



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2018  
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente: **Fondazione Banca degli Occhi del Veneto Onlus**

Codice fiscale: **02320670272**

Sede legale: **Via Paccagnella 11, 30174 Zelarino (Venezia)**

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: [fbov@pec.fbov.it](mailto:fbov@pec.fbov.it)

Dati del rappresentante legale: **dott. Giuseppe Di Falco** – Presidente del Consiglio di Amministrazione, nato il 20 ottobre 1948 a Vittoria (RG).

C. F. DFLGPP48R20M088E

**Titolo del progetto:** 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) antifibrotica, (3) antiangiogenica, (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**)

SF

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**).

## RISULTATI

### **WP1: Messa a punto di protocolli di conservazione della MA per la chirurgia oculare**

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
<b>A</b>	DMSO	$-160^{\circ}\text{C}$
<b>B</b>	DMSO	$-80^{\circ}\text{C}$
<b>C</b>	Destrano	$-160^{\circ}\text{C}$
<b>D</b>	Destrano	$-80^{\circ}\text{C}$
<b>E</b>	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**).

Condizione	Lato epiteliale	Lato stromale
<b>DMSO @ <math>-160^{\circ}\text{C}</math></b>	-	+++
<b>DMSO @ <math>-80^{\circ}\text{C}</math></b>	-	+++
<b>Destrano @ <math>-160^{\circ}\text{C}</math></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 crioconservante 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 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°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°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.

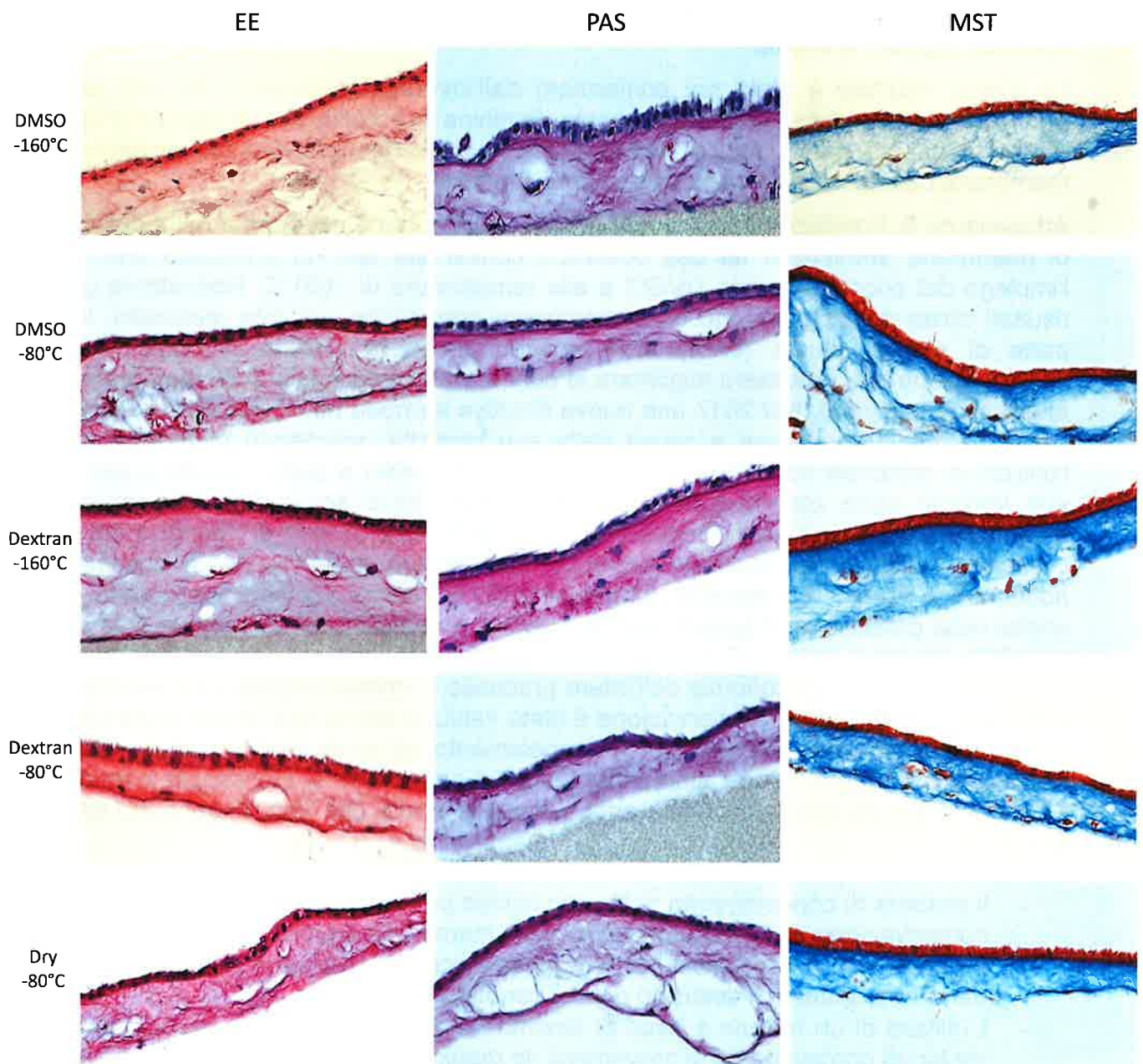
Se da una parte i risultati ottenuti hanno dimostrato che i nuovi protocolli di conservazione non alterano le proprietà della membrana, sarà necessaria anche una valutazione clinica dell'efficacia e della sicurezza di questi nuovi metodi di "*tissue banking*". Non è possibile infatti escludere che la 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 ispessimento o un assottigliamento della membrana, rendendola troppo rigida o troppo lassa e complicando l'applicazione chirurgica.

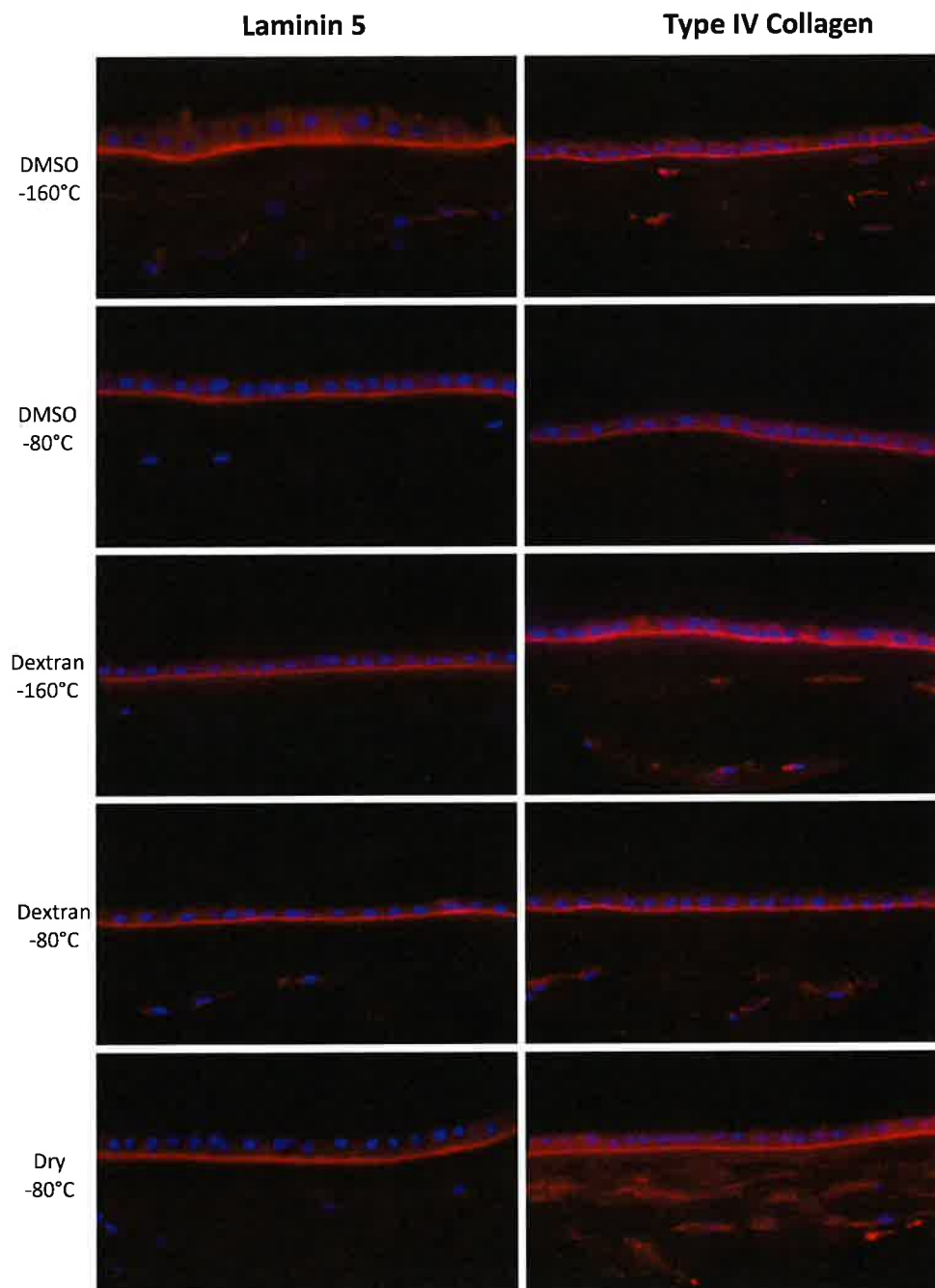
I dati dei risultati del WP1 sono da poco stati pubblicati sulla rivista *Cell and Tissue Banking* (articolo accettato il 9 marzo 2022):

**Lamon M, Bertolin M, Trojan D, Spagnol L, Donisi PM, Camposampiero D, Ponzin D, Ferrari S.** Cryopreservation of human amniotic membrane for ocular surface reconstruction: a comparison between protocols. *Cell and Tissue Banking* 2022; *in press*.

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



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



**WP2: Utilizzo della MA come scaffold per la rigenerazione dell'epitelio congiuntivale**

Ogni anno più di 100.000 pazienti nel mondo sviluppano gravi disturbi della superficie oculare, ed in particolare della congiuntiva. Lo pterigio è una crescita anomala di tessuto appartenente alla congiuntiva (la membrana che ricopre il bulbo oculare e la parte interna delle palpebre) sulla cornea. La malattia non regredisce spontaneamente, anzi, il tessuto tende a continuare a crescere invadendo la cornea e limitando, così, la visione. Questo disturbo colpisce circa il 10% della popolazione e la prevalenza è associata principalmente ad età avanzata, latitudine geografica più elevata, sesso maschile e attività all'aperto prolungate (è la cosiddetta "malattia dei pescatori").

I trattamenti convenzionali utilizzati per risolvere o limitare questo disturbo includono diverse tecniche come innesto congiuntivale autologo, applicazione della membrana

amniotica umana come bendaggio biologico e la combinazione di entrambi gli approcci. Tuttavia, sono stati segnalati diversi svantaggi, quali elevate percentuali di recidive e limitata disponibilità di tessuto congiuntivale del donatore che limita a ripetere la procedura in caso di recidiva. L'ingegneria tissutale e la terapia cellulare potrebbero teoricamente rappresentare una valida alternativa a questi approcci convenzionali; tuttavia, gli standard GMP e gli alti costi richiesti per la produzione non rendono ancora questa applicazione disponibile. Questi presupposti stanno portando gli scienziati a sviluppare nuove strategie per il trattamento dello pterigio, puntando su approcci semplici di facile applicazione ed in grado di ridurre le percentuali di ricorrenze rispetto agli approcci convenzionali.

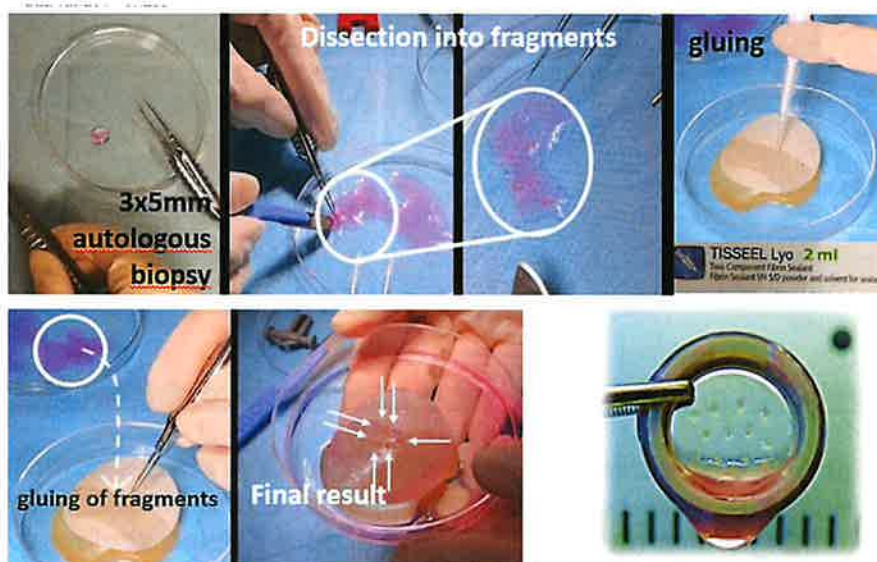
Il **WP2** ambisce a sviluppare una nuova tecnologia basata appunto su questi presupposti. Il lavoro ha visto la sinergia tra Fondazione Banca degli Occhi del Veneto (e la sua esperienza in termini di cultura epiteliale congiuntivale) e la Clinica Oculistica dell'Università di Verona. Questa nuova tecnologia, (che abbiamo chiamato SCET, acronimo di *simple conjunctival epithelial transplantation*) si basa su l'espansione in vivo dell'epitelio congiuntivale funzionale ottenuto da piccoli frammenti di tessuto congiuntivale fatti aderire sulla membrana amniotica dopo l'escissione dello pterigio durante l'intervento chirurgico.

Lo studio ha previsto due fasi:

- # la validazione in vitro della tecnica;
- # risultati dell'applicazione clinica in 6 pazienti tutti affetti da pterigio primario.

La validazione in vitro e l'applicazione clinica (SCET) hanno previsto tre step operativi (**Figura 3**):

- raccolta di una piccola biopsia congiuntivale sana di circa 3\*5 mm<sup>2</sup>,
- dissezione in 5-10 frammenti più piccoli,
- adesione dei frammenti sulla membrana amniotica mediante pochi microlitri di colla Tisseel di fibrina.

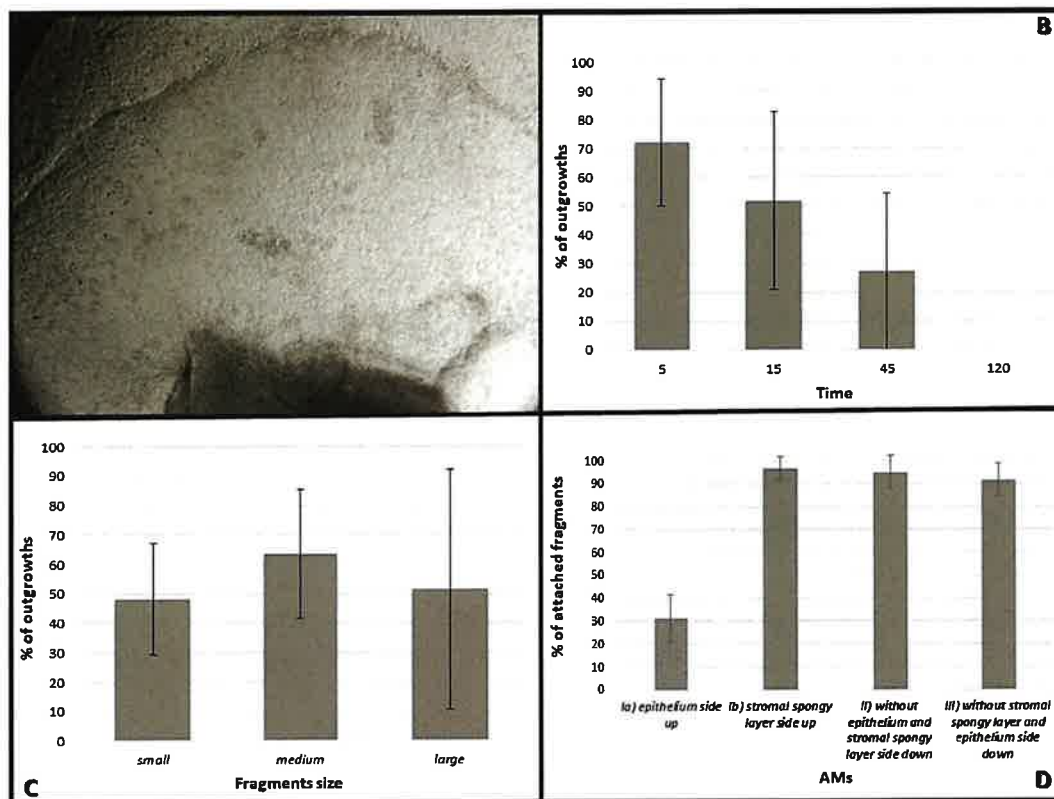


**Figura 3**

I due tessuti così combinati (membrana amniotica precaricata con i frammenti congiuntivali incollati) sono stati così usati nelle due fasi dello studio:

@ per la convalida in vitro, il tessuto combinato (membrana amniotica e frammenti incollati) sono stati coltivati in vitro al fine di ottenere una crescita cellulare dai frammenti (outgrowth, **Figura 4A**), e le colture cellulari così ottenute analizzate per valutare eventuali differenze tra le diverse condizioni studiate

@ per l'applicazione clinica, il tessuto combinato è stato applicato direttamente sulla superficie congiuntivale di pazienti affetti da pterigio previa rimozione dello pterigio stesso.



**Figura 4**

### Validazione in vitro

La convalida in vitro ha incluso più test. I test effettuati hanno fatto emergere importanti informazioni:

- Sono sufficienti 2 microlitri di colla per mantenere saldamente adesi i frammenti sulla membrana amniotica (per la precisione: 1 microlitro di Trombina più 1 microlitro di Fibrina).
- Gli outgrowth possono essere ottenuti incollando i frammenti congiuntivali su entrambi i lati della membrana amniotica (lato epiteliale e lato spugnoso *spongy layer*) e in aggiunta anche sullo stroma nudo della membrana sia sul lato epiteliale che dal versante spongy (quindi utilizzando la membrana amniotica previa rimozione dello strato epiteliale o dello spongy layer rispettivamente) (schema in **Figura 5**). Tuttavia è stato visto che parte dei frammenti incollati si staccano entro 24 ore quando incollati sul lato epiteliale dello stroma nudo della membrana amniotica. Tutte le altre condizioni (adesione dei frammenti sul lato epiteliale, sullo spongy layer e sullo stroma nudo dopo rimozione dello spongy layer) non hanno mai portato a distacchi dei frammenti congiuntivali precedentemente incollati (dati in **Figura 4D**).

AM ORIENTATION FOR ATTACHMENT OF THE FRAGMENTS :

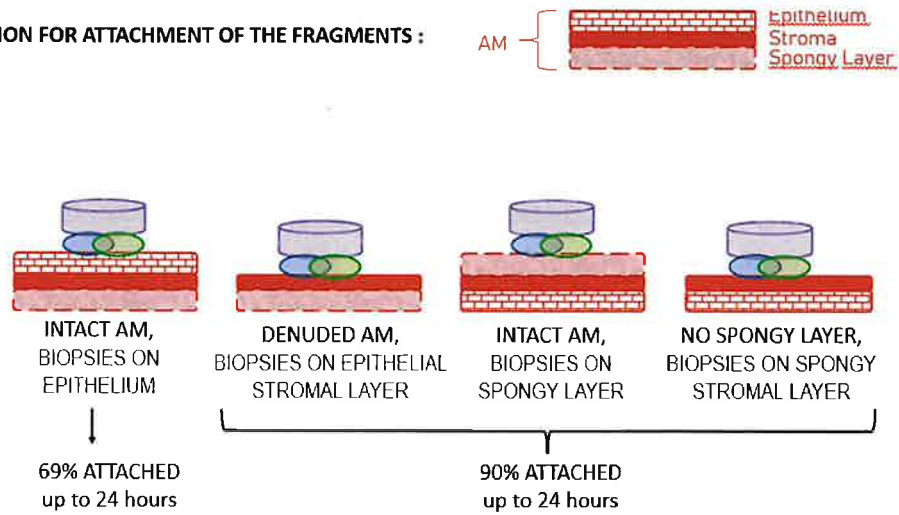


Figura 5

- I frammenti incollati non possono rimanere asciutti per più di 5 minuti durante le varie fasi di lavorazione: sono stati testati diversi tempi di “tenuta a secco” ed è stato visto che aumentando l’esposizione prolungata dei frammenti all’aria diminuiscono le capacità dei frammenti di generare outgrowth (espressa in % di frammenti precaricati in grado di generare outgrowth) (dati in **Figura 4B**).

- La percentuale di outgrowth ottenuta non varia a seconda delle dimensioni dei frammenti incollati (dati in **Figura 4C**).

- I test di validazione in vitro hanno inoltre dimostrato che:

- il 65-80% dei frammenti congiuntivali incollati ha dato origine ad una crescita cellulare (outgrowth),
- gli outgrowth iniziano a formarsi 48-72 ore dopo l'incollaggio,
- non è stata osservata nessuna differenza sostanziale tra i tipi di membrane utilizzate e la dimensione dei frammenti incollati,
- entro 6-13 giorni un epitelio congiuntivale completo ricopriva la superficie della membrana amniotica.

- E' stata eseguito un test di immunofluorescenza sulle colture congiuntivali ottenute: i frammenti incollati sulla membrana amniotica hanno dimostrato di essere in grado di generare un epitelio confluyente che esprime i principali marker congiuntivali ed i marker delle cellule staminali (come cheratina 13, cheratina 19, mucina 1 e p63) (**Figura 6**). Non è stata vista differenza fra un tessuto congiuntivale sano di controllo e gli epitelii congiuntivali cresciuti utilizzando i diversi tipi di membrana amniotica testati.

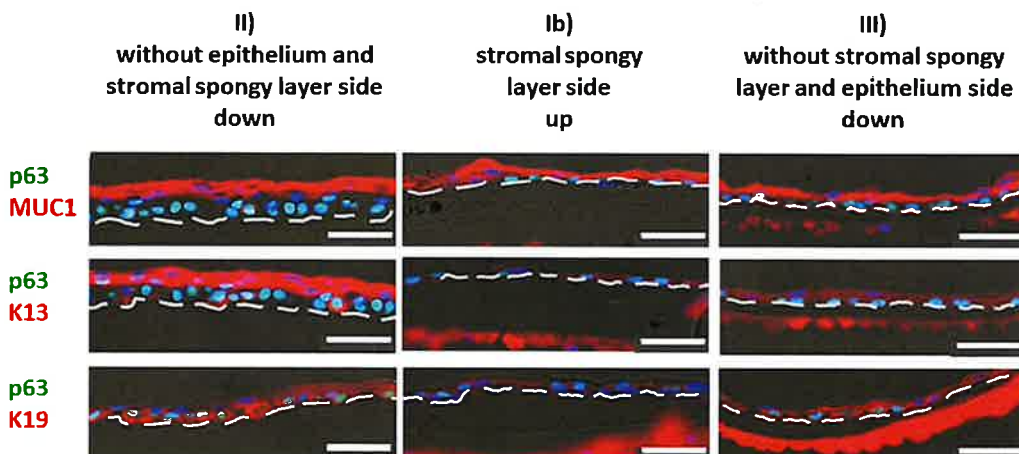


Figura 6



- Abbiamo inoltre dimostrato in vitro che il tessuto combinato così preparato (frammenti precaricati/incollati sulla membrana amniotica) può essere trasportato e/o spedito. Dopo la spedizione non è stato registrato distacco dei frammenti ed i frammenti incollati non hanno dimostrato ridotta capacità di generare un outgrowth. Il chirurgo può quindi considerare il supporto di un laboratorio esterno per la preparazione e spedizione di un prodotto di membrana amniotica con frammenti congiuntivali autologhi precaricati.

Risultati dell'applicazione clinica per pterigio primario.

Abbiamo eseguito il trapianto epiteliale congiuntivale semplice (SCET) in 6 occhi di 6 pazienti affetti da pterigio. Sono state eseguite le seguenti manovre chirurgiche (**Figura 7**):

- prelievo di una biopsia congiuntivale da una zona sana dell'occhio
- asportazione chirurgica dello pterigio nasale primario
- adesione sulla sclera scoperta della membrana amniotica con i frammenti di tessuto congiuntivale autologo.

Surgical steps:

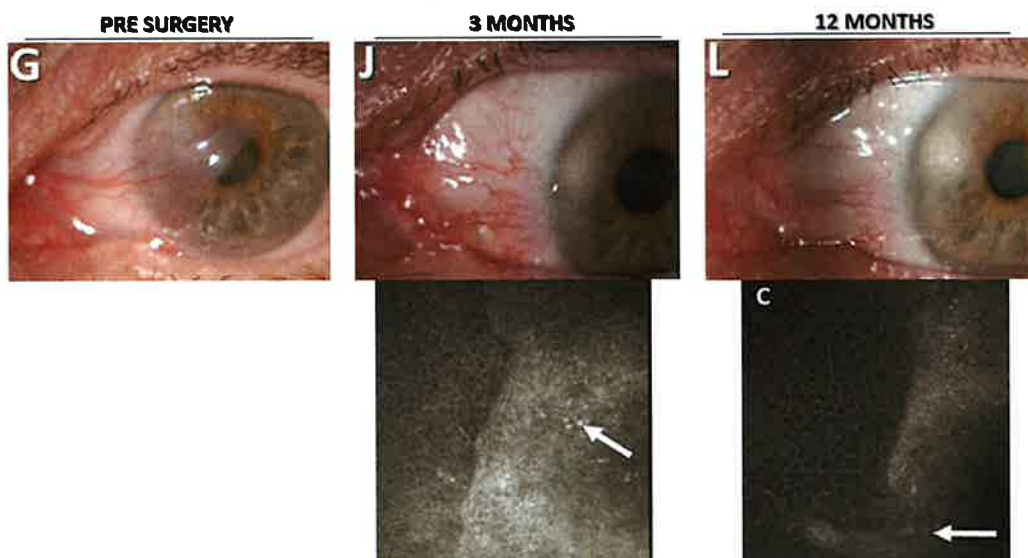


**Figura 7**

Le valutazioni di follow-up sono state eseguite dopo 3, 6 e 12 mesi (**Figura 8**). Abbiamo trovato che:

- Non si è verificato alcun distacco dell'innesto.
- Non sono stati osservati segni di recidiva o complicanze pericolose.
- La microscopia confocale in vivo ha dimostrato: - una progressiva espansione della popolazione di cellule congiuntivali – la presenza di una chiara zona di transizione corneale-congiuntivale con cellule congiuntivali mature, la presenza di cellule altamente riflettenti (probabili cellule calciformi sparse). L'istituzione di una zona di transizione cornea-congiuntiva è il segno che le due popolazioni di cellule, l'epitelio corneale e congiuntivale, mantengono la posizione fisiologica sulla superficie oculare.

Example of follow up:



**Figura 8**

Per concludere, i nostri risultati in vitro hanno permesso di stabilire le condizioni più appropriate per lo sviluppo clinico di una nuova strategia basata sull'espansione in vivo di

cellule da frammenti congiuntivali incollati su una membrana amniotica per la rigenerazione dell'epitelio congiuntivale. L'applicazione clinica della SCET, sebbene in un numero limitato di pazienti, sembra offrire un'efficace e replicabile opzione chirurgica per il rinnovamento del tessuto congiuntivale nei pazienti che richiedono la ricostruzione della superficie oculare dopo l'escissione dello pterigio.

I dati dei risultati del WP2 sono stati pubblicati come di seguito indicato:

1. **Bertolin M, Barbaro V, Breda C, Ferrari S, Marchini G, Pedrotti E, Ferrari B, Ponzin D, Fasolo A.** In vitro establishment, validation and characterisation of conjunctival epithelium outgrowth using tissue fragments and amniotic membranes. *British Journal of Ophthalmology* 2022; **106 (3)**: 440-444. DOI: [10.1136/bjophthalmol-2020-318513](https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-318513)
2. **Bertolin M, Breda C, Ferrari S, Lamon M, Ponzin D, Ferrari B and Barbaro V.** A new standardized immunofluorescence method for potency quantification (SMPQ) of human conjunctival cell cultures. *Cell and Tissue Banking* 2021; **22(1)**: 145-159.

### **WP3: Utilizzo della MA come scaffold per la rigenerazione dell'epitelio retinico pigmentato**

La membrana amniotica umana (hAM) è stata presa in considerazione come possibile matrice di supporto per le cellule dell'epitelio pigmentato retinico (EPR) differenziate a partire da una linea di cellule embrionali umane pluripotenti. Questo tessuto umano, già ampiamente utilizzato in oftalmologia come *patch* nei casi di ulcerazione corneale e nelle applicazioni di medicina rigenerativa per il trattamento di pazienti affetti da deficit di cellule staminali limbo-corneali, possiede proprietà anti-infiammatorie ed anti-angiogeniche notevoli (**Figura 9**). Inoltre, in casi di ricostruzione della superficie oculare, può essere efficientemente integrata nel tessuto ospite, aiutando ad implementare la qualità strutturale del tessuto stesso. Dalla ricerca in letteratura è emerso il lavoro di un gruppo francese che ha dimostrato come un *monolayer* di cellule dell'EPR differenziate da cellule embrionali seminate su hAM sia in grado di ristabilire la funzione visiva su roditori affetti da degenerazione retinica. In una successiva pubblicazione, lo stesso gruppo ha confermato l'integrità e la funzionalità del suddetto prodotto di terapia cellulare su primate non-umano, senza alcun effetto indesiderato sulla normale attività retinica.

Uno dei motivi che hanno portato a considerare la hAM un appetibile *scaffold* per le cellule dell'EPR è la stretta somiglianza della membrana basale amniotica alla membrana di Bruch, sopra cui risiedono le cellule dell'EPR in normali condizioni fisiologiche.

Nel nostro studio la membrana amniotica ha subito un processo di disepitelizzazione in modo da promuovere l'adesione delle cellule dell'EPR grazie all'esposizione della membrana basale amniotica. Inoltre, la rimozione dell'epitelio della hAM ha permesso di ottenere uno *scaffold* privo o quasi di potenziale immunogenico.

In seguito al montaggio della hAM su un anellino di silicone in grado di mantenerla distesa e trazionata (**Figura 10**), sono stati paragonati tre metodi di disepitelizzazione enzimatica (termolisina, 0.25% tripsina e dispase 1), così da confrontare le diverse efficienze nel rimuovere l'epitelio della hAM senza però intaccare l'integrità della sottostante membrana basale (**Figura 11**). Dopo attente analisi, è stato preferito il metodo con termolisina, in virtù dell'ottima conservazione della membrana basale rilevata in seguito al trattamento (**Figura 12**).

Sono state quindi effettuate le prime prove di semina di cellule dell'EPR su membrana amniotica disepitelializzata. Sono state testate diverse condizioni di coltura, variando i seguenti parametri:

- Densità di cellule seminate
- Quantità di siero aggiunto nel mezzo (necessario per garantire l'iniziale adesione cellulare)
- Metodo di distacco delle cellule (a cella singola vs. gruppi di cellule)

- Applicazione di diversi substrati di rivestimento sulla superficie della hAM con l'idea di favorire l'adesione cellulare

Nonostante i numerosi tentativi, si è riscontrata una grande variabilità tra le risultanti colture cellulari (**Figura 13**). Nella maggior parte dei casi, non si è osservato un *monolayer* continuo di cellule dell'EPR sulla superficie della membrana, segno dell'incapacità delle cellule di aderire e/o proliferare correttamente su questo substrato nonostante la presenza di una intatta membrana basale amniotica. Inoltre, la complessa architettura della hAM, nonché il suo elevato spessore, non hanno permesso di monitorare la crescita delle cellule dell'EPR.

Le colture su membrana amniotica sono state mantenute per quattro settimane. Oltre questo tempo, è stato possibile osservare tramite sezioni istologiche una progressiva perdita dell'integrità del tessuto.

Un altro grande svantaggio della hAM è risultato essere l'ampia variabilità tra diversi lotti di membrana. Questa diversità ha portato ad avere risultati discordanti in termini di adesione cellulare ed all'impossibilità di ottenere un protocollo standardizzato per la manipolazione del tessuto e la successiva semina delle cellule dell'EPR.

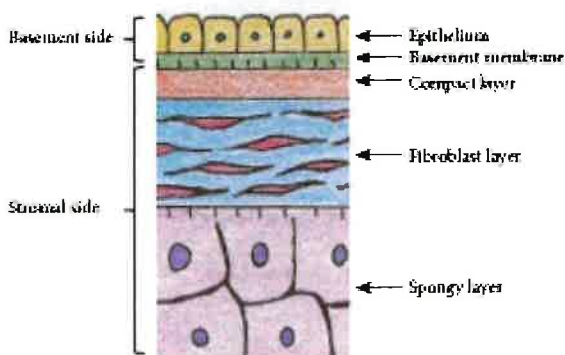


Figura 9. Struttura della membrana amniotica umana.

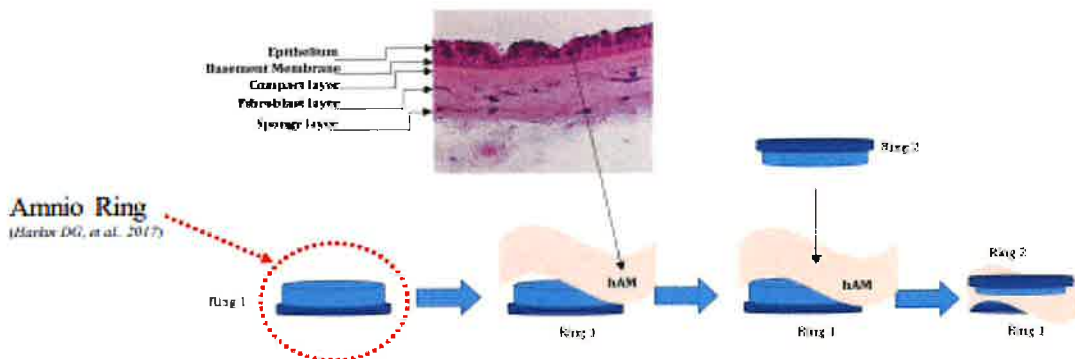


Figura 10. Montaggio della hAM sull'anello di silicone (*Amnio Ring*).

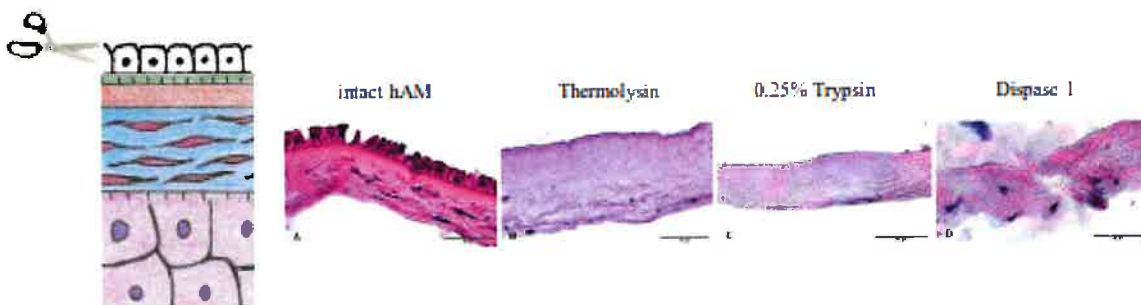


Figura 11. Aspetto del tessuto in seguito ai diversi metodi di disepitelizzazione testati.

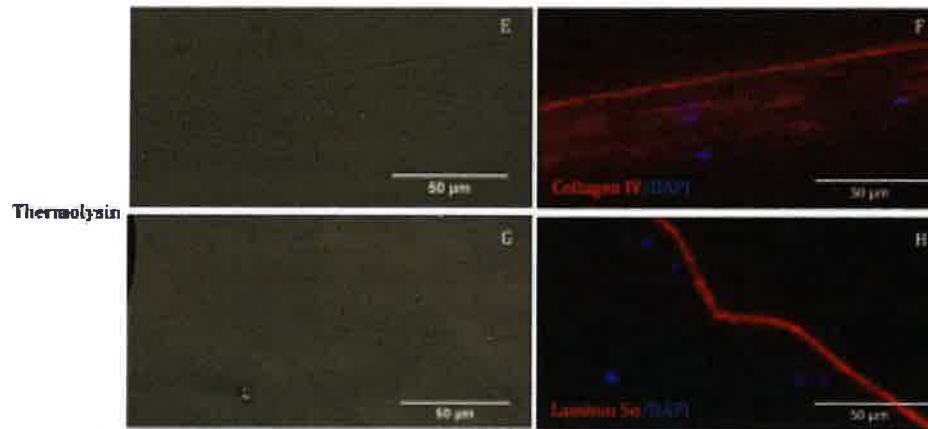


Figura 12. Immunofluorescenza per tipici marcatori della membrana basale amniotica.



Figura 13. Variabilità riscontrata fra le colture cellulari di cellule dell'EPR su HAM discipitelializzata.

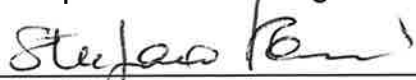
## ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INDICIZZATE

I seguenti articoli scientifici sono stati pubblicati su riviste internazionali indicizzate e riportano negli *acknowledgments* il ringraziamento ai fondi del 5x1000:

1. **Bertolin M, Barbaro V, Breda C, Ferrari S, Marchini G, Pedrotti E, Ferrari B, Ponzin D, Fasolo A.** In vitro establishment, validation and characterisation of conjunctival epithelium outgrowth using tissue fragments and amniotic membrane. *British Journal of Ophthalmology* 2022; **106 (3)**: 440-444. DOI: [10.1136/bjophthalmol-2020-318513](https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-318513)
2. **Bertolin M, Breda C, Ferrari S, Lamon M, Ponzin D, Ferrari B and Barbaro V.** A new standardized immunofluorescence method for potency quantification (SMPQ) of human conjunctival cell cultures. *Cell and Tissue Banking* 2021; **22(1)**: 145-159.
3. **Lamon M, Bertolin M, Trojan D, Spagnol L, Donisi PM, Camposampiero D, Ponzin D, Ferrari S.** Cryopreservation of human amniotic membrane for ocular surface reconstruction: a comparison between protocols. *Cell and Tissue Banking* 2022; *in press*.

Data 17 marzo 2022

Il Responsabile del Progetto



Dott. Stefano Ferrari

Il Legale Rappresentante



dott. Giuseppe Di Falco

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante



Dott. Giuseppe Di Falco

