



III Convegno Nazionale SITLaB
7 - 8 giugno 2025 - Chieti

SITLaB
Società Scientifica Italiana dei TSLB



Ingegneria tissutale nella Retinopatia Diabetica: un approccio sperimentale a supporto della terapia personalizzata

Faieta S.¹, Pelusi L.², Hurst J.³, Detta N.⁴, Pipino C.⁵, Lamolinara A.⁶, Conte G.⁴, Mastropasqua R.⁶, Allegretti M.⁷, Di Pietrantonio N.⁵, Romeo T.⁷, Palumbo R.⁵, Nubile M.⁸, Guerricchio L.⁹, Bollini S.⁹, Pandolfi A.⁵, Schnichels S.³ e Mandatori D.⁵

¹Dipartimento di Tecnologie Innovative in Medicina e Odontoiatria, Centro Studi e Tecnologie Avanzate (CAST), Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti, Italia. ²Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Centro Studi e Tecnologie Avanzate (CAST), Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti, Italia. ³Clinica Oculistica Universitaria, Centro di Oftalmologia, Università di Tübingen, Tübingen, Germania. ⁴Dompé Farmaceutici SpA, Napoli, Italia. ⁵Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Centro Studi e Tecnologie Avanzate (CAST), Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti, Italia. ⁶Dipartimento di Neuroscienze, Imaging e Scienze Cliniche, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti, Italia. ⁷Dompé Farmaceutici SpA, L'Aquila, Italia. ⁸Clinica Oculistica, Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti, Italia. ⁹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Genova, Genova, Italia.

INTRODUZIONE

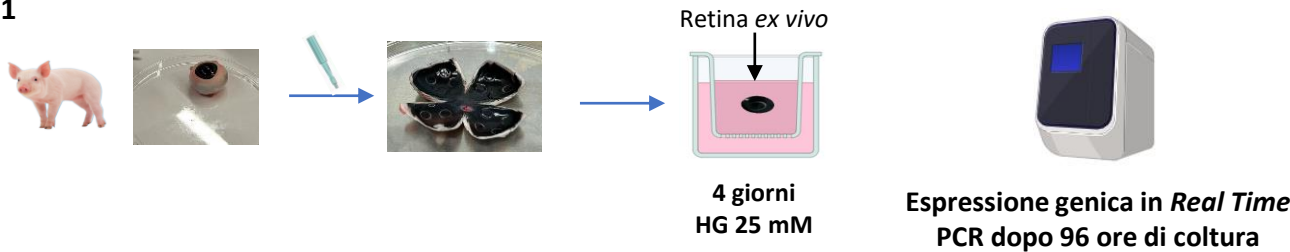
La Retinopatia Diabetica (RD) è una complicanza del Diabete Mellito, caratterizzata da alterazioni vascolari e neurodegenerative che colpiscono le cellule retiniche. A causa della complessità della patologia e dei limiti dei modelli *in vitro* ed *in vivo*, sono stati sviluppati modelli alternativi per studiarne i meccanismi molecolari. Considerando l'aspetto neurodegenerativo della RD, le cellule staminali derivanti dal fluido amniotico (hAFSCs) e il *Nerve Growth Factor* (NGF) rappresentano una strategia terapeutica promettente: le hAFSCs per la loro capacità di rilasciare fattori pro-rigenerativi, e l'NGF per il suo effetto neurotrofico. Per superare le difficoltà legate alla somministrazione di questi fattori, il lenticolo corneale stromale umano (*human corneal lenticule*, hCL), tessuto di scarto ottenuto delle operazioni di chirurgia refrattiva, potrebbe rappresentare un innovativo sistema di *ocular drug delivery*.

OBIETTIVI

1. Sviluppare un modello *ex vivo* di RD utilizzando espianti di neuroretina porcini trattati con alti livelli di glucosio (*High Glucose*, HG);
2. Mettere a punto un protocollo per bioingegnerizzare i hCL decellularizzati (Decell_hCL) con hAFSCs e microparticelle caricate con *recombinant human NGF* (rhNGF-PLGA-MPs);
3. Valutare gli effetti delle hAFSCs e del rhNGF veicolati dai hCL precedentemente bioingegnerizzati sui meccanismi molecolari associati alla RD.

MATERIALI E METODI

1



Gli espianti neuroretinici sono stati ottenuti da occhi di maiale e posizionati sulla membrana porosa di una transwell. Per mimare la RD, gli espianti retinici sono stati esposti all'HG per 4 giorni ed in seguito è stata effettuata una Real Time PCR (RT - PCR).

2



I hCLs sono stati decellularizzati con sodium dodecyl sulfate (SDS, 0,1%) e successivamente bioingegnerizzati con hAFSCs e/o con rhNGF-PLGA-MPs. Sono state eseguite analisi di immunofluorescenza (IF) e microscopia elettronica a scansione (SEM) per confermare il processo di bioingegnerizzazione dei hCLs.

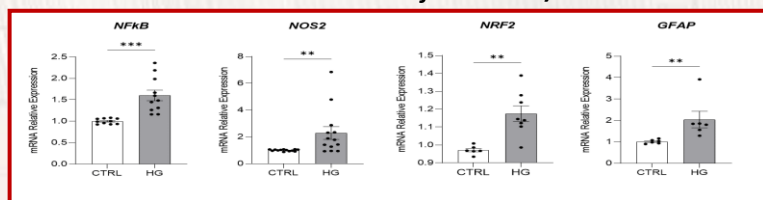
3



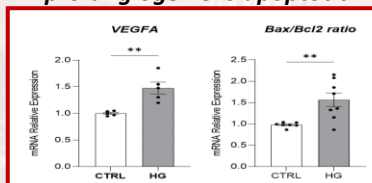
Per valutare gli effetti delle hAFSCs e del rhNGF sui meccanismi molecolari della RD, i hCLs bioingegnerizzati (BioE_hCL) sono stati co-cultivati con espianti neuroretinici trattati con HG e, dopo quattro giorni, sono stati eseguiti esperimenti di RT-PCR.

1. Espressione genica in HG

Aumento dei marker infiammatori/ossidativi



Aumento dei marker pro-angiogenici e apoptotici



Diminuzione dei marker retinici

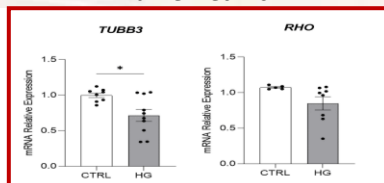


Figura 1. Livelli di mRNA di marcatori infiammatori, ossidativi, pro-angiogenici, apoptotici e retinici in espianti neuroretinici porcini coltivati per 4 giorni in presenza o assenza di HG (25 mM).

2. Valutazione in IF e al SEM dei BioE_hCL

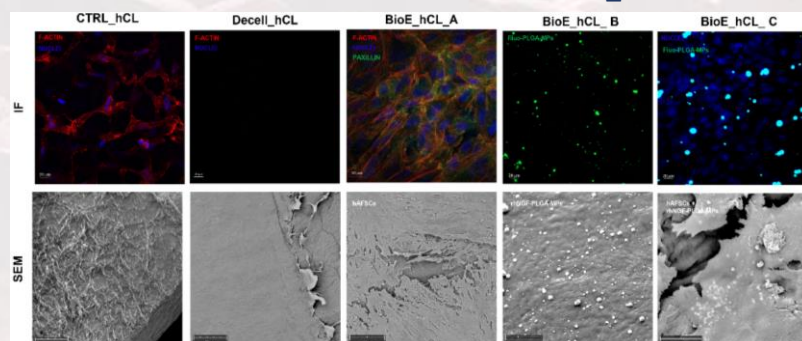
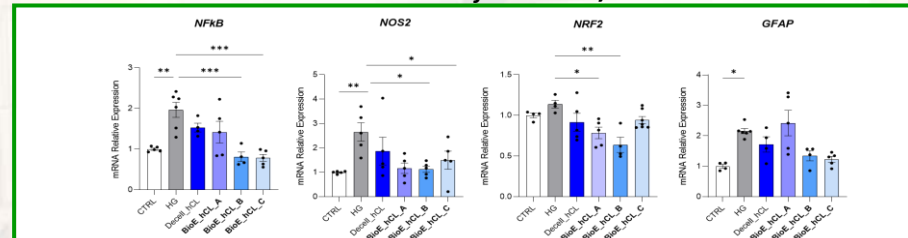


Figura 2. Decell_hCL ricellularizzato con hAFSCs (BioE_hCL_A), bioingegnerizzato con rhNGF-PLGA-MPs (BioE_hCL_B), e con entrambi (BioE_hCL_C).

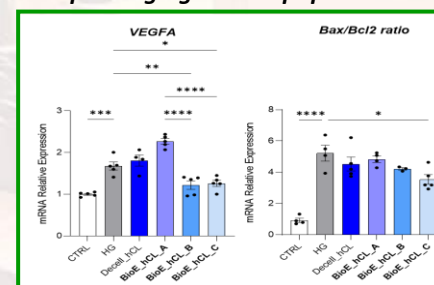
RISULTATI

3. Espressione genica in HG dopo co – coltura con i BioE_hCL

Diminuzione dei marker infiammatori/ossidativi



Diminuzione dei marker pro-angiogenici e apoptotici



Aumento dei marker retinici

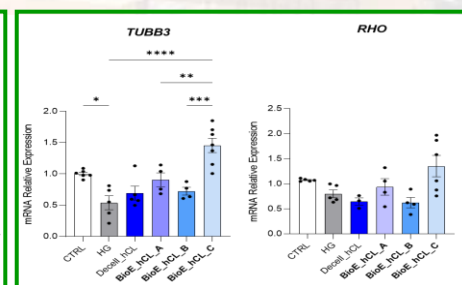


Figura 3. Livelli di mRNA di marcatori infiammatori, ossidativi, pro-angiogenici, apoptotici e retinici in espianti neuroretinici porcini trattati con HG e co-cultivati con ciascuno dei tre BioE_hCLs.

CONCLUSIONI

In conclusione, i dati dimostrano come il trattamento delle retine porcine con HG ha permesso di riprodurre ex vivo il microambiente caratteristico della RD. Inoltre, è stata dimostrata la possibilità di effettuare una doppia bioingegnerizzazione dei hCLs con le hAFSCs e il rhNGF, i quali vengono rilasciati modulando i meccanismi molecolari implicati nella RD.

REFERENZE

doi: 10.3389/fendo.2024.1462043; doi: 10.3389/fbioe.2022.887414.