



Ministero dell'Università e della Ricerca

Direzione generale della ricerca

RICEVUTA DI AVVENUTO RENDICONTO DI SPESA

CINQUE PER MILLE

ENTI DELLA RICERCA SCIENTIFICA E DELL'UNIVERSITÀ

ANNO FINANZIARIO

2024

L'utente: Daniela Andreazza (C.F. NDRDNL67H41L736Y) ha inoltrato in data 10/11/2025 alle 13:37:54 la richiesta di rendiconto 5x1000 per l'anno 2024 per conto di :

Denominazione: FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI DEL VENETO ETS

Codice fiscale: 02320670272

Codice protocollo: 5X1000_9990132_2024



Ministero dell'Università e della Ricerca

Direzione generale della ricerca

**RENDICONTO DI SPESA
CINQUE PER MILLE
ENTI DELLA RICERCA SCIENTIFICA E DELL'UNIVERSITÀ**

ANNO FINANZIARIO

2024

ANAGRAFICA ENTE BENEFICIARIO

Denominazione Ente	FONDAZIONE BANCA DEGLI OCCHI DEL VENETO ETS
Codice fiscale	02320670272
Sede legale - Provincia	VE
Sede legale - Comune	VENEZIA
Sede legale - Indirizzo	VIA PACCAGNELLA 11
Sede legale - CAP	30174
Indirizzo PEC	fbov@pec.fbov.it
Scopo dell'attività sociale	Promozione, sviluppo, organizzazione delle attività di prelievo; 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; Elaborazione e messa a disposizione di Enti e Istituti autorizzati dei dati clinici acquisiti; Promozione della ricerca e degli studi nel campo della chirurgia corneale, anche in collaborazione con Istituti Universitari e ULSS
Link di pubblicazione del rendiconto	https://www.fbov.org/rendicontazione-5permille

SPESE SOSTENUTE

Voci di spesa	Costo complessivo (€)	Quota finanziata 5x1000
Di funzionamento	44.441,66 €	19.547,66 €
Risorse umane	24.894,00 €	0,00 €
Acquisto beni e servizi	19.547,66 €	19.547,66 €
Altre voci di spesa	3.142,23 €	3.018,63 €
Fondi accantonati	0,00 €	0,00 €
Totale	47.583,89 €	22.566,29 €

Utilizzo fondi accantonati l'anno precedente: 0,00 €

Il Legale Rappresentante

(Firma digitale)

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

Firmato digitalmente da:
DIEGO PONZIN
Data: 10/11/2025 13:34:24

RELAZIONE FINALE DEL PROGETTO
“NUOVI UTILIZZI DELLA MEMBRANA DI DESCOMET PER LE PATOLOGIE
RETINICHE”

FINANZIATO CON I FONDI 5X1000 RELATIVI ALL'ANNO 2023 - MUR

INTRODUZIONE

La retina è il tessuto che ricopre la superficie interna dell'occhio ed è responsabile della ricezione degli stimoli luminosi e della loro trasformazione in impulsi nervosi. Assolvono a questa funzione i fotorecettori, cellule fotosensibili che trasmettono il loro segnale alla rete neuronale sottostante che confluisce nel nervo ottico. L'insorgenza di questo potenziale d'azione è possibile grazie alla presenza di molecole cromofore all'interno dei fotorecettori, che sono i protagonisti del cosiddetto “ciclo visivo”. Il metabolismo dei cromofori è regolato dalle cellule dell'epitelio pigmentato retinico (EPR), situate all'interfaccia tra il tessuto neuronale e la rete coriocalpillare sottostante e, come tale, responsabili del suo nutrimento e funzionalità.

Numerose sono le patologie che interessano la retina, che nelle forme più gravi possono comportare la perdita completa e irreversibile della vista nei soggetti anziani. La più frequente è la degenerazione maculare legata all'età, di cui esistono due forme con eziologie e decorso differenti:

- una forma umida, che è causata da un'eccessiva neovascolarizzazione della tunica coroidea, che può essere tenuta sotto controllo con una terapia rivolta contro il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF);
- una forma secca, in cui un danneggiamento dell'EPR comporta l'accumulo di prodotti di scarto dei fotorecettori e la formazione di drusen.

Per la forma secca l'unica via risolutiva efficace è costituita dalla sostituzione della porzione di EPR danneggiato con del tessuto sano. Tale tessuto dovrebbe essere ricreato su una matrice biocompatibile e biodegradabile, che si integri col tessuto nativo e permetta di colmare il danno senza generare fibrosi.

Un altro tipo di patologia retinica che prevede un danno che interessa l'EPR oltre che il tessuto neuronale adiacente è il foro maculare a tutto spessore (FTMH). I FTMH sono delle rotture individuabili nella regione centrale della retina, ovvero la macula. La terapia chirurgica attualmente prevede l'utilizzo di diverse matrici da impiantare per la chiusura del difetto, come lembi di membrana interna limitante o di capsula del cristallino, o membrana amniotica. Tuttavia questi tessuti sono spesso di difficile reperimento, oppure possiedono delle caratteristiche fisiche (come adesività o fragilità) che rendono difficile per il chirurgo maneggiarli.

La membrana di Descemet costituisce la membrana basale dell'endotelio corneale. Ha uno spessore di circa 12 μm nei soggetti adulti ed è composta da una rete proteica a base di collagene, elastina, glicoproteine e proteoglicani. In essa sono presenti molti componenti che la rendono una perfetta nicchia extracellulare e, in quanto tale, ben si presta a fungere da scaffold per la ricostruzione dell'EPR o graft per la chiusura di FTMH. Attualmente la membrana di Descemet trova impiego ad esempio nella cheratoplastica DMEK (Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty), un intervento in cui l'endotelio danneggiato del paziente viene rimpiazzato dal complesso formato dalla membrana e dell'endotelio isolati da una cornea da donatore con adeguata densità endoteliale. La procedura di stripping della membrana unita all'endotelio è pertanto già pratica comune nelle banche degli occhi, il che rende queste membrane facilmente reperibili e disponibili per la chirurgia e per le applicazioni *in vitro*.

SCOPO DEL PROGETTO

Scopo del progetto è la messa a punto di una metodologia di decellularizzazione della membrana di Descemet, la caratterizzazione della matrice extracellulare e il suo utilizzo come scaffold per la chiusura dei fori maculari o per la ricostruzione dell'EPR.

RISULTATI

Di seguito verranno descritti i risultati ottenuti per il raggiungimento dei due obiettivi indicati nella sezione precedente.

1. Produzione di membrana di Descemet decellularizzata per la chirurgia del foro maculare

Lo stripping del complesso formato dall'endotelio corneale e la sua membrana basale dal resto dell'anello corneosclerale è una procedura comunemente adottata da chirurghi e banche degli occhi per i suoi utilizzi ad esempio in chirurgia DMEK. L'obiettivo del progetto è stato quello di sottoporre tale complesso al processo di decellularizzazione per isolarne la matrice extracellulare, corrispondente alla membrana di Descemet. Si tratta di una matrice composta prevalentemente da collagene, elastina, glicoproteine e proteoglicani, dallo spessore di circa 12 μm . Per ottenere la rimozione completa del materiale cellulare mantenendo l'integrità di una membrana così delicata, dopo lo stripping gli endoteli sono state immersi in acqua per iniettabili in agitazione per due ore, sfruttando il principio della lisi cellulare causata da shock osmotico.

Un indicatore dell'effettiva eliminazione delle cellule dal tessuto è l'abbattimento della quantità di DNA inizialmente presente. La quantificazione dell'acido nucleico ha mostrato che circa il 99% del DNA è stato efficacemente rimosso dal processo di decellularizzazione, mantenendo una quantità residua pari a 28.90 ± 9.86 ng/mg di tessuto secco. L'analisi elettroforetica del DNA residuo isolato dai tessuti dopo decellularizzazione ha confermato che non permangono frammenti di lunghezza superiore alle 200 paia di basi (**Figura 1**).

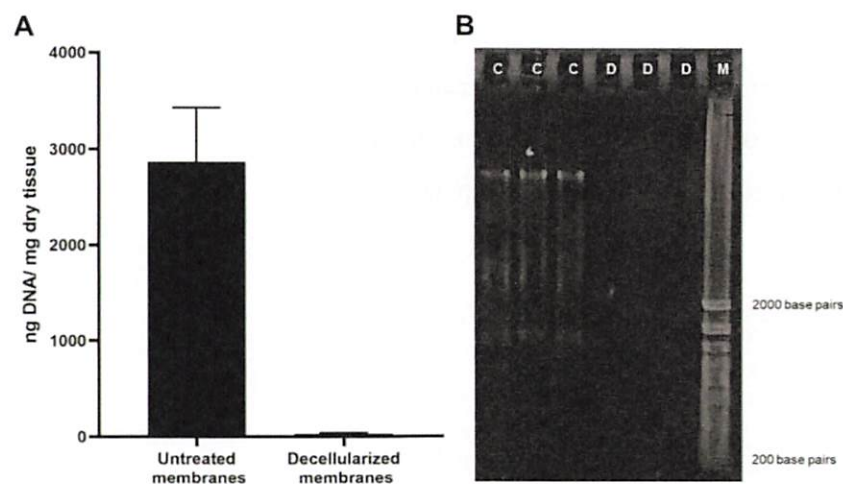


Figura 1. Analisi del DNA residuo dopo decellularizzazione della membrana di Descemet. A: quantificazione del DNA residuo nelle membrane decellularizzate a confronto con quello presente in membrane di controllo non trattate. B: corsa elettroforetica del DNA estratto da tre membrane di controllo (C) e decellularizzate (D). Un marcatore (M) con range da 2000 a 100 paia di basi è stato utilizzato per risalire alla lunghezza dei frammenti di DNA visibili.

L'analisi in immunofluorescenza per i componenti della membrana di Descemet (collagene di tipo VIII, IV e I, elastina, fibronectina, laminina e il proteoglicano HSPG2) ha mostrato come la struttura non sia stata modificata dal processo di decellularizzazione e come invece i componenti abbiano mantenuto la loro localizzazione. I componenti citoplasmatici sono invece stati rimossi (**Figura 2**).

Il protocollo di decellularizzazione si è perciò rivelato efficace per l'isolamento della membrana di Descemet secondo i requisiti dell'European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), che prevede di dimostrare l'assenza di materiale cellulare e genetico e l'integrità della matrice di un tessuto destinato a trapianto. L'obiettivo è quello di garantire l'assenza di rischi per il paziente ricevente, e a tal fine è stata anche condotta un'analisi del rischio utilizzando l'EuroGTP Tool per la valutazione dei rischi associati a tutte le fasi del processo. La rimozione del materiale genetico del donatore riduce il rischio di reazioni immunitarie indesiderate nel ricevente che possono compromettere la riuscita del trapianto; in aggiunta, l'utilizzo di sola acqua per iniettabili come agente decellularizzante garantisce che nel prodotto finale non permangano residui di reagenti potenzialmente tossici per il ricevente. La membrana di Descemet è già ampiamente utilizzata in chirurgia oculare e il suo isolamento avviene secondo gli elevati standard di qualità propri della Banca degli occhi. Per i suddetti motivi il Centro Nazionale Trapianti ha rilasciato l'autorizzazione alla produzione e distribuzione della membrana di Descemet decellularizzata per la chirurgia del foro maculare, una patologia caratterizzata da un danno nella regione centrale della retina che beneficia dell'applicazione di una matrice che faccia da scaffold per la sua rigenerazione.

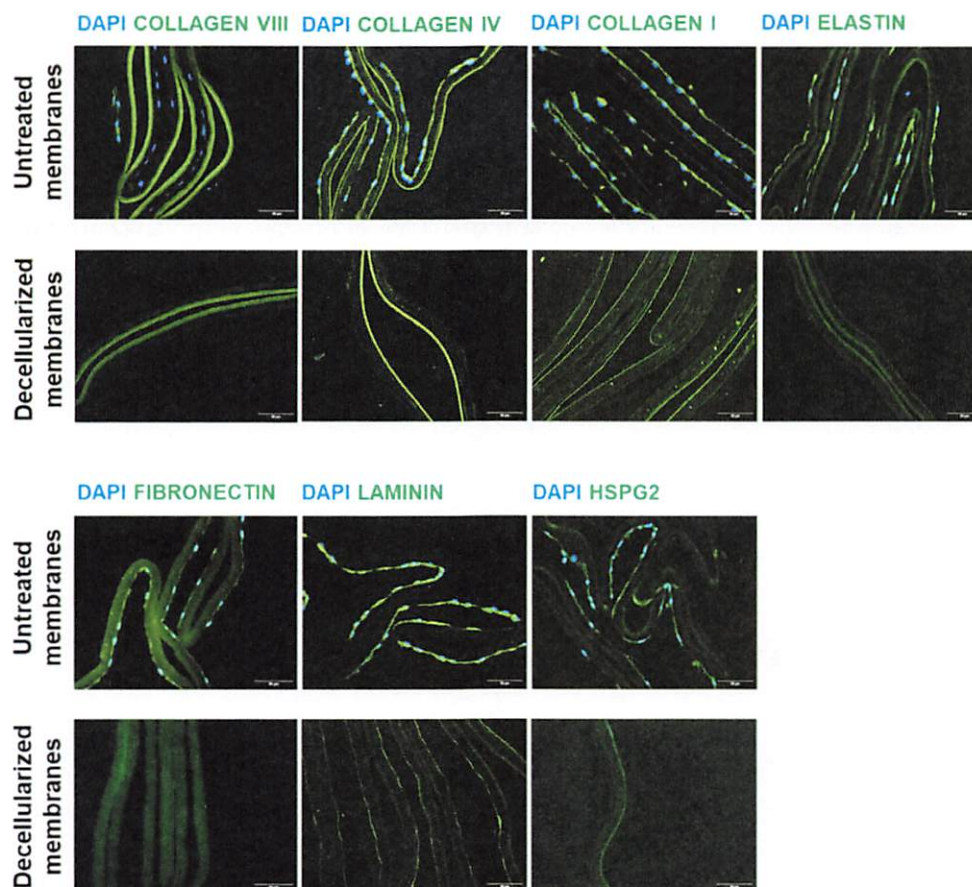


Figura 2. Componenti della membrana di Descemet. Il pannello mostra lo staining per collagene di tipo VIII, IV, I, elastina, fibronectina, laminina e HSPG2 in membrane decellularizzate e membrane non trattate di controllo. I nuclei sono marcati con 4', 6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Scale bar: 50 μ m.

2. Utilizzo della membrana di Descemet come scaffold per la ricostruzione dell'epitelio pigmentato retinico

Il secondo obiettivo del progetto è stato quello di testare la fattibilità dell'utilizzo della membrana di Descemet come scaffold per la ricostruzione dell'epitelio pigmentato retinico (EPR). A tal fine è stato utilizzato un protocollo di differenziamento di cellule EPR a partire da una linea di cellule staminali embrionali (hESC). Il protocollo selezionato si basava sulla modulazione delle vie di segnale di WNT, TGF β , BMP e IGF-1 ottenuta inserendo opportuni supplementi ed inibitori nel terreno di coltura delle cellule al fine di indurre prima un fenotipo di neuroectoderma e successivamente quello di cellule EPR

immature. La maturazione delle cellule EPR è stata completata mediante coltura su uno scaffold costituito da membrana di Descemet isolata mediante il protocollo di decellularizzazione precedentemente descritto. La formazione di un epitelio funzionale è stata verificata mediante il monitoraggio della resistenza elettrica transepiteliale (TEER). In particolare un aumento della TEER sopra un valore di $400 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ è indice della formazione di un epitelio polarizzato e funzionale, le cui cellule sono collegate da giunzioni strette. Tale valore è stato raggiunto in circa 5 settimane dagli epiteli formati da cellule EPR coltivate su membrana di Descemet, mentre non si registra un aumento della TEER nel tempo nel caso di cellule che non formano giunzioni strette, come i fibroblasti (**Figura 3**).

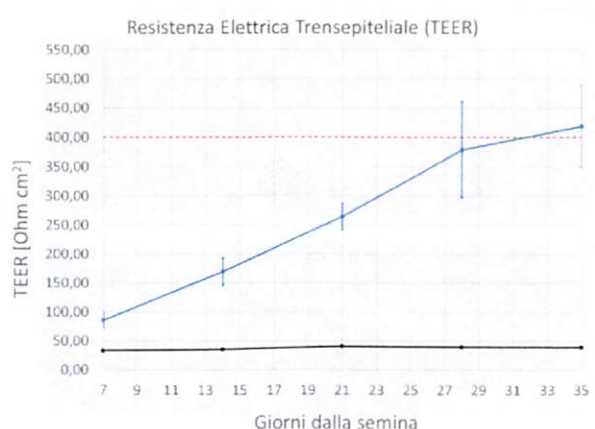


Figura 3. Monitoraggio della TEER in cellule EPR differenziate a partire da hESC. Blu: valori di TEER rilevati a 7, 14, 21, 28 e 35 giorni dalla semina delle cellule EPR su membrana di Descemet. Nero: controllo negativo, ovvero valori di TEER misurati negli stessi giorni per fibroblasti seminati su membrana.

Per verificare il completamento del differenziamento delle cellule RPE è stata valutata l'espressione dei marcatori caratterizzanti il fenotipo RPE: ZO1, che indica la formazione delle giunzioni strette; phosphoezrin (P-ezrin), localizzata nei microvilli e perciò indica la corretta polarizzazione apicale delle cellule; proteine legate alla funzionalità delle cellule EPR, come bestrophin e RPE65; proteine legate allo sviluppo della pigmentazione, come MITF, TYRP1 e PMEL (**Figura 4**).

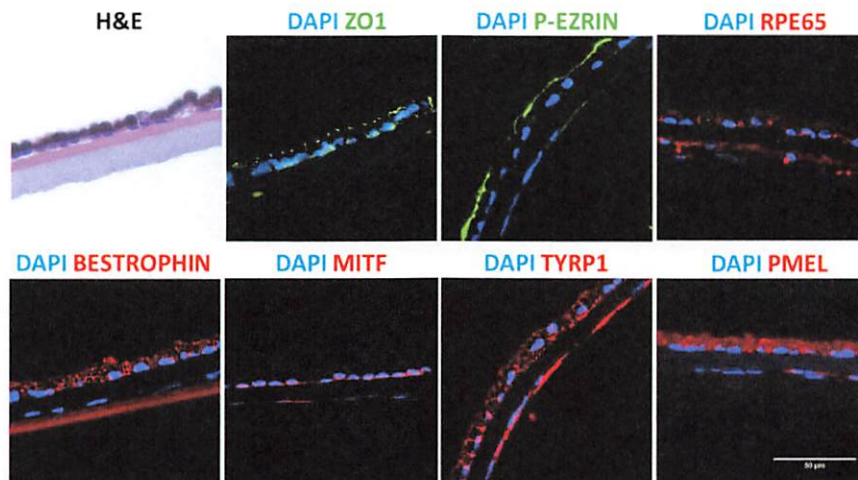


Figura 4. Struttura e marcatori del fenotipo EPR in cellule differenziate su membrana di Descemet. Staining con ematossilina ed eosina (H&E) ed immunofluorescenza per ZO1, P-ezrin, RPE65, bestrophin, MITF, TYRP1, PMEL degli epiteli coltivati per 35 giorni su membrana di Descemet. I nuclei sono stati marcati con DAPI. Scale bar: 50 µm.

CONCLUSIONI

In conclusione, il differenziamento di cellule hESC su membrana di Descemet ha portato alla produzione di cellule EPR esprimenti tutti i principali marcatori del fenotipo maturo, che si uniscono in un monostrato tramite giunzioni occludenti creando un epitelio funzionale. Questo setup potrà essere in futuro replicato con cellule EPR derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), con l'obiettivo di arrivare a un trapianto autologo di EPR, che rappresenterà una nuova speranza per i pazienti affetti da degenerazione maculare senile.

Il progetto di ricerca è finanziato anche con il contributo 5xMille A.F. 2023 Enti della Ricerca Sanitaria (Ministero della Salute).

Firmato digitalmente da:
DIEGO PONZIN
 Data: 03/11/2025 17:18:17