



Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca

Spese sostenute <sup>2</sup>

PROGETTO DI RICERCA FINANZIATO CON I CONTRIBUTI DEL 5 PER MILLE

“La membrana amniotica come scaffold per nuovi medicinali di terapia avanzata”

Viste le innumerevoli proprietà che rendono la Membrana Amniotica uno dei tessuti più richiesti alle banche dei tessuti, l'obiettivo del presente progetto di ricerca è di valutare nuovi protocolli di crioconservazione e di sviluppare nuove strategie per un suo utilizzo come scaffold per la crescita di cellule staminali provenienti dall'epitelio congiuntivale e/o dall'epitelio retinico. Se promettenti, tali Advanced Therapy Medicinal Products verrebbero in seguito usati in protocolli di terapia cellulare per il trattamento di patologie che affliggono la congiuntiva e la retina.

Tale attività rientra tra gli scopi di Fondazione Banca degli Occhi del Veneto Onlus tra i quali vi è la promozione e lo svolgimento di attività di ricerca in ambito oculare.

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
<b>DI FUNZIONAMENTO</b>		
<b>Risorse umane</b> <i>Dettaglio spese:</i> 1. n. 3 ricercatori senior (Ore dedicate * CMO) 2. ...	12.180,47	5.273,78
<b>Acquisto beni e servizi</b> <i>Dettaglio spese:</i> 1. Materiali per ricerca e sviluppo (i costi sono comprensivi della quota pro rata dell'Iva) 2. ...	6.292,25	6.292,25
<b>ALTRE VOCI DI SPESA <sup>3</sup></b>		
<i>Dettaglio spese:</i> 1. Formazione e aggiornamento (partecipazione a InnovaBiomed 2021 – Centro Congressi Pala Expo VR) 2. Analisi Citologiche – Istologiche	144,90 1.554,42	144,90 1.554,42
<b>ACCANTONAMENTI PROGETTI PLURIENNALI <sup>4</sup></b>		

<sup>2</sup> Evidenziare la loro riconduzione alle finalità ed agli scopi istituzionali del soggetto beneficiario.

<sup>3</sup> Altre voci di spesa comunque destinate ad attività direttamente riconducibili alle finalità e agli istituzionali del soggetto beneficiario.

<sup>4</sup> Eventuali accantonamenti delle somme percepite per la realizzazione di progetti pluriennali, con durata massima triennale, fermo restando l'obbligo di rendicontazione successive al loro utilizzo.



**Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca**

**Rendiconto di spesa fondi 5 per mille  
Enti della Ricerca Scientifica  
ANNO FINANZIARIO 2018<sup>1</sup>**

**Ente beneficiario**

Denominazione sociale	<b>FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI DEL VENETO ONLUS</b>
Codice fiscale	<b>02320670272</b>
Sede legale	<b>VIA PACCAGNELLA 11 – 30174 ZELARINO VENEZIA</b>
Indirizzo posta elettronica (NO PEC)	<b>amm@fbov.it</b>
Scopo dell'attività sociale	<b>a) sensibilizzazione della pubblica opinione sull'alto valore morale e sociale dell'atto di donazione delle cornee a scopo di trapianto; b) promozione, sviluppo e organizzazione delle attività di prelievo e innesto di cornee, in attuazione di quanto previsto dall'art.4 della Legge 12 agosto 1933 n. 301 anche mediante intese tecnico - scientifiche con altri Enti e Istituti; c) raccolta, esame, selezione, conservazione delle cornee, eventuale trattamento e distribuzione delle stesse ad Ospedali e Enti autorizzati agli innesti corneali, con preferenza per quelli della Regione Veneto; d) elaborazione e messa a disposizione di Enti e Istituti autorizzati dei dati clinici acquisiti; e) promozione della ricerca e degli studi nel campo della chirurgia corneale, anche in collaborazione con Istituti Universitari e ULSS.</b>
Nominativo legale rappresentante	<b>Dott. GIUSEPPE DI FALCO</b>

**Contributo percepito**

Data percezione	<b>9 DICEMBRE 2020</b>
Importo	<b>13.265,35</b>

<sup>1</sup> Indicare l'anno finanziario al quale si riferisce l'erogazione.



Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca

Dettaglio spese: 1. ... 2. ...		
<b>TOTALE</b>	<b>20.172,04</b>	<b>13.265,35</b>

Il seguente rendiconto è pubblicato al seguente indirizzo web

<https://www.fbov.org/rendicontazione-5permille>

Zelarino, 23 novembre 2021

  
Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs.196/2003 e al Regolamento (UE) 2016/679 (GDPR).

  
Il Legale Rappresentante



**Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca**

**Relazione scientifica  
Fondi 5 per mille ANNO 2018  
Enti della Ricerca Scientifica**

**“La membrana amniotica come scaffold per nuovi medicinali di terapia avanzata**

**Introduzione e scopi del progetto finanziato**

La membrana amniotica (MA) costituisce lo strato più interno della porzione fetale della placenta che si sviluppa dal 7° giorno di gestazione dall'ectoderma. La sua funzione consiste nella protezione del prodotto del concepimento durante la gravidanza. Istologicamente è caratterizzata da uno spessore variabile tra 0.02 e 0.50 mm ed è costituita da tre strati. Tra le proprietà fondamentali della MA si annoverano attività quali: (1) riepitelizzante, (2) anti fibrotica, (3) anti angiogenica, (4) antinfiammatoria e (5) antimicrobica. Tali caratteristiche rendono la MA interessante in diverse tipologie di applicazioni chirurgiche, incluso il trattamento dei disordini della superficie oculare. In oftalmologia la MA viene infatti applicata con le seguenti modalità:

- come graft, con l'epitelio rivolto verso l'alto che, sfruttando il fenomeno di integrazione, favorisce la ricostruzione della superficie oculare corneale e congiuntivale dell'ospite;
- come patch, con l'epitelio rivolto verso il basso, intrappolando le cellule flogistiche dell'ospite mediante lo stroma e rilasciando alcune delle sostanze responsabili delle sue peculiari proprietà (come bendaggio oculare protettivo con attività antiinfiammatoria e, quindi, antidolorifica in affezioni acute/croniche).

In virtù di queste caratteristiche, la MA è uno dei tessuti più richiesti alle banche degli occhi/tessuti. Nel solo 2019, la Fondazione Banca degli Occhi del Veneto ha distribuito 608 porzioni di MA ad ospedali italiani per il trattamento chirurgico di pazienti.

Viste le sue proprietà, molti gruppi di ricerca hanno sviluppato metodiche per l'utilizzo della MA sia come collirio, sia come scaffold per medicinali di terapie avanzate. Scopo del presente progetto è pertanto, di caratterizzare e valutare l'idoneità della MA per la crescita di:

- cellule staminali provenienti dall'epitelio congiuntivale (**WP2**);
- cellule dell'epitelio retinico pigmentato (**WP3**)

con il fine di valutarne il potenziale come scaffold per la crescita cellulare e il loro utilizzo in protocolli di terapia cellulare per il trattamento di patologie che affliggono la congiuntiva (quali lo pterigio) e la retina (quali la degenerazione maculare senile). Prima di questo, però, verranno valutati nuovi protocolli di conservazione della MA per l'utilizzo in chirurgia oculare (**WP1**).



**Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca**

**Risultati**

In letteratura è stato riportato come la funzionalità della MA sia strettamente correlata alla sua struttura. Inoltre, essendo la MA utilizzata come bendaggio oculare protettivo, è essenziale che il tessuto mantenga una certa capacità adesiva così da garantirne l'applicazione sulla superficie oculare. Alla luce di ciò, la prima fase del progetto (**WP1**) si è posta come obiettivo quello di ricercare nuovi metodi di conservazione paragonabili al protocollo di riferimento (DMSO a  $-160^{\circ}\text{C}$ ) che non alterassero le proprietà della membrana. Come indicato nella **Tabella 1**, le condizioni di conservazione valutate sono state le seguenti:

- DMSO  $-160^{\circ}\text{C}$  (condizione standard di riferimento)
- DMSO  $-80^{\circ}\text{C}$
- Terreno con destrano a  $-160^{\circ}\text{C}$
- Terreno con destrano a  $-80^{\circ}\text{C}$
- A secco  $-80^{\circ}\text{C}$  (senza alcun terreno di conservazione)

**Tabella 1:** Condizioni di criopreservazione

Condizione	Medium	Temperatura
A	DMSO	$-160^{\circ}\text{C}$
B	DMSO	$-80^{\circ}\text{C}$
C	Destrano	$-160^{\circ}\text{C}$
D	Destrano	$-80^{\circ}\text{C}$
E	A secco (Dry)	$-80^{\circ}\text{C}$

Patch di MA sono stati conservati per 4 mesi nelle condizioni sopra elencate. Al termine di questo periodo di conservazione sono state eseguite le analisi per valutare le proprietà adesive e la struttura della membrana. Mediante lo sticky test è stata valutata la capacità adesiva dello strato stromale. Le membrane sono state rimosse dal supporto in nitrocellulosa e con un tampone sterile sono stati testati sia il lato stromale che quello epiteliale. Per quantificare il livello di adesività è stato calcolato il tempo nel quale le membrane sono rimaste adese al tampone. Come atteso, il lato epiteliale non ha mai presentato adesività in nessuno dei campioni. Contrariamente il lato stromale della MA ha sempre mantenuto la sua adesività in tutte le condizioni di conservazione (**Tabella 2**).



**Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca**

<b>Condizione</b>	<b>Lato epiteliale</b>	<b>Lato stromale</b>
<b>DMSO @ -160°C</b>	-	+++
<b>DMSO @ -80°C</b>	-	+++
<b>Destrano @ -160°C</b>	-	+++
<b>Destrano @ -80°C</b>	-	+++
<b>Dry @ -80°C</b>	-	+++

Successivamente sono state condotte delle analisi sulla struttura della membrana mediante tre differenti colorazioni istologiche: Ematossilina-Eosina (EE), reattivo di Schiff (PAS) e tricromica di Masson (MST). Le tre diverse colorazioni permettono di evidenziare tutte le strutture della membrana amniotica, tra cui epitelio, membrana basale e strato stromale (**Figura 1**). In tutte e tre le analisi istologiche è stata evidenziata una macrostruttura regolare e simile tra tutte le condizioni di conservazione. L'epitelio non presenta alterazioni e mantiene sempre la sua fisiologica disposizione monostratificata. Lo strato stromale, nonostante si presenti con uno spessore variabile (dovuta alla differenza tra donatrici), non ha risentito delle diverse condizioni di conservazione. Con la colorazione PAS (tecnica del reattivo di Schiff) è stato inoltre possibile marcare la struttura della membrana basale sottostante l'epitelio. Quest'ultima appare sempre come una linea continua regolare e intatta.

Lo stesso risultato è stato poi confermato dall'immunofluorescenza dei due principali marcatori proteici della membrana basale, laminina 5 e collagene di tipo IV (**Figura 2**). Anche in questo caso, l'analisi dell'espressione delle due proteine ha evidenziato una membrana basale intatta e senza alterazioni strutturali.

Attualmente la Fondazione Banca degli Occhi del Veneto è impegnata nella distribuzione di membrane amniotiche ad uso oculistico conservate con un protocollo che prevede l'impiego del criocconservante DMSO e alla temperatura di -160°C. Nonostante gli ottimi risultati clinici dell'applicazione delle membrane conservate con tale protocollo, la prima parte di questo studio (**WP1**) si è concentrata nella ricerca di nuovi metodi di conservazione che potessero migliorare le condizioni di stoccaggio della membrana senza alterarne le proprietà. Nel 2017 una nuova direttiva europea ha sconsigliato l'utilizzato del DMSO come crioprotettore a causa della sua tossicità, spingendo ulteriormente verso l'utilizzo di protocolli alternativi. Come sostituto del DMSO è stato



**Ministero dell'Università e della Ricerca**  
**Direzione Generale della Ricerca**

valutato il destrano. Il suo impiego nella conservazione dei tessuti corneali è ampiamente documentato in letteratura. Dato il suo ruolo fondamentale anche durante la fase di trasporto del tessuto corneale, l'utilizzo del destrano potrebbe semplificare il protocollo di conservazione riducendo il rischio di potenziali contaminazioni. Gli stessi vantaggi verrebbero ottenuti anche nella condizione di conservazione a secco. In questo caso inoltre, non solo sarebbe possibile ridurre il rischio di contaminazione microbiologica, ma tale protocollo avrebbe anche un impatto sull'economia dell'intero processo di conservazione riducendone i costi. Oltre ai due mezzi di crioconservazione è stata valutata anche una temperatura più alta di  $-80^{\circ}\text{C}$ . La sostituzione del sistema di congelamento ad azoto liquido con questa nuova temperatura potrebbe ridurre ulteriormente i costi per la fase di stoccaggio e rendere più semplice e accessibile tale pratica anche a quelle realtà che non dispongono dell'azoto liquido.

Riassumendo dunque, gli studi del **WP1** hanno evidenziato che:

- Il sistema di congelamento dell'azoto liquido può essere facilmente sostituito con la conservazione a  $-80^{\circ}\text{C}$  senza effetti sulla membrana amniotica;
- Il DMSO non è essenziale per la conservazione dei tessuti e può essere sostituito da terreno a base di destrano o dalla condizione a secco;
- L'utilizzo di un terreno a base di destrano o della condizione a secco ridurrebbe il rischio di contaminazione provenienti da manipolazioni aggiuntive della membrana.

Se da una parte i risultati ottenuti hanno dimostrato che i nuovi protocolli di conservazione non alterano le proprietà della membrana, sarà necessaria anche una valutazione clinica dell'efficacia e della sicurezza di questi nuovi metodi di "tissue banking". Non è possibile infatti, escludere che la conservazione possa in qualche modo influenzare le proprietà meccaniche ed elastiche della membrana. Il nuovo terreno a base di destrano e la condizione a secco potrebbero infatti provocare rispettivamente un inspessimento o un assottigliamento della membrana, rendendola troppo rigida o troppo lassa e complicando l'applicazione chirurgica.

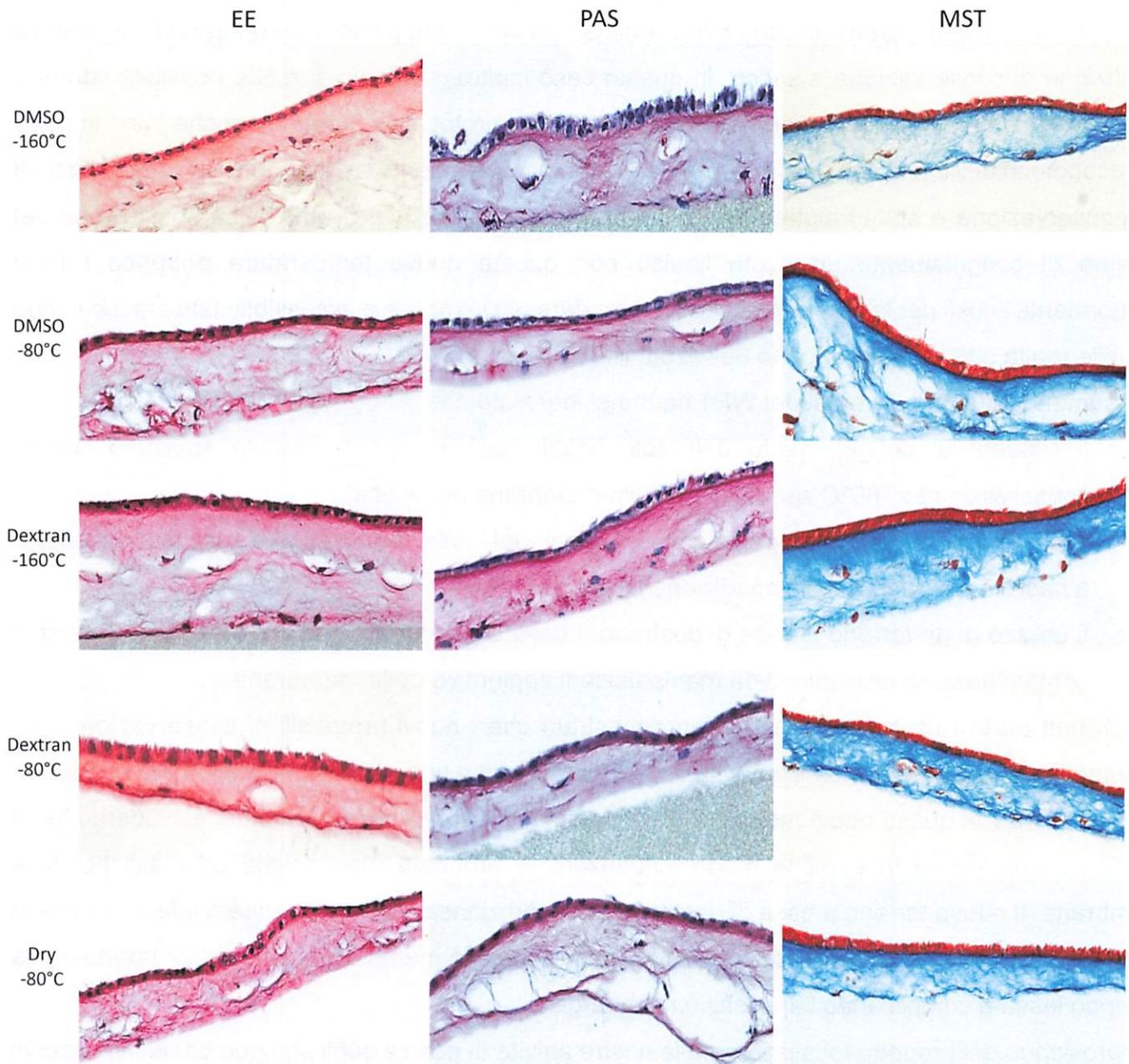
Nel prosieguo del progetto focalizzeremo le nostre attività di ricerca sugli altri due obiettivi descritti in **WP2** e **WP3**.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'G' followed by a flourish.



Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca

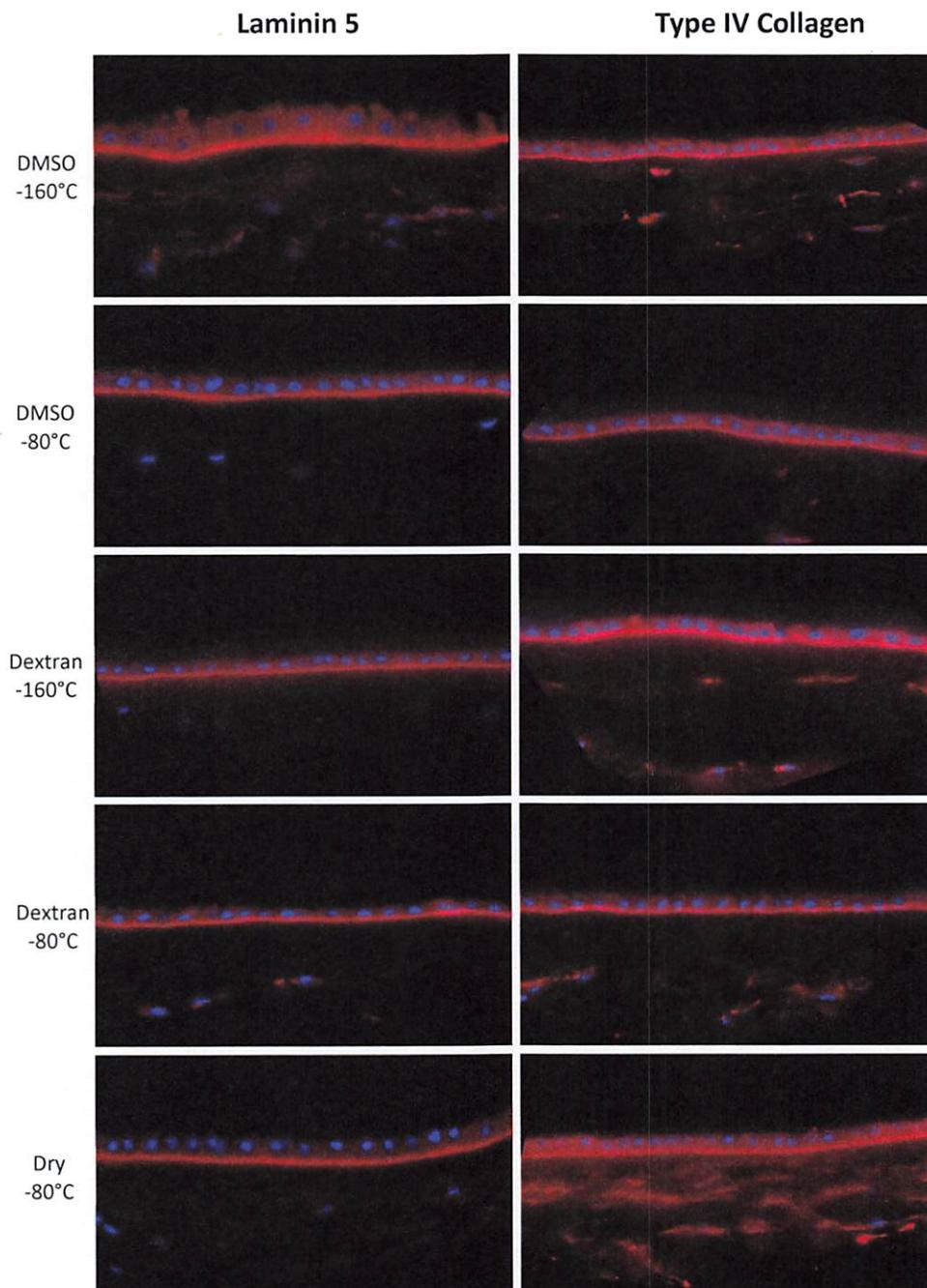
**Figura 1:** Analisi istologica con colorazioni ematossilina-eosina (EE), reattivo di Schiff (PAS) e colorazione tricromica di Masson (MST)





Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca

**Figura 2:** Analisi mediante immunofluorescenza dell'espressione di laminina 5 e collagene di tipo 4 nelle MA conservate nelle diverse condizioni di crioconservazione.



NOTA: Il progetto è finanziato anche dai fondi 5xMille 2018 per gli Enti della Ricerca Sanitaria (Ministero della Salute 2018 – contributo pari ad € 127.512,23=).