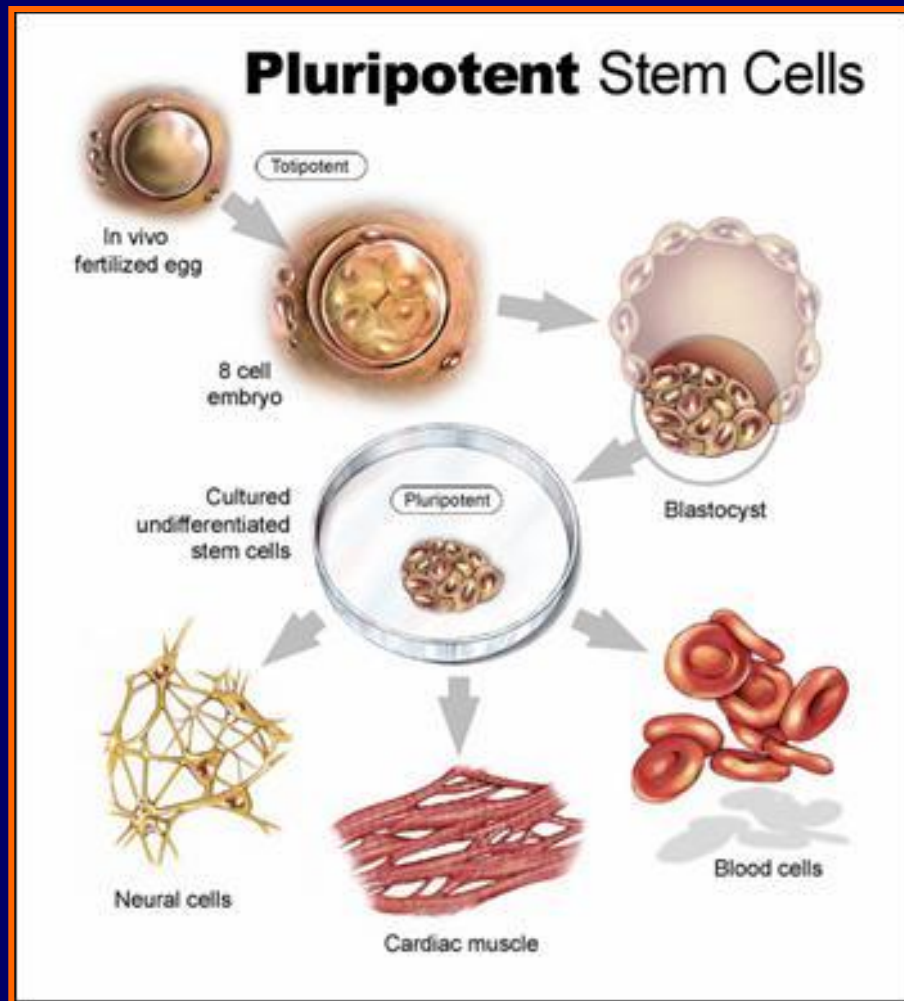
Sir John B. Gurdon,



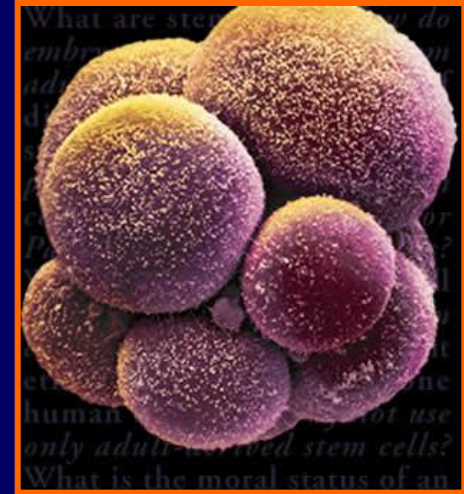
Sir. Shinya Yamanaka

"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"

Cellule Staminali



Cellule Staminali



TIPOLOGIE

- ***embrionali*** (da embrioni entro 5 giorni): totipotenti
- ***germinali embrionali*** (da embrioni di 6 settimane): pluripotenti
- ***del cordone ombelicale o della placenta***: pluripotenti
- ***adulte*** (da midollo osseo, dagli epiteli): pluripotenti

Cellule Staminali

OBIETTIVO:

Sostituire popolazioni cellulari patologiche e non funzionali con cellule staminali capaci di acquisire la specializzazione della linea cellulare alterata.

Utilizzare le cellule staminali in patologie retiniche ereditarie caratterizzate da progressiva perdita delle popolazioni cellulari: retinite pigmentosa, rod cone dystrophy...

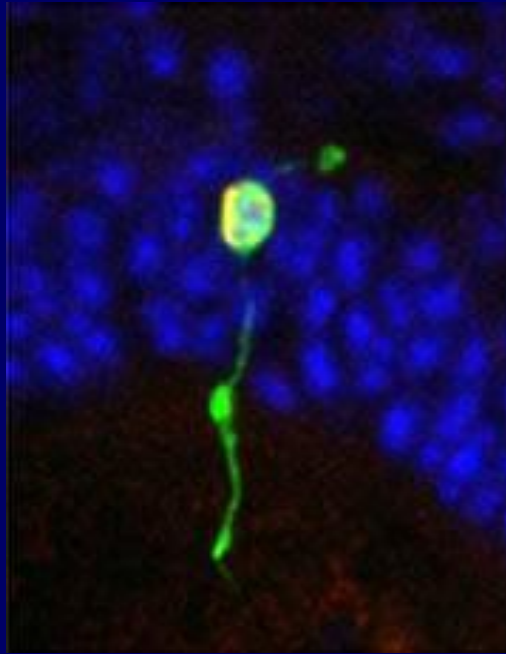
Cellule Staminali

APPLICAZIONI

- Dagli anni '70 sono state impiegate per svariate patologie corneali con ottimi successi.
- Dal 1998 - 1999 primi studi sull'esistenza di cellule staminali retiniche (trapianti di retina di embrione nell'adulto).
- Nel 2004 sono state isolate cellule staminali adulte in grado di differenziarsi in tutti i tipi di cellula retinica.

Nature 2006

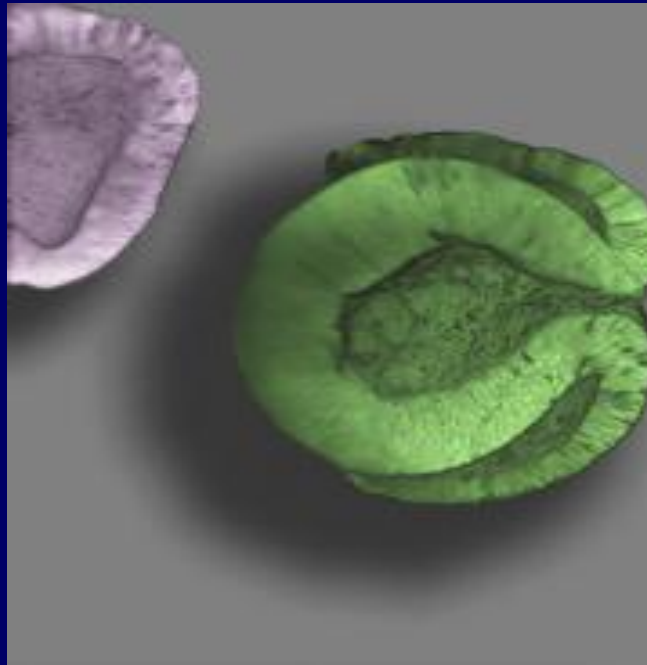
Blind mice see after cell transplant



Nature 2011

Stem cells make 'retina in a dish'

Mouse cells have been coaxed into forming a retina, the most complex tissue yet engineered.



Cellule Staminali

Gli studi

Retina 2011

INTRAVITREAL INJECTION OF AUTOLOGOUS BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELLS FOR HEREDITARY RETINAL DYSTROPHY

A Phase I Trial

RUBENS C. SIQUEIRA, MD, PhD,*† ANDRÉ MESSIAS, MD, PhD,* JULIO C. VOLTARELLI, MD, PhD,‡
INGRID U. SCOTT, MD, MPH,§¶ RODRIGO JORGE, MD, PhD*



Ophthalmology 2012

Stem cell therapy for retinal disease

Michael D. Tibbetts^a, Michael A. Samuel^b, Tom S. Chang^b, and Allen C. Ho^a

Cellule Staminali

I RISULTATI

- spiccata capacità di migrazione, differenziazione e integrazione con il tessuto retinico
- limite delle cellule staminali embrionarie: elevata possibilità di rigetto
- confortanti successi per il trapianto di cellule staminali autologhe

Cellule Staminali

LA VISIONE

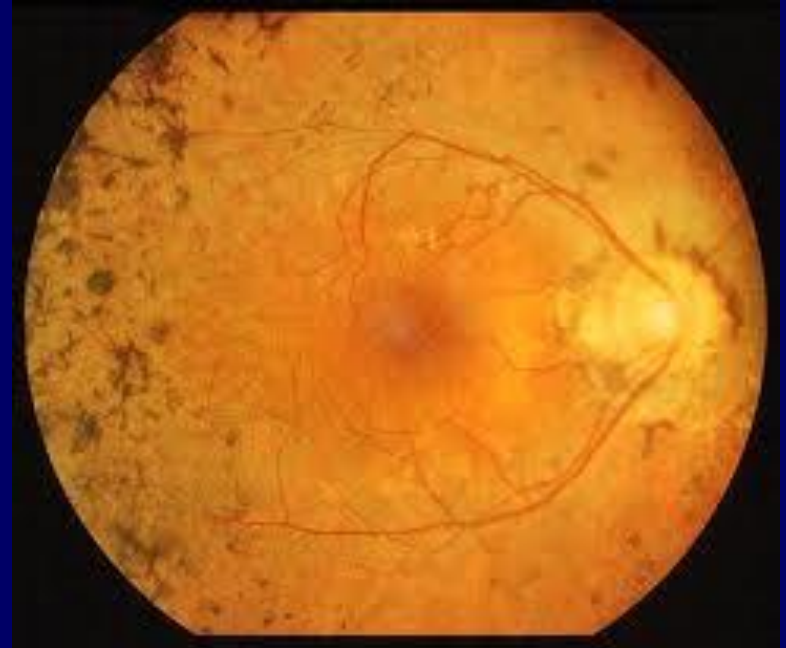
- miglioramento della capacità di distinguere oggetti (contare le dita) a distanze maggiori
- pazienti che presentavano solo capacità di contare le dita hanno acquisito una capacità visiva di 1/10
- miglioramento di 1 riga secondo ETDRS in alcuni dei pazienti sottoposti a trapianto autologo



Cellule Staminali

IL FUTURO...

utilizzo di cellule staminali autologhe per iniezioni intravitreali in patologie retiniche di tipo progressivo non solo a carattere ereditario ma anche di tipo acquisito (atrofie retiniche in miopie elevate, degenerazione maculare legata all'età di tipo atrofico)



Conclusioni

- Importanti evidenze scientifiche circa l'impiego clinico di queste nuove metodiche.
- Risultati clinici modesti, rispetto la grande risonanza mediatica.
- Un impiego su larga scala ancora lontano.
- Necessità di una forte cooperazione tra investimenti pubblici e privati.