



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

**Rendiconto di spesa fondi 5 per mille  
Enti della Ricerca Scientifica**

**ANNO FINANZIARIO 2019<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	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.
Nominativo legale rappresentante	<b>Dott. GIUSEPPE DI FALCO</b>

**Contributo percepito**

Data percezione	<b>22 OTTOBRE 2020</b>
Importo	<b>18.940,31</b>

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



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

**“Degenerazione maculare della retina - sviluppo di un approccio terapeutico basato su innesto di cellule dell'epitelio pigmentato retinico”**

L'obiettivo del progetto risiede nella messa a punto di un prodotto di terapia cellulare (noto anche come Advanced Therapy Medicinal Product – ATMP) che possa offrire nuove opportunità nella cura della Degenerazione Maculare Senile della 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. 2 ricercatori senior (Ore dedicate * CMO) 2. ...	5.269,49	5.000,00
<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. ...	18.236,13	13.940,31
<b>ALTRE VOCI DI SPESA <sup>3</sup></b>		
<i>Dettaglio spese:</i> 1. Formazione e aggiornamento 2. ...	622,20	0
<b>ACCANTONAMENTI PROGETTI PLURIENNALI <sup>4</sup></b>		
<i>Dettaglio spese:</i> 1. ... 2. ...		

<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

<b>TOTALE</b>	<b>24.127,82</b>	<b>18.940,31</b>
---------------	------------------	------------------

Il seguente rendiconto è pubblicato al seguente indirizzo web

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

Zelarino, 8 luglio 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 2019  
Enti della Ricerca Scientifica**

**DEGENERAZIONE MACULARE DELLA RETINA - SVILUPPO DI UN APPROCCIO  
TERAPEUTICO BASATO SU INNESTO DI CELLULE DELL'EPITELIO PIGMENTATO  
RETINICO**

**Introduzione e scopi del progetto finanziato**

La degenerazione maculare senile (DMS) rappresenta la causa più comune di cecità nel mondo occidentale nella fascia di età superiore ai 60 anni. Attualmente, si riportano più di 150 milioni di persone affette a livello mondiale, un numero destinato ad aumentare nel corso degli anni.

Questa patologia multifattoriale colpisce la macula, regione centrale della retina responsabile della visione nitida e dettagliata. Il decorso è generalmente ad andamento progressivo e può portare alla perdita completa ed irreversibile della visione centrale.

La DMS può essere classificata in due forme, atrofica (*dry*) o essudativa (*wet*). La seconda, che colpisce circa il 10% dei casi di DMS, è caratterizzata da neovascolarizzazione coroidale. La formazione di nuovi capillari fragili sottostanti la retina può portare, nei casi più gravi, ad emorragia retinica.

La comprensione dei meccanismi molecolari alla base di questa forma essudativa di DMS ha portato allo sviluppo di farmaci anti-angiogenici, indirizzati a contrastare lo sviluppo di nuovi vasi. Tuttavia, non esiste al momento alcuna terapia valida per la forma atrofica, che colpisce la maggior parte dei pazienti affetti da DMS (circa il 90%). Questa forma si accompagna allo sviluppo di depositi di materiale proteico-lipidico conosciuti come "*drusen*", i quali si accumulano fra l'epitelio pigmentato retinico e la membrana di *Bruch*. Questi depositi interferiscono con le normali funzioni dell'epitelio retinico pigmentato e con l'avanzare dell'età tendono ad accumularsi, conducendo alla degenerazione dell'epitelio stesso e dei fotorecettori sovrastanti.

L'epitelio pigmentato retinico (EPR) è un epitelio monostratificato di cellule pigmentate che si trova nella parte posteriore dell'occhio e va a formare la barriera emato-retinica (BER), sostenendo il volume e la composizione chimica dello spazio subretinico. Grazie alla sua collocazione anatomica fra i fotorecettori e la sottostante coroide, l'EPR possiede un ruolo chiave nel mantenimento della normale funzione visiva e nella regolazione dei processi biochimici che supportano la fototrasduzione.

La perdita dell'integrità strutturale e funzionale dell'EPR è alla base della degenerazione retinica tipica dell'AMD.

Come tale, il trapianto di cellule dell'EPR funzionali in sostituzione a quelle danneggiate rappresenta una strategia interessante per il trattamento della DMS. La ricerca di una valida fonte alternativa di cellule dell'EPR ha condotto allo sviluppo di prodotti di terapia cellulare basati sull'impiego di cellule staminali pluripotenti umane.



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

L'utilizzo di queste cellule nel trattamento di patologie retiniche racchiude in sé grandi speranze in virtù di alcune caratteristiche intrinseche di queste cellule, quali l'abilità di auto-rinnovamento e la capacità di differenziarsi in cellule dell'EPR in grado di svolgere le stesse funzioni di quelle native.

### **Risultati**

Nel corso del periodo rendicontato, ci siamo concentrati sul primo dei 3 *work-packages* in cui si divide il progetto, ossia la messa a punto del protocollo di differenziazione di cellule embrionali staminali umane.

Il progetto prevede l'utilizzo di una linea di cellule staminali embrionali umane chiamata WA09 (H9), provenienti dalla *stem cell bank* WiCell (Madison, WI, USA). Le cellule sono state mantenute in coltura su un substrato di Laminina (BioLamina) in un terreno di coltura che permette il mantenimento della pluripotenza.

L'utilizzo di tecniche di immunofluorescenza, volta a valutare l'espressione di marcatori di pluripotenza quali OCT3/4, Nanog, Lin28A, SSEA-4, TRA-1-60 e SOX4, ha confermato lo stato indifferenziato del monostrato di cellule embrionali. Inoltre, è stato possibile crio-preservare una discreta quantità di cellule embrionali pluripotenti da utilizzare per esperimenti futuri.

La differenziazione spontanea di una quantità definita di cellule della linea WA09 ha avuto inizio con l'induzione delle cellule in corpi embrionali, ossia corpi sferici presenti in sospensione nel medium di coltura (**Figura 1**). L'utilizzo della Blebbistatin (inibitore della miosina II) è risultato essere fondamentale per la formazione dei suddetti corpi embrionali.

Questi sono stati in seguito ri-piastrati su un substrato di Laminina e Collagene IV (un componente fondamentale della membrana di Bruch). La presenza di entrambi questi componenti nel substrato ha favorito l'adesione delle cellule in differenziazione e la successiva maturazione in cellule dell'EPR, riconoscibili grazie alla tipica morfologia esagonale ed alla loro peculiare pigmentazione (**Figura 2**). Successivamente, queste cellule sono state selezionate ed isolate meccanicamente al fine di ottenere una coltura pura di cellule dell'EPR.

Per venire incontro alle normative delle autorità competenti tese a garantire la sicurezza dei prodotti di terapia cellulare, le colture cellulari sono state condotte in condizioni *xeno-free*, ovvero in assenza di componenti di origine animale.

Successivamente, la caratterizzazione di tali cellule ha permesso di confermare l'identità biologica delle cellule dell'EPR differenziate e di verificarne la loro funzionalità.

Sono stati quindi eseguiti i seguenti controlli di qualità:

1. Stima della funzione di membrana tramite misura della resistenza elettrica transepiteliale;
2. Valutazione dell'espressione genica tramite real-time PCR ed *imaging* di marcatori chiave delle cellule dell'EPR per dimostrarne la corretta espressione e localizzazione (**Figura 3**).
3. Studi di fagocitosi del segmento esterno di fotorecettori isolati da maiale, volti ad indicare la corretta funzionalità delle cellule differenziate. In questi studi le cellule dell'EPR sono state esposte a residui di segmento esterno di fotorecettori (POS) ed è stata esaminata la



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

capacità delle cellule di internalizzare tali frammenti. I POS sono stati isolati da occhi di maiale pervenuti da un macello della zona. Per la procedura di isolamento, generalmente molto laboriosa, è stata necessaria una grande quantità di occhi per ottenere una minima quantità di POS. Si è ricorso inoltre a latex *beads* (Sigma Aldrich) marcate con FITC, opsonizzate ai POS isolati in modo da renderli visibili in fluorescenza.

4. Saggi ELISA di quantificazione della secrezione di fattori di crescita quali VEGF (secrezione basale) e PEDF (secrezione apicale) delle cellule EPR

L'innesto del monostrato di cellule pigmentate differenziate richiederà però uno *scaffold* sopra cui far aderire e crescere le cellule dell'EPR. A livello dello spazio sub-retinico, questo prodotto di terapia cellulare potrebbe risolvere la necessità delle cellule di dover migrare nel locus corretto e compiere le opportune funzioni *in vivo*. Inoltre, in associazione con tecniche avanzate di *imaging* retinico, sarebbe possibile per i chirurghi seguire il destino del graft cellulare una volta che è stato trapiantato.

La ricerca in corso (che verrà ulteriormente implementata nel work package 3) è improntata allo sviluppo di potenziali substrati (biologici e non) per la crescita delle cellule dell'EPR. È stata presa in considerazione come possibile matrice di supporto la membrana amniotica umana (hAM). Questo tessuto, 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. Inoltre, in casi di ricostruzione della superficie oculare, può essere efficientemente integrata nel tessuto ospite, aiutando ad implementare la qualità strutturale del tessuto stesso. Uno dei motivi che ci spingono a considerare la hAM uno *scaffold* interessante per la crescita delle cellule dell'EPR è la stretta somiglianza della membrana basale amniotica alla membrana di Bruch, sopra cui risiedono le cellule dell'epitelio retinico in condizioni fisiologiche. Nel corso del progetto la membrana amniotica subirà un processo di disepitelizzazione, così da favorire un'efficace adesione delle cellule grazie all'esposizione della membrana basale amniotica ed in modo da ottenere uno *scaffold* privo o quasi di antigeni immunogenici. Come scaffold alternativo alla hAM, verrà valutata anche la membrana di Descemet, strato elastico localizzato tra l'endotelio e lo stroma corneali. Questo tessuto membranoso è composto da collagene prodotto dalle cellule endoteliali che giacciono al di sotto di esso e funziona come barriera protettiva contro le lesioni agli occhi e le infezioni. Si andrà quindi a studiare l'integrità della hAM in seguito a differenti trattamenti enzimatici (rispettivamente dispase II, tripsina e termolisina), in modo da valutare l'efficacia di tali enzimi nel rimuovere l'epitelio della hAM, senza danni agli strati sottostanti. In particolare, si è interessati a confermare che tali trattamenti non abbiano un effetto distruttivo sulla membrana basale (strato su cui giace l'epitelio della hAM), in quanto la conservazione di questo sottile strato è cruciale affinché le cellule dell'EPR differenziate si attacchino e proliferino. Verranno inoltre eseguiti gli stessi trattamenti anche sulla membrana di Descemet, opportunamente decellularizzata dopo trattamento enzimatico con termolisina. Gli scaffold di origine biologica appena descritto verranno inoltre confrontati con matrici artificiali composte da gelatine modificate in grado di mimare la struttura della matrice extracellulare del tessuto target.

Lo *scaffold* scelto sarà quello in grado di offrire l'ambiente più adatto alla crescita ed alla proliferazione delle suddette cellule e sarà l'obiettivo del work package 3 che sarà finanziato con i fondi del 5x1000 (anno 2019) per gli Enti della Ricerca Sanitaria (Ministero della Salute).





Ministero dell'Università e della Ricerca  
Direzione Generale della Ricerca

FIGURE

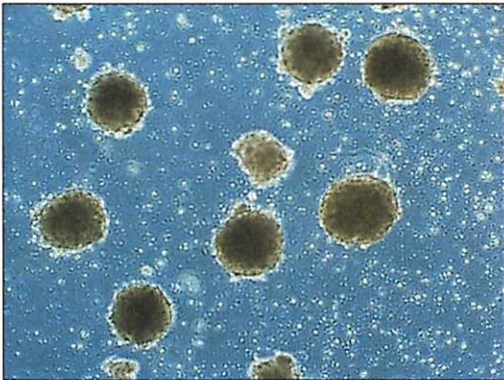
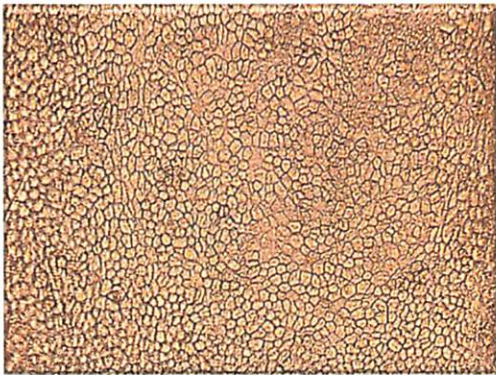


Figura 1. Corpi embrionali dopo 4 giorni dall'induzione delle cellule della linea embrionale WA09.

*Stereomicroscope view*



*Phase contrast microscope view*

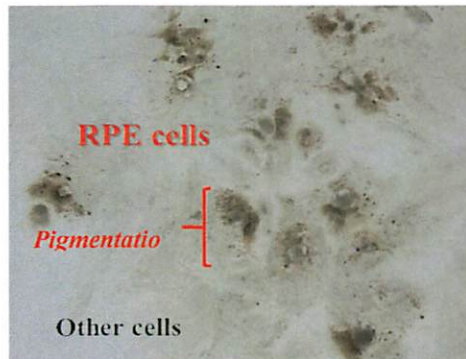
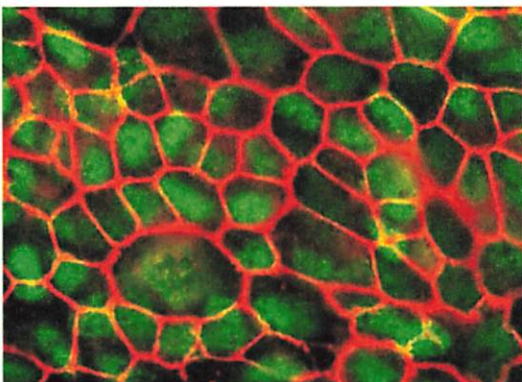


Figura 2. Cellule dell'EPR derivate dalla linea cellulare embrionale WA09 4 settimane dopo il piastramento dei corpi embrionali.

MITF ZO1



Best1 DAPI

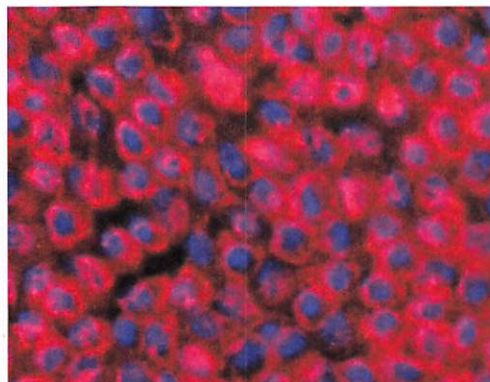


Figura 3. Immunofluorescenza su cellule dell'EPR derivate dalla linea cellulare embrionale WA09 relativa a marcatori chiave delle cellule dell'EPR.