



Riepilogo comunicazione

Risposta al messaggio:	2025003191 - 20/03/2025 15:04
ID invio:	2025003784
Data:	31/03/2025 07:52
Stato:	Inviata
Mittente:	Ministero della Salute (10128)
Destinatario:	Fondazione Banca degli Occhi del Veneto Onlus (1306148)
Progetto:	5M-2020-23681939 - Sviluppo di un "Advanced Therapy Medicinal Product" (ATMP) per la rigenerazione in vitro dell'endotelio corneale
Tipo:	Rendicontazione economica
Oggetto:	5xMille 2020 - RENDICONTAZIONE ECONOMICA del progetto SVILUPPO DI UN ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCT (ATMP) PER LA RIGENERAZIONE IN VITRO DELL'ENDOTELIO CORNEALE
Messaggio:	ESITO POSITIVO Il Referente Amministrativo Dott.ssa Tiziana Mattina Il Coordinatore Tecnico-scientifico dell'ufficio 3 Dott. Giuseppe Gervasi
Tipo messaggio	Messaggio di accettazione

Rendicontazione economica	Voci di spesa	Importi (in Euro)
	Personale di ricerca	55.293,67
	Apparecchiature	0,00
	Materiale uso destinato alla ricerca	81.500,00
	Spese di organizzazione	3.600,00
	Elaborazione dati	0,00
	Spese amministrative	0,00
	Altro (indicare quali)	38.000,00
	Totale	178.393,67



RENDICONTO DI SPESA - FONDI 5 PER MILLE 2020
FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI DEL VENETO ETS

PROGETTO

Sviluppo di un Advanced Therapy Medicinal Product (Atmp) per la Rigenerazione in vitro dell'endotelio corneale

VOCE DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	88.480,27	55.293,67
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	-	-
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per lab. ricerca, acquisto farmaci ecc.)	95.943,73	81.500,00
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	3.618,86	3.600,00
Elaborazione dati	-	-
Spese amministrative	-	-
Altro (manutenzioni, analisi e trasporti speciali)*	38.525,53	38.000,00
TOTALE	226.568,39	178.393,67

Importi comprensivi di IVA (Iva indetraibile pro rata)

* Analisi - Trasposto con corriere - Manutenzioni - Cancelleria - Consulenze


FONDAZIONE
BANCA DEGLI OCCHI
DEL VENETO - ETS



Ministero della Salute



WORKFLOW DELLA RICERCA 2.0

Riepilogo comunicazione

ID invio:	2025003191
Data:	20/03/2025 15:04
Stato:	Inviata
Mittente:	Fondazione Banca degli Occhi del Veneto Onlus (1306148)
Destinatario:	Ministero della Salute (10128)
Progetto:	5M-2020-23681939 - Sviluppo di un "Advanced Therapy Medicinal Product" (ATMP) per la rigenerazione in vitro dell'endotelio corneale
Tipo:	Rendicontazione economica
Oggetto:	5xMille 2020 - RENDICONTAZIONE ECONOMICA del progetto SVILUPPO DI UN ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCT (ATMP) PER LA RIGENERAZIONE IN VITRO DELL'ENDOTELIO CORNEALE
Messaggio:	Con la presente si inoltra la rendicontazione economica del progetto di cui all'oggetto, finanziato con il 5 per mille 2020. Il progetto ha un valore totale di € 254.154,83= (con un budget previsionale di € 200.000) ed è stato finanziato anche dai fondi 5xMille 2020 per gli Enti della Ricerca Scientifica (MUR 2020 contributo pari a € 18.058,31)
Allegato:	Riepilogo spese sostenute_5xMille 2020 FBOV ETS.pdf
Esito	null

Rendicontazione economica	Voci di spesa	Importi (in Euro)
	Personale di ricerca	55.293,67
	Apparecchiature	0,00
	Materiale uso destinato alla ricerca	81.500,00
	Spese di organizzazione	3.600,00
	Elaborazione dati	0,00
	Spese amministrative	0,00
	Altro (indicare quali)	38.000,00
	Totale	178.393,67



Riepilogo comunicazione

Risposta al messaggio:	2025003192 - 20/03/2025 15:04
ID invio:	2025003785
Data:	31/03/2025 07:52
Stato:	Inviata
Mittente:	Ministero della Salute (10128)
Destinatario:	Fondazione Banca degli Occhi del Veneto Onlus (1306148)
Progetto:	5M-2020-23681939 - Sviluppo di un "Advanced Therapy Medicinal Product" (ATMP) per la rigenerazione in vitro dell'endotelio corneale
Tipo:	Relazione finale
Oggetto:	5xMille 2020 - RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE - Progetto: Sviluppo di un Advanced Therapy Medicinal Product (Atmp) per la Rigenerazione in vitro dell'endotelio corneale
Messaggio:	ESITO POSITIVO Il Referente Amministrativo Dott.ssa Tiziana Mattina Il Coordinatore Tecnico-scientifico dell'ufficio 3 Dott. Giuseppe Gervasi
Tipo messaggio	Messaggio di accettazione

Stato progetto:	Relazione finale
-----------------	------------------



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

Fondi 5 per mille ANNO 2020
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria

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

Codice fiscale: **02320670272**

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

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: fbov@pec.fbov.it

Dati del rappresentante legale: dott. Diego Ponzin – Presidente del Consiglio di Amministrazione, nato il 13 giugno 1961 a Carrara S. Giorgio (PD).

C. F. PNZDGI61H13B833G

Titolo del progetto: SVILUPPO DI UN ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCT (ATMP) PER LA RIGENERAZIONE IN VITRO DELL'ENDOTELIO CORNEALE

INTRODUZIONE

L'endotelio corneale rappresenta lo strato più profondo della cornea. Si tratta di un singolo strato di cellule con morfologia esagonale, adese tra loro attraverso giunzioni strette e comunicanti. Tale struttura è essenziale per il corretto funzionamento della cornea e la sua trasparenza. Queste cellule non si rigenerano *in vivo* e il loro numero diminuisce con l'età. L'alterazione di queste cellule rappresenta una delle principali cause che portano al trapianto di cornea. Tra le patologie più comuni vi è la distrofia di Fuchs, una disfunzione corneale che provoca una riduzione drammatica del numero di cellule endoteliali funzionanti ed un'alterazione della membrana di Descemet, supporto su cui le cellule sono ancorate, con formazione di escrescenze della membrana chiamate *gutte*. Tali disfunzioni comportano opacizzazione della cornea ed una graduale perdita della vista. Negli ultimi anni le cheratoplastiche endoteliale e perforante hanno costituito le principali soluzioni chirurgiche al trattamento di tali patologie. Tuttavia, in alcuni paesi dell'Asia orientale, ma anche in molti dell'Europa, il numero di cornee da donatore non soddisfa la domanda. Un prodotto di terapia cellulare potrebbe pertanto ovviare a questa mancanza.

Le cellule dell'endotelio corneale però non replicano *in vivo* e una volta isolate da cornee di donatore possono essere mantenute *in vitro* con una modesta capacità mitotica. Tali colture sembrano avere dei limiti molto forti legati soprattutto all'età del donatore, alla densità endoteliale della cornea di partenza, alle caratteristiche del donatore, al *post-mortem time* (tempo che intercorre tra il decesso e il prelievo della cornea) e ai protocolli di isolamento/cultura delle cellule stesse. Questi limiti si traducono in colture con morfologie non conformi (Endothelial-to-Mesenchymal Transition) e con ridotte capacità proliferative. L'ottenimento di protocolli di espansione e proliferazione delle cellule endoteliali corneali è ancora ampiamente discusso nella comunità scientifica, così come l'individuazione di un marcatore specifico.

 SF

SCOPO DEL PROGETTO

Lo scopo finale di questo progetto è quello di mettere a punto un prodotto di terapia cellulare (ATMP – Advanced Therapy Medicinal Product) che possa offrire nuove opportunità nella cura delle patologie che coinvolgono l'endotelio corneale. Il progetto è diviso in 3 Work Packages (WPs) come di seguito indicato:

WP1: culture cellulari endoteliali derivanti da donatore cadavere;

WP2: Isolamento di cellule mesenchimali e differenziazione in cellule dell'endotelio corneale;

WP3: Scaffold 3D per la rigenerazione dell'endotelio corneale in pazienti affetti da distrofia di Fuchs.

Saranno oggetto di questa relazione scientifica i risultati ottenuti durante 2 finestre temporali:

- 01.01.2022 - 31.10.2022 (relazione intermedia), con focus sul WP1 al fine di migliorare la qualità delle colture di endotelio corneale derivante da donatore cadavere.
- biennio 2022-2024 (questa relazione finale) in cui sono stati sviluppati tutti e 3 i WPs.

RISULTATI 2023-24

Nel corso del biennio 2023-24 sono stati sviluppati tutti e 3 i WPs indicati dal progetto.

→ WP1: culture cellulari endoteliali derivanti da donatore cadavere

I risultati ottenuti nel corso del 2022 sono stati riassunti nel paper "FACTORS AFFECTING THE DENSITY OF CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS CULTURED FROM DONOR CORNEAS" pubblicato nella rivista *International Journal of Molecular Sciences* [Bertolin et al., Int J Mol Sci 2024; 25(22):11884]. Nel corso del biennio 2023-4 abbiamo continuato a verificare sempre nuove condizioni di coltura per migliorare il protocollo in uso. Il fine ultimo è sempre quello di ottenere colture corneali endoteliali ad alte densità (superiore alle 2000 cellule per millimetro quadrato, che è lo standard universalmente adottato per il trapianto di tessuti di endotelio corneale) e che esprimano i marcatori tipicamente endoteliali. Diverse le strade investigate come di seguito illustrato.

 Nel corso di questo biennio sono stati testati ancora nuovi reagenti sulla base di protocolli suggeriti dalla letteratura. Alcuni di questi reagenti sono stati precedentemente testati o su culture endoteliali ottenute da donatore giovane o da donatore anziano con alta densità endoteliale (ECD). Abbiamo ritenuto tuttavia opportuno ri-testarli in quanto l'esperienza precedente ha evidenziato come le colture ottenute da donatore anziano con bassa ECD passano comportarsi diversamente rispetto a quelle ottenute da donatore giovane o anziano con alta ECD.

Poiché la letteratura sembra dimostrare la presenza di Neural Crest-derived progenitor cells sia in pazienti con endotelio corneale sano che in pazienti affetti da Fuchs (<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5222986/>), sono stati in aggiunta testati anche reagenti comunemente utilizzati per le colture NC al fine di incentivare la proliferazione delle cellule endoteliali corneali.

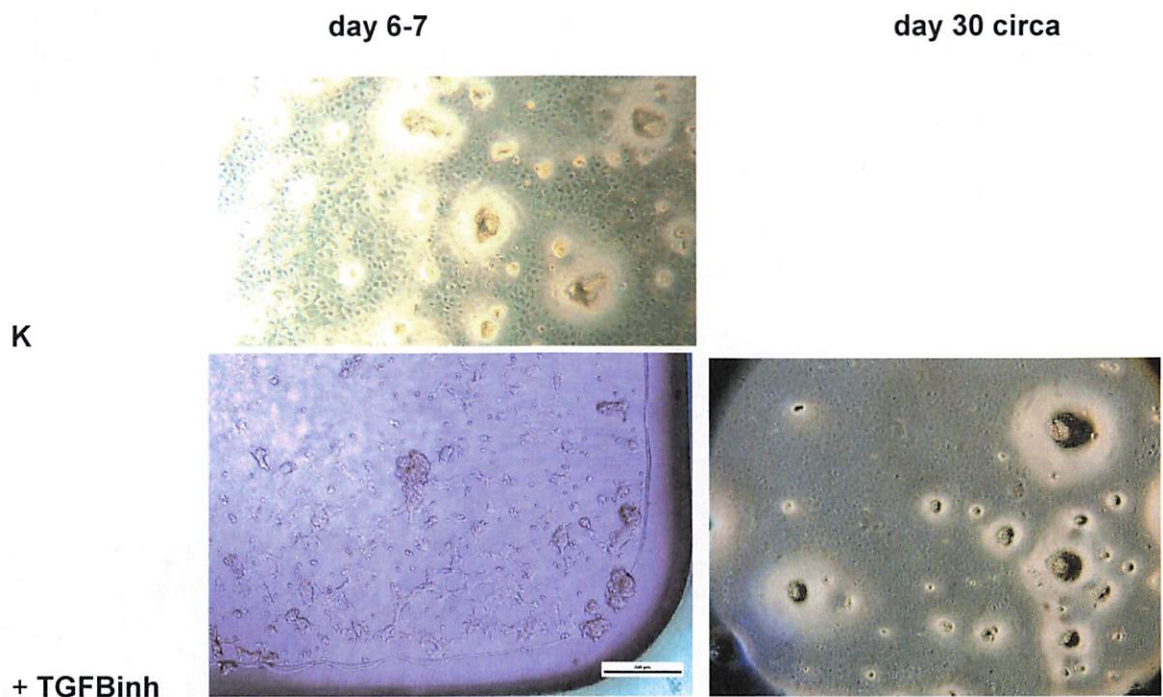
Questi i reagenti testati:

- 1X B-27 supplement e 1X N-2 supplement (serum free alternative, s a Standard for Neuronal Cell Culture) come descritto per esempio in https://web.archive.org/web/20200807084853id_/https://assets.researchsquare.com/files/rs-45399/v1/c2f40fc8-8aa1-4898-841f-9a0d29194ad6.pdf e <https://www.medsci.org/v14p0128.htm> e https://www.thermofisher.com/it/en/home/brands/gibco/gibco-b-27-supplement.html?gclid=Cj0KCQiAx9q6BhCDARIsACwUxu6kME0m1yWjq4c95iuB0bqJvWaN4GZrMx9KZpsXgnEhhy5U87t-39saAk3OEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQiAx9q6BhCDARIsACwUxu6kME0m1yWjq4c95iuB0bqJvWaN4GZrMx9KZpsXgnEhhy5U87t-

39saAk3OEALw wCB:G:s&s kwcid=AL!3652!3!721123635245!!!g!!!21905512708!173946064761&cid=bid clb acn r01 co cp0000 pjt0000 bid00000 0se gaw dy pur con&gad source=1

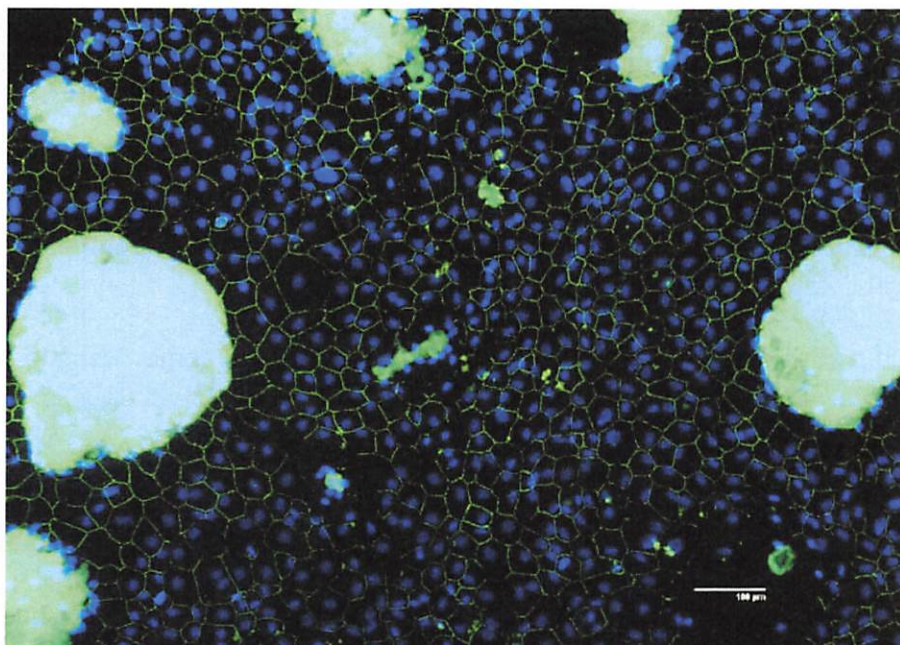
- TGF- β receptor inhibition, an EnMT inhibitor (TGF- β RI Kinase Inhibitor VI, SB431542 nel *growing medium*) come descritto per esempio in <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23451286/> e <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10297110/pdf/cells-12-01624.pdf>;
- TGFB1 and TGFB2 (nel *maturation medium*) come descritto per esempio in <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36194422/> e <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35150734/>;
- SB203580: un p38 MAP Kinases Inhibitor (nel *growing medium*) come descritto per esempio in <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10297110/pdf/cells-12-01624.pdf> e <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30128493/> e <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28672399/>;
- AG-1478, an epithelial growth factor receptor inhibitor, an EnMT inhibitor (nel *maturation medium*) come descritto per esempio in <https://www.nature.com/articles/s41598-018-22821-9> e <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.201902862RRR>;
- CHIR99021, a GSK3 inhibitor, an EnMT inhibitor (nel *maturation medium*) come descritto in <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014483522000203> e <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36905755/>.

Tra tutti i reagenti testati, solo *TGF- β receptor inhibition* ha dimostrato una sostanziale variazione nella morfologia e nell'andamento di crescita delle colture endoteliali ottenute: si è verificata una selezione iniziale (sono rimasti solo gli accumuli (cellule e membrana?), la crescita è stata molto lenta rispetto al controllo, sono necessari cambi terreni molto delicati (le cellule sono poco adese e il cambio terreno può provocare dei distacchi).



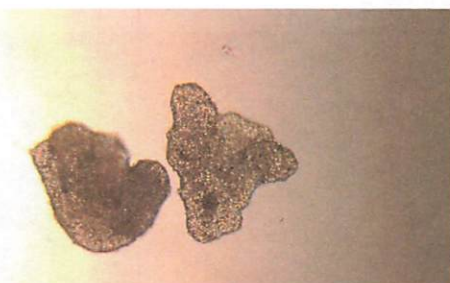
Nel complesso però, la densità cellulare finale ottenuta non supera quella della coltura gemella in condizioni standard, non raggiungendo così l'obiettivo prefissato. Le colture hanno dimostrato di esprimere i marcatori tradizionali in modo specifico lì dove le densità sono migliori (come già dimostrato in letteratura).

SF



→ Abbiamo in aggiunta messo a punto e testato un protocollo ancora diverso, simile a quello precedentemente messo a punto da Jurkunas et al nel paper <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5222986/>, approccio che trae probabilmente spunto dagli ormai consolidati protocolli di transdifferenziamento cellulare. Gli autori dimostrano infatti l'esistenza nell'endotelio corneale umano di cellule endoteliali in grado di comportarsi in vitro come delle neural crest-derived progenitor cells, ossia dimostrano la presenza nell'endotelio corneale umano di cellule aventi la capacità di formare sfere che possono essere poi essere indotte e proliferazione su plastiche da colture cellulari. Pertanto, traendo spunto da questo tipo di approccio e da noti protocolli di transdifferenziamento cellulare utilizzati per la derivazione di cellule corneali endoteliali da cellule di diversa origine (mesenchimali/del follicolo ciliare/adipose/della polpa dentale/ ecc ecc, ex <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7876244/>), abbiamo messo a punto e testato il nuovo protocollo qui di seguito descritto:

Cellule ottenute da donatore anziano sono state coltivate in piastre *low attachment* in un terreno arricchito (F12/M199 + B12 +N2, EGF, Glutammmina, FGF2, PS, TGF- β receptor inhibition, CHIR) al fine di ottenere delle sfere da trasferire e far aderire su piastre per colture cellulari in terreno standard per colture cellulari ed indurre da queste sfere poi la proliferazione (outgrown) di cellule endoteliali corneali.



Il protocollo messo a punto ha in effetti dimostrato la formazione di sfere.

Una volta trasferite in piastre per l'adesione, queste sfere hanno dato origine ad un monolayer (outgrowth).

Le sfere tendono con il tempo ad esaurirsi diminuendo progressivamente di dimensioni.

Al fine di migliorare la morfologia della coltura e ridurre la tendenza delle cellule periferiche ad evolvere in ETM (Endothelial-to-mesenchymal transition), intorno al giorno 20 di coltura, gli outgrowth sono stati messi in *stabilization medium* (come da consolidato *dual medium approach* di



Peh).



Dopo qualche giorno di coltura in *stabilization medium*, parecchi campioni hanno visto la formazione di cellule di piccole dimensioni, morfologicamente diverse, aventi spiccate capacità proliferative (indicate in foto con una freccia).

Le dimensioni cellulari di queste cellule tendono tuttavia ad aumentare al passaggio dei giorni di mantenimento della coltura.

Le colture esprimono i marcatori tradizionali in modo specifico lì dove le densità sono migliori (come già dimostrato in letteratura).

Nel complesso però, nessun punto delle colture ottenuto ha dimostrato di avere una densità cellulare alta, non raggiungendo così l'obiettivo prefissato.

Sarebbe interessante investigare la natura di queste cellule e capire se queste cellule possano essere effettivamente il giusto presupposto per nuovi approcci più performanti.

→ Le colture cellulari sono tradizionalmente ottenute mediante 2 diversi protocolli di colture:

- isolamento delle cellule singole cellule dal tessuto tramite enzimi digestivi e piastramento della soluzione cellulare su piastra favorendone così l'adesione e la proliferazione, oppure
- piastramento del tessuto con fuoriuscita e proliferazione (out growth) delle cellule dal tessuto alla piastra fino a coprire in maniera centripetta la piastra (anche chiamato autograft).

Mentre la prima è ampiamente utilizzata per le colture cellulari dell'endotelio corneale (tutte le referenze citate precedentemente usano questa tecnica), la seconda non trova riscontro in lettura per le colture cellulari endoteliali, seppure ampiamente applicata in altri modelli cellulari (solo per fare un esempio, un nostro precedente lavoro sulle colture cellulari dell'epitelio congiuntivale <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34108226/>). Abbiamo pertanto ritenuto di valutare questa tecnica, sperando in un successo dell'innovazione apportata. Diverse le condizioni valutate:

- sono state confrontate diverse condizioni di piastramento del tessuto (Descemet cellularizzata strappata dalla cornea di donatore): piastramento del tessuto intero e piastramento dello stesso tessuto suddiviso in più pezzi (4-8 pezzi);
- è stata valutata anche una possibile differenza di efficienza fra autografts ottenuti da pezzi di tessuto centrali e pezzi di tessuto periferico (la letteratura suggerisce infatti la presenza nell'endotelio periferico di cellule con un più alto ECD e maggiore capacità proliferativa);
- gli autografts ottenuti sono inoltre stati coltivati sia nel medium tradizionale che nei medium addizionati precedentemente illustrati;
- infine è stata valutata anche la capacità del tessuto di formare sfere, utilizzando una prima fase di coltura in terreni per NNC, come illustrato al punto precedente.

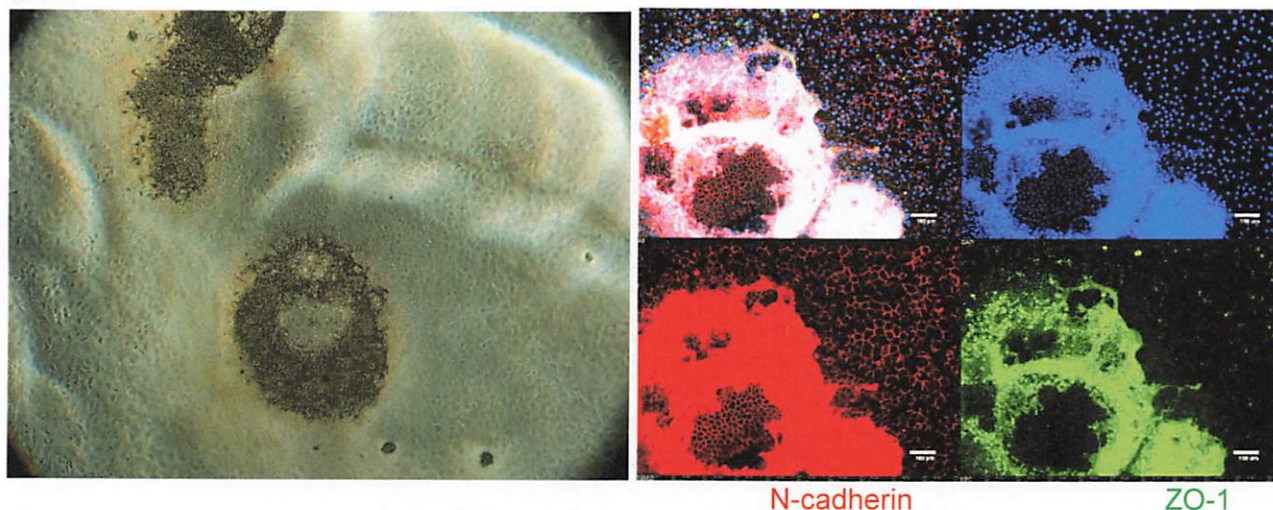
Tutte le colture sono sempre state confrontate con le culture "gemelle" ottenute nelle nostre condizioni standard.

Nel complesso però, nessun punto delle colture ottenuto ha dimostrato di avere una densità cellulare alta (>2000cellule/mmq), non raggiungendo così l'obiettivo prefissato.

Una sola eccezione da segnalare: le colture indotte a formare sfere hanno visto la formazione di "cuori centrali" nelle sfere con cellule di piccole dimensioni (ECD intorno alle 4000 cellule /mmq). Al passare dei giorni in coltura il tessuto è andato "esaurendosi" e le cellule del cuore centrale "liberate" con un progressivo aumento delle dimensioni cellulari.

SF

DAPI



N-cadherin

ZO-1

→ Infine, abbiamo testato anche un diverso utilizzo dell'enzima di estrazione. Il nostro protocollo standard prevede la digestione del tessuto in una soluzione di collagenasi 2mg/ml per 2,5-3 h a 37°C, tuttavia altri studi (per esempio <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10297110/>) la usano a concentrazione minore applicando un trattamento di 16h a 37°C.

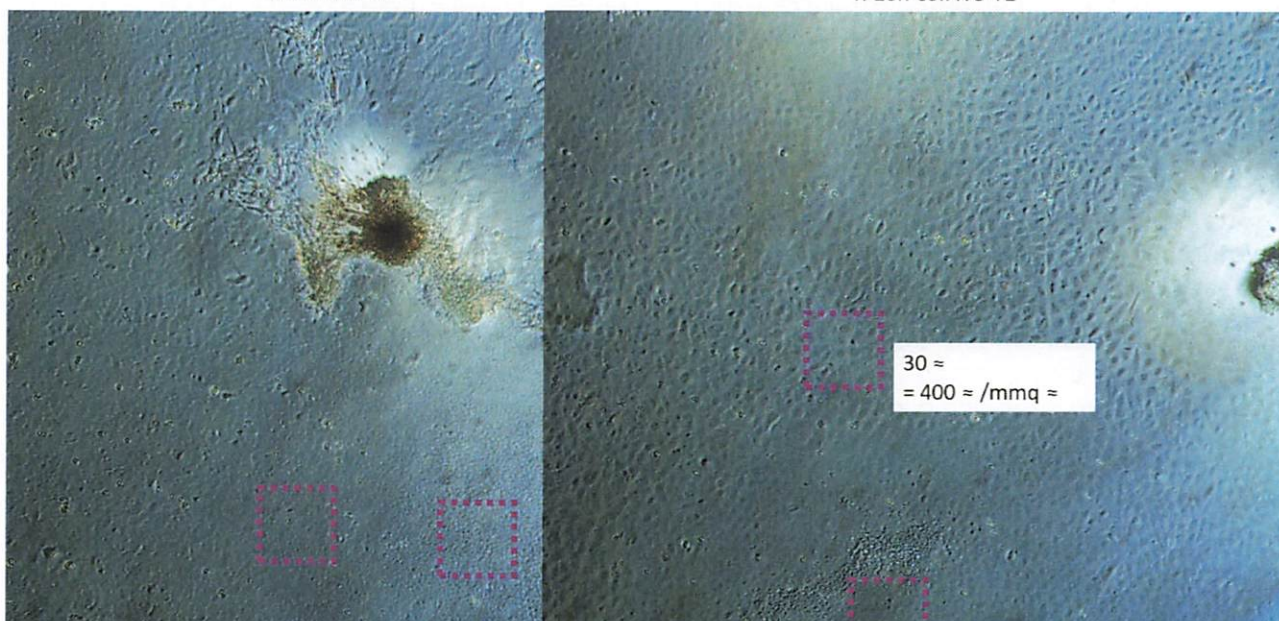
Tutte le colture sono sempre state confrontate con le culture “gemelle” ottenute nelle nostre condizioni standard.

Nel complesso però, non sono state ottenute colture con densità cellulare alta, non raggiungendo così l'obiettivo prefissato. Come per la nostra condizione di controllo si notano aree della coltura ad alta densità (in corrispondenza di agglomerati o frammenti di tessuto), che tendono tuttavia a diminuire con l'aumentare del tempo in coltura uniformando così l'ECD della coltura stessa.

↓ day25 (10X) ↓

K: 3hcoll+TE

T: 16h coll NO TE



→ WP2: Isolamento di cellule mesenchimali e differenziazione in cellule dell'endotelio corneale

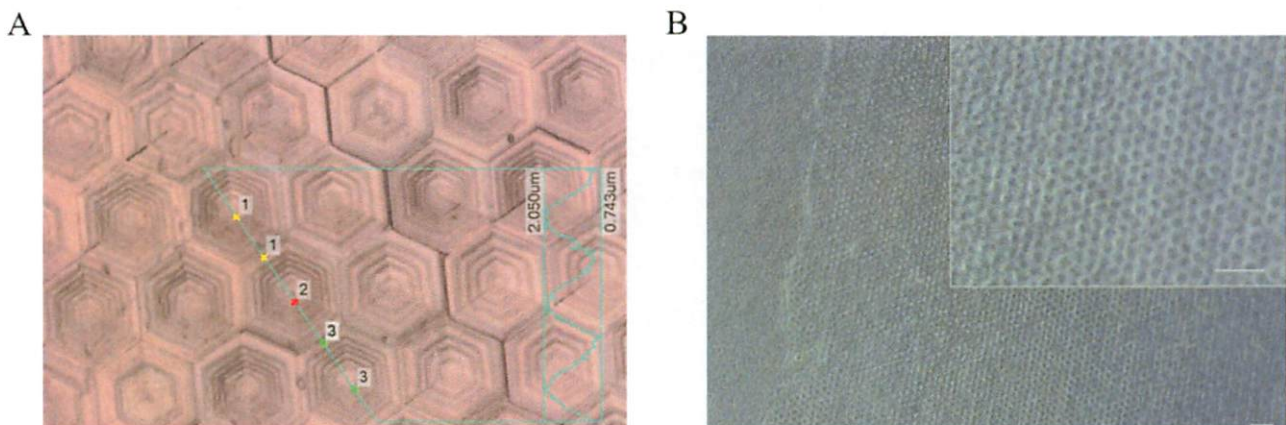
Gli studi precedentemente illustrati hanno messo in evidenza come ci siano evidenti impedimenti all'ottenimento in vitro di colture cellulari ad alte densità, soprattutto quando vengono utilizzate come *starting material* cornee provenienti da donatore anziano e con basse densità (un processo che permetterebbe a FBOV di ottimizzare la donazione cornee utilizzando tessuti che sono non idonei al trapianto e quotidianamente scartati).

Mancando di cornee da donatore giovane, abbiamo cambiato completamente approccio, investigando l'utilizzo di altre sorgenti cellulari che possano transdifferenziare in cellule dell'endotelio corneale. Vista l'inesperienza in questo campo sono stati contattati e cercata la collaborazione con altri gruppi di ricerca che dispongono di protocolli già pubblicati. Pur essendo un campo ancora poco praticato, abbiamo ottenuto la collaborazione di un gruppo di ricercatori Di Aachen [Dott.ssa Skazik-Voogt Claudia e Dr. Christoph Baum del Fraunhofer-Institut für Produktionstechnologie IPT (<https://www.ipt.fraunhofer.de/>); Dott.ssa Angela Gutermuth, , Dr. Kramer e Dr Demunder di Neuroplast (<https://www.neuroplast.com>); Prof. Dr. med. Dr. h.c. Norbert Schrage, Dr.ssa Beatrix Seeliger e Dr. Claudia Panfil di ACTO (Aachen Center for technology transfer in ophthalmology <https://www.acto.de/EN/personelles.html>). Questo gruppo presenta già pubblicazioni pregresse nell'ambito del transdifferenziamento di cellule staminali del follicolo ciliare (stessa derivazione embrionale dell'endotelio corneale) oltre che di cellule mesenchimali in cellule dell'endotelio corneale:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30308581/>

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-021-10249-0>

Secondo questi studi, queste cellule vengono indotte a "regredire" a neuronal crest cells (NNC) mediante l'utilizzo di appositi cocktail; l'originalità di questo protocollo è basata sull'uso di scaffold bio-mimetici costruiti in 3D in grado di guidare poi le NNC cellule verso il risultato finale (ossia appunto il trans-differenziamento ad endoteliali).



A) CLSM image of PDMS imprinted with Descemet like Topography (DLT) showing hexagonal elevations.

B) Transfer of the DLT onto a collagen membrane. Scale bar indicates 50 μ m

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-021-10249-0>

Il gruppo di Aachen ha coinvolto FBOV nel progetto con i seguenti ruoli:

- invio di cellule endoteliali umane sane da utilizzare come controllo per la realizzazione di saggi funzionali di PCR sulle colture/grfts messi a punto nei loro laboratori;
- messa a punto di un pannello di marcatori per l'analisi in fluorescenza dell'espressione dei principali marcatori endoteliali corneali, saggi che potrebbero poi entrare a far parte del processo di controllo qualità di un futuro prodotto di terapia cellulare somministrabile a pazienti affetti da patologie endoteliali.

Seguendo la letteratura, è stato individuato un pannello di marcatori in grado di fotografare il processo nelle sue fasi (cellule di origine – passaggio a NNC cells – trans-differenziamento a cellule endoteliali indotte) e di testimoniare le effettive transizioni.

SF

	COMPANY	CODE	ANIMAL	EXPRESSION	REFER.
<u>Zs-I</u>	<u>ThermoFisher</u>	339188	<u>Coniugated Green</u>	CEC associated marker	HS SS HS AG
<u>Na+/K+ (ATP1A1)</u>	<u>Santa Cruz</u>	Sc-21712	<u>Mouse</u>	CEC associated marker	MW HS BB AG MK BB
<u>Tag</u>	<u>Millipore MERCK</u>	MABN1797	<u>Mouse</u>	CEC associated marker	GT MP
<u>Col8A2</u>	<u>ThermoFisher</u>	PA5-35077	<u>Mouse</u>	CEC associated marker (gene muted in FUCHS)	MW BB AG MK
<u>Collagen IV</u>	<u>Millipore MERCK</u>	MAB1910	<u>Mouse</u>	CEC + (SP)	SP
<u>Laminin 5</u>	<u>Millipore MERCK</u>	MAB1924	<u>Mouse</u>		
<u>N Cadherin</u>	<u>Abcam</u>	AB18203	<u>Rabbit</u>	CEC associated marker	HS; GT
<u>ACQ anti-aquaporin 1</u>	<u>Abcam</u>	AB9566	<u>Mouse</u>	CEC associated marker (AM)	MW HS AM GT
<u>FOXCI</u>	<u>Abcam</u>	ab227977	<u>Rabbit</u>	PDM cells + (HS); CEC associated marker (AM)	HS AM MK
<u>PITX2</u>	<u>ThermoFisher</u>	PA5-98817	<u>Mouse</u>	PDM cells + (HS); CEC specific markers (AG)	HS AG MK
<u>Nestin</u>	<u>Miltenyi Biotec</u>	130-120-164	<u>Coniugated red</u>	Neuroectodermal cell marker (NAA); NCC marker (BB; AG); negative in mature cells (EME)	NAA BB AGMK (EME)
<u>NGFR</u>	<u>Miltenyi Biotec</u>	130-112-794	<u>Coniugated green</u>	Stem cells +; mesench cells +; CEC peripheric cells + (EME); negative in mature cells (EME)	MW EME
<u>NANOG</u>	<u>Miltenyi Biotec</u>	130-117-526	<u>Mouse</u>	Pluripotent cells (BB; AG); NCC induced cells + (BB)	BB AG BB MK
<u>DOX % (Pou5F1)</u>	<u>R&D System</u>	AF1759	<u>GOAT</u>	Pluripotency markers (HS; AG)	HS AG MW
<u>SDX9</u>	<u>Millipore MERCK</u>	AB5535	<u>Rabbit</u>	NCC induced cells + (BB); down regulated in mice cornea maturation (EME)	USS BB
<u>SDX10</u>	<u>Abcam</u>	AB195364	<u>Mouse</u>	Commonly used NCC marker (HS); NCC induced cells + (BB)	HS SS (BB)
<u>PAX6</u>	<u>Biolegend</u>	19013	<u>Rabbit</u>	Express during embrionic development	HS
<u>CKB/18</u>	<u>ARP</u>	24-MSM16-979	<u>Mouse</u>	Paquet cells ++; ETM CEC ++ (SP)	SP
<u>Live/Dead test</u>	<u>ThermoFisher</u>	L3224			
<u>Fluorescein diacetate</u>	<u>ThermoFisher</u>	F1303			

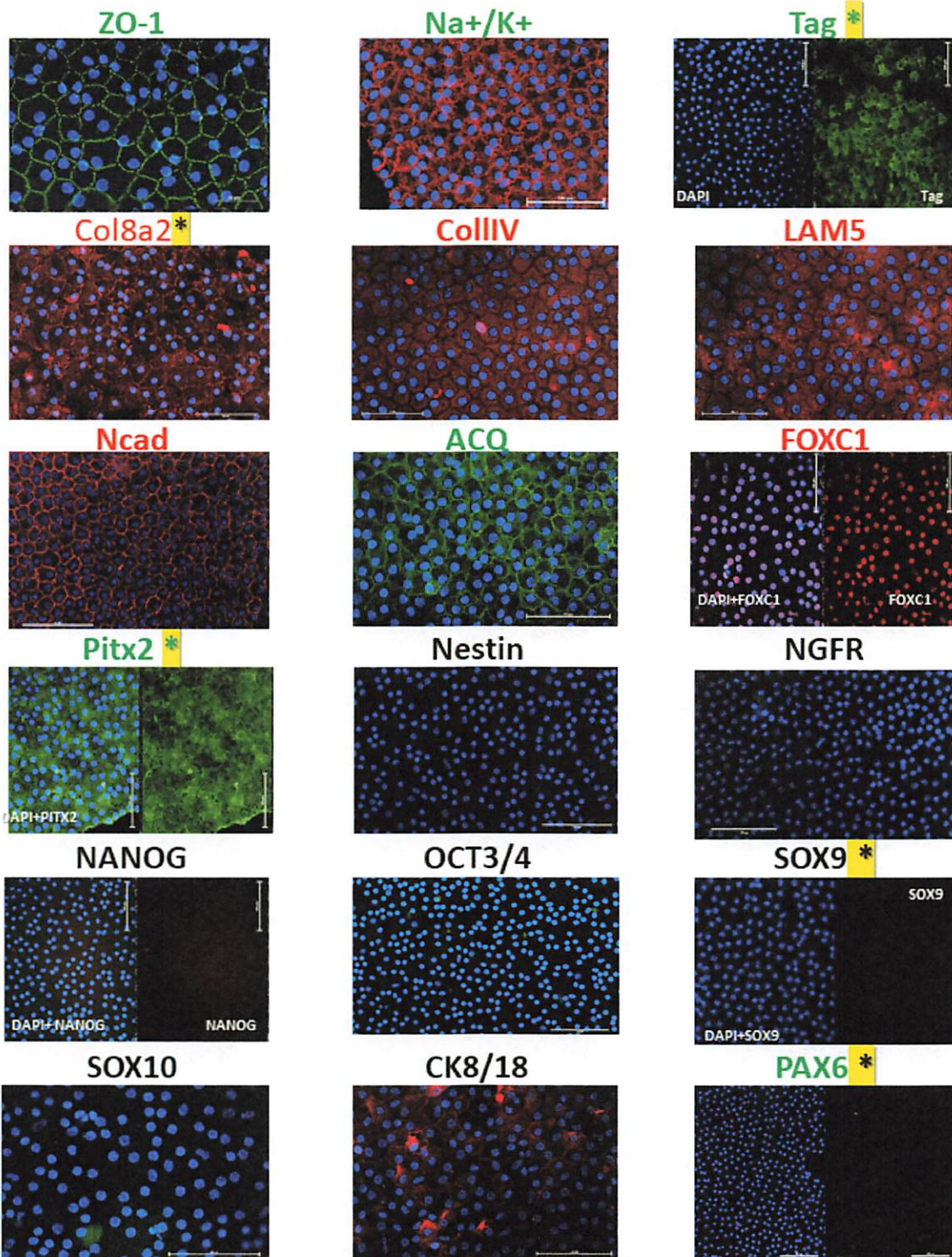
REFERENCES:

HS = Heli Skottman et al 2021 : Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells towards Corneal Endothelial-Like...
 SP = Stepanie Proulx (Canada)
 GT = Gilles Thuret 2016 : 3D map of the human corneal endothelial cells
 AM = Ali Muhammad & Amer Riazuddin
 MW = Michael D. Wagoner & Luke A. Wiley
 SS = Shigeto Shimmura
 NAA = Natalie A. Afshari
 BB = Begona Bosh & Roman Perez (dental pulp derived CEC)
 MK = Mostafa Khalili & Effat Alizadeh (NNC adipose dericed CEC)
 USS = Ursula Schlotzer-Schrehardt <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29980721/>
 AG = Angela Gutermuth & Christian Olszewski
 EME = Edgard M. Espana & David E. Birk
 JC = Joseph Casey
 EPK = E. P. Kay <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2914755/>

Il processo è stato ottimizzato testando marcatori di diversi produttori e a diverse concentrazioni di utilizzo. Cornee proveniente da donatore anziano e cellule mesenchimali provenienti da donatori disponibili in laboratorio sono state utilizzate come controllo nella messa a punto di questi test.

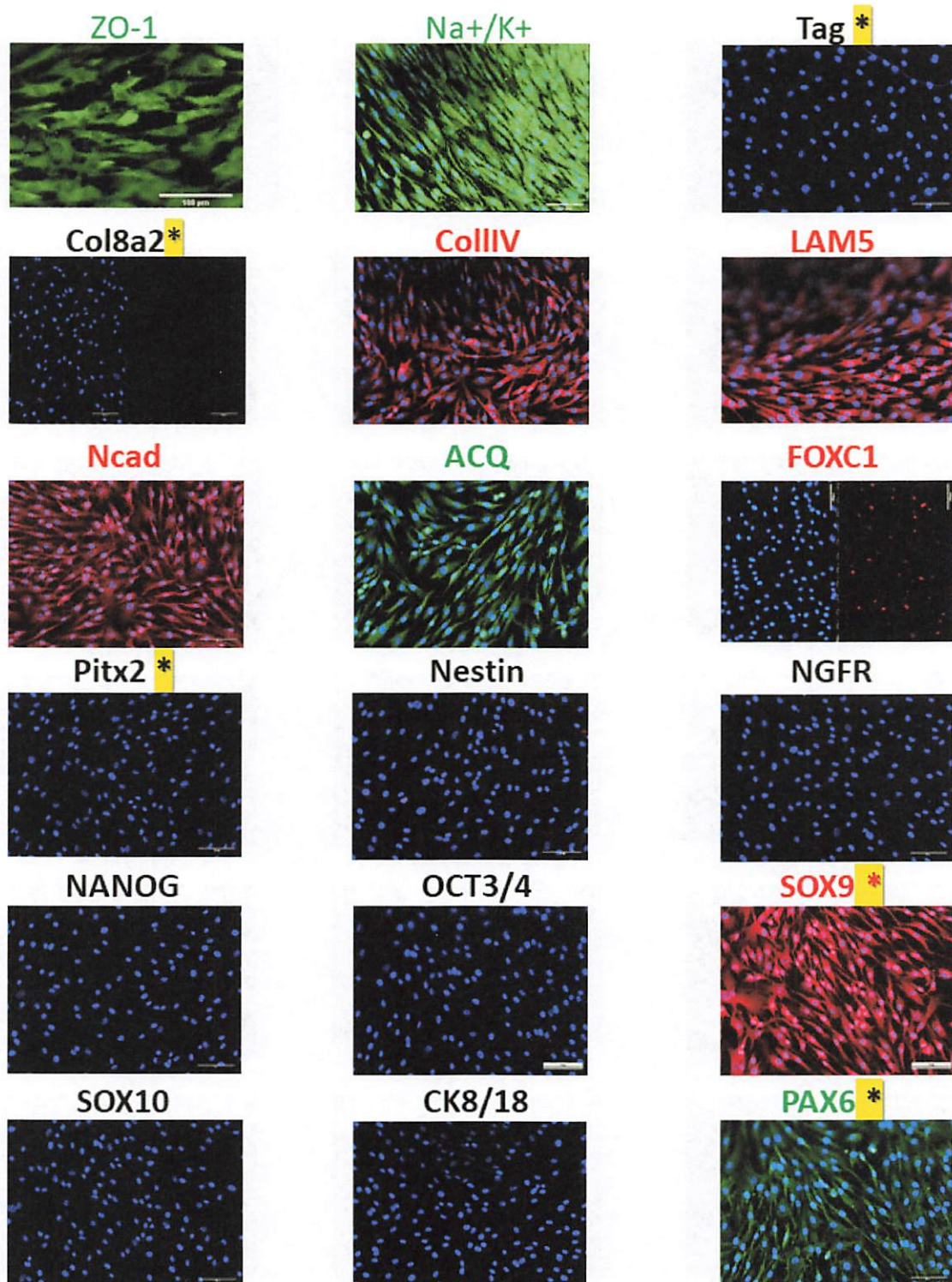
Questo il pannello realizzato:

Summary on CORNEA (* different expression respect to MSC)



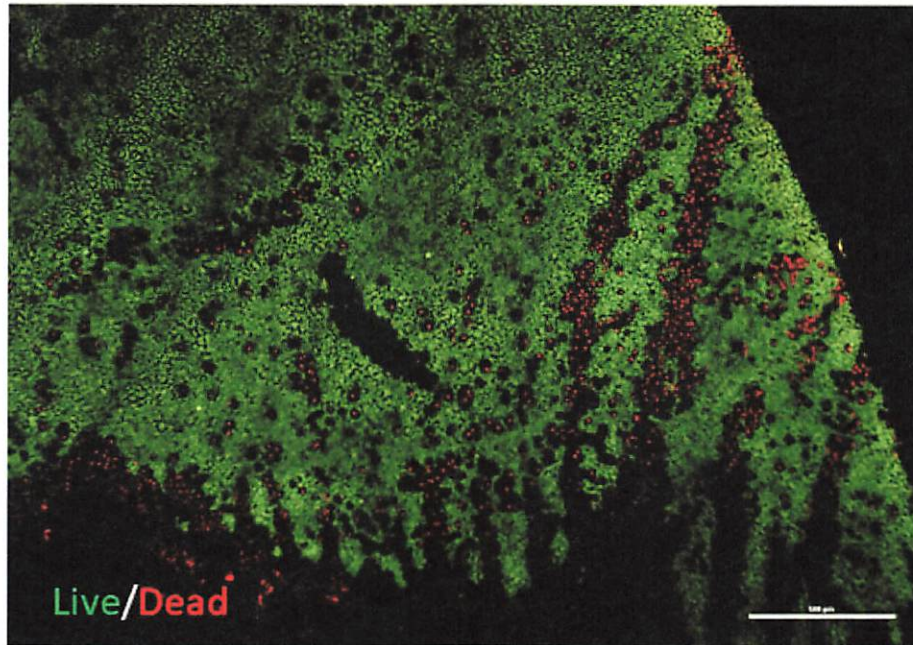
Handwritten signature and initials: SF

Bone marrow mesenchymal cells (* different expression respect to Cornea/CEC)



Saggi di funzionalità del processo necessiteranno poi di un test di vitalità cellulare.

Questo il saggio ritenuto più performante tra quelli testati (saggio su cornea da donatore):



*Esempio di live/dead test su membrana da donatore cadavere
Sulle pieghe naturali della membrana si evidenziano, come attese, cellule con mortalità (rosse).*

Nel corso del 2024 ITS ha poi inviato a FBOV i primi campioni/prototipi da analizzare. Sono tuttavia stati riscontrati alcuni problemi che hanno inficiato le analisi eseguite in FBOV, ossia:

- la prima volta i campioni sono arrivati a secco, il contenitore non era ideale al trasporto e il liquido di conservazione è fuoriuscito lasciando a secco il campione;
- i campioni sono arrivati con poche cellule adese; si sono evidenziate ancora problematiche di adesione nel protocollo utilizzato, problematiche che si accentuano durante il trasporto.

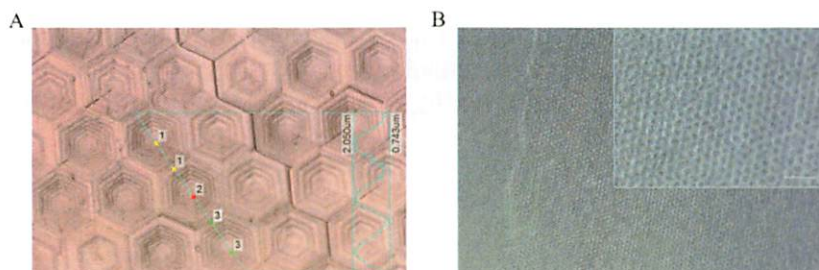
Sono attualmente in corso ulteriori test atti ad ottimizzare ulteriormente il protocollo cellulare in uso (aumento delle capacità adesive delle cellule allo scaffold). Una volta risolte tali problematiche, IPT invierà a FBOV nuovi prototipi per nuovi test.

→ WP3: Scaffold 3D per la rigenerazione dell'endotelio corneale in pazienti affetti da distrofia di Fuchs

In questo gruppo di lavoro rientrano due filoni di ricerca portati avanti nel nostro laboratorio nel corso di questo biennio e di seguito descritti:

→ la collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Skazik-Voogt Claudia e della Dott.ssa Angela Gutermuth di Aachen prima descritto al WP2.

Il progetto di rigenerazione dell'endotelio corneale del gruppo tedesco prevede infatti l'utilizzo di uno scaffold biomimetico stampato in 3D sul "calco" di una Descemet fisiologica a bassa densità. Secondo i loro studi, la morfologia della membrana oltre a favorire il transdifferenziamento cellulare (da NCC a endoteliali corneali) frena l'aumento di dimensioni cellulari favorendo il mantenimento a lungo termine di basse densità cellulari.



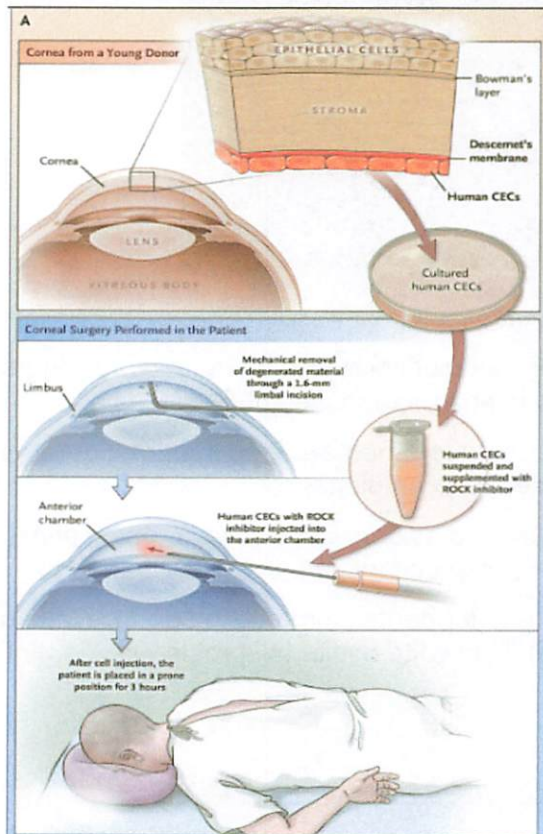
A) CLSM image of PDMS imprinted with Descemet like Topography (DLT) showing hexagonal elevations.

SF

→ Facciamo rientrare in questo gruppo di lavoro anche un ulteriore studio avviato in laboratorio chiamato internamente *P0 cells injection*.

Gli studi precedentemente illustrati (ricerca intermedia 2022 e WP1 del biennio 2023-4) hanno messo in evidenza come ci siano importanti impedimenti all'ottenimento in vitro di colture cellulari ad alte densità, soprattutto quando vengono utilizzate come *starting material* cornee provenienti da donatore anziano e con basse densità. A testimoniare ciò, il fatto che non esistano ancora terapie cellulari per l'endotelio corneale. Da notare tuttavia che tali studi sono sempre stati condotti su colture ottenute su piastre per colture cellulari.

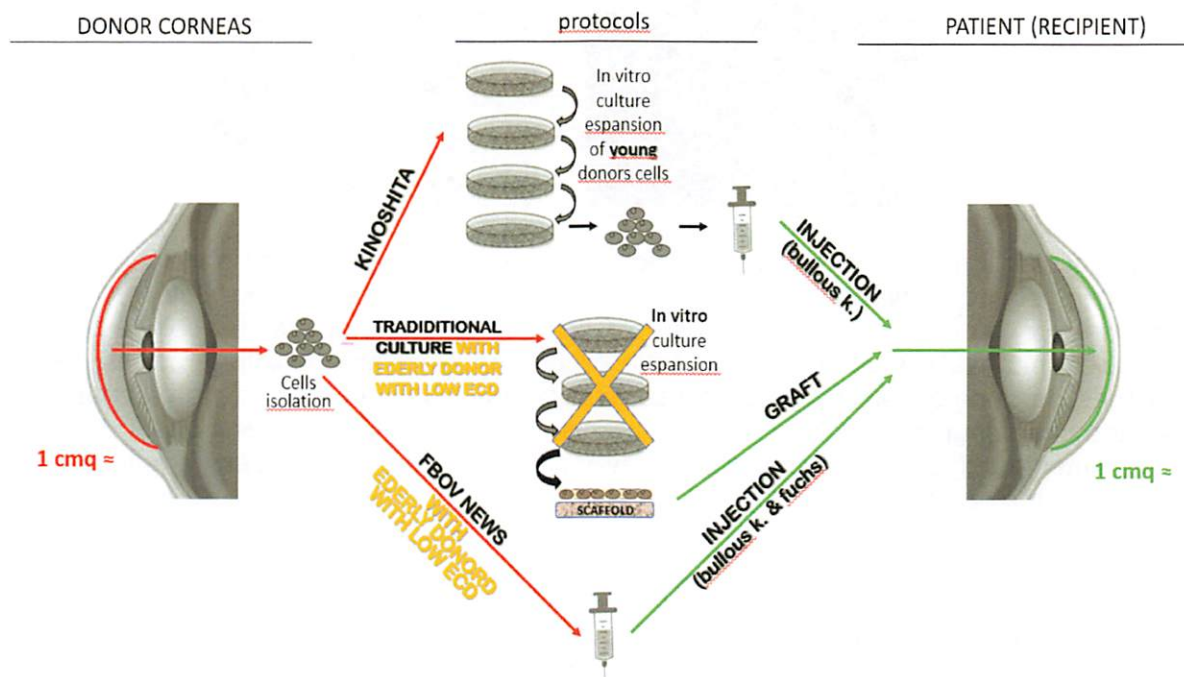
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29539291/>



Attualmente l'unica terapia cellulare disponibile per pazienti affetti da scompensi endoteliali e quella messa a punto dal gruppo del chirurgo/ricercatore giapponese Shigeru Kinoshita e Naoki Okumura (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29539291/> e <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32898516/>). Tale protocollo si distacca fortemente dai protocolli precedentemente illustrati in quanto prevede l'espansione in vitro per alcuni passaggi di cellule corneali endoteliali, queste cellule vengono poi applicate su paziente mediante iniezione in camera posteriore e previa rimozione delle cellule/tessuto malato. Vengono espanse esclusivamente cellule provenienti da donatore bambino. I pazienti trattati fino ad oggi, presentano un follow-up molto incoraggiante. Il trial clinico, partito sia su pazienti affetti da Fuchs sia su pazienti affetti da bullosa (rispettivamente con e senza rimozione della membrana di Descemet pre iniezione delle cellule), sta ora proseguendo solo su pazienti affetti da bullosa vista la sua maggiore efficacia. L'applicazione di questo protocollo divide l'opinione pubblica relativamente la sua sicurezza: il dubbio che viene sollevato è relativo all'elevato numero di cellule iniettate e quindi sul destino delle cellule che non riescono ad aderire ma che potrebbero essere messe in circolo tramite i trabecolati.

Sulla base dell'esperienza di Kinoshita abbiamo messo a punto un nuovo protocollo. Come già evidenziato, il goal di FBOV è quel di ottimizzare il processo trapianto cornea della banca mettendo a punto un protocollo di terapia cellulare in grado di usare le cornee scartate dal processo, che sono per la percentuale maggiore cornee da donatore anziano con basse densità (inferiore alle 2000 cellule per millimetro quadrato). Dimostrato pertanto che, partendo da cornee da donatore a basse densità non è possibile ottenere in vitro (su piastre per colture cellulari) colture cellulari ad alta densità (a meno che non si poollino più cornee da più donatori), abbiamo verificato se questo sia possibile mediante la tecnica dell'injection messa a punto da Kinoshita.

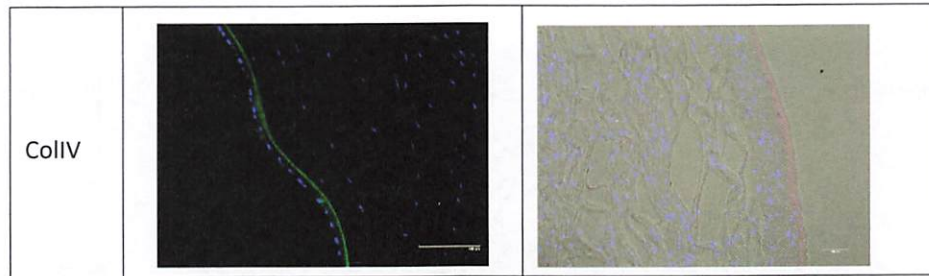
Nei nostri test l'injection di Kinoshita è stata mimata ex vivo con il piastramento su cornea da donatore. Entrando nei dettagli, poiché le cellule endoteliali corneali proveniente da donatore anziano non possono essere moltiplicate in vitro, abbiamo iniettato direttamente le cellule isolate dalle cornee.



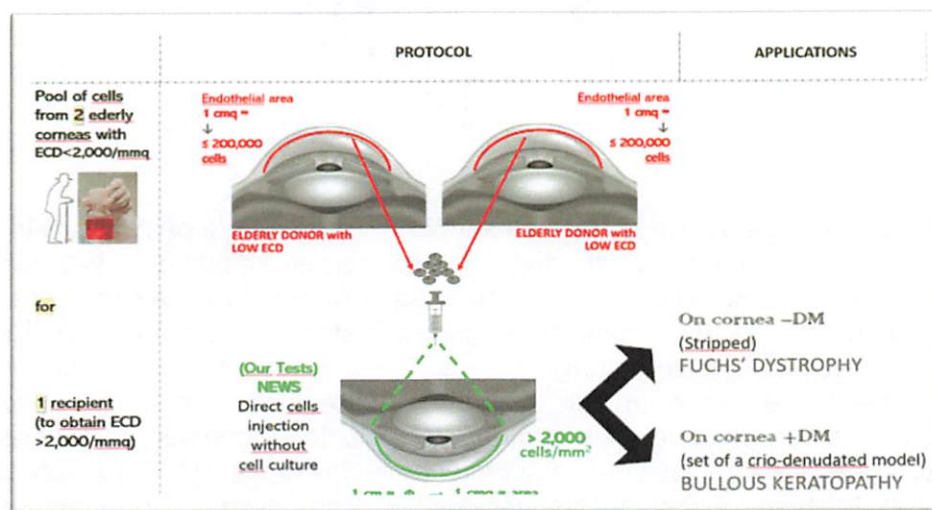
Al fine di soddisfare le esigenze sia di pazienti affetti da Fuchs che di pazienti affetti da bullosa, il piastramento è avvenuto in parallelo rispettivamente su cornee strippate (private sia delle cellule dell'endotelio che della membrana di Descemet) e su cornee solo decellularizzate (private solo delle cellule dell'endotelio, la membrana di Descemet è stata lasciata integra sul tessuto). Non disponendo dello speciale attrezzo chirurgico utilizzato da Kinoshita per la rimozione in vivo del monolayer endoteliale, e' stato quindi prima di tutto messo a punto una tecnica di decellularizzazione: le cornee sono state crio-denuotate mediante contatto sulla cavità endoteliale della cornea di ancorette magnetiche precedentemente messe a -80°C (9 applicazioni da 30 secondi ciascuna). I test eseguiti sui tessuti così trattati hanno evidenziato la completa rimozione delle cellule (negatività al DAPI) e l'integrità dell'intero tessuto post trattamento, membrana di Descemet compresa (espressione dei principali marcatori molecolari della membrana). Questi i risultati della validazione:

	K (CORNEA NON TRATTATA)	CORNEA CRIODENUDATA
LAM 5		
Col8A		

SF R

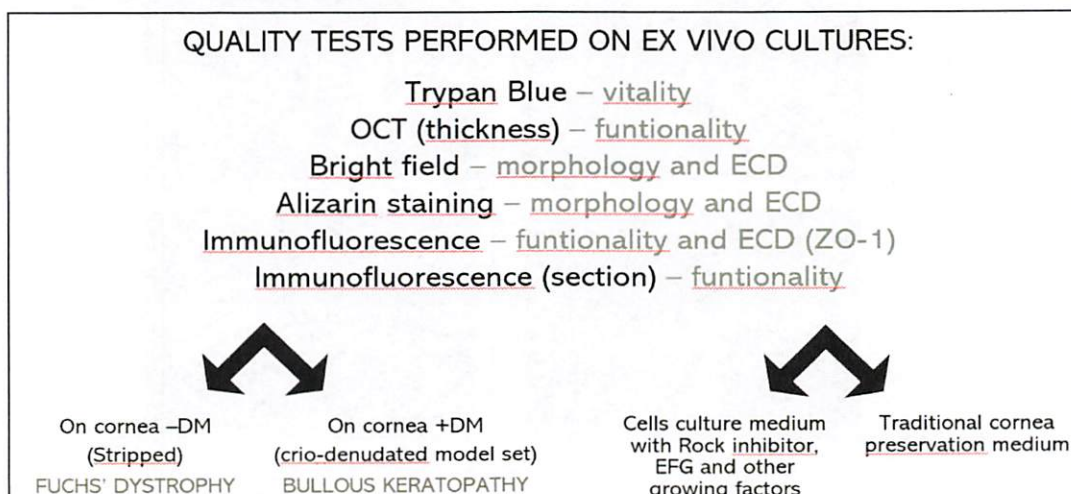


Una volta validato il modello di crio-denudazione, abbiamo mimato ex-vivo l'iniezione delle cellule. Per iniziare abbiamo seminato in rapporto 2:1 (le cellule di 2 cornee sono state seminate in 1 cornea ricevente), condizione che in vitro su plastica non permette di ottenere colture con ECD > 2000 cellule/mm². Nello specifico, per ciascun esperimento abbiamo isolato le cellule endoteliali da 4 cornee da donatore anziano con basse densità e le abbiamo equamente piastrate su due tessuti, uno crio-denudato (mimando quanto avviene in chirurgia per i pazienti affetti da Fuchs) e uno normalmente strappato (mimando quanto avviene in chirurgia per i pazienti affetti da bullosa). Questo lo schema dei test allestiti:

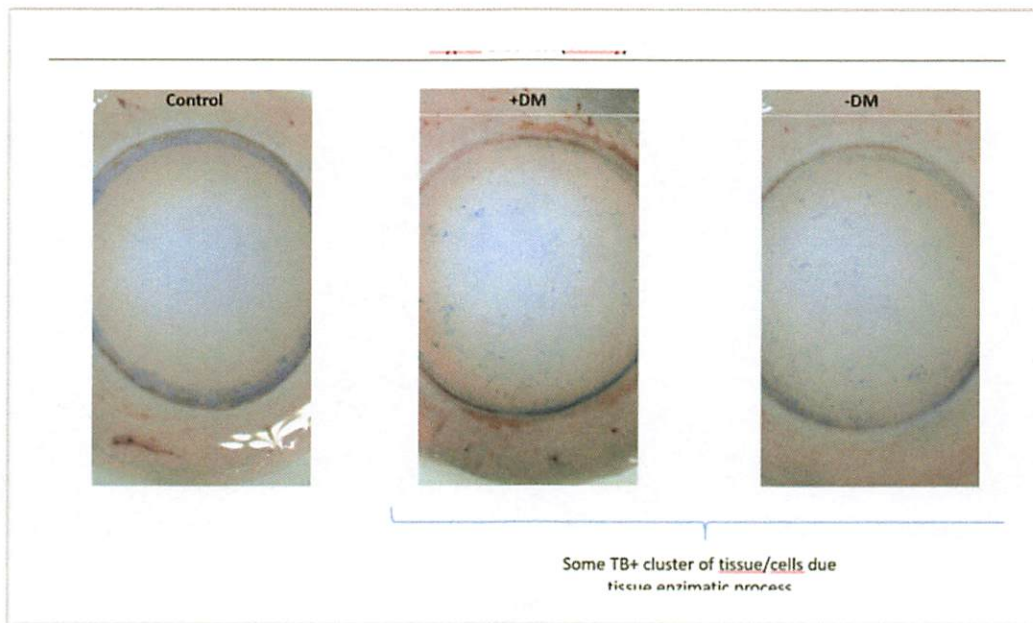


Le cornee così ingegnerizzate sono state tenute in coltura sia utilizzando il terreno standard per colture endoteliali corneali prima descritto, sia il terreno standard di mantenimento a caldo delle cornee (Storagix). Questo per verificare se fattori di crescita comunemente utilizzati nella coltura delle cellule dell'endotelio corneale (quali Rock inhibitor, EGF, bFGF, ecc) siano indispensabili o meno. Il test ad oggi è stato ripetuto 6 volte (n=6), 3 volte per ciascun terreno.

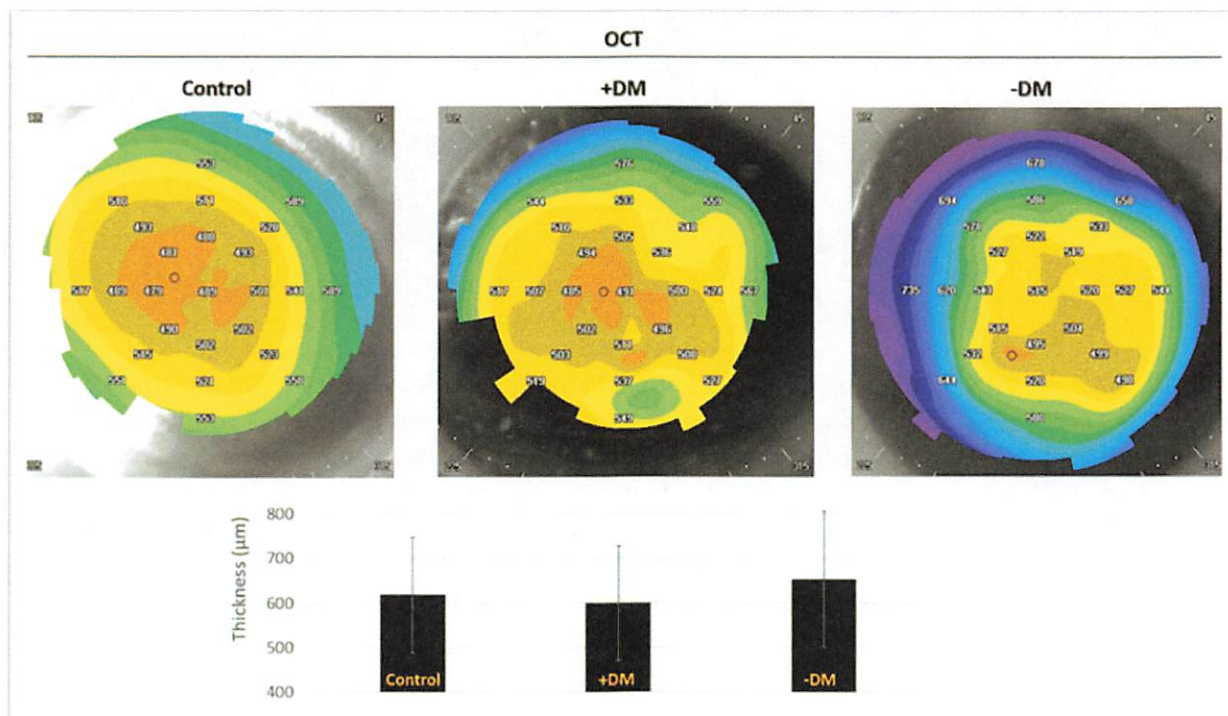
Dopo circa 20 giorni di coltura sono stati eseguiti i seguenti saggi per verificare la qualità del tessuto ingegnerizzato così ottenuto:



E questi i risultati ottenuti nei primi preliminari esperimenti eseguiti fino ad oggi:

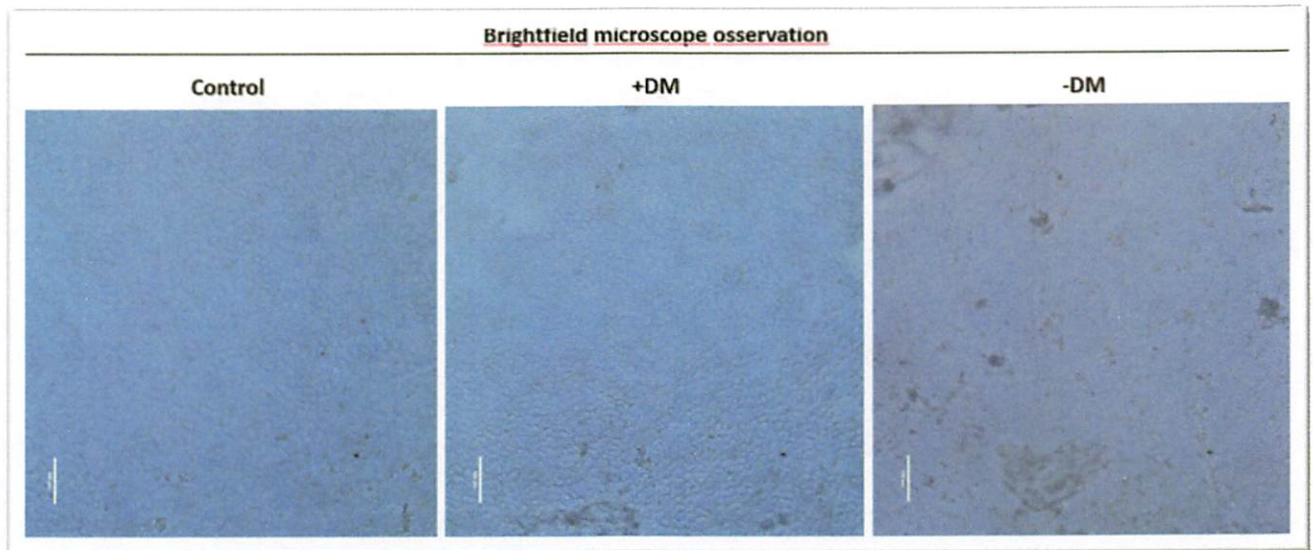


Staining con Trypan Blue (test vitalità cellulare) - Commento: buon risultato (simile al fisiologico). Nei due tessuti ingegnerizzati sono evidenti dei punti blu che sono frammenti di membrana derivati dal piastramento e che sono ancora adesi.

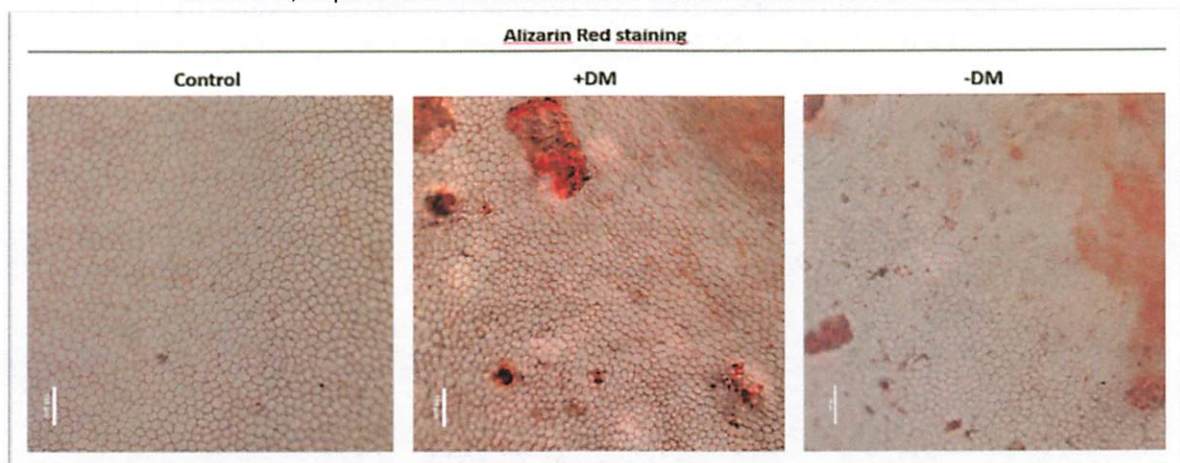


Saggio OCT - Commento: spessore normale, buona funzionalità dell'endotelio ingegnerizzato.

SF



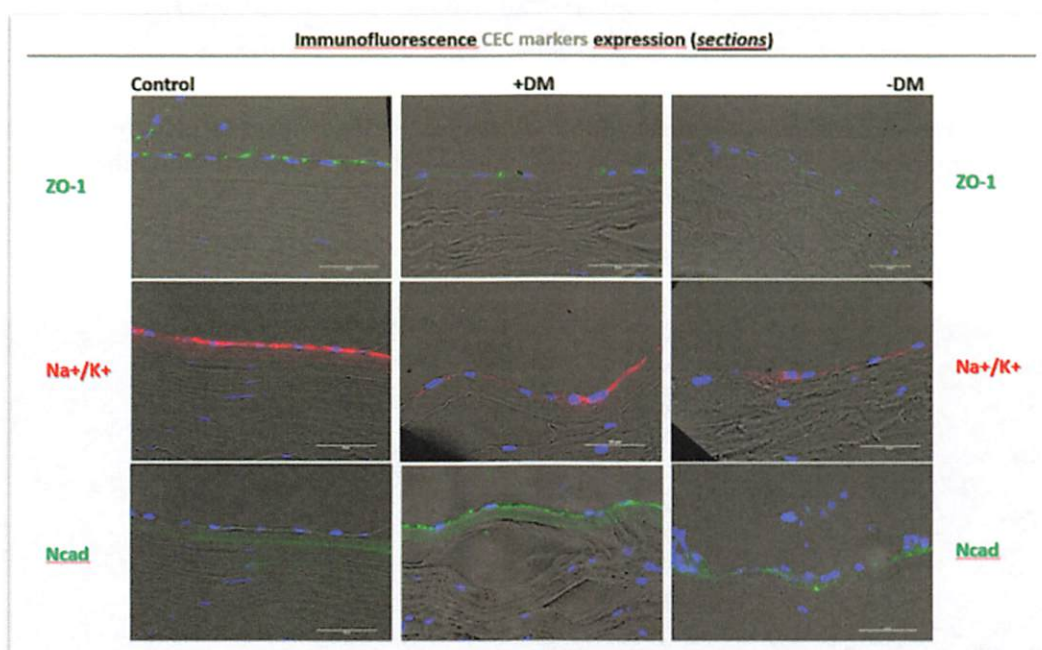
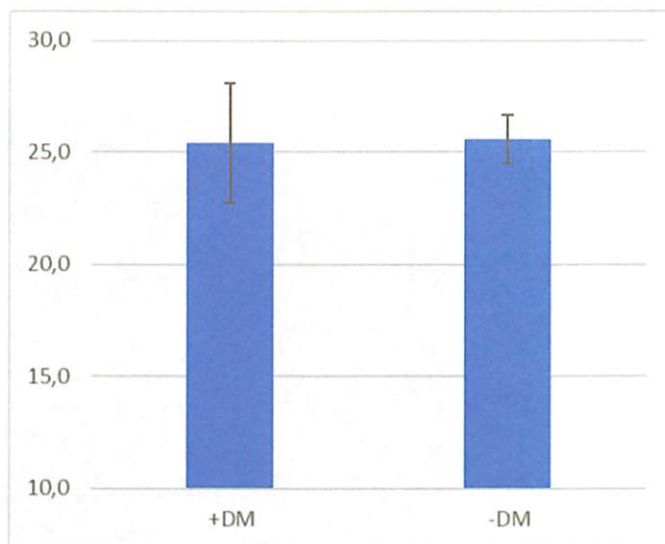
Osservazione dell'endotelio al microscopio ottico - Commento: nelle due condizioni ingegnerizzate è spesso difficile visualizzare le cellule, i margini affaticano a gonfiarsi in modo uniforme, soprattutto nella condizione senza membrana di Descemet.



Staining con Alizarin Red al fine di evidenziare la morfologia cellulare e facilitare la conta cellulare (ECD) - Commento: monolayer regolare come nel controllo. Le due condizioni ingegnerizzate (+DM e -DM) presentano aree con variazioni di densità dovute alla presenza dei frammenti di tessuto (la densità è più alta dove ci sono i frammenti di tessuto, come succede anche in colture cellulari su plastica a causa del rilascio del frammento di cellule non distaccate dall'enzima). L'esperienza con le colture cellulari in vitro dimostra che tale effetto va uniformandosi aumentando i tempi di coltura e quindi dando tempo al tessuto di riorganizzarsi.

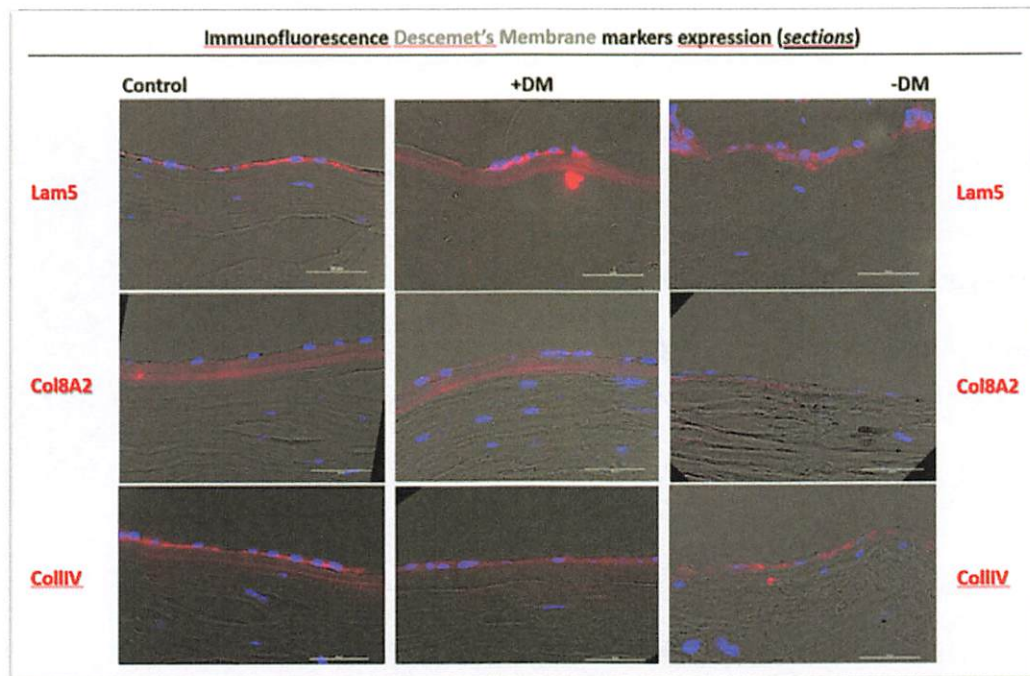
La densità cellulare (calcolata dallo staining con Alizarin Red) è superiore alle 2000 cellule per millimetro quadrato.

Nessuna variazione apparente tra le due condizioni testate (con e senza Descemet Membrane, ossia +DM e -DM).

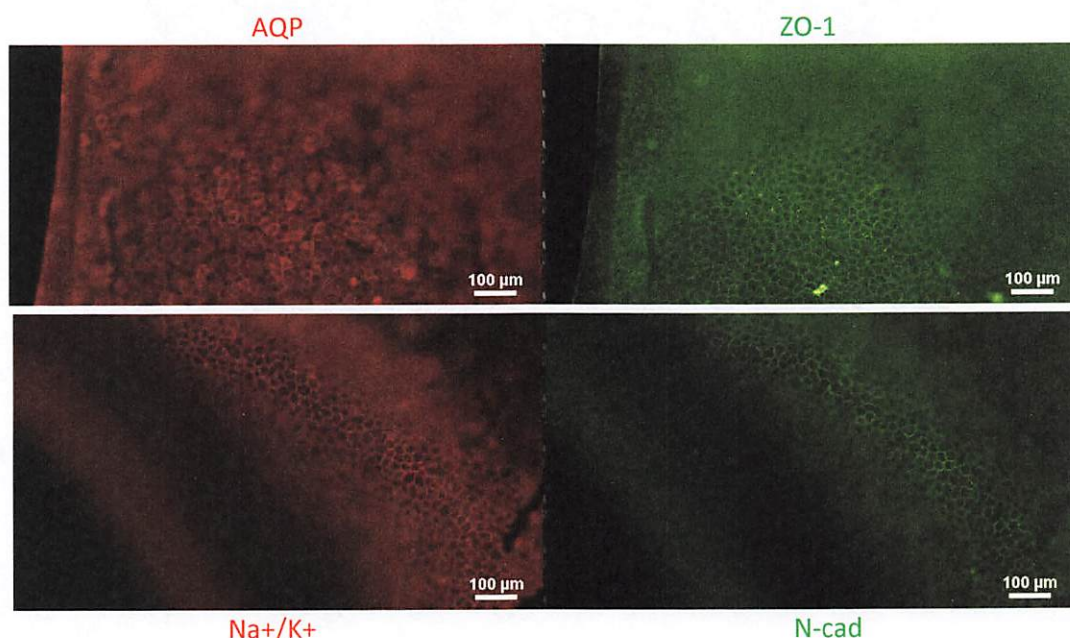


Immunofluorescenza su sezioni di tessuto - Commento: i tessuti ingegnerizzati esprimono i principali marcatori endoteliali (Zo-1, Na⁺/K⁺-ATPasi e N-cadherin), sia in presenza che assenza della membrana di Descemet (+DM e -DM). Nuclei in blu (DAPI staining).


 SF



Immunofluorescenza su sezioni di tessuto - Commento: i tessuti ingegnerizzati esprimono i principali marcatori molecolari endoteliali, sia in presenza che assenza della membrana di Descemet (+DM e -DM).
Nuclei in blu (DAPI staining)



Immunofluorescenza dei tessuti ingegnerizzati - Commento: i tessuti ingegnerizzati esprimono i principali marcatori endoteliali (Zo-1, Acquaporine, Na+/K+-ATPasi e N-cadherin), sia in presenza che assenza della membrana di Descemet (+DM e -DM).

I dati qui riportati si riferiscono solo a delle prove preliminari ma sembrano tuttavia molto incoraggianti, sia sulla condizione in presenza di membrana che in assenza, oltre che sia in terreno per colture cellulari addizionato di fattori di crescita che in terreno per il mantenimento a caldo delle cornee. Questo denota due importanti considerazioni: la tecnologia, se confermata, potrebbe essere applicata sia su pazienti affetti da Fuchs, sia su pazienti affetti da bullosa, le cellule non necessitano di particolari stimoli per riorganizzarsi a ricostruire il monolayer cellulare.

Molti dei parametri ottenuti sono in fatti indicativi di un buon funzionamento dell'endotelio rigenerato: densità cellulare superiore alle 2000, spessore corneale (OCT) fisiologico ed espressioni dei marcatori funzionali endoteliali. Due invece i parametri discutibili: all'osservazione morfologica in bright-field in soluzione di saccarosio le cellule affaticano a gonfiarsi e sono difficilmente osservabili, la densità media è superiore alle 2000 cellule per millimetro quadrato ma non è omogenea. Da considerare tuttavia che, qualora l'approccio fosse applicato in vivo su paziente, l'osservazione al microscopio non sarebbe necessaria e la densità cellulare è destinata ad uniformarsi nel tempo (dato che andrebbe cmq confermato con test specifici).

Sono attualmente in corso ulteriori test per confermare ed approfondire i risultati ottenuti qui mostrati, altri sono in corso atti a migliorare/approfondire le applicazioni pratiche di questa tecnologia:

→ un'eventuale applicazione in vivo su paziente della tecnologia non vedrebbe la rimozione dell'intero endotelio (come fatto in questi esperimenti) ma solo della porzione centrale (come avviene nella tradizionale chirurgia di Fuchs e di bullosa). Sono in corso test con questa variazione nel protocollo. Questo potrebbe andare ulteriormente ad aumentare la densità cellulare.

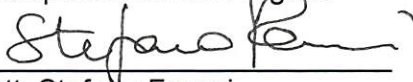
→ I pazienti che potrebbero beneficiare di questa tecnologia sono pazienti con densità molto basse (anche sotto le 1000 cellule per mmq), nei test precedenti abbiamo invece ingegnerizzato cornee con basse densità sì (< di 2000 cellule / mmq) ma cmq non così vicine al modello reale. Sono in corso test con questa variazione nel protocollo. Il risultato non è scontato dal momento che un tessuto scompensato potrebbe non essere in grado di supportare un buon endotelio.

Riteniamo che l'applicazione chirurgica di questa tecnologia potrebbe presentare alcuni vantaggi rispetto alla tecnica proposta da Kinoshita. Ossia: le cellule da donatore anziano non replicano, quindi il fattore sicurezza è molto mitigato in quanto un eventuale ricircolo tramite trabecolati non avrebbe nessuna potenziale conseguenza; può essere ottimizzato il processo trapianto; potrebbe funzionare oltre che su pazienti affetti da bullosa anche su pazienti affetti da distrofia di Fuchs.

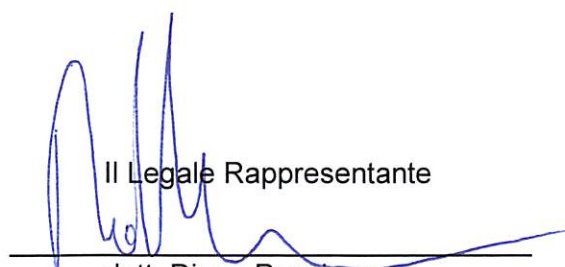
Le premesse sono pertanto molto incoraggianti, ma ulteriori approfondimenti devono seguire.

Zelarino 19 marzo 2025

Il Responsabile del Progetto


Dott. Stefano Ferrari

Il Legale Rappresentante


dott. Diego Ponzin

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

Il Legale Rappresentante


Dott. Diego Ponzin