



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

UTILIZZO DELLA CITOLOGIA AD IMPRESSIONE PER
LO STUDIO DELLE POPOLAZIONI CELLULARI
CORNEO-CONGIUNTIVALI NEL CANE E NEL GATTO

Relatore: Prof.ssa Ilaria Iacopetti
Correlatori: Dott.ssa Anna Perazzi
Dott. Enzo Di Iorio

Laureanda: Elisa Perrone
Matricola n.564603

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Ad Antonio ed Alma

INDICE

Riassunto.....	7
Abstract	9
Capitolo 1: Anatomia e fisiologia dell'occhio	11
1.1 Il bulbo oculare	12
1.1.1 La cornea	12
1.1.2 La sclera	16
1.1.3 Il limbus	17
1.1.4 L'iride	17
1.1.5 Il corpo ciliare	18
1.1.6 L'umor acqueo	19
1.1.7 La coroide e il tapetum lucidum.....	19
1.1.8 Il cristallino	20
1.1.9 L'umor vitreo.....	21
1.1.10 La retina	22
1.2 Gli annessi oculari.....	25
1.2.1 L'orbita	25
1.2.2 Le palpebre.....	26
1.2.3 La congiuntiva.....	27
1.2.4 La terza palpebra.....	28
1.2.5 I muscoli dell'occhio.....	29
1.3 Vascolarizzazione dell'occhio	30
1.4 Innervazione dell'occhio	31

1.4.1 I riflessi oculari.....	32
Capitolo 2: La visita oftalmologica nel cane e nel gatto	34
2.1 Valutazione della visione e dei riflessi.....	34
2.2 Valutazione degli annessi oculari.....	35
2.3 Valutazione del sistema lacrimale	35
2.4 Valutazione del globo oculare.....	36
2.5 La citologia	38
Capitolo 3: Scopo della tesi.....	39
Capitolo 4: Cellule staminali e Limbal stem cells deficiency (LSCD)	41
Capitolo 5: I marker	50
Capitolo 6: La citologia ad impressione	57
Capitolo 7: Parte sperimentale	64
7.1 Materiali e metodi.....	64
7.1.1 Raccolta dati e procedura operativa	64
7.1.2 L'immunofluorescenza	66
7.2 Risultati.....	71
7.3 Discussione	90
Capitolo 8: Conclusioni e considerazioni personali	93
Capitolo 9: Bibliografia.....	94
Ringraziamenti.....	101

Riassunto

Nell'ambito della visita oftalmologica dei piccoli animali come cane e gatto, la citologia rappresenta una parte molto importante, che deve essere sempre effettuata. In particolare la citologia ad impressione è una tecnica relativamente sconosciuta in ambito veterinario, che presenta tuttavia grandi vantaggi e potenzialità rispetto ad altre tecniche citologiche utilizzate. I vantaggi offerti e le possibilità di applicazione di tale tecnica sono molteplici e sono stati studiati e analizzati soprattutto nell'uomo, specie in cui tale pratica è ormai utilizzata quasi di routine. Sono stati riconosciuti infatti nell'uomo due specifici marker (Citocheratina 12 e Mucina 1) in grado di distinguere tra epitelio corneale e congiuntivale.

La citologia ad impressione è fondamentale per esaminare la superficie oculare normale (cornea, congiuntiva e limbus sclero-corneale) e di conseguenza può rappresentare un valido aiuto per studiare ed indagare eventuali alterazioni e patologie oculari corneo-congiuntivali nel cane e nel gatto, specialmente nei casi in cui sia presente un deficit di cellule staminali limbari-corneali.

È stato seguito lo stesso protocollo utilizzato in medicina umana dalla Fondazione Banca degli Occhi del Veneto, per il quale è previsto un esame citologico ad impressione realizzato tramite filtri di cellulosa, una colorazione del campione tramite una doppia immunofluorescenza, ed infine l'osservazione del campione al microscopio confocale. Sono stati sottoposti a tale procedura 8 pazienti: 5 cani e 3 gatti, di razza, sesso ed età variabili e sani dal punto di vista oftalmologico; sono stati campionati cornea e congiuntiva o limbus per ogni paziente.

L'obiettivo finale è verificare se i marker usati nell'uomo possano avere lo stesso valore anche nel cane e nel gatto, ovvero se identifichino specificatamente l'epitelio corneale (cK12) e quello congiuntivale (Muc1).

Nel gatto sono stati ottenuti risultati positivi; possiamo concludere affermando che l'occhio felino per quanto riguarda tali marcatori si comporta esattamente come

l'occhio umano, e tale metodica può essere utilizzata tal quale nel gatto con grandi prospettive anche nella diagnosi di varie patologie oculari.

Nel cane invece i risultati ottenuti sono ad oggi negativi: la colorazione, andata a buon fine per il gatto e per l'uomo, nel cane non risulta funzionare, probabilmente a causa di una mancata specificità dell'anticorpo utilizzato.

Abstract

Cytology is a very important part of the ophthalmological examination of small animals such as dogs and cats, and it is something that must always be carried out. Impression cytology in particular is a relatively unknown technique in the veterinary field, yet it presents great advantages and potential with respect to other cytological techniques that are currently used. The advantages and the possibilities of application of this technique are many and they have been studied and analysed, especially in humans, for whom using this technique has become standard practice. In fact in humans two markers have been identified (Cytokeratin 12 and Mucin 1) that are able to distinguish between corneal and conjunctival epithelium.

Impression cytology is fundamental in order to examine the normal ocular surface (cornea, conjunctiva and limbus) and therefore represents a valid tool to study and examine possible pathologies in cats and dogs, especially in cases in which there is a lack of limbal stem cells.

The same protocol has been followed in human medicine by the Veneto Eye Bank Foundation, that provides impression cytology with the use of paper or cellulose acetate filters, indirect immunofluorescence to stain the specimens, specimens analysis with confocal laser scanning microscope. Cytological specimens were collected by impression from 8 normal and healthy patients: 5 dogs and 3 cats of mixed breed, sex and age; for each patient specimens were obtained from cornea, conjunctiva or limbus.

The main objective is to check if the two markers used in humans are also valid in dogs and cats, and if they specifically identify corneal (cK12) and conjunctival (Muc1) epithelium.

In cats we obtained positive results; we can assert that the feline eye behaves like the human one with regards to these two markers, and this technique can therefore be used in cats, opening up new and interesting perspectives even for ocular pathology diagnosis. In dogs however we did not obtain the expected

results: the staining and the indirect immunofluorescence used for cats and humans did not work well, probably because of a lack of specificity of the primary antibody used.

Capitolo 1

Anatomia e fisiologia dell'occhio

L'occhio è un organo di senso pari, responsabile della vista, formato dal bulbo oculare e dagli annessi oculari, quali i muscoli oculari che muovono il bulbo, le palpebre che lo proteggono, le fasce orbitarie, e l'apparato lacrimale che mantiene umide le parti esposte all'aria. La posizione degli occhi negli animali è in relazione all'ambiente in cui essi vivono, alle loro abitudini e al loro modo di alimentarsi. Le specie predatrici quali i carnivori, tra cui il cane e il gatto, hanno occhi ben posizionati frontalmente. Questo rende possibile una visione binoculare più ampia, che permette una maggiore concentrazione sugli oggetti vicini ed una migliore percezione della profondità¹⁵. Il bulbo oculare è contenuto all'interno dell'orbita, incluso in un abbondante quantità di grasso. Ha una forma quasi sferica: il punto più sporgente della cornea è detto polo anteriore, il punto più sporgente sulla porzione posteriore è detto polo posteriore. La linea passante per i poli è detta asse ottico. L'equatore è una circonferenza immaginaria passante attorno all'occhio ed equidistante dai poli. I meridiani sono delle circonferenze immaginarie passanti per entrambi i poli.

Il bulbo oculare è formato da tre tonache: una tonaca esterna fibrosa, una tonaca vascolare intermedia ed una tonaca nervosa interna. Nel bulbo oculare riconosciamo tre cavità: la camera anteriore e la camera posteriore, comunicanti tra loro, che contengono una sostanza liquida detta umor acqueo e più profondamente, la cavità vitreale, che contiene l'umor vitreo¹⁸.

La tonaca fibrosa dà forma al bulbo e lo protegge, e consiste nella cornea (parte anteriore) e nella sclera (parte posteriore). La tonaca vascolare, detta uvea, si divide in una parte anteriore composta da iride e corpo ciliare, e in una parte posteriore detta corioidea ed è importante per la nutrizione del bulbo e la regolazione della forma del cristallino. La tonaca interna o retina, è costituita da

cellule foto recettrici, fa parte del sistema nervoso centrale ed è un'estensione dell'encefalo, al quale è connessa tramite il nervo ottico¹⁵.

1.1 Il bulbo oculare

1.1.1 La cornea

La cornea rappresenta la parte anteriore della tonaca fibrosa del globo oculare e, insieme alla sclera, costituisce la porzione più esterna dell'occhio¹⁸. La cornea ha forma ovoidale con un diametro verticale che nel cane raggiunge i 12-16 mm, mentre il diametro orizzontale è maggiore del 10%, raggiungendo i 13-17mm²³, mentre il raggio di curvatura è di 8.5 mm¹⁹. Nel gatto il raggio di curvatura è di 8.6 mm, mentre il diametro verticale e quello orizzontale misurano rispettivamente 16 e 17 mm. Lo spessore varia in base all'età ed alla localizzazione, con un incremento col progredire degli anni e verso la periferia, con la cornea centrale leggermente più sottile rispetto alla cornea perilimbare. È stato riscontrato anche uno spessore maggiore in cani maschi rispetto alle femmine. Nei cani adulti la cornea misura $560 \pm 5 \mu\text{m}$, la periferica temporale $581 \pm 6 \mu\text{m}$, e la periferica dorsale $612 \pm 5 \mu\text{m}$. In animali di età inferiore ad un anno i valori sono rispettivamente di 520,540 e 557 μm , mentre in cani di età superiore ai 7 anni si registrano valori di 597,643 e 617 μm ¹⁹.

Nel gatto, invece, lo spessore non sembra presentare variazioni significative da una zona all'altra, con un valore medio di $578 \pm 64 \mu$, mentre aumenta progressivamente con l'età come nel cane, passando da $379 \pm 12 \mu$ a 9 settimane di età a $567 \pm 12 \mu$ oltre l'anno di età¹⁹.

Il primo abbozzo di cornea ectodermica si può vedere al venticinquesimo giorno di gestazione nel cane, l'endotelio può essere riconoscibile attorno al trentaduesimo giorno, mentre la membrana di Descemet si forma al quarantacinquesimo giorno. La maturazione corneale si ritiene completata intorno al sedicesimo giorno dopo la nascita¹⁹.

La cornea è formata da vari strati e dall'esterno all'interno riconosciamo l'epitelio, la membrana basale o di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e l'endotelio.

L'epitelio corneale è pluristratificato, squamoso, non cheratinizzato, con un numero di strati variabile da 5 a 15. Le cellule epiteliali più superficiali sono unite tra loro tramite giunzioni serrate (*tight junctions*) che costituiscono una barriera fisiologica difficilmente permeabile; questa è molto importante nel prevenire infezioni, edema e passaggio di varie sostanze, ma allo stesso tempo ostacola le terapie basate sull'utilizzo di farmaci locali non liposolubili. Le cellule più superficiali hanno forma squamosa, e le più esterne perdono il nucleo ed esfoliano nel film lacrimale. Lo strato intermedio è costituito da cellule con una caratteristica forma a farfalla, dette *wing cells*. Le cellule basali, più interne, sono colonnari e sono responsabili della sintesi della membrana basale. Quest'ultima è formata da laminina, fibronectina, collagene di tipo IV e proteoglicani, ed aderisce allo stroma sottostante tramite emidesmosomi e fibrille, che aderiscono a placche proteiche di ancoraggio stromale¹⁹. Nel cane e nel gatto il normale turn over epiteliale è di 7 giorni²³.

L'epitelio corneale si continua con quello congiuntivale a livello del limbo, dove sono presenti cellule staminali, che rappresentano la sorgente maggiore per la formazione delle cellule epiteliali corneali. La migrazione centripeta di queste cellule consente il rinnovo costante delle cellule basali ed è di vitale importanza anche per la guarigione dei difetti erosivi/ulcerativi.

Lo stroma rappresenta il 90% dello spessore corneale ed è formato da cheratociti, fibrille, lamelle di collagene e proteoglicani. Le fibrille hanno un diametro uniforme e sono disposte a formare 200-250 lamelle, che vanno da limbo a limbo, per poi fondersi con le lamelle della sclera. Nello stroma anteriore hanno un orientamento obliquo, mentre nello stroma posteriore hanno un orientamento ortogonale. La distanza tra le fibre di collagene non deve superare la metà della lunghezza d'onda delle onde elettromagnetiche nel campo del visibile, altrimenti la rifrazione e la riflessione del raggio luminoso risulterebbero alterati. I cheratociti sono sparsi tra le lamelle, ma connessi tra loro da prolungamenti cellulari, sono quindi considerati un sincizio. Essi hanno la funzione di produrre il collagene. I cheratociti hanno un

basso turnover nell'adulto, ma in seguito ad un danno corneale vengono attivati come fibroblasti, producendo i precursori del collagene e della matrice. Cellule immunitarie come leucociti, macrofagi e linfociti sono rari in una cornea sana, più presenti a livello epiteliale che a livello stromale. La matrice è costituita principalmente da proteoglicani, GAG e glicoproteine, che riempiono lo spazio tra le lamelle. Il lumicano sembra essere il proteoglicano più coinvolto nel mantenimento della trasparenza corneale. Quando varia il rapporto tra i diversi proteoglicani la trasparenza corneale può risultare diminuita, come nel caso delle cicatrici stromali. I GAG hanno la funzione di mantenere idratata la cornea, agendo come anioni in grado di legare le molecole d'acqua²³. I GAG più rappresentati sono il Cheratinsolfato, più concentrato nella camera posteriore, e il Dermatinsolfato, più concentrato nella camera anteriore¹⁹.

La membrana di Descemet rappresenta la membrana basale dell'endotelio e aumenta di spessore con l'età.

L'endotelio corneale è monostratificato e formato da cellule esagonali unite da giunzioni comunicanti (*gap junctions*) e da giunzioni serrate localizzate (*macula occludens*). Le cellule endoteliali diminuiscono fisiologicamente con l'età e perdono la capacità di duplicarsi nell'adulto, portando quindi ad un assottigliamento dell'endotelio col progredire degli anni. L'endotelio consente il passaggio di molecole nutritive dall'umor acqueo allo stroma e permette il mantenimento della forma e della trasparenza corneale. Inoltre, tramite il trasporto di ioni bicarbonato e sodio nell'umor acqueo, crea un gradiente osmotico essenziale per mantenere la cornea in uno stato di disidratazione¹⁹.

La cornea ha una grande capacità di guarigione. L'epitelio corneale rigenera in tre fasi: migrazione cellulare, proliferazione cellulare e adesione cellulare. Dopo una lesione epiteliale, le cellule adiacenti al margine della ferita aumentano di volume e sono soggette a retrazione. Fibrina e neutrofilo, provenienti dal film lacrimale, raggiungono il tessuto danneggiato entro tre ore dal danno. Gli emidesmosomi attorno ai margini della lesione si disgregano e le cellule più superficiali esfoliano. Nell'arco di tre o sei ore le cellule staminali, presenti a livello del limbo, compiono una migrazione in senso centripeto, raggiungendo il difetto epiteliale²³.

Dopo circa ventiquattr'ore tali cellule entrano in mitosi, dando origine ad un primo strato di cellule basali. Queste ultime si differenziano infine in cellule epiteliali. Nel caso in cui fosse rimosso l'intero epitelio corneale o il limbo, la guarigione avverrebbe tramite migrazione di cellule dall'epitelio congiuntivale. L'ultima fase prevede la rigenerazione degli emidesmosomi, processo che impiega più tempo, rispetto alla sola riepitelizzazione. Se la lamina basale è intatta la rigenerazione impiega una settimana, altrimenti sei o sette settimane. Da ciò si deduce che l'epitelio resta suscettibile a lesioni secondarie fino a che il processo di adesione cellulare non è concluso. La guarigione della sostanza propria è associata ad un'iniziale migrazione di leucociti, provenienti dal film lacrimale o dal limbo. I cheratociti presenti a livello dei margini della lesione si disgregano, mentre i cheratociti circostanti vengono attivati. Dopo alcuni giorni il difetto viene coperto da una popolazione mista di cheratociti e fibroblasti. Nei 15-20 giorni successivi alla lesione si ha deposizione di Dermatansolfato e, solo dopo tre mesi, si ha una sufficiente deposizione di Cheratinsolfato¹⁹. La rigenerazione epiteliale avviene senza formazione di cicatrice, mentre la rigenerazione stromale può essere associata ad una perdita di trasparenza corneale, dovuta ad una disorganizzazione delle fibre di collagene²³.

La cornea fornisce trasparenza ed elevato potere diottrico, che consentono una visione *emmetropica*. Il potere diottrico corneale corrisponde alla somma dei poteri rifrattivi di tre interfacce: aria/lacrime, lacrime/cornea, cornea/umor acqueo; in rapporto al raggio di curvatura corneale. La cornea possiede nel cane una capacità diottrica di $39,4 \pm 2,6$ D¹⁹. Il potere rifrattivo della cornea è maggiore di quello della lente, in quanto il passaggio da un mezzo molto rarefatto, come l'aria, ad un mezzo molto meno rarefatto, come l'umor acqueo, crea una rifrazione del raggio luminoso maggiore, rispetto a quella ottenuta a livello di lente, con il passaggio da umor acqueo a umor vitreo. Nel cane l'indice di rifrazione della cornea in toto è 1,337, dell'acqueo e del vitreo è di 1,333 ed il raggio di curvatura è di 9,13 mm²³.

1.1.2. La sclera

La sclera o sclerotica è una lamina di connettivo denso irregolare che protegge l'occhio e ne mantiene la forma. È la parte posteriore della tonaca fibrosa del globo oculare; il suo spessore varia nelle diverse parti dell'occhio e da specie a specie. Nel cane lo spessore è di circa 0.3-0.4 mm a livello del polo posteriore e 0.12-0.2 all'equatore. Nel gatto invece i valori sono rispettivamente di 0.13-0.6 mm e 0.09-0.2 mm. Il colore della sclera dipende in parte dallo spessore dello strato stromale; la corioide può essere visibile parzialmente tramite la sclera nei casi in cui quest'ultima sia particolarmente sottile (ad esempio negli animali giovani) e assumere una colorazione azzurra pallida. L'episclera è una parte della sclera e consiste in una struttura fibroelastica composta da collagene, fibroblasti, melanociti, proteoglicani e glicoproteine²³.

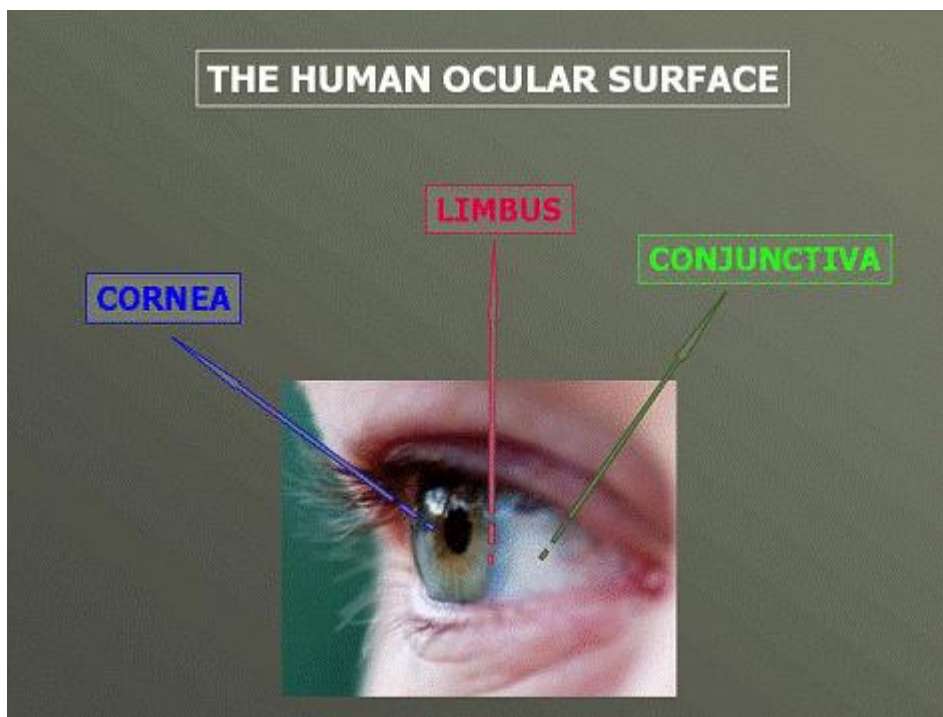


Figura 1.1.2.1: Anatomia della superficie oculare umana, divisa in cornea, congiuntiva e limbus

1.1.3 Il limbus

Il limbo, o limbus, rappresenta la giunzione sclerocorneale. In questa zona, la sclera si porta per un breve tratto al di sopra della cornea, e l'epitelio anteriore corneale gradualmente si trasforma e si continua con l'epitelio congiuntivale. È una zona di ampiezza di circa 1-2 mm, pigmentata, che circonda la cornea periferica. La pigmentazione è data dai melanociti, che sono sparpagliati in tutta la zona e attraversano il limbus in direzione obliqua, dalla porzione stromale profonda a quella superficiale posta tra cornea e sclera. Il limbus è ricco di cellule staminali che, come vedremo in seguito, hanno un ruolo fondamentale nel rinnovamento cellulare, nella guarigione corneale in seguito a lesioni ed insulti, e nella gestione di tutte le patologie corneo-congiuntivali ¹⁸.

1.1.4 L'iride

L'iride, assieme al corpo ciliare e alla coroide, fa parte della tonaca vascolare dell'occhio, detta uvea. È un diaframma anulare appiattito connesso con la sclera tramite il legamento pettinato, e con il corpo ciliare. È suddivisa in una zona centrale pupillare ed una zona periferica ciliare, separate dal collaretto, una linea circolare dall'aspetto festonato. L'iride suddivide lo spazio compreso tra il cristallino e la cornea in due camere, una anteriore ed una posteriore, che comunicano tramite la pupilla. Entrambe sono riempite da un fluido acquoso trasparente detto umor acqueo. L'iride è formata da quattro strati: uno strato epiteliale anteriore, uno strato intermedio di tessuto connettivo, lo stroma contenente i due muscoli lisci (muscolo sfintere pupillare e muscolo dilatatore della pupilla) e l'epitelio posteriore ¹⁵. Lo strato anteriore è formato da fibroblasti e melanociti; lo stroma contiene collagene, vasi sanguigni, nervi, melanociti, mentre l'epitelio posteriore è costituito da due strati di cellule pigmentate. La vascolarizzazione dell'iride è garantita dalle arterie ciliari posteriori ²³. Il colore dell'iride determina il colore dell'occhio e dipende dalla quantità di cellule pigmentate presenti nello stroma nonché dal tipo di pigmento in esse contenuto: se le cellule che contengono melanina sono strettamente impacchettate, l'iride

assume un colore bruno scuro; se le cellule sono in quantità minore l'iride sarà di colore più chiaro, quasi giallastro. Se le cellule sono in minima quantità, l'iride apparirà bluastra. Negli animali albinici l'iride è totalmente priva di pigmento e i loro occhi appaiono di colore rosso in quanto il sangue contenuto nei capillari non viene mascherato¹⁵. L'iride regola la quantità di luce che entra all'interno dell'occhio grazie alla sua componente muscolare, costituita dai muscoli sfintere pupillare e dilatatore della pupilla. Il muscolo sfintere della pupilla è posto attorno al margine pupillare: riceve innervazione prevalentemente dal sistema nervoso parasimpatico ed una sua contrazione porta ad un restringimento del diametro pupillare (miosi). Le fibre del muscolo dilatatore sono invece dirette radialmente: ricevono innervazione principalmente dal sistema nervoso simpatico e la loro contrazione allarga la pupilla (midriasi)³³.

1.1.5 Il corpo ciliare

Il corpo ciliare è un anello sporgente compreso tra iride, sclera e muscolo ciliare anteriormente e coroide posteriormente, e deputato alla produzione dell'umor acqueo. Può essere suddiviso in una parte anteriore, *pars plicata*, e in una parte posteriore, *pars plana*. La *pars plicata* è un anello di più di 70 *processi ciliari*, mentre la *pars plana* si continua con la parte nervosa della retina²¹. Dai processi ciliari si estendono le *fibre zonulari*, dirette all'equatore del cristallino. Il corpo ciliare è formato da un epitelio costituito da due strati: uno strato esterno non pigmentato ed uno strato interno pigmentato che si continua con l'epitelio pigmentato della retina. Lo stroma sottostante è composto da fibroblasti, tessuto connettivo, melanociti, vasi e nervi. Tra il corpo ciliare e la sclera è presente il *muscolo ciliare*, un muscolo liscio ad andamento circolare che è in grado di cambiare la forma del cristallino, permettendo l'accomodazione, ovvero il meccanismo deputato alla diversa messa a fuoco di oggetti vicini o lontani¹⁵.

1.1.6 L'umor acqueo

L'umor acqueo è un liquido chiaro acquoso che riempie le camere anteriore e posteriore dell'occhio. La camera anteriore è compresa tra cornea ed iride, la camera posteriore tra iride e cristallino. La sua composizione è simile al plasma, e contiene glucosio ed acido ascorbico in quantità maggiore rispetto al plasma. L'umor acqueo è continuamente prodotto dal corpo ciliare sia tramite processi passivi di diffusione e ultrafiltrazione, sia tramite processi attivi di trasporto contro gradiente. In questo caso ioni sodio e cloro vengono pompati attivamente nell'umor acqueo, generando un gradiente osmotico richiamante acqua. Inoltre, nello strato interno dell'epitelio ciliare sono presenti Na^+/K^+ ATPasi. L'umor acqueo è prodotto anche grazie all'enzima anidrasi carbonica, che catalizza la formazione di Acido carbonico partendo da acqua e diossido di carbonio. L'acido carbonico si dissocia, genera ioni bicarbonato che passano poi nell'umor acqueo ²¹. L'umor acqueo passa dalla camera posteriore alla camera anteriore tramite la pupilla, fino all'angolo irido-sclerale attraverso il legamento pettinato; viene poi convogliato ai seni venosi della sclera ed infine nel torrente circolatorio ¹⁵. Una via di drenaggio alternativa è rappresentata dalla via uveosclerale, che drena dal 3% al 15% circa del liquido: l'umor acqueo passa attraverso il corpo ciliare e la coroide verso gli spazi sopraciliari, e da qui passa nell'orbita tramite la sclera e assorbito dai vasi linfatici orbitali. L'equilibrio tra la produzione e il drenaggio dell'umor acqueo determina la pressione intraoculare (IOP) ²¹.

1.1.7 La coroide e il tapetum lucidum

La coroide forma la parte posteriore dell'uvea. È unita al corpo ciliare anteriormente e si trova tra la retina e la sclera posteriormente. Consiste in una densa rete di vasi sanguigni inclusi in tessuto connettivo molto pigmentato. La rete vascolare è alimentata dalle arterie ciliari posteriori ed è drenata dalle vene vorticosi. È suddivisa in uno strato esterno detto sopracoroide, uno strato superficiale, uno strato intermedio ed uno strato interno. La sopracoroide è una

zona avascolare, pigmentata, di tessuto connettivo. Nello strato superficiale si trovano vasi di grandi dimensioni, nello strato intermedio vasi di medie dimensioni, e nello strato più profondo vasi di piccole dimensioni. Questi ultimi sono responsabili della nutrizione della porzione anteriore della retina. Nella parte dorsale dello strato intermedio, è presente un'area colorata che riflette la luce, conosciuta come *tapetum lucidum* ²¹.

Questa struttura nei carnivori consiste di strati di cellule che contengono cristalli altamente riflettenti, diversi da specie a specie per forma e composizione.

Nel cane e nel gatto il tapetum è ricco di zinco e cisteina, e riboflavina rispettivamente ³³. In cuccioli di quattro o cinque settimane il tappeto si presenta di colore marrone o grigio, assume una tonalità viola o blu attorno alle sei o sette settimane, attorno ai tre mesi di età raggiunge il colore definitivo, che può variare dal verde, all'arancione, al giallo²³. Il tappeto rende gli occhi degli animali "brillanti" quando al buio guardano verso una sorgente luminosa. Questa struttura rappresenta un adattamento alla visione notturna poiché la riflessione della luce incidente aumenta la quantità di luce che raggiunge la retina, coadiuvando così la visione nei luoghi bui. La mancanza di un tappeto è considerata normale in animali con iride blu o albin ¹⁵.

1.1.8 Il cristallino

Il cristallino è una struttura biconvessa trasparente avascolare, localizzata posteriormente all'iride nella fossa ialoidea e mantenuta in sede grazie alle fibre zonulari²³. È una struttura solida, ma sufficientemente elastica da potersi deformare. Presenta un polo anteriore e un polo posteriore, un'equatore e un asse centrale che coincide con l'asse ottico dell'occhio¹⁵. Nel cane il diametro medio è di 10,5 mm, mentre nel gatto è di 9-10,4 mm. È costituito da acqua (64%) e proteine (35%), è ricco di glutazione e anidrasi carbonica e povero di minerali. Si distinguono una zona corticale, esterna, posta vicino alla capsula, e un nucleo centrale²³. La zona corticale contiene alte concentrazioni di proteine cristalline, che diminuiscono invece verso il nucleo, dove aumenta invece la quantità di

proteine insolubili. Queste ultime aumentano progressivamente anche con l'età. Il cristallino è formato da una capsula esterna, un epitelio ed uno stroma sottostante. La capsula è un involucro trasparente ed elastico, è impermeabile alle grosse macromolecole mentre consente il passaggio di acqua ed elettroliti²¹. Presenta uno spessore maggiore sulla superficie anteriore; lo spessore raggiunge il massimo all'equatore, dove si inseriscono le fibre zonulari provenienti dal corpo ciliare¹⁵. L'epitelio è di tipo cuboidale nella parte anteriore, mentre verso l'equatore diventa di tipo colonnare. Essendo il cristallino una struttura avascolare, le sue necessità metaboliche sono garantite dall'umor acqueo: alterazioni di quest'ultimo possono causare perdita di trasparenza del cristallino. Il cristallino svolge due importantissime funzioni: la prima è quella di focalizzare i raggi sulla retina attraverso il meccanismo dell'accomodazione; la seconda è quella di proteggere la retina dai dannosi raggi ultravioletti. L'accomodazione è determinata dalle contrazioni del muscolo ciliare. La contrazione di tale muscolo determina il rilasciamento della zonula del cristallino, che a sua volta consente alla capsula lenticolare di contrarsi e rendere il cristallino più sferico. L'aumento della curvatura della lente causa un maggior potere rifrattivo, e pertanto i raggi divergenti originati da oggetti vicini vengono focalizzati sulla retina. Il cane rispetto all'uomo presenta una scarsa accomodazione, in quanto il muscolo ciliare risulta meno sviluppato e perciò ha una maggiore difficoltà di messa a fuoco da vicino. La dimensione e la curvatura della cornea compensano in parte questo problema²¹.

1.1.9 L'umor vitreo

L'umor vitreo è un idrogel trasparente ed elastico che occupa circa l'80% del volume dell'occhio. Occupa uno spazio delimitato anteriormente dal cristallino, lateralmente da corpo ciliare e fibre zonulari, posteriormente da retina e nervo ottico²³. Per quanto riguarda lo sviluppo embrionale, si riconoscono tre tipi di vitreo: il vitreo primario, il secondario e il terziario. Il vitreo primario deriva da

fibre ectodermiche e mesodermiche; contiene i vasi del sistema ialoideo, che vascolarizzano il cristallino fetale, mesenchima e macrofagi. Il vitreo secondario si sviluppa attorno al venticinquesimo giorno di gestazione, spostando il vitreo primario verso la porzione assiale della cavità vitreale²³. I residui del vitreo primario costituiscono un canale, denominato *canale di Cloquet*. Il processo di atrofia dell'arteria ialoidea inizia attorno al quarantacinquesimo giorno di gestazione e si completa tra le due e le quattro settimane post natali²⁸.

Il vitreo secondario si divide in una zona corticale ed una centrale. Esso contiene acido ialuronico, monociti, ialociti. Il vitreo terziario è costituito da fibre di collagene. Il vitreo è formato per il 99 % di acqua, il restante 1% da acido ialuronico, poche cellule tra cui ialociti e monociti derivanti dal sangue, e fibre di collagene che danno sostegno alla struttura. Gli ialociti, cellule deputate alla sintesi di acido ialuronico e con attività fagocitaria, sono presenti specialmente a livello del vitreo corticale²³.

L'acido ialuronico è un glucosamminoglicano che determina la viscosità dell'umor vitreo, il quale può essere allo stato di gel o allo stato di fluido. Le molecole di acido ialuronico hanno la capacità di assorbire o espellere acqua tramite un meccanismo dipendente da cariche elettriche. In condizioni normali le cariche negative dell'acido ialuronico sono in equilibrio con le cariche positive degli ioni sodio e delle molecole proteiche. La perdita di cariche positive determina un'espansione dell'acido ialuronico, in quanto le restanti cariche negative tendono a respingersi tra loro, comportando un maggior assorbimento d'acqua. La perdita di cariche negative determina l'effetto opposto, causando perdita d'acqua. Con l'avanzare dell'età aumenta la percentuale di umor vitreo allo stato fluido²³.

1.1.10 La retina

Il fondo dell'occhio è quella parte del segmento posteriore dell'occhio che può essere osservato tramite l'oftalmoscopio e che consiste in retina, coroide e papilla ottica. La retina è una vera e propria estensione del sistema nervoso centrale. È suddivisa in due parti: retina cieca e retina ottica. La *retina cieca* (1/3 circa della retina totale) è un sottile strato pigmentato che prosegue sul corpo ciliare e sulla

faccia posteriore dell'iride. La *retina ottica* è l'unica parte che può essere raggiunta dalla luce, poiché solo in questa parte sono presenti fotorecettori. Costituisce i 2/3 della retina ed è formata da dieci strati. La zona di passaggio tra retina ottica e cieca è costituita da una brusca riduzione di spessore ed è chiamata ora serrata¹⁵. L'epitelio pigmentato è uno strato cellulare localizzato tra coroide e neuro retina; è costituito da cellule di forma esagonale, connesse tra loro da giunzioni serrate, le quali fungono da *barriera emato-retinica*. Esso contiene granuli di melanina, eccetto nell'area del tappetale; svolge un'attività di fagocitosi nei confronti dei dischi che esfoliano dai fotorecettori, riciclando la vitamina A e i lipidi polinsaturi. Gli strati della retina ottica sono: uno strato esterno di fotorecettori, una membrana limitante esterna, uno strato nucleare esterno, uno strato plessiforme esterno, uno strato nucleare interno, uno strato plessiforme interno, uno strato di cellule gangliari, uno strato di fibre del nervo ottico ed una membrana limitante interna²⁸.

I *fotorecettori*, cellule sensibili alla luce, sono raggiunte dalla luce dopo che quest'ultima ha attraversato tutti gli altri strati. Sono cellule costituite da un segmento esterno, un ciglio connettore, un segmento interno, un nucleo e una terminazione sinaptica, che si connette con lo strato sottostante di cellule bipolari. Il segmento esterno è costituito da dischi membranosi impilati, i quali contengono i pigmenti visivi. I fotopigmenti hanno la funzione di trasdurre le onde luminose in segnali elettrici, i quali vengono trasmessi al sistema nervoso. Ogni fotopigmento risponde ad una specifica lunghezza d'onda, alla quale corrisponde la visione di un colore. Esistono due tipi di fotorecettori: coni e bastoncelli. Nei coni sono presenti quattro diversi fotopigmenti, che hanno un picco di assorbimento per le lunghezze d'onda corrispondenti al blu, verde, rosso e ultravioletto. Nei bastoncelli è presente un unico pigmento, la *rodopsina*, costituito da *opsina* (una glicoproteina) e *retinale* (un'aldeide della vitamina A). I coni servono per la visione distinta, fotopica, a colori, in condizioni di buona illuminazione, i bastoncelli servono per la visione scotopica, in condizioni di scarsa luminosità. Coni e bastoncelli presentano una diversa distribuzione all'interno della retina: nelle zone periferiche sono presenti quasi esclusivamente bastoncelli, mentre man mano che ci si avvicina al centro della retina aumenta la concentrazione dei coni.

La *membrana limitante esterna* è formata dalle zonule aderenti che si trovano tra i processi delle cellule gliali radiali, o cellule di Müller, e quelli delle cellule fotorecetrici.

Lo *strato nucleare esterno* (strato dei granuli esterno) è formato dai nuclei di coni e bastoncelli.

Lo *strato plessiforme esterno* è costituito dalle terminazioni assoniche dei fotorecettori, cioè dalle sferule dei bastoncelli e dai pedicelli dei coni, che contraggono sinapsi con i processi delle cellule orizzontali e con i dendriti delle cellule bipolari.

Lo *strato nucleare interno* (strato dei granuli interno) è formato da quattro strati di nuclei, appartenenti alle cellule bipolari, orizzontali, amacrine e alle cellule di Müller.

Le *cellule di Müller* sono astrociti fibrosi e allungati, che si estendono dalla membrana limitante esterna a quella interna, con funzione di sostegno e nutrizione della retina. I loro nuclei sono sparsi tra le altre cellule.

Lo *strato plessiforme interno* è sede di contatti sinaptici tra le suddette cellule.

Lo *strato delle cellule gangliari* (terzo neurone della via ottica) è formato dai pirenofori delle cellule gangliari e dagli assoni che formano il nervo ottico.

La *membrana limitante interna* è formata dall'espansione dei processi delle cellule di Müller, che si uniscono per formare uno strato continuo²³.

La vascolarizzazione della retina sia nel cane che nel gatto è olangiotica, ovvero i vasi si distribuiscono su tutta la superficie retinica.

Nell'uomo in tutta la superficie della retina, ad eccezione della *fovea* (parte centrale), la luce deve passare attraverso gli strati di cellule gangliari e bipolari prima di raggiungere i fotorecettori. Nella fovea non ci sono cellule gangliari o bipolari e la luce colpisce direttamente i fotorecettori. Questo, assieme al fatto che nella fovea sono presenti solo coni, rende la fovea il punto di massima acuità visiva. Il cane è privo di fovea, ma possiede la cosiddetta *stria visiva*, dove la capacità visiva e la densità di cellule gangliari sono ai massimi livelli³³.

1.2 Gli annessi oculari

1.2.1 L'orbita e le fasce orbitarie

L'orbita è una struttura ossea cavitaria all'interno della quale si trovano il bulbo oculare e gli annessi oculari. È delimitata da pareti ossee, muscoli e tessuto connettivo che si organizza formando le cosiddette fasce orbitarie. Nel cane e nel gatto le pareti anteroventrale, mediale e minima porzione della volta orbitale sono di natura ossea. L'osso frontale costituisce la parete mediale e il margine orbitale dorsale, l'osso zigomatico, lacrimale e mascellare costituiscono le pareti anteroventrali, mentre l'osso sfenoide costituisce il pavimento dell'orbita. Nella regione temporale si trova il *legamento orbitario*, il quale si estende dal processo sopraorbitale dell'osso frontale al processo frontale dell'osso zigomatico. La *rima orbitale* è delimitata dal processo zigomatico dell'osso frontale dorsalmente, dal legamento orbitale lateralmente, da parte dell'osso zigomatico, mascellare e lacrimale ventralmente¹⁸. I tessuti molli che delimitano l'orbita sono il muscolo temporale posteromedialmente, il muscolo pterigoideo medioventralmente e il muscolo massetere lateralmente. Nelle razze canine brachicefale l'orbita è caratterizzata dall'essere poco profonda, rispetto a quella delle razze dolicocefale. A livello dell'apice dell'orbita vi è il passaggio del nervo ottico, dei nervi destinati ai muscoli oculari e dei nervi sensitivi destinati al bulbo oculare.

Sono presenti tre strati di fasce orbitarie. La più esterna è la periorbita, internamente ad essa si trovano le fasce muscolari superficiale e profonda.

La *periorbita* si inserisce all'apice dell'orbita, vicino al foro ottico. Al margine dell'orbita e sulle pareti mediale e dorsale si fonde col periostio, mentre lateralmente e ventralmente resta libera e forma un consistente setto fibroso che separa le strutture orbitarie da quelle extraorbitarie. Al margine dell'orbita la periorbita si sdoppia: una parte si continua nel periostio delle ossa della faccia; l'altra, detta setto orbitario, forma due pieghe semilunari con margini liberi ispessiti (*tarsi*) che danno consistenza alle palpebre. Inclusa nella parete dorsomediale dell'orbita si trova la *troclea*, un frammento cartilagineo, attorno al quale fa perno il muscolo obliquo dorsale.

La *fascia muscolare superficiale* è posta dentro la periorbita, è formata da tessuto connettivo lasso e tessuto adiposo infiltrato. Avvolge il muscolo elevatore della palpebra superiore e la ghiandola lacrimale.

La *fascia muscolare profonda* è più fibrosa e si riflette attorno ai muscoli del bulbo oculare. A questo livello costituisce la guaina del bulbo oculare, o *capsula di Tenone*, sottile e fibrosa, che riveste intimamente il globo oculare. Essa risulta separata dalla sclera tramite un piccolo spazio, lo *spazio di Tenone*, che divide il bulbo oculare dal contenuto orbitale¹⁵.

1.2.2 Le palpebre

Le palpebre sono due pliche cutanee, superiore e inferiore, che delimitano la rima palpebrale, la cui forma è ovalare per la trazione esercitata medialmente e lateralmente da alcuni legamenti. Nel cane la rima palpebrale ha una lunghezza di 35-40 mm²¹. La porzione in cui le due palpebre si uniscono viene detta canto. Il canto mediale o nasale è sostenuto da un legamento che si inserisce sul periostio delle ossa nasali; lateralmente invece un legamento ancora le palpebre alla parete dell'orbita formando il canto laterale o temporale. Nel cane tale legamento è sostituito dal muscolo retrattore del bulbo¹⁹. Le palpebre aiutano i meccanismi di protezione dell'occhio contro traumi ed essiccazione della cornea, contribuiscono alla produzione del film lacrimale e sono responsabili della sua distribuzione in tutta la superficie oculare²¹.

Sono costituite da tre strati: la cute, lo stroma fibromuscolare, palpebrale e congiuntivale, e la congiuntiva palpebrale. Il margine palpebrale superiore presenta da due a quattro fila di ciglia nel cane, mentre nel gatto contiene soltanto alcuni peli più lunghi sul versante cutaneo. Il margine palpebrale inferiore è invece privo di ciglia. Alle ciglia sono associate due strutture ghiandolari: le ghiandole di Zeis e le ghiandole di Moll. Le ghiandole di Zeis si trovano alla base delle ciglia, sono ghiandole sebacee che contribuiscono alla produzione lipidica esterna del film lacrimale. Le ghiandole di Moll sono invece ghiandole sudoripare modificate. Il margine libero della palpebra contiene il *tarso*, lamina fibrosa che conferisce solidità al margine palpebrale. Profondamente al tarso sono localizzate le

ghiandole di Meibomio, ghiandole sebacee modificate che formano uno strato parallelo, a palizzata, e che sboccano lungo il margine palpebrale ¹⁹. La porzione interna delle palpebre è rivestita da epitelio congiuntivale (vedi 1.2.3).

1.2.3 La congiuntiva

La congiuntiva è una membrana mucosa che ricopre il bulbo oculare e la superficie interna delle palpebre. Ha la funzione di proteggere il bulbo, specialmente la cornea, nonché di facilitare il suo scorrimento e quello delle palpebre nelle fasi di ammiccamento. La congiuntiva origina dalla rima palpebrale, proseguendo nella parte posteriore delle palpebre formando la *congiuntiva palpebrale*, per poi ripiegarsi coprendo il bulbo formando la *congiuntiva bulbare* che termina a livello del limbus.

Lo spazio virtuale tra le palpebre e il bulbo oculare è detto *sacco congiuntivale* e le sue estremità, dorsale e ventrale, sono denominate *fornici congiuntivali*.

La morfologia cellulare dell'epitelio congiuntivale differisce in queste tre regioni: stratificato cuboidale a livello tarsale, colonnare in prossimità del fornice congiuntivale e squamoso a livello del globo. È presente poi una lamina propria di tessuto connettivo lasso, molto vascolarizzata e ricca di fibrociti, linfociti e plasmacellule. Si trovano anche rari mastociti, macrofagi e linfonodi aggregati o solitari. L'epitelio contiene poi le cosiddette *Goblet cells*, cellule caliciformi mucipare che contribuiscono a produrre lo strato mucoso del film lacrimale ²³.

La concentrazione di tali cellule inoltre varia a seconda dell'area esaminata e della specie. Nel cane sono più numerose nel fornice congiuntivale inferiore mediale ²⁵; inoltre si rileva una maggior concentrazione nelle femmine piuttosto che nei maschi ²⁶.

Una mancanza di Goblet cells si traduce in cheratocongiuntivite secca.

I vasi congiuntivali, visibili in trasparenza, derivano dalle arterie ciliari anteriori. Il drenaggio linfatico è deputato ad un sistema superficiale ed uno profondo, che dirigono la linfa verso i linfonodi sottomascellari ¹⁹.

1.2.4 La terza palpebra

La terza palpebra, anche detta *membrana nittitante*, è una struttura mobile posta tra la cornea e la palpebra inferiore, nella porzione mediale del sacco congiuntivale inferiore. Presenta un margine libero, concavo ventromedialmente e posto a stretto contatto col bulbo¹⁹. Il margine è generalmente pigmentato nel cane, mentre nel gatto non è pigmentato. È formata dai seguenti componenti: una cartilagine a forma di T che le conferisce una certa rigidità, una ghiandola lacrimale accessoria, congiuntiva che ricopre le superfici bulbare e palpebrale, e numerosi follicoli linfoidi posti sulla superficie bulbare. È responsabile della protezione della cornea tramite la produzione e la distribuzione del film lacrimale sulla sua superficie. La ghiandola lacrimale accessoria infatti, di natura sieromucosa, produce fino al 50 % della componente sierosa del film lacrimale²¹.

Normalmente la terza palpebra non è visibile nei nostri animali, in quanto mantenuta in posizione ventromediale da fasci di muscolatura liscia. La superficie palpebrale può essere esaminata applicando una pressione digitale sul globo attraverso la palpebra superiore, la superficie bulbare viene esaminata invece tramite una pinza (di Von Graefe) previa instillazione di un collirio anestetico. La protrusione della terza palpebra viene regolata da un meccanismo passivo: la retrazione del globo oculare, conseguente alla contrazione dei muscoli retrattore del bulbo e dei muscoli retti, favorisce il movimento anteriore e in direzione dorsolaterale della membrana nittitante, che risulta quindi visibile, adesa al bulbo oculare¹⁸. La vascolarizzazione della membrana nittitante è deputata ad un ramo dell'arteria mascellare interna, mentre l'innervazione è data dal nervo trocleare⁸. L'asportazione della terza palpebra porta a maggiore esposizione corneale con successivo essiccamento, aumento nell'incidenza di cheratiti e congiuntiviti croniche, e diminuzione della produzione lacrimale. Le uniche indicazioni per la sua rimozione sono traumi gravi e irreparabili e neoplasie maligne²¹.

1.2.5 I muscoli dell'occhio

I muscoli che muovono l'occhio sono posti dietro il bulbo oculare. Tutti tranne uno prendono origine nelle vicinanze del foro ottico, all'apice del cono orbitario. Vi sono quattro muscoli retti, due obliqui ed un retrattore.

I quattro *muscoli retti* (*dorsale, ventrale, laterale e mediale*) si inseriscono anteriormente all'equatore mediante tendini larghi molto sottili. I *muscoli obliqui dorsale e ventrale* si inseriscono sul bulbo vicino all'equatore e contraendosi fanno ruotare il bulbo attorno all'asse visivo. Il *muscolo obliquo ventrale* è l'unico che non origina dal foro ottico, ma si inserisce sulla parete ventromediale dell'orbita, decorre lateralmente sotto il bulbo e termina sulla sua parte ventrolaterale. Il *muscolo retrattore del bulbo*, assente nell'uomo, forma un cono muscolare quasi completo attorno al nervo ottico, origina nelle vicinanze del foro ottico e si inserisce nel bulbo posteriormente all'equatore. I movimenti degli occhi sono più complessi di quanto si creda, nessun muscolo agisce da solo, e la gradualità del passaggio da una posizione dell'occhio all'altra sembra essere dovuta all'aumento o alla diminuzione del tono muscolare nei gruppi muscolari contrapposti.

Il *muscolo elevatore della palpebra superiore* è un muscolo striato che origina a livello dell'inserzione del m. retto dorsale e decorre all'interno dell'orbita terminando a livello della palpebra superiore.

Sono presenti inoltre tre lamine di muscolatura liscia: il *muscolo orbitario*, il *muscolo tarsale inferiore* (dal muscolo retto ventrale alla palpebra inferiore e terza palpebra) e il *muscolo tarsale superiore*, (dal muscolo retto mediale alla palpebra superiore). La loro funzione è essenzialmente di mantenere la posizione protrusa del bulbo oculare e la posizione retratta delle palpebre ¹⁵.

1.3 Vascolarizzazione dell'occhio

Il letto vascolare principale è fornito dall'arteria oftalmica esterna e dall'arteria malare, rami dell'arteria mascellare interna. Le ramificazioni di questi tre grandi vasi sono destinati alla vascolarizzazione del bulbo oculare, dei muscoli oculari e degli annessi oculari. I rami dell'arteria oftalmica esterna, destinati al bulbo oculare, sono : le arterie ciliari posteriori brevi, le arterie ciliari posteriori lunghe, le arterie ciliari anteriori. Le *a.ciliari posteriori brevi* entrano in prossimità del nervo ottico e sono destinate alla coroide, al nervo ottico e alla retina. Le *a.ciliari posteriori lunghe* perforano la sclera vicino all'equatore e vascolarizzano il corpo ciliare. Le *a.ciliari anteriori* entrano a livello del limbo sclerocorneale , destinate a corpo ciliare, iride e porzione anteriore della coroide. Queste arterie anastomizzano per formare il circolo arterioso maggiore dell'iride. Le arterie ciliari inviano rami anche alla congiuntiva; la cornea, non vascolarizzata direttamente, viene nutrita per diffusione dai capillari del limbus corneale. Le arterie destinate ai muscoli oculari entrano nei muscoli prossimalmente e sono rami dell'arteria orbitale.

Le arterie destinate agli annessi oculari sono quattro: l'arteria lacrimale, l'arteria temporale superficiale, l'arteria malare, e l'arteria etmoidale esterna. *L'arteria lacrimale*, ramo dell'a.oftalmica esterna, decorre nella parte laterale del cono orbitario, vascolarizzando la ghiandola lacrimale, le parti laterali delle palpebre e la congiuntiva. *L'arteria malare* deriva dall'a.mascellare, decorre sulla parete ventrale dell'orbita, giungendo al canto mediale dell'occhio, dove vascolarizza le palpebre. *L'arteria temporale superficiale*, ramo dell'a.carotide esterna, proietta lunghi rami per la vascolarizzazione della palpebra superiore. *L'arteria etmoidale esterna*, ramo dell'a.oftalmica, abbandona l'orbita attraverso il foro etmoidale e vascolarizza il labirinto etmoidale ¹⁵.

1.4 Innervazione dell'occhio

L'innervazione dell'occhio e degli annessi oculari deriva principalmente dai nervi cranici.

Il *nervo ottico* (II nervo cranico) è formato dagli assoni dei neuroni dello strato gangliare della retina; esso penetra nel cranio tramite il canale ottico e si incrocia con il nervo ottico controlaterale a livello del chiasma ottico. È formato da fibre nervose mieliniche ed è avvolto dalle meningi, pertanto viene considerato un vero e proprio tratto del sistema nervoso centrale più che un nervo periferico⁸.

Il *nervo oculomotore* (III nervo cranico) innerva i muscoli retto dorsale, retto ventrale e retto mediale, il muscolo obliquo ventrale e il muscolo elevatore della palpebra superiore.

Il *nervo trocleare* (IV nervo cranico) è un nervo motore destinato all'innervazione del muscolo obliquo dorsale; ha origine dal tronco encefalico e penetra all'interno dell'orbita tramite la fessura orbitaria.

Il *nervo trigemino* (V nervo cranico) è un nervo misto e si divide in tre branche: oftalmica, mascellare e mandibolare, tutte originanti dal ganglio del trigemino.

Il nervo oftalmico si suddivide in: *n.sopraorbitario*, che innerva la parte centrale della palpebra superiore, *n.lacrimale* diretto alla ghiandola lacrimale, e i *nn.nasociliari*, che a loro volta daranno origine a *n.etmoidale* e *n.infratrocleare*. Il *n.etmoidale* innerva l'etmoide e la mucosa delle cavità nasali. Il *n.infratrocleare* innerva il canto mediale dell'occhio, la terza palpebra e il sistema lacrimale. Da esso derivano i *nervi ciliari lunghi*, che vanno ad innervare il bulbo oculare, soprattutto la cornea.

Dalla branca mascellare origina il *n.zigomatico*, che si divide in *n.zigomatico temporale* e *n.zigomatico facciale*. Il primo innerva la parte laterale della palpebra superiore e l'area temporale rostrale, mentre il secondo innerva il canto laterale dell'occhio e la parte laterale della palpebra inferiore.

Il *nervo abducente* (VI nervo cranico) innerva il muscolo retto laterale e il muscolo retrattore del bulbo. La sua azione porta ad una contrazione del muscolo retto laterale, che fa ruotare verso l'esterno il globo oculare. Un suo deficit causa strabismo, ovvero una deviazione dell'asse del bulbo rispetto alla sua normale direzione, in quanto prevale l'azione del muscolo retto mediale.

Il *nervo facciale* (VII nervo cranico) è un nervo misto; contiene fibre motorie somatiche e fibre parasimpatiche, che innervano il muscolo orbicolare dell'occhio e la ghiandola lacrimale.

Le *fibre simpatiche* destinate all'occhio derivano dai nervi spinali T1 e T2, originando il tronco simpatico, che termina a livello del ganglio cervicale craniale.

Le *fibre parasimpatiche* originano dal nucleo di Edinger-Westphal e contraggono sinapsi nel ganglio ciliare²¹.

1.4.1 I riflessi oculari

Tutti i riflessi oculari dipendono da un circuito nervoso così costituito: recettore, neurone afferente, connessioni interneuronali, neurone efferente ed effettore. Tramite la valutazione di tali riflessi è possibile verificare l'integrità delle suddette strutture nei casi in cui i riflessi risultino positivi, e localizzare le eventuali lesioni neuroftalmiche, nel caso in cui i riflessi risultino negativi²¹.

Il *test di risposta alla minaccia* non è un riflesso ma una reazione conscia che richiede l'integrità di moltissime aree corticali, ragion per cui in caso di una risposta normale si può escludere quasi sicuramente una lesione intracranica. Vengono coinvolte la corteccia occipitale visiva, la corteccia parietale associativa e la corteccia frontale motoria, e vengono valutati il nervo ottico (II) e il nervo facciale (VII). Il test viene effettuato chiudendo alternativamente i due occhi con una mano, mentre con l'altra si esegue un rapido gesto di minaccia, facendo attenzione a non evocare il riflesso corneale e a non generare spostamenti d'aria che potrebbero falsare il test. L'animale risponderà con ammiccamento, chiusura delle palpebre, allontanamento della testa e retrazione del globo oculare. È possibile che alcuni soggetti non rispondano al gesto della minaccia in assenza di alterazioni patologiche: animali molto giovani, che non hanno esperienza del fatto che tale gesto possa rappresentare un pericolo, animali stoici e animali particolarmente abituati alla presenza dell'uomo.

In questi casi si può utilizzare il *test del batuffolo di cotone*, che consiste nel lasciar cadere del cotone nel campo visivo di un solo occhio alla volta e l'animale deve seguirne la traiettoria e muovere la testa.

Il *test del riflesso pupillare* si effettua dirigendo una luce (transilluminatore di Finoff o fonte luminosa dell'endoscopio) verso il globo oculare. Si valutano sia il riflesso pupillare diretto sia il riflesso pupillare consensuale. Il riflesso diretto induce una rapida miosi nell'occhio stimolato, quello consensuale è la risposta di un occhio quando la luce viene indirizzata nell'occhio controlaterale. Quest'ultimo è meno evidente nei nostri animali a causa della decussazione ineguale delle fibre nervose a livello del chiasma ottico. Il riflesso pupillare valuta l'integrità di retina, nervi ottico (II) e oculomotore (III), mesencefalo, chiasma ottico, muscolo sfintere irideo. È un riflesso subcorticale, utile per indagare la funzionalità delle strutture sopracitate ma non tanto per la visione: animali ciechi possono avere un riflesso pupillare normale.

Il *riflesso corneale* viene valutato toccando delicatamente la cornea non anestetizzata e la risposta positiva consiste in un immediato ammiccamento e retrazione del globo oculare. È un riflesso subcorticale e valuta i nervi trigemino (V), facciale (VII) e abducente (VI).

Il *test del riflesso palpebrale* consiste nel toccare gentilmente il canto mediale o laterale dell'occhio, provocando ammiccamento e chiusura delle palpebre. Valuta i nervi trigemino (V), facciale (VII) e il tronco encefalico ¹⁹.

Capitolo 2

La visita oftalmologica nel cane e nel gatto

Prima di procedere descrivendo l'esecuzione di una visita oculistica nel cane e nel gatto, è bene sottolineare l'importanza delle conoscenze di anatomia e fisiologia oculare; queste, accompagnate da un'esplorazione oculare eseguita correttamente, consentono di arrivare ad una diagnosi in più del 90 % dei casi, facilitando perciò prognosi e trattamento. Innanzitutto è consigliabile prendere in considerazione segnalamento (specie, razza, età), storia clinica ed anamnesi del soggetto ed effettuare una rapida esplorazione fisica generale, dal momento che molte patologie sistemiche hanno delle ripercussioni sulla salute dell'occhio, e talvolta i sintomi oculari possono addirittura precedere la sintomatologia generale sistemica. L'esame oculistico vero e proprio deve essere svolto in modo ordinato e sistematico, valutando la *visione*, gli *annessi oculari* ed infine il *globo oculare* ¹⁹.

2.1 Valutazione della visione e dei riflessi

La *visione* può essere valutata osservando il comportamento e l'andatura dell'animale in ambulatorio. Un soggetto con deficit visivi può facilmente urtare contro oggetti presenti nella stanza oppure essere riluttante a muoversi in un ambiente a lui sconosciuto. È opportuno creare un "percorso a ostacoli" da far affrontare sia in condizioni fotopiche sia scotopiche. Altre prove fondamentali che vanno effettuate sono il test della reazione alla minaccia e il Cotton Ball Test ¹⁹.

I principali *riflessi* che devono essere valutati sono il riflesso pupillare, diretto e consensuale, il riflesso palpebrale ed il riflesso corneale (vedi capitolo 1.4.1).

2.2 Valutazione degli annessi oculari

Nella valutazione degli *annessi oculari* è importante esaminare:

- Orbita: simmetria, eventuali malformazioni, rapporto tra orbita e globo oculare, eventuali prove complementari come ecografia e radiografia.
- Palpebre: alterazioni nella posizione o struttura, presenza di ptosi palpebrale, trichiasi, distichiasi, entropion, ectropion, neoplasie, lagoftalmo ecc...
- Congiuntiva e membrana nittitante: ispezione previa instillazione di collirio anestetico ¹⁹.

2.3 Valutazione del sistema lacrimale

Nella valutazione del sistema lacrimale è doveroso prendere in considerazione sia la componente secretoria che la componente escretoria.

In particolare per la valutazione della **componente secretoria** viene utilizzato il test di Schirmer, utile per valutare e quantificare la produzione lacrimale.

Il *film lacrimale* è costituito da tre strati con funzione di protezione e nutrimento della cornea. La componente acquosa è prodotta dalla ghiandola lacrimale e dalla ghiandola superficiale della terza palpebra, mentre la componente mucosa, la più interna, è prodotta dalle cellule caliciformi congiuntivali; infine la parte esterna, lipidica, è prodotta dalle *ghiandole di Meibomio*. Alterazioni a carico della componente acquosa del film lacrimale sono stati a lungo imputati come possibili cause di lesioni corneali e congiuntivali. Nel cane e nel gatto si utilizzano il test di Schirmer di tipo 1 (STT I), eseguito senza anestesia, e quello di tipo 2 (STT II) che prevede l'utilizzo di un anestetico locale. Lo STT I è una valutazione della produzione acquosa basale, residua e riflessa legata all'irritazione della cornea e della congiuntiva. La quantità di lacrime prodotta dipende dall'integrità del riflesso che coinvolge le terminazioni sensitive del trigemino e dal potenziale secretorio della ghiandola. Lo STT II invece misura solo la produzione basale, eliminando la componente irritativa riflessa poiché la cornea è desensibilizzata dall'uso dell'anestetico locale. L'esecuzione del test è semplice e consiste nell'impiego di

strisce di carta bibula millimetrata, inserite tra il terzo medio e il terzo laterale del fornice congiuntivale inferiore dove vengono mantenute per un minuto. Valori normali del STT I nel cane sono di 20 ± 5 mm/min. Valori inferiori a 10 mm/min sono diagnostici di cheratocongiuntivite secca. Nel gatto si hanno valori leggermente più bassi (15-17 mm/min) e variabili.

Per quanto riguarda la **componente escretoria** è necessario osservare i punti e i canalicoli lacrimali superiore ed inferiore, il sacco e il dotto naso lacrimale. I punti lacrimali sono posti circa a 2-5 mm lateralmente al canto mediale e 1-3 mm internamente al margine palpebrale; sono ovali nel cane e tondi nel gatto.

La pervietà del sistema viene valutata tramite l'uso della fluoresceina e con il lavaggio naso lacrimale. In quest'ultima tecnica la palpebra superiore viene eversa per esporre il punto lacrimale superiore, che viene incannulato e viene irrigato con soluzione fisiologica. Il fluido passa attraverso canalicolo superiore, sacco nasolacrimale, canalicolo inferiore e punto lacrimale inferiore. Se quest'ultimo è imperforato si noterà un piccolo rigonfiamento in quell'area¹⁹.

2.4 Valutazione del globo oculare

Si procede all'ispezione della cornea, che dovrà essere liscia, trasparente, brillante, avascolare e non pigmentata. Per esaminare la cornea si utilizzano fluoresceina, rosa bengala, citologia ed esame colturale. In particolare i primi due suddetti test vengono utilizzati per valutarne l'integrità ed escludere la presenza di lesioni come ulcere corneali; si tratta di coloranti idrofili che non aderiscono alla cornea sana in quanto non si legano all'epitelio ma allo stroma sottostante. Questi test devono essere sempre eseguiti.

A questo punto si passano ad esaminare la camera anteriore e l'umor acqueo; si prendono in considerazione l'ampiezza della camera e la torbidezza dell'umor.

Una parte importante della visita oftalmologica è la tonometria ovvero la misurazione della pressione intraoculare. Essa rappresenta il normale equilibrio tra la produzione e l'eliminazione dell'umor acqueo, e il suo valore medio è di 15-25 mmHg. La IOP va misurata previa instillazione di collirio anestetico, in entrambi gli occhi.

Può essere misurata mediante tonometria digitale, per indentazione (Schiotz) e per appianazione (Tonopen Vet). Nella tonometria digitale si ottengono risultati spesso non del tutto affidabili. La tonometria per appianazione, molto usata negli ultimi anni, stima la pressione attraverso la misurazione della forza necessaria ad appianare una determinata area della superficie corneale ¹⁹.

Per esaminare tutte le strutture posteriori all'iride è necessario dilatare la pupilla con sostanze midriatiche come la Tropicamide. Nel cristallino si cerca di individuare eventuali alterazioni nella forma, nelle dimensioni, nella posizione, eventuali opacità (cataratta), sclerosi nucleare, melanosi, emorragie ed altro. L'esame del cristallino completa l'esame della parte anteriore dell'occhio. La lente si osserva tramite illuminazione e retroilluminazione. Per completare la visita oftalmologica bisogna procedere con l'esame della porzione posteriore dell'occhio, ovvero il vitreo e il fondo oculare con retina e coroide. Questo richiede l'utilizzo di strumenti di maggior precisione: si utilizzano l'oftalmoscopio diretto ed indiretto, meglio se in modo complementare tra loro.

L'oftalmoscopio diretto è in genere più utilizzato rispetto all'indiretto. Si definisce diretto perché non viene interposta alcuna lente tra l'occhio e lo strumento, e produce un'immagine diretta, reale e diritta, ingrandita di 17-19 volte. Con l'oftalmoscopio indiretto invece si utilizza una fonte luminosa e una lente biconvessa frapposta tra l'occhio del paziente e lo strumento. Si ottiene un ingrandimento di 2-4 volte circa e quella che si ottiene è un'immagine virtuale, invertita e capovolta, di un campo visuale di maggiori dimensioni ¹⁹.

Nel fondo oculare normale riconosciamo: zona tappetale, zona non tappetale, papilla ottica e vasi sanguigni. Nel cane il tappeto può essere giallo dorato, verde-azzurro, arancio-marrone. L'area non tappetale è marrone scuro-nera e impedisce di vedere le sottostanti coroide e sclera. La papilla ottica è visibile vicino alla giunzione tra area tappetale e non tappetale; nel cane presenta una grande variazione di dimensioni, di forma (vagamente triangolare nelle razze più grandi) e di colore. Nel gatto il fondo oculare è più uniforme, con tappeto dorato o verde, e zona non tappetale più scura; la papilla ottica è più piccola rispetto al cane e di forma più circolare e standardizzata tra le diverse razze ²³.

2.5 La citologia

Una corretta visita oftalmologica non dovrebbe tralasciare la citologia oculare, molto utile soprattutto per indagare le patologie corneali e congiuntivali. Ad oggi le pratiche citologiche più comunemente utilizzate in oftalmologia veterinaria sono lo *scraping* e il *citobrushing*, anche detto *spazzolato congiuntivale* ⁴².

Lo *scraping* consiste nell'asportazione dello strato superficiale della congiuntiva tramite la componente smussa di una lama da bisturi sterile. Deve essere effettuato sulla congiuntiva bulbare o limbare e richiede una certa manualità da parte dell'operatore. È necessario, per ottenere buoni risultati, distendere uniformemente le cellule sul vetrino, in modo da ottenere uno strato sottile senza danneggiare le cellule.

Il *citobrushing* consiste nel prelievo tramite spazzolatura delle cellule congiuntivali e corneali e successiva stesura del materiale per rotazione della spazzola su un vetrino portaoggetti. Anche in questo caso si richiede una certa manualità, e c'è anche il rischio di raccogliere cellule profonde che possono modificare i risultati e di conseguenza confondere la diagnosi.

Una tecnica originale e innovativa è rappresentata dalla citologia per impressione, che viene comunemente utilizzata in medicina umana e che sta prendendo sempre più piede in ambito veterinario ^{19, 42}.

Tale tecnica diagnostica verrà descritta nello specifico nel capitolo 6.

Capitolo 3

Scopo della tesi

La superficie oculare è rivestita da due diversi epiteli, l'epitelio corneale e quello congiuntivale; entrambi si rinnovano costantemente attraverso la proliferazione e il differenziamento delle rispettive cellule staminali. Esse sono essenziali per il mantenimento dell'integrità della superficie oculare, tramite un rinnovamento continuo in caso di necessità.

Se le cellule staminali corneali sono scarse, danneggiate o distrutte, l'organismo risponde con un'invasione corneale da parte dell'epitelio congiuntivale, causando neovascolarizzazione, perdita della visione e della normale trasparenza corneale.

Nell'uomo le cellule staminali corneali sono localizzate nella porzione basale del limbus sclero-corneale, in specifiche invaginazioni o "nicchie" dette *palizzate di Vogt*, mentre le cellule staminali congiuntivali si trovano nella zona fornicale e bulbare della congiuntiva.

Negli animali invece, l'entità e la posizione di tali cellule sono ancora oggetto di studio e in letteratura poco si è detto a riguardo.

In medicina umana si possono utilizzare appositi *marker cellulari* che sono in grado di riconoscere le cellule staminali dell'epitelio corneale e congiuntivale; il loro impiego risulta molto utile per la diagnosi di patologie oculari caratterizzate da un deficit delle cellule staminali. Tali marcatori vengono utilizzati nelle tecniche di *citologia per impressione* corneale e congiuntivale con doppia immunofluorescenza, e forniscono un grande aiuto sia dal punto di vista diagnostico che terapeutico.

In particolare si è visto che la *Citocheratina 12* (cK12) e la *Mucina 1* (MUC1) sono marcatori particolarmente selettivi e specifici rispettivamente per la cornea e per la congiuntiva.

L'obiettivo di questo lavoro è capire e valutare se gli stessi marker usati abitualmente in medicina umana possano essere utilizzati con la stessa funzione in medicina veterinaria utilizzando la stessa tecnica citologica, e se siano in grado di discriminare tra i due diversi epitelii anche nel cane e nel gatto.

Qualora i risultati fossero positivi, questo rappresenterebbe un enorme ausilio per la gestione delle patologie oculari del cane e del gatto, soprattutto per problemi corneali e congiuntivali.

Questo tipo di indagine infatti permetterebbe di determinare l'origine dell'epitelio che ricopre la cornea, con grandi vantaggi dal punto di vista eziopatogenetico, clinico, diagnostico e prognostico per la patologia considerata.

Capitolo 4

Cellule staminali e Limbal Stem Cells Deficiency (LSCD)

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate, che possono trasformarsi in cellule specializzate nei diversi organi e tessuti. La scienza medica le sta utilizzando in modo sempre più massiccio per curare patologie e ricostruire tessuti.

A seconda dello stadio di sviluppo e della potenzialità differenziativa si distinguono in *cellule staminali embrionali* ed *adulte*.

Le cellule embrionali sono rappresentate dall'ovocellula fecondata e dalle cellule derivate da questa per successive duplicazioni, nei primi giorni della vita embrionale. Col susseguirsi delle duplicazioni esse vanno incontro ad una progressiva riduzione della potenzialità differenziativa e si distinguono in cellule *totipotenti*, in grado cioè di produrre qualsiasi tipo di cellula matura e di tessuto, e in cellule *pluripotenti*, capaci di produrre molti tipi diversi di cellule mature e tessuti, ma non tutti. Queste ultime danno origine alle cellule staminali adulte ⁴¹.

Le cellule staminali adulte possono essere *unipotenti* o *pluripotenti*. Le cellule pluripotenti danno origine alle diverse cellule mature di uno specifico tessuto (es. le cellule staminali emopoietiche che producono le cellule del sangue). Le cellule unipotenti possono dar luogo solo ad uno specifico tipo di cellula matura (es. le cellule staminali del limbus corneale) ⁴¹.

Ad oggi sappiamo che nell'uomo le cellule staminali della superficie oculare sono localizzate nella porzione basale del limbus corneale all'interno di specifiche invaginazioni o "nicchie" dette *Palizzate di Vogt*, e nella zona fornica e bulbare della congiuntiva ⁴⁵.

Già dagli anni '40, alcuni studi di Mann e Hanna avevano ipotizzato un movimento delle cellule epiteliali corneali dalla zona limbare verso la parte centrale della cornea nel coniglio^{22, 40}. In seguito a studi condotti su occhi di suini, è stato ipotizzato che il limbus potesse avere un ruolo importante nel rinnovamento

dell'epitelio corneale ¹⁰, e con studi ulteriori di Sun e Green nel 1977 e di Cotsarelis nel 1989 si è arrivati alla conclusione che le cellule staminali corneali risiedono proprio nello strato basale limbare¹. La concentrazione di tali cellule non è uniforme in tutto il limbus, ma è maggiore nelle zone superiore e inferiore rispetto alle zone nasale e temporale; questa differenza è probabilmente dovuta all'azione protettiva delle palpebre superiore ed inferiore ¹¹.

Danni corneali che non coinvolgono il limbus possono essere risolti ed avere un esito favorevole, mentre danni al limbus portano a difetti epiteliali corneali permanenti che non possono essere risolti: questo conferma l'enorme importanza rivestita dalla zona limbare ⁴⁰.

Thoft e Friend hanno proposto la cosiddetta "X,Y,Z" ipotesi di mantenimento della superficie epiteliale corneale, secondo cui $X + Y = Z$. "X" è il movimento delle cellule epiteliali dalla cornea periferica parallelamente verso la parte centrale e la membrana basale, "Y" indica il movimento delle cellule dagli strati basali alla superficie, e "Z" la perdita delle cellule epiteliali superficiali ^{1,38}.

Le cellule staminali limbari sono cellule staminali adulte unipotenti con un'elevata capacità rigenerativa e mitotica; possono riprodursi in tempi brevissimi e ricostruire superfici epiteliali interamente distrutte, dando origine ad un tipo specifico di cellula matura. Da esse originano le cellule ad amplificazione transiente (TACs: Transient amplifying cells), che migrano centripetamente e si differenziano in cellule post mitotiche (PMCs: postmitotic cells). Ulteriori differenziazioni delle cellule postmitotiche danno origine alle cellule epiteliali della superficie corneale (TDCs: terminal differentiated cells)⁴¹.

Le palizzate di Vogt rappresentano una zona "ondulata", con numerose papille limbari che si approfondano e si estendono verso lo stroma sottostante. Tali invaginazioni permettono alle cellule basali limbari di interagire con la ricca rete vascolare sottostante, che fornisce loro nutrienti, fattori di supporto, ed una superficie maggiore, permettendo una grande concentrazione di cellule staminali limbari all'interno di una piccola area.

L'anatomia dell'occhio permette di studiare facilmente tali cellule, e di esaminarle tramite tecniche minimamente invasive.

Le cellule dello strato basale risiedono tra i melanociti e spesso presentano un “cappello” di melanina, che le protegge da insulti ambientali come le radiazioni ultraviolette.

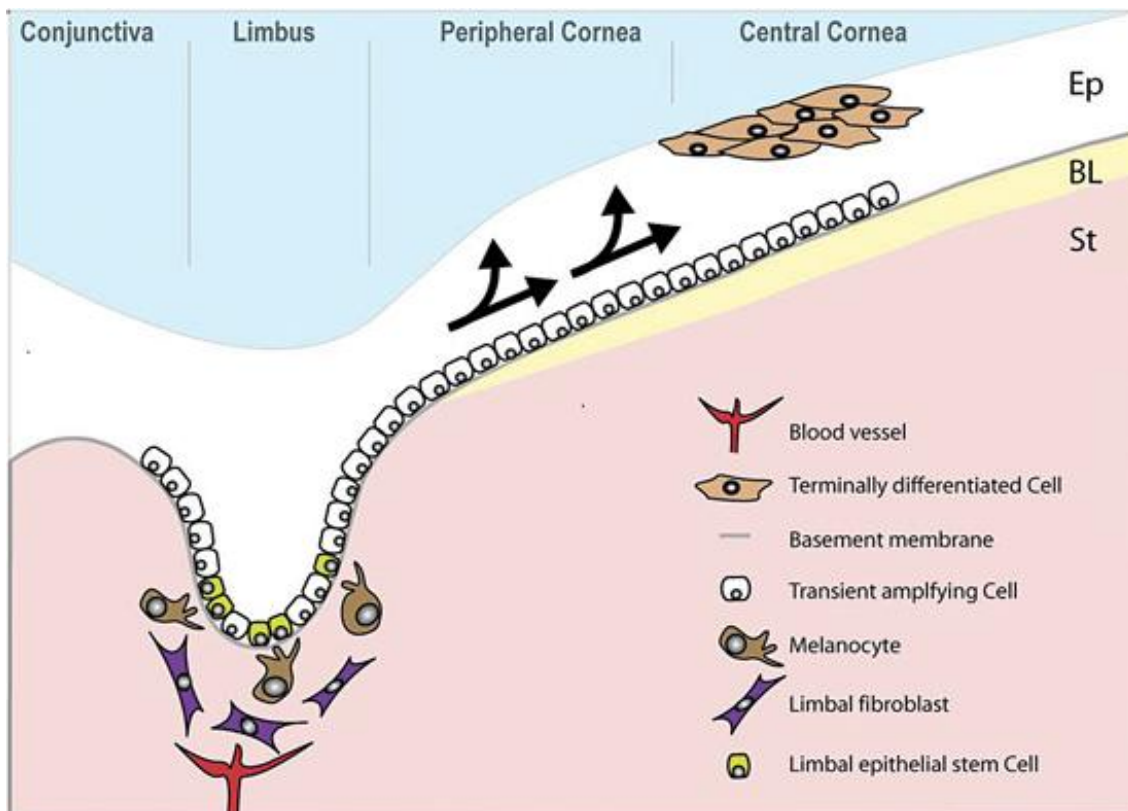


Figura 4.1 (tratta dal sito web eec-syndrome) : schema del limbus e del turn-over dell'epitelio corneale

In aggiunta a tale ruolo di fornire una nicchia per le cellule staminali limbari, l'epitelio limbare agisce anche come una sorta di barriera fisiologica e meccanica, prevenendo l'invasione della cornea da parte dell'epitelio congiuntivale¹.

L'acronimo LSCD significa “Limbal stem cells deficiency” ed indica un deficit delle cellule staminali limbari; nel momento in cui queste cellule, le palizzate di Vogt, o

entrambe, vengono perse o danneggiate, le cellule epiteliali non sono più in grado di essere sostituite da nuove cellule funzionali.

Tale patologia finora è stata riconosciuta universalmente soltanto in medicina umana; ad oggi la sua esistenza in medicina veterinaria è stata soltanto ipotizzata.

I segni clinici di LSCD comprendono: congiuntivalizzazione, vascolarizzazione corneale superficiale e poi profonda, fotofobia, dolore oculare variabile, diminuzione fino a perdita della capacità visiva, opacità corneale, arrossamento diffuso, infiammazione cronica oculare, presenza di ulcere, cicatrici e difetti epiteliali permanenti^{1, 27}. La maggior parte di tali segni clinici è la diretta conseguenza ed espressione della sostituzione dell'epitelio corneale con quello congiuntivale, che risulta essere molto vascolarizzato.

Il deficit di cellule staminali può essere parziale o totale, a seconda dell'entità del danno, della percentuale di cellule e dell'estensione della zona colpite. Un deficit parziale comporta una perdita di cellule staminali settoriale ma in ogni caso inferiore al 50 %.

Un deficit totale porta a completa opacizzazione e congiuntivalizzazione della cornea, con una probabile completa perdita della visione.

La LSCD può essere poi unilaterale o bilaterale a seconda che siano coinvolti uno solo o entrambi gli occhi.

Si distinguono LSCD primaria e secondaria⁴⁰.

Nell'uomo la **LSCD primaria** è caratterizzata dall'assenza di fattori esterni identificabili, ad esempio nei casi di: aniridia ereditaria, sindrome EEC, cheratiti associate a sindromi endocrine multiple, cheratopatia neurotrofica, infiammazioni limbari periferiche gravi.

La sindrome *EEC* o *Ectrodattilia-displasia ectodermica-palatoschisi* è una rara patologia malformativa congenita caratterizzata dall'associazione di ectrodattilia (un'anomalia degli arti in cui alcuni raggi centrali della mano sono mancanti con aspetto di "mano a pinza" o "mano a chela di granchio"), anomalie del palato ed anomalie dei tessuti di origine ectodermica. L'ectoderma è il foglietto embrionale più esterno da cui prendono origine il tessuto nervoso ed i tessuti epiteliali di rivestimento (epidermide, epitelio corneale ecc.) ed annessi cutanei (capelli, peli, unghie ecc.). Anomalie frequenti in tale patologia sono: anomalie del dotto naso-

lacrimale, del sistema genito-urinario e delle estremità; alterazioni dei denti che possono essere piccoli e formati parzialmente, cute secca, ciglia e sopracciglia spesso assenti.

Le alterazioni oculari rappresentano uno dei principali problemi della malattia: blefariti, congiuntiviti, cheratocongiuntiviti ricorrenti, disfunzione dell'epitelio corneale, scarsa riepitelizzazione in seguito a traumi e a cheratoplastica perforante, pannus corneale vascolarizzato e progressiva diminuzione della capacità visiva fino alla completa perdita della vista. Tale patologia è legata a mutazioni del gene p63, necessario affinché le cellule staminali corneali possano mantenere e garantire la rigenerazione dell'epitelio corneale, sia in risposta alle fisiologiche necessità di rinnovamento, sia in caso di insulti lesivi che richiedano una riparazione della superficie oculare⁴¹.

La **LSCD secondaria**, più comune, è dovuta alla distruzione delle cellule staminali limbari a causa di fattori esterni, tra cui: traumi, causticazioni chimiche (da acidi e alcali) e termiche, radiazioni ionizzanti e ultraviolette, patologie sistemiche come la Sindrome di Stevens-Johnson, Pemfigoide oculare cicatriziale, deficit di vitamina A, patologie endocrine, fattori iatrogeni (chirurgie oculari multiple, uso prolungato di farmaci topici, chemioterapia sistemica), cheratopatia da lenti a contatto e svariate patologie come cheratocongiuntivite secca, cheratiti infettive, pterigio ed altre.

La cornea è un tessuto avascolare, immunologicamente privilegiato e favorevole in quanto il rigetto è raro e non è necessaria una terapia immunosoppressiva; per questo motivo i trapianti di cornea vengono eseguiti molto più facilmente rispetto ai trapianti di qualsiasi altro organo. Tale intervento ha un'alta percentuale di successo (95%) se il limbus è in buone condizioni ^{12, 46}.

Tale intervento, anche se inizialmente tentato, non può essere effettuato nei casi di LSCD. Questo infatti può funzionare per i primi tempi, per la presenza delle cellule ad amplificazione transiente nel tessuto trapiantato, ma dopo alcuni mesi si ripresentano gli stessi problemi di vascolarizzazione, opacità e panno congiuntivale.

Infatti fino a che vive l'epitelio del donatore si avrà un'ottima cornea, dopo di che, mancando le cellule staminali che dovrebbero provvedere a crearne uno nuovo, la

cornea rimarrà scoperta, andando in contro al fenomeno di “melting” o colliquazione⁴⁶.

In passato le opzioni possibili erano: speciali cheratoprotesi, osteo-odonto-cheratoprotesi e trapianto sclero-corneale sostituendo interamente il tessuto malato. I risultati erano piuttosto deludenti ¹².

Oggi si agisce in questo modo: nei casi di LSCD totale unilaterale si procede con un autotrapianto limbare (trapianto di cellule staminali coltivate dall'occhio controlaterale sano); nei casi di LSCD parziale unilaterale, si preleva tessuto limbare sano o dallo stesso occhio o dal controlaterale, si amplifica e si reinnesta.

Nei casi di LSCD bilaterale si può effettuare un allotrapianto limbare utilizzando come donatore un cadavere o un parente (aumenta però l'incidenza di rigetto) oppure un autotrapianto con cellule staminali epiteliali non corneali, come le cellule staminali della mucosa orale, usate dalla Banca degli Occhi del Veneto (FBOV).

La tecnica più innovativa, proposta dal team di ricerca e produzione clinica della “Cell Factory” della Fondazione Banca degli Occhi del Veneto, è il trapianto di cellule staminali, che rappresenta una soluzione definitiva al problema. Si preleva una biopsia di 1-1,5 mm² di limbus dall'occhio sano, tale biopsia viene amplificata in laboratorio e poi reinnestata nel paziente, ottenendo una risoluzione delle patologie corneali in oltre il 70% dei casi ¹². Dopo qualche tempo si verifica con la citologia l'attecchimento delle cellule staminali.

Ovviamente l'unica condizione è che l'occhio controlaterale sia sano, altrimenti bisogna ricorrere a trapianti limbari omologhi (allograpianti), più complicati in quanto i pazienti necessitano di una terapia immunosoppressiva per lungo tempo. Si tratta inoltre di una pratica molto costosa; l'intenzione futura è quella di poter sfruttare cellule staminali embrionali totipotenti meno differenziate rispetto a quelle limbari.

Il limite di tale tecnologia è che le cellule trapiantate non possono riparare e risolvere danni sottostanti avvenuti nello stroma (come soventemente accade) e quindi l'occhio dovrà comunque essere sottoposto ad un successivo intervento di cheratoplastica lamellare tradizionale¹².

Per quanto riguarda i substrati utilizzati, ad oggi il gold standard è il gel di fibrina, un materiale inerte che non modifica la capacità proliferativa delle cellule staminali, agendo esclusivamente da carrier^{30, 46}.

La fibrina non è però in grado di riparare lo stroma eventualmente danneggiato. Un altro inconveniente può essere dato dal fatto che la proliferazione cellulare può portare all'assottigliamento dello strato di fibrina rendendo difficile la manipolazione del lembo durante la chirurgia, o ancora il fatto che l'eventuale ristagno di sangue al di sotto del lembo di cellule staminali può portare ad una compromissione nel riassorbimento della fibrina¹².

Una delle principali attività della FBOV consiste nella ricerca di nuovi scaffold ovvero supporti biologici e/o sintetici alternativi alla fibrina, compatibili con la crescita delle cellule staminali limbari e in grado di fare le veci dello stroma sottostante¹²: lenti a contatto terapeutiche, supporti di collagene, Myogel, glucosamminoglicani, membrana amniotica umana e lenticoli corneali liofilizzati o vivi a cui si asporta l'epitelio³.

I lenticoli corneali sono dei "bottoni" di tessuto, di 8-8.5 mm di diametro³². Possono essere liofilizzati o vivi, e sono ottenuti tramite un microcheratomo da cornee a cui viene asportato l'epitelio. Si è visto che tali lenticoli permettono l'adesione delle cellule staminali corneali pur mantenendo la popolazione stromale intatta (cheratociti); di conseguenza sarebbe possibile ottenere delle emicornee autologhe in vitro costituite da due popolazioni cellulari distinte (cheratociti e cheratinociti), organizzate nella normale nicchia corneale.

Tale prodotto sarebbe pertanto in grado di riparare e correggere sia il deficit limbare sia quello stromale tramite un unico intervento chirurgico¹².

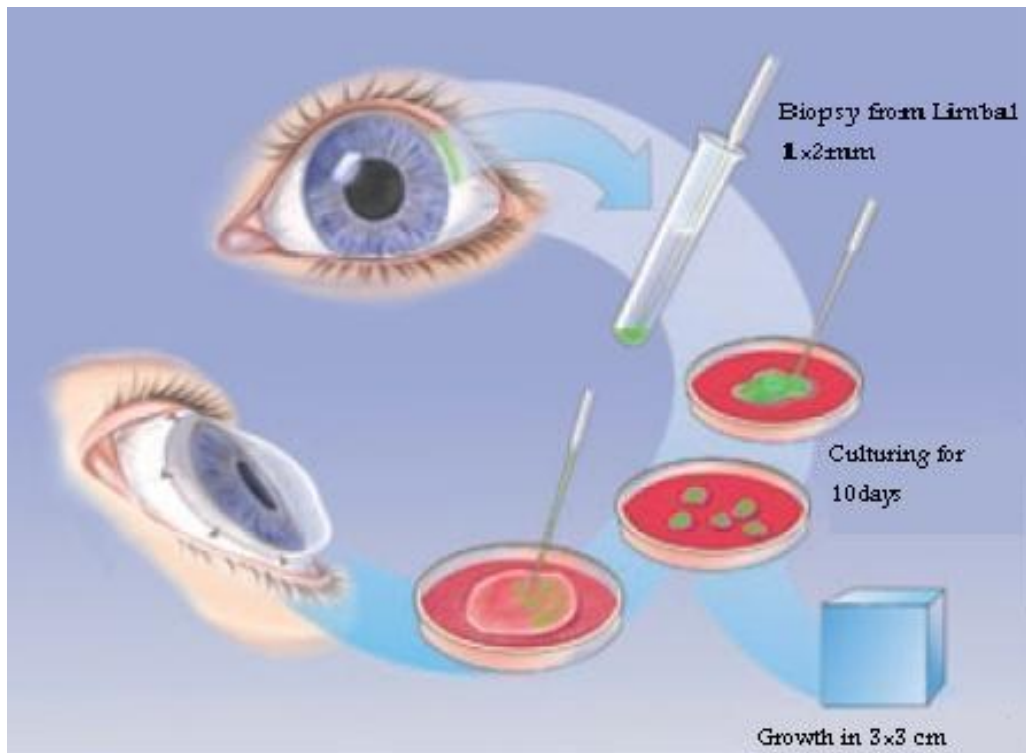


Figura 4.2 : Prelievo e coltura di cellule staminali limbari

Da studi precedenti di Chung et al. è probabile che le cellule staminali corneali siano localizzate nel limbus anche nel cane e l'esatta localizzazione è stata dimostrata usando anticorpi monoclonali ⁶.

La letteratura a riguardo è scarsa: un'importante conferma in tal senso è data da uno studio realizzato dalla Facoltà di Scienze Agrarie e Veterinarie dell'Università di San Paolo in Brasile nel 2007. Tale studio includeva 18 cani adulti, di razza variabile, sia maschi che femmine. In questa ricerca si è visto che causando sperimentalmente una distruzione del limbus, si avevano tutti i sintomi di LSCD, a testimonianza del fatto che anche in questa specie il limbus riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità della superficie oculare, ospitando le cellule staminali corneali indifferenziate. Tutti gli animali sono stati sottoposti a distruzione limbare unilaterale; in seguito sono stati divisi in 2 gruppi: il gruppo 1 (12 cani) sottoposto a trapianto limbare 30 giorni dopo la distruzione di cellule staminali; il gruppo 2 (6 cani) utilizzato come gruppo di controllo.

I risultati sono stati ottimi, pari a quelli ottenuti nell'uomo. Dopo soli 60 giorni dal trapianto di cellule staminali la congiuntivalizzazione dell'epitelio corneale mostrava i primi segni di regressione, e dopo altri 60 giorni era regredita completamente⁶.

Infine ricerche condotte dalla Facoltà di Medicina Veterinaria e dal Dipartimento di Biologia dell'Università di Zagabria hanno permesso di ottenere 10 innesti di cornea di cane di dimensioni di 1 cm², ottenuti da cellule limbari canine coltivate in vitro. Questi risultati sono sicuramente molto incoraggianti; inoltre tale possibilità di trapianto corneale nel cane ha aperto nuove prospettive anche in medicina veterinaria, facendo pensare anche alla creazione di una "Banca degli occhi" divisa per specie, che rappresenterebbe senza dubbio un enorme passo in avanti in tale ambito²⁰.

Capitolo 5

I marker

La diagnosi di LSCD viene normalmente effettuata tramite visita clinica oftalmologica e confermata successivamente tramite citologia ad impressione ³¹.

La presenza di Goblet Cells nella cornea indica la presenza di un epitelio congiuntivale. Tuttavia in varie patologie in cui si riscontra LSCD, si possono osservare deficit anche di Goblet Cells, portando quindi ad un risultato falso negativo. In ogni caso in assenza di tali cellule risulta difficile distinguere epitelio corneale e congiuntivale³.

Già con gli studi effettuati da Egbert et al. si era visto in realtà che è molto complicato discriminare tra epitelio corneale e congiuntivale tramite tecniche citologiche convenzionali (colorazione PAS-Ematossilina). Ecco perché la necessità di identificare uno o più marker che possa differenziare i due tipi di epiteli si è fatta negli anni sempre più impellente³¹.

Buoni potenziali candidati sono le citocheratine e le mucine³¹.

Tali proteine infatti, soprattutto le citocheratine, sono normalmente espresse sulla superficie oculare ed hanno un ruolo cruciale per il mantenimento della lubrificazione e della fisiologia degli epiteli oculari.

Ciò che si ricerca è quindi la presenza di marcatori che soddisfino i seguenti requisiti:

1. Specificità e selettività: i marcatori devono essere altamente specifici e mutualmente esclusivi per le due linee cellulari (cornea e congiuntiva), senza sovrapposizione di segnali).
2. Localizzazione: i marcatori devono essere espressi solamente nello strato più superficiale degli epiteli, dal momento che solo le cellule dello strato apicale verranno impresse sul filtro e pertanto analizzate; è inoltre

preferibile che il marcatore abbia un'appropriata localizzazione subcellulare (nucleare, citoplasmatica, di membrana ecc.) e non sia secreto dalle cellule, al fine di garantire un'accurata rintracciabilità e definizione del preparato cellulare³.

Nella cornea umana sono state identificate circa 36 cheratine di cui 30 appartengono al tipo I e II delle cheratine epiteliali, 6 appartengono al tipo I e II delle cheratine dei capelli. Studi del 2011 da parte di Merjava et al. e Lyngholm et al. hanno mostrato la presenza nella cornea umana delle seguenti cheratine: cK1, cK3-cK6, cK8, cK13-cK16, cK18 e cK19. Inoltre le cheratine epiteliali rappresentano il 47% delle proteine totali presenti negli strati epiteliali¹⁶.

Le citocheratine sono proteine filamentose del citoscheletro appartenenti alla classe dei filamenti intermedi ⁴⁴. Sono proteine non idrosolubili, presenti in tutti i tessuti epiteliali dell'organismo. Sono suddivise in due famiglie: le cheratine acide e le cheratine basiche-neutre. Generalmente ogni cheratina acida è "accoppiata" ad una cheratina della famiglia basico-neutra³⁴.

In uno studio del 2010, Barbaro ed altri ricercatori della Fondazione Banca degli Occhi del Veneto, hanno cercato di mettere a punto un nuovo metodo diagnostico per la LSCD, basandosi essenzialmente sull'utilizzo di marker specifici, citologia ad impressione e utilizzo di un microscopio confocale di tecnologia avanzata³.

Le analisi sono state effettuate sia in soggetti sani (6 soggetti) sia in soggetti con evidenti patologie oculari (12 soggetti), proprio per osservare la differente espressione dei marker cellulari. Sono state effettuate immunofluorescenze sia su sezioni istologiche sia su campioni sclero-corneali prelevati da donatori sani.

Sono stati studiati e quantificati i seguenti marker: muc 1, cK3, cK12, cK19.

Da questo studio è emerso che:

- **muc 1** è presente esclusivamente negli strati soprabasali della congiuntiva, mentre non è presente nel limbus e nella cornea. In base a questi risultati, potrebbe essere ragionevolmente considerato un marker specifico per l'epitelio congiuntivale.

- **cK12** è un marcatore specifico per l'epitelio corneale. È presente infatti in tutti gli strati corneali e nello strato soprabasale limbare, mentre è assente nella congiuntiva³. Tale risultato conferma quanto era stato affermato dalla letteratura precedente. Infatti già studi precedenti di Chen et al. nel 1994 e di Yoshida et al. nel 2006 avevano rilevato la presenza di cK12 solo ed esclusivamente a livello di epitelio corneale.
- **cK 3** è invece presente in tutti e tre i tipi epiteliali: nel limbus parzialmente, nella cornea e negli strati soprabasali della congiuntiva; non è pertanto un marker specifico per l'epitelio corneale.
- **cK19** è espresso nello strato basale e soprabasale di tutti e tre gli epiteli: cornea, congiuntiva e limbus, anche se il livello espresso nella congiuntiva è decisamente maggiore.

Ecco quindi che la citocheratina cK3 utilizzata in passato per la caratterizzazione dei campioni di citologia ad impressione si è dimostrata non altamente specifica e non è stata confermata in tale studio³.

Saggi molecolari mediante RT-PCR semiquantitativa e di immunocistochimica (**Figura 5.1**) hanno chiaramente dimostrato la presenza di entrambi i marcatori nei compartimenti limbare, corneale e congiuntivale, con un elevato grado di "overlapping", cioè di sovrapposizione del segnale³.

Nello studio di Poli et al. del 2011 viene confermato quanto detto da Barbaro et al. per quanto riguarda cK12 e cK3.

Per quanto riguarda cK19 è presente invece una discrepanza di risultati.

cK19 è stato proposto in passato da Donisi et al. come marker congiuntivale¹³.

Dallo studio di Barbaro et al. del 2010, cK19 risulta essere tuttavia un marker non specifico per la congiuntiva, essendo presente in cornea, limbus e congiuntiva³.

Nello studio di Poli et al. dell'anno seguente invece, cK19 risulta presente in tutti gli strati congiuntivali, nello strato soprabasale del limbus, ma assente nella cornea (nonostante deboli colorazioni nello strato corneale basale periferico).

Di conseguenza secondo questo studio cK19 può essere considerato un marker congiuntivale²⁹. In questo stesso studio viene esaminata anche la cK13, che risulta

essere presente nella congiuntiva, nello strato basale del limbus ed assente nella cornea, risultando essere un migliore marker congiuntivale rispetto a cK19.

D'accordo con Barbaro et al., un ulteriore studio del 2011 di Ramirez-Miranda contesta la specificità congiuntivale di cK19 in favore di cK13. Il fatto che l'espressione di cK12 e ck13 sia mutualmente esclusiva sulla superficie oculare rende cK13 un potenziale marker congiuntivale molto più specifico di quanto non si credesse in passato³¹.

In definitiva i ricercatori della Banca degli Occhi del Veneto si sono concentrati sull'espressione di cK12 e Muc1.

cK12, come si è visto, è un marcatore assolutamente specifico per la cornea.

Muc1 è un marcatore che in realtà è stato precedentemente trovato sia nella cornea che nella congiuntiva, anche se i livelli sono significativamente molto più elevati nella congiuntiva. In particolare l'anticorpo contro la Muc1 (H-295) utilizzato durante tale studio sembra essere così specifico che solamente la congiuntiva viene ben evidenziata³.

A questo punto dopo le analisi molecolari ed istologiche si è verificato se tali osservazioni fossero riproducibili anche in campioni di citologia ad impressione. Sono stati quindi analizzati i campioni citologici prelevati da donatori sani (**Figura 5.2**).

Come atteso, i marcatori cK12 e Muc1 erano mutualmente esclusivi e in grado di riconoscere solamente la cornea (nel caso di cK12) o la congiuntiva (nel caso di Muc1). A differenza dei due marcatori precedentemente utilizzati per questo tipo di analisi (cK3 e cK19) non è stata evidenziata alcuna sovrapposizione nei segnali e la distinzione fra congiuntiva e cornea è assai specifica come chiaramente visibile nella zona limbare (**Figura 5.3**)³.

Figura 5.1 (da Barbaro et al., 2010): Analisi di marcatori della superficie oculare su sezioni congiuntivali, limbari e corneali. La citocheratina 3 (cK3 - viola) e la citocheratina 19 (cK19 - giallo) sono espresse in tutti e tre i distretti della superficie oculare. La citocheratina 12 (cK12 - rosso) è invece espressa solo nei compartimenti limbare e corneale ed assente nella congiuntiva, mentre la mucina 1 (Muc1 - verde) è presente solo nella congiuntiva.

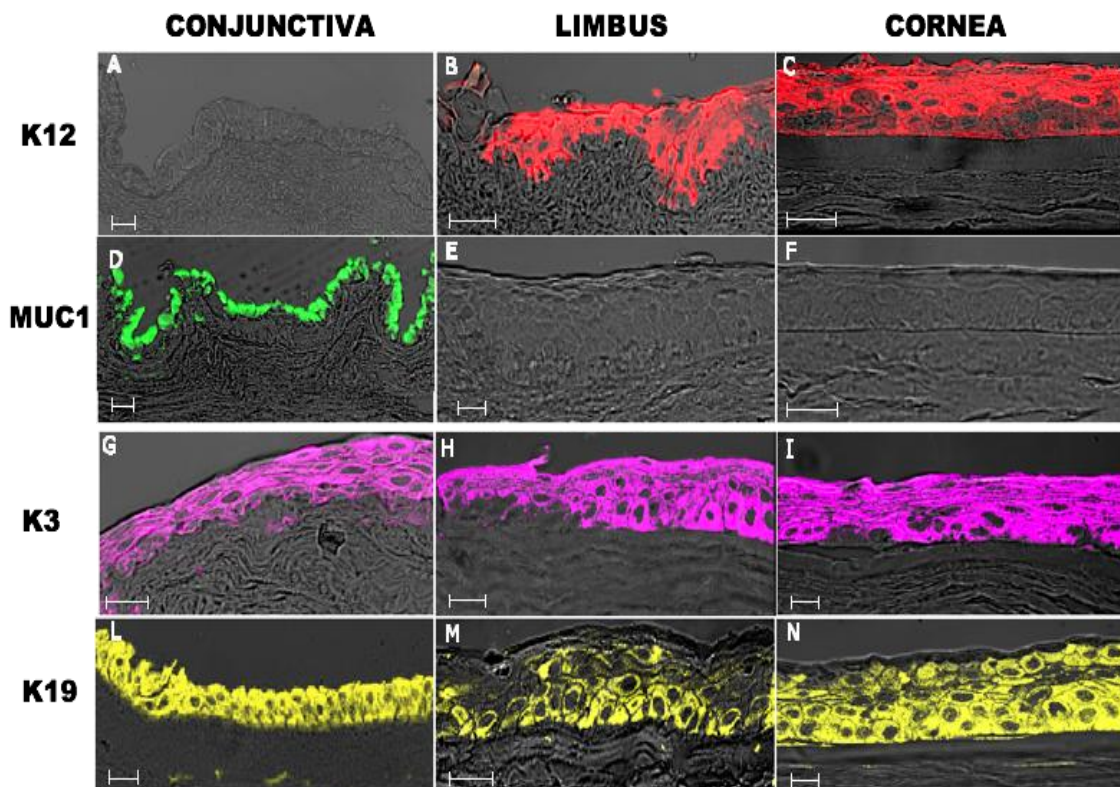


Figura 5.2 (da Barbaro *et al.*, 2010): Risultati della citologia a impressione su soggetti normali analizzati mediante la coppia di marcatori cK12/Muc1 e cK3/cK19. Filtri impressi nella regione congiuntivale (A) risultano positivi solo a Muc1 (verde), mentre filtri impressi nella regione corneale sono positivi solo a cK12 (rosso) (C). Nella zona di separazione (regione limbare) i filtri risultano positivi sia a Muc1 che a cK12 (B). Quando vengono usati i marcatori cK3 (viola) e cK19 (giallo) questa netta suddivisione non è facilmente riscontrabile e i due marker risultano ampiamente in sovrapposizione (D, E, F).

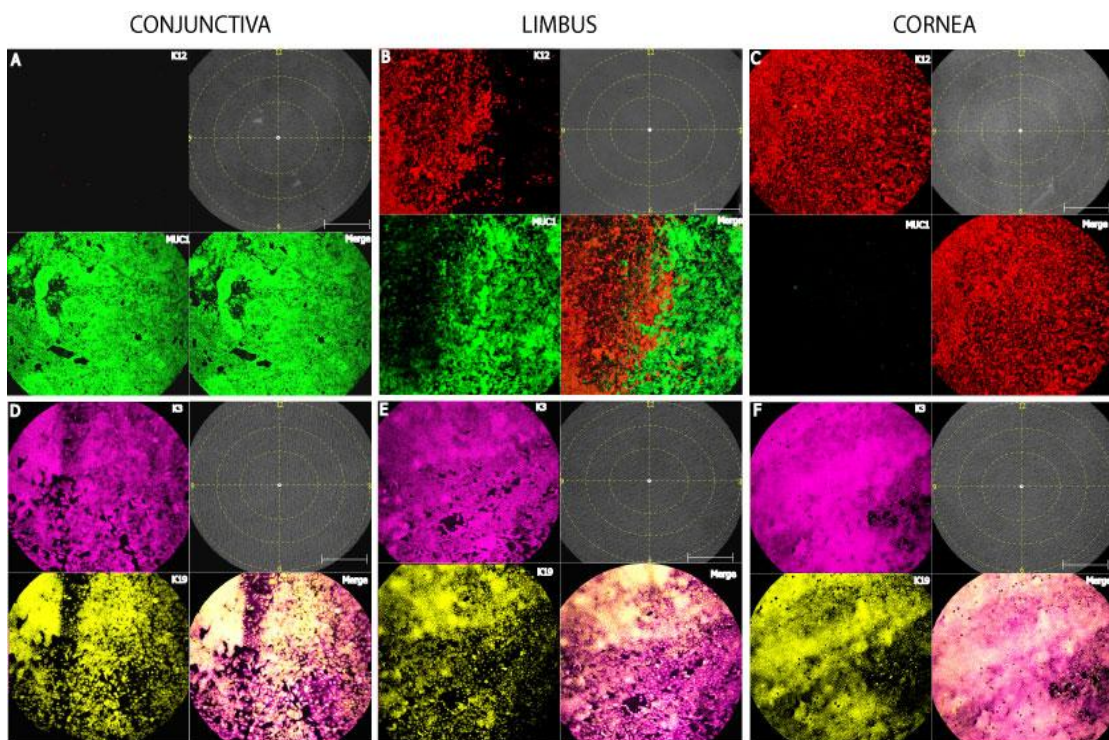
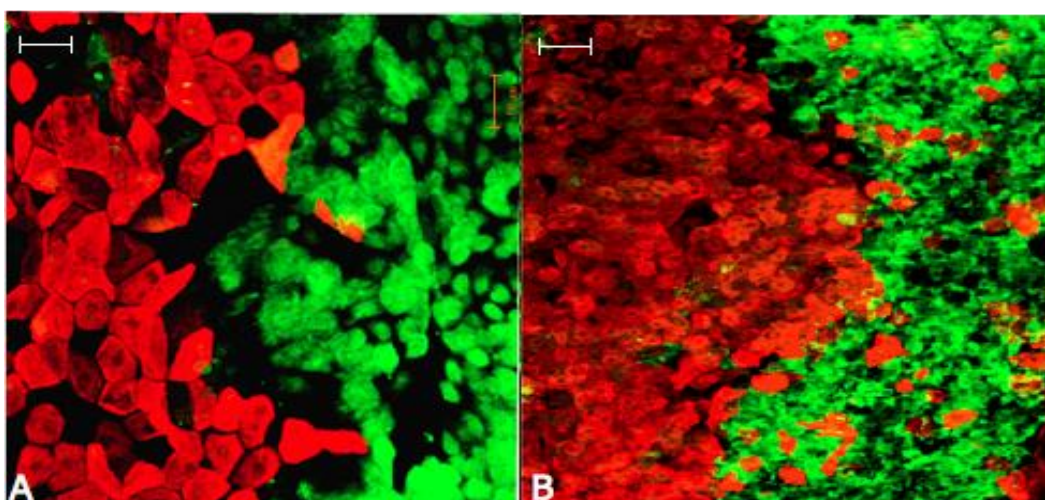


Figura 5.3 (da Barbaro *et al.*, 2010): Nella regione limbare di donatori sani i filtri per citologia ad impressione trattati con anticorpi contro cK12 e Muc1 dimostrano una distinta e netta separazione fra la regione corneale (in rosso, cK12-positiva) e quella congiuntivale (in verde, Muc1-positiva).



Capitolo 6

La citologia ad impressione

La citologia ad impressione è una tecnica diagnostica innovativa e originale, che prevede l'applicazione di un filtro di acetato di cellulosa sulla superficie oculare da campionare ^{4,9,35}.

È una tecnica pratica, sicura, semplice da effettuare e minimamente invasiva. Fornisce le stesse identiche informazioni di una normale biopsia, con il vantaggio, rispetto a questa, di causare un minimo discomfort per il paziente e di conseguenza fornisce una valida alternativa per la diagnostica congiuntivale e corneale rispetto a biopsia e citologia per spazzolamento⁹. Inoltre le normali biopsie danno informazioni su un'area molto piccola della superficie oculare, e la conservazione morfologica delle cellule non è sempre ottimale.

Con questo tipo di indagine si rimuovono gli strati più superficiali dell'epitelio oculare; di solito si tratta di 1-3 strati che attecchiscono al filtro e vi restano attaccati. I campioni così ottenuti possono essere sottoposti ad analisi istologiche, immunoistochimiche o molecolari ⁹.

Il tipo di filtro di carta usato e la tecnica di raccolta del campione dipendono dallo scopo per cui il campione stesso viene raccolto.

Per quanto riguarda il materiale utilizzato, nel corso degli anni sono stati usati filtri di varie dimensioni, forme e tipologie. Inizialmente sono stati utilizzati materiali plastici come il Polistirolo³⁶, dischi di plastica Thermanox da Hershenfeld et al. e di vetro da Zaidman et al.⁷.

Egbert et al. furono i primi ad ottenere buoni risultati utilizzando filtri composti da esteri di cellulosa con pori submicroscopici (Millipore) dopo aver avuto risultati scadenti con filtri sintetici.

Le dimensioni dei pori del filtro condizionano la consistenza delle cellule epiteliali raccolte e la risoluzione dell'immagine. Pori più grandi raccolgono meglio le cellule, ma il dettaglio non viene preservato altrettanto bene⁷.

La maggior parte degli autori oggi utilizza filtri di carta senza surfactante, con pori di 0.22-0.44 μm . L'eventuale utilizzo del surfactante infatti influisce negativamente sul numero delle cellule epiteliali raccolte⁹.

Nei primi studi i pazienti non erano sottoposti ad anestesia locale⁷: alcuni autori ritenevano che l'utilizzo di anestetici potesse inficiare la buona riuscita dell'esame, causando artefatti³⁶. Queste teorie sono state smentite ed oggi si somministra di prassi un anestetico topico⁷.

Dopo la somministrazione dell'anestetico si rimuove l'eccesso di fluido lacrimale (per evitare un eccessivo imbibimento del filtro che ridurrebbe la cellularità del campione), e si applica il filtro, previa marcatura sul retro³⁵.

Il filtro può essere applicato sulla cornea, sulla congiuntiva, sul limbus, a seconda della zona che si vuole campionare.

Si esercita una leggera pressione e si mantiene il filtro adeso per circa 5-10 secondi; con Nelson è stato introdotto un oftalmodinamometro per esercitare sempre la stessa pressione di 40 g. Pressioni di 60 o 80 g sono risultate in seguito più funzionali²⁴.

Viene rimosso delicatamente il filtro con un movimento continuo e deciso, avendo cura di mantenere le palpebre aperte e lontane dal filtro.

Il filtro, secondo la tecnica di Tseng, viene trasferito in una piastra Multiwell con 24 pozzetti, contenente un fissativo. In seguito i filtri vengono trasferiti su un vetrino e sono di solito colorati per l'osservazione al microscopio ottico ed elettronico.

Egbert ed altri hanno usato le colorazioni di PAS (Periodic Acid Schiff) per colorare le Goblet cells e l'ematosilina per colorare le cellule epiteliali⁷.

Tseng ha modificato la tecnica utilizzando una combinazione di PAS e Papanicolaou⁷.

Le applicazioni cliniche per l'utilizzo della citologia a impressione sono varie: diagnosi eziologica delle patologie che colpiscono la superficie oculare, documentare eventuali cambiamenti sequenziali in cornea e congiuntiva nel corso del tempo, monitorare l'efficacia dei trattamenti, stadiare la metaplasia squamosa

congiuntivale, analizzare la superficie oculare con tecniche di immunocolorazione e analisi del DNA³⁵.

Tale tecnica è stata descritta per la prima volta simultaneamente da due diversi gruppi di ricercatori: da una parte da studiosi del Moorfield Hospital Eye di Londra (Thatcher et al., 1977), e dall'altra da un gruppo della facoltà di Medicina dell'Università di Stanford negli Usa (Egbert et al., 1977)⁷.

Nel corso degli anni la tecnica è stata poi modificata da vari autori. Inizialmente era usata da Egbert et al. soprattutto per quantificare il numero di Goblet cells nelle diverse aree della congiuntiva. Negli anni successivi, è diventata la tecnica standard per studiare la metaplasia squamosa e la perdita di Goblet cells nel corso di patologie oculari tipo "occhio secco", congiuntiviti, danni chimici ed altre; il ritrovamento di Goblet cells nei campioni di citologia ad impressione corneali divenne una delle caratteristiche diagnostiche della LSCD⁷.

Esistono diverse classificazioni per stadare la metaplasia squamosa: ad oggi la più utilizzata è quella di Tseng del 1985, che attribuisce al campione un valore variabile da 0 (normale) a 5 (cheratinizzazione avanzata)³⁹.

La citologia ad impressione è utile per la valutazione di patologie quali cheratocongiuntivite secca, deficit di vitamina A, pemfigoide oculare cicatriziale, patologie atopiche, cheratocongiuntivite limbica superiore, mucopolisaccaridiosi e per investigare sull'invasione di microrganismi nella superficie oculare³⁵.

Modifiche alla tecnica tradizionale sono state fatte per lo studio delle citocheratine espresse nella cornea e nella congiuntiva, tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali⁴.

Thiel et al. hanno introdotto l'utilizzo di una membrana trasparente di nitrocellulosa (Biopore) per poter applicare metodiche immunopatologiche per diagnosticare infezioni virali superficiali tipo Herpes Simplex Virus, Varicella Zoster Virus e Adenovirus. Infatti in questo tipo di infezioni più che in altre una diagnosi precoce è essenziale. Le tecniche microbiologiche convenzionali sono costose, richiedono molto tempo e non sono sufficientemente sensibili.

La citologia ad impressione è invece rapida e semplice: i campioni si raccolgono e conservano facilmente nel tempo³⁷; si utilizzano delle membrane Biopore, in

quanto il normale filtro di acetato di cellulosa necessiterebbe un trattamento chimico per essere "schiarito".

Tali membrane sono state utilizzate anche in associazione alla tecnica ELISA da Garcher et al. e per lo studio delle neoplasie oculari da Tole et al.⁷.

La citologia infine permette di valutare i cambiamenti della superficie oculare dopo cheratectomia terapeutica in pazienti con distrofia corneale ed altre patologie, e di esaminare la superficie oculare e determinare il grado di LSCD in pazienti che hanno subito bruciature chimiche-termiche. Le bruciature chimiche sono il danno oculare più frequente, e la gravità della situazione dipende dall'estensione della zona oculare che viene a contatto con la sostanza, e dal grado di penetrazione di quest'ultima.

Ciò comporta non solo una perdita di cellule staminali, ma anche un danno ad epitelio e stroma corneale, con presenza di Goblet cells a livello corneale. Tali cellule sono molto importanti per due motivi: da un lato, la presenza di queste cellule implica congiuntivalizzazione e LSCD; dall'altro lato, la riduzione o assenza di muco nel film lacrimale compromette una diffusione lacrimale uniforme, portando a cheratocongiuntivite secca, una delle principali complicazioni post bruciature nel lungo termine.

Nonostante le innumerevoli applicazioni cliniche in cui trova utilizzo, la citologia ad impressione non si può ancora considerare un metodo diagnostico di routine, probabilmente perché richiede tempo sia per il clinico sia per il patologo. Tuttavia l'abilità nell'ottenere campioni multipli della superficie oculare la rende il metodo ideale per investigare patologie della superficie oculare quando la diagnosi non è clinicamente ovvia^{9,35}.

In veterinaria ci sono ancora pochi studi riguardo la citologia ad impressione.

I vantaggi sono molteplici: non invasività, semplicità, rapidità di esecuzione.

Tra gli studi più recenti si riporta un lavoro dell'Università di San Paolo in Brasile, in cui viene descritta la metodica di citologia per impressione nel cane. La tecnica usata è stata basata su studi condotti nell'uomo. I campioni vengono prelevati dalla congiuntiva bulbare temporale tramite filtri di 0.45 µm; vengono poi colorati tramite PAS e Papanicolaou previo fissaggio in Alcol Etilico al 95% per non più di

48 ore. Si è scelto di campionare la congiuntiva bulbare temporale per l'alta incidenza di proliferazione cellulare (benigna o maligna) ed anche per la facile accessibilità della zona.

Anche nel cane i risultati sono stati ottimi: conservazione della morfologia cellulare ottimale, facilità di esecuzione e minimo discomfort per il soggetto. Si tratta di un primo studio, che mira a dimostrare la fattibilità di tale tecnica e i vantaggi relativi che questo tipo di citologia può avere anche in ambito veterinario⁵.

Uno studio realizzato nel 2011 dalle facoltà di medicina veterinaria di Lublino e Varsavia e dalla clinica veterinaria "Radvet" di Slupsk, in Polonia, si focalizza sulla citologia ad impressione nel cane per la valutazione della cheratocongiuntivite secca. In questo studio sono stati esaminati 18 cani, razze miste, sia maschi che femmine, di età compresa tra i 2.5 e i 10 anni. A tutti i cani è stata diagnosticata una cheratocongiuntivite immunomediata. La citologia è stata effettuata sul quadrante superiore e inferiore della cornea, congiuntiva bulbare e congiuntiva palpebrale a livello della palpebra superiore e i campioni sono stati colorati con colorazione di PAS.

I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi sulla base del STT: il gruppo 1 con STT: 0-5 mm; il gruppo 2 con STT: 6-10 mm; il gruppo 3 con STT: 11-14 mm.

La cheratocongiuntivite secca (KCS) è una patologia molto comune nel cane. Comporta alterazioni nella produzione lacrimale o nella composizione del film lacrimale, che portano a patologie infiammatorie e/o degenerative in cornea e congiuntiva. Il trattamento è difficile, causa continuo discomfort, e alla lunga può portare a diminuzione della capacità visiva fino alla cecità.

Balicki et al. sono andati quindi ad osservare i cambiamenti morfologici presenti a livello di epitelio corneale e congiuntivale. I risultati ottenuti con la citologia sono buoni: si osservano metaplasia squamosa, presenza di cellule infiammatorie come granulociti neutrofili, difetti epiteliali persistenti, diminuzione fino a scomparsa di Goblet cells; inoltre tutti i segni clinici osservati nei tre differenti gruppi rispecchiavano esattamente la gravità della malattia.

La tecnica anche in questo caso si è rivelata di facile attuazione e i soggetti non hanno manifestato ansia, agitazione o segni di dolore come blefarospasmo post procedura².

Un altro lavoro del 2012, realizzato in Brasile, mette a confronto citobrushing e citologia ad impressione nel gatto.

Lo studio comprende quattro gruppi di soggetti, ognuno formato da 10 gatti sani e 10 gatti con congiuntivite. I gruppi 1 e 2 sono gruppi di controllo, esenti da patologie oculari, i gruppi 3 e 4 comprendono gatti con congiuntivite: nei gruppi 1 e 3 viene campionato l'occhio destro tramite citobrushing, nei gruppi 2 e 4 viene campionato l'occhio sinistro tramite citologia ad impressione. Quest'ultima viene definita un'alternativa a basso costo, di facile esecuzione ed interpretazione. Nel citobrushing si osservano maggiore discomfort per i soggetti, e durante il campionamento non è raro che alcune cellule vengano danneggiate. Questo non si osserva nella citologia ad impressione: vengono raccolte solamente cellule superficiali e sono conservate in modo ottimale; il discomfort per i soggetti esaminati è minimo¹⁴.

Sempre a proposito della citologia ad impressione nel gatto, all'ultimo congresso dell'European College of Veterinary Ophthalmologist, tenutosi a Londra dal 15 al 18 maggio 2014, è stato presentato un lavoro che conferma ancora una volta le grandi potenzialità di tale tecnica. Sono stati campionati 10 soggetti sani: inizialmente sono stati usati filtri Millipore con pori di 8 diverse dimensioni; nella seconda fase della ricerca sono stati campionati pazienti con 3 diverse modalità: anestesia topica, senza anestesia, e con anestesia topica e utilizzo di membrane Biopore dopo aver asciugato la superficie oculare. Con l'ultima opzione sono stati ottenuti i risultati migliori: i campioni presentavano un'elevata cellularità e un'ottima conservazione cellulare¹⁷.

Studi del 2008 inoltre definiscono la citologia ad impressione congiuntivale come l'esame d'elezione in corso di patologie che necessitano l'instaurazione di un trattamento terapeutico in tempi rapidi, come nel caso di Chlamidiosi ed infezioni virali: permette infatti di evidenziare alterazioni quali inclusi citoplasmatici (tipico delle Chlamidiosi), perdita delle adesioni intracellulari e lesioni nucleari (tipico delle infezioni virali come la congiuntivite erpetica). L'imprinting congiuntivale

trova applicazione in tutti i tipi di congiuntiviti (batterica, virale, allergica, micotica, autoimmune, da Chlamidia) e nella cheratocongiuntivite secca, andando a valutare la presenza o meno di cellule mucipare.

Infine, come nell'uomo, ai filtri si possono applicare tecniche di immunofluorescenza ed altre sia nel cane che nel gatto⁴².

Capitolo 7

Parte sperimentale

7.1 Materiali e metodi

7.1.1 Raccolta dati e procedura operativa

Nel nostro studio pilota sono stati presi in considerazione cani e gatti di età, sesso e razza variabili, esenti da patologie oculari. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame citologico per impressione, prelevando due campioni per ogni paziente, a livello di cornea-limbus e congiuntiva. L'esame è stato eseguito o in soggetti che si trovavano in anestesia generale per chirurgie di altra natura presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (Ovud), o in soggetti appena deceduti, o poco prima dell'eutanasia. I campioni sono stati raccolti in un periodo di tempo compreso tra il 10-10-2013 e il 19-02-2014, per un totale di 5 cani sani e 3 gatti sani; la raccolta è stata eseguita sempre dal medesimo operatore al fine di standardizzare la metodica.

È stata utilizzata la stessa procedura operativa normalmente eseguita in medicina umana e descritta nel Manuale delle procedure della Fondazione Banca degli Occhi del Veneto.

I filtri utilizzati sono particolari filtri di nitrocellulosa (Millicell-CM Culture Plate Insert, 0.4 μm , Ø 12 mm, Codice PICM 012 50; Millipore) (**Figure 7.1.2 e 7.1.3**). Innanzitutto con un pennarello indelebile si marca il lato interno del supporto in plastica della membrana , da usare come punto di reperi per le ore 12 della cornea. Nell'uomo si mette una goccia di anestetico topico mentre nel nostro caso per la maggior parte si trattava di soggetti già in anestesia per cui non è stato necessario. Si mantengono le palpebre aperte per qualche minuto per permettere la completa evaporazione del film lacrimale (quest'operazione favorisce l'adesione dell'epitelio

alla membrana) e se necessario si può asciugare la superficie oculare arieggiandola.

Si preme la membrana sulla cornea tenendola per il supporto in plastica, facendola aderire per almeno cinque secondi, avendo cura di far corrispondere le ore 12 corneali con il punto di repere precedentemente segnato.

Si stacca poi delicatamente ma con decisione la membrana.

I preparati vengono poi fissati con il fissatore citologico Kito-Fix (Kaltek s.r.l.) (**Figura 7.1.1**), spruzzato ad una distanza di circa 15-20 cm. La membrana diventa trasparente, in seguito si asciuga e riacquista il colore bianco e dovrebbe essere visibile lo strato epiteliale che rimane attaccato alla membrana.

Si ripone la membrana nel suo contenitore originale, sigillandolo con del cerotto; sul contenitore vengono quindi riportati i dati del soggetto, l'occhio esaminato, la zona di campionamento e la data del prelievo. I campioni vengono poi conservati a 4°C in attesa di procedere con lo step successivo, ovvero l'immunofluorescenza.

Ai pazienti umani viene prescritta una terapia antibiotica topica per circa 3 giorni; nel nostro caso per i soggetti sottoposti a chirurgia era comunque prevista una terapia antibiotica per via sistemica per 2-3 giorni.



Figura 7.1.1: Fissatore Kito-fix



Figure 7.1.2 e 7.1.3: Filtro Millicell-Cm Millipore

7.1.2 L'immunofluorescenza

Per valutare lo stato della superficie oculare è stata utilizzata la metodica della doppia immunofluorescenza. Questa permette di definire l'identità della superficie oculare se di tipo corneale (valutata tramite l'espressione del marcatore cK12), o congiuntivale (valutata mediante l'espressione del marcatore MUC1).

L'immunofluorescenza è una metodica altamente specifica per la rilevazione di determinati antigeni presenti nel tessuto o nelle cellule da esaminare, e permette di evidenziare le reazioni antigene-anticorpo; si distinguono un'immunofluorescenza diretta e una indiretta. Nell'immunofluorescenza diretta sono coinvolti soltanto gli antigeni e gli anticorpi specifici, marcati con sostanze fluorescenti dette fluorocromi, che hanno la capacità di emettere luce a diverse lunghezze d'onda osservabili con un microscopio a fluorescenza. Nell'immunofluorescenza indiretta, invece, si utilizzano due serie di anticorpi. La prima è rappresentata dai cosiddetti anticorpi primari, non marcati e prodotti in una specie animale diversa da quella da analizzare, che si vanno a legare alla proteina in modo specifico. La seconda serie è costituita dagli anticorpi secondari, ovvero degli Anti-Ig marcati con un fluorocromo, che andranno a riconoscere tutte le immunoglobuline di una determinata specie.

Ovviamente nell'immunofluorescenza indiretta l'anticorpo secondario dovrà essere diretto contro le IgG della specie utilizzata per la produzione dell'anticorpo primario. Gli anticorpi consistono di due frammenti, il frammento Fc e il frammento Fab. In un dato animale il frammento Fc è presente in tutti gli anticorpi esattamente nella stessa forma, mentre il frammento Fab è variabile e si lega in maniera altamente specifica ad un epitopo dell'antigene. Con epitopo si intende la regione di antigene riconosciuta anticorpo. Il vantaggio dell'utilizzo di un secondo anticorpo è dato dall'amplificazione del segnale, perché ad ogni anticorpo primario si andranno a legare più anticorpi secondari.

I fluorocromi più utilizzati in questa metodica sono l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) e la rodamina, che emettono una fluorescenza rispettivamente verde e rossa.

Per le immunofluorescenze multiple, come in questo caso, bisogna stare attenti ad utilizzare anticorpi primari provenienti da ospiti diversi, altrimenti gli anticorpi secondari poi si legheranno a tutti i primari allo stesso identico modo.

La procedura è costituita da diverse fasi: allestimento del campione, permeabilizzazione, coating, incubazione con anticorpi primari, incubazione con anticorpi secondari, colorazione dei nuclei, montaggio del vetrino.

Per **allestire** e preparare il campione si rimuove la membrana del filtro da citologia ad impressione (12mm di diametro) dal suo supporto in plastica tramite un bisturi chirurgico, cercando di incidere il più esternamente possibile, e tramite una pinza si trasferisce la membrana nel pozzetto di una piastra 24well, in cui si aggiungono 500 microlitri di PBS 1X e si lascia per 5 minuti a temperatura ambiente. Il PBS 1X (“Phosphate buffered saline”, o in italiano “tampone fosfato salino”) è una soluzione salina contenente Cloruro di Sodio, Sodio Fosfato e Potassio Fosfato; si tratta di una specie di soluzione fisiologica, isotonica e non tossica per le cellule e viene comunemente utilizzata nei laboratori di biologia e biochimica per lavare le cellule, riequilibrare i campioni e preparare le diverse soluzioni. Successivamente si aspira la soluzione di PBS 1X.

Nella fase di **permeabilizzazione** si aggiungono 500 microlitri di TRITON X-100 0.5% e si lascia incubare per 10 minuti. Il TRITON è un detergente molto viscoso, che ha la funzione di permeabilizzare le cellule, creando dei pori a livello delle membrane cellulari in modo tale da permettere agli anticorpi (che andremo ad aggiungere successivamente), di penetrare uniformemente e raggiungere tutti gli strati cellulari. Al termine dell'incubazione si aspira la soluzione di permeabilizzazione e si fa un lavaggio in PBS 1X per 5 minuti al fine di rimuovere il detergente in eccesso.

Nella fase di **coating** si aggiungono 500 microlitri di soluzione PBS-BSA 0.5% e si lascia in incubazione per 45 minuti. La soluzione BSA (Bovine Serum Albumine o Albumina di siero bovino) è un estratto di proteine bovine, albumina appunto per lo più, che legandosi aspecificamente ai siti antigenici blocca i siti aspecifici, ovvero quei siti a cui si possono legare gli anticorpi per interazione idrofobica. Al termine dell'incubazione si aspira la soluzione di PBS-BSA 0.5%.

Nella fase di **incubazione con anticorpi primari** si aggiungono nel pozzetto 500 microlitri della soluzione contenente gli anticorpi primari (senza lavare precedentemente con PBS 1X) e si lascia in incubazione per 1h a 37°C.

Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti:

- cK12 (Goat anti human); diluizione d'uso 1:100 in PBS-BSA 0.25%
- MUC1 (Rabbit anti human); diluizione d'uso 1:200 in PBS-BSA 0.25%

Vengono poi eseguiti tre lavaggi in PBS 1X di 5 minuti ciascuno.

Nella fase di **incubazione con anticorpi secondari** si aggiungono nel pozzetto 500 microlitri della soluzione contenente gli anticorpi secondari. È importante da questo punto in poi lavorare il più possibile al buio, per proteggere dalla luce i fluorofori legati agli anticorpi secondari ed evitare il decadimento della fluorescenza. La piastra viene chiusa e avvolta in un foglio di alluminio in modo tale che stia al buio e si lascia in incubazione per 60 minuti a temperatura ambiente.

Gli anticorpi secondari utilizzati sono i seguenti:

- Donkey anti-Goat Rhod (Anticorpo I K12); diluizione d'uso 1:100 in PBS-BSA 0.25%
- Donkey anti-Rabbit FITC (Anticorpo I Muc1); diluizione d'uso 1:100 in PBS-BSA 0.25%

Si aspira la soluzione di incubazione e si fanno tre lavaggi in PBS 1X di 5 minuti ciascuno.

Nella fase di **colorazione dei nuclei** si aggiungono nel pozzetto 500 microlitri di Draq5 (diluizione d'uso 1:1000 in PBS 1X) e si lascia in incubazione per 10 minuti. Il Draq5 (1,5-bis[[2-(di-metilamino)etil]amino]-4, 8-diidrossiantracene-9, 10-dione) è un colorante fluorescente (emette nel rosso lontano) specifico per i nuclei, che si lega al DNA.

Vengono poi eseguiti due lavaggi in PBS 1X di 2 minuti ciascuno.

Infine, nella fase di **montaggio del vetrino**, si rimuove la membrana con una pinzetta e la si trasferisce su un normale vetrino da citologia, si chiude il vetrino

con un copri oggetto posizionando sul filtro una goccia di montante a base di glicerolo, e si pressa leggermente in modo tale da evitare il più possibile la formazione di bolle d'aria.

A questo punto il vetrino è pronto e può essere osservato al microscopio confocale. Il microscopio confocale è un particolare tipo di microscopio a fluorescenza, per mezzo del quale è possibile rilevare nei campioni la presenza di cK12 (marcatore corneale) e di Muc1 (marcatore congiuntivale) e quindi definire la natura delle cellule raccolte sul filtro da citologia.

Nel caso di un tessuto corneale sano, ci si aspetta di trovare nel campione tutte le cellule marcate in rosso, ovvero positive per il marker corneale cK12. Nel caso di una superficie corneale alterata o patologica si ha una situazione diversa, con presenza di cellule marcate in verde, ovvero positive per il marker congiuntivale Muc1. Nei casi di una cornea completamente distrutta, la colorazione sarà diffusamente verde, in quanto l'epitelio corneale sarà sostituito interamente da quello congiuntivale. In altri casi, meno gravi, si avranno cellule marcate in verde per lo più, con presenza però anche di una colorazione rossa dovuta alla presenza di residui di cellule corneali. Il limbus essendo una zona di transizione tra l'epitelio corneale e quello congiuntivale esprime entrambe le colorazioni.

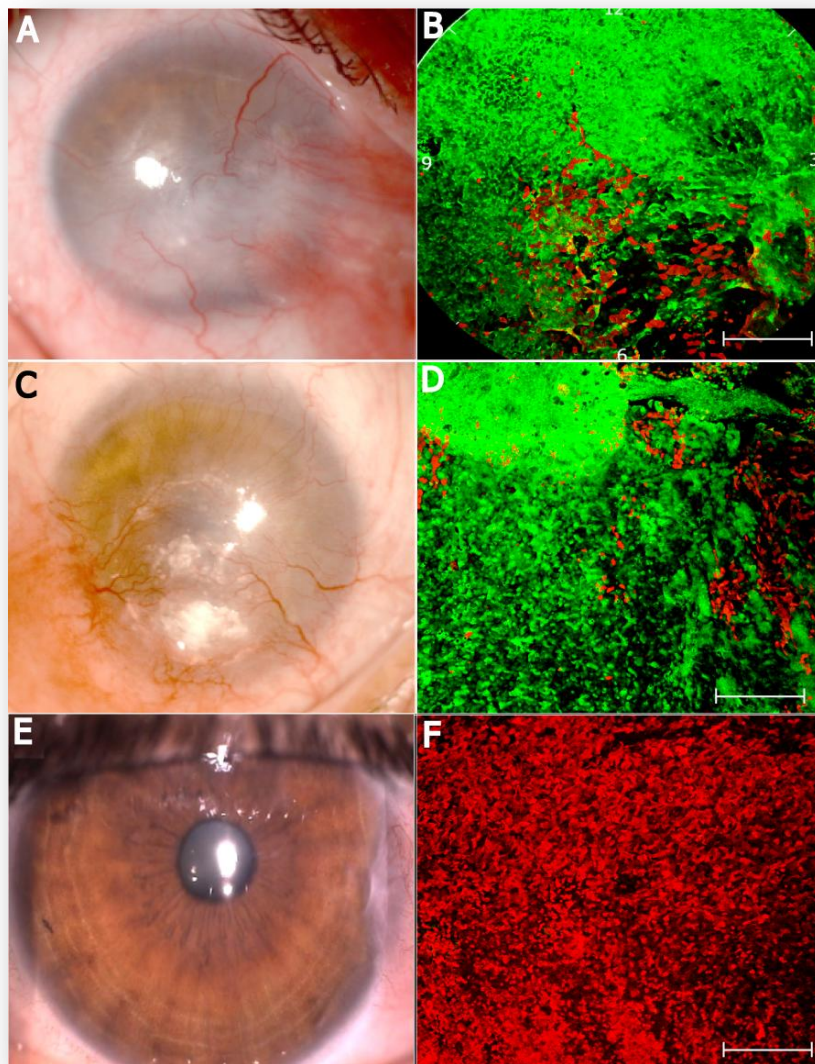


Figura 7.1.3: Esempio di risultati della citologia ad impressione ottenuta mediante la coppia di marcatori Muc1/cK12 su pazienti umani affetti da LSCD (A-D) e dopo innesto di colture di cellule staminali corneali autologhe (E-F). I campioni analizzati mostrano un'immagine della superficie oculare priva di sovrapposizione di segnali e con una netta distinzione fra tessuto congiuntivale e corneale.

7.2 Risultati

La metodica di prelievo utilizzata per entrambe le specie è risultata semplice da eseguire: il protocollo utilizzato per l'uomo è risultato perfettamente adattabile al cane ed al gatto.

Nei soggetti sottoposti a tale procedura non si sono osservati effetti collaterali di alcun genere o complicazioni legate al prelievo, né segni di dolore oculare.

Negli animali sottoposti a prelievo durante anestesia generale e quindi non sottoposti ad eutanasia non si sono verificate erosioni epiteliali corneali o alterazioni della superficie oculare in seguito all'intervento.

Cani

Caso 1

Razza	Meticcio
Sesso	F
Età	11 anni
Causa decesso	Eutanasia per gravi ferite da morso
Distanza prelievo dal decesso	5 minuti prima
Occhio	Dx
Punto Prelievo	C1a: Cornea C1b: Congiuntiva
Risultati Citologia Impressione	Cornea(C1a): positività cK12 Congiuntiva (C1b): positività Muc1

Nel caso 1 sono stati prelevati due campioni dall'occhio destro: il primo corneale ed il secondo congiuntivale. Nel primo campione (corneale) nell'immagine ottenuta dal microscopio confocale (**Figura C1a**) si evidenzia una diffusa colorazione rossa, un'epressione ed una positività per il marker corneale cK12.

Nel secondo campione (congiuntivale) (**Figura C1b**) si osserva una leggera colorazione verde indicante una positività per il marker Muc1.

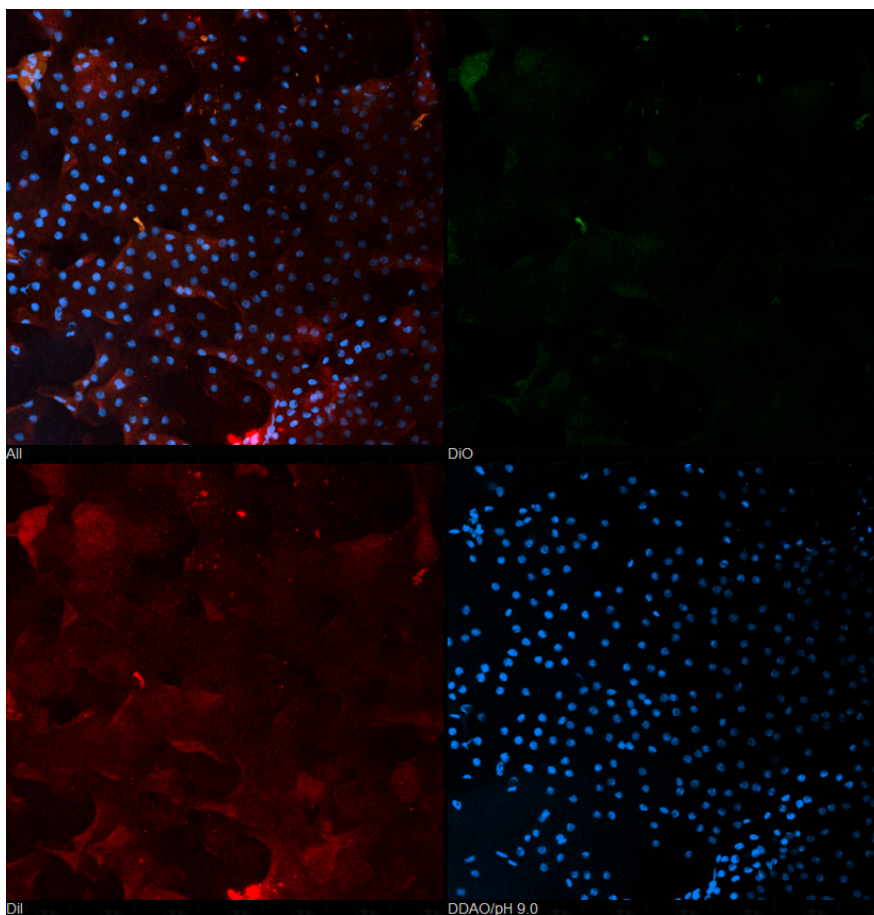


Figura C1a : cornea con positività per cK12 (colorazione rossa)

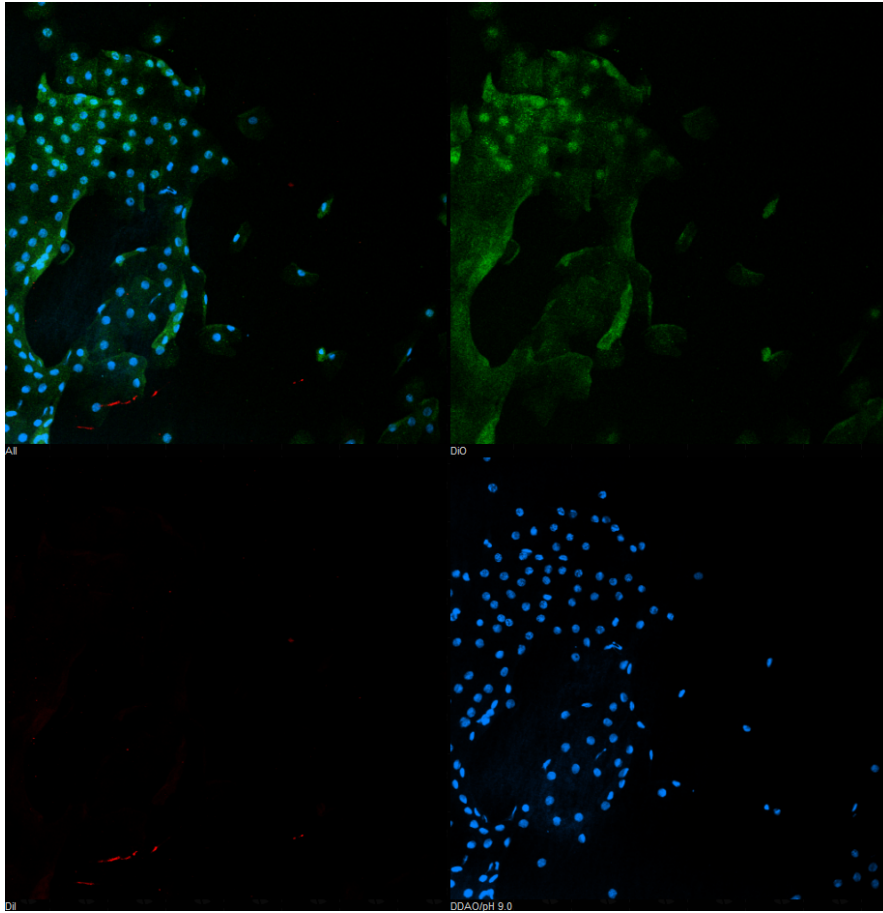


Figura C1b: congiuntiva con positività per Muc1 (colorazione verde).
Non c'è positività per cK12

Caso 2

Razza	Akita Inu
Sesso	M
Età	6 mesi
Causa decesso	No decesso
Distanza prelievo dal decesso	Prelievo in anestesia generale
Occhio	Dx
Punto prelievo	C2a: cornea C2 b: congiuntiva
Risultati Citologia Impressione	Cornea (C2a): positività Muc1 Congiuntiva (C2b): positività Muc1

Nel caso 2 sono stati prelevati due campioni dall'occhio destro durante anestesia generale. Il primo campione è stato prelevato a livello corneale e nell'immagine ottenuta dal microscopio confocale (**Figura C2a**) si evidenzia una colorazione verde che indica una positività per il marker Muc1. Non si osserva invece alcuna colorazione rossa indicante espressione di cK12.

Il secondo campione (**Figura C2b**) è stato prelevato a livello congiuntivale; il campione risulta maggiormente cellulare rispetto al precedente ma per quanto riguarda la colorazione la situazione è identica, ovvero una colorazione verde che indica una positività per Muc 1.

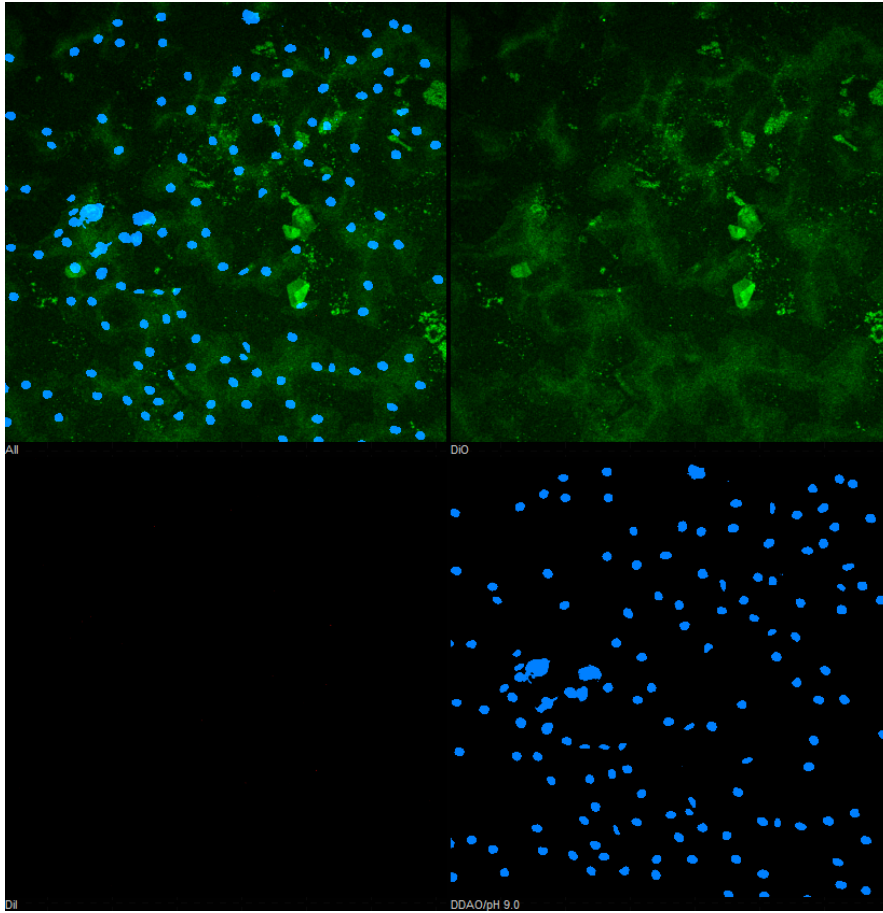


Figura C2a: cornea con positività per Muc1.
Non c'è positività per cK12

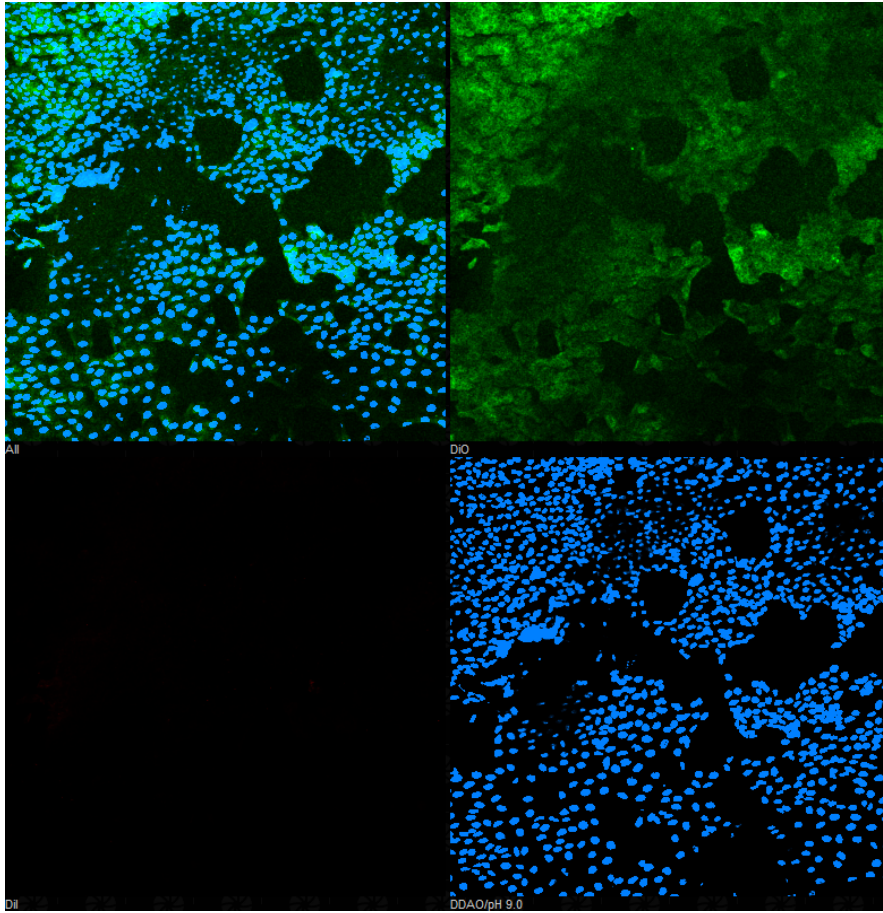


Figura C2b: congiuntiva con positività per Muc1.
Non c'è positività per cK12

Caso 3

Razza	Meticcio
Sesso	M
Età	1 anno
Causa decesso	No decesso
Distanza prelievo dal decesso	Prelievo in anestesia generale
Occhio	Dx
Punto prelievo	C3a: cornea C3b: congiuntiva
Risultati Citologia Impressione	Cornea (C3a): positività Muc1 Congiuntiva (C3b): positività Muc1

Il caso 3 è praticamente identico al precedente. Sono stati prelevati due campioni rispettivamente da cornea e congiuntiva dell'occhio destro durante anestesia generale. Entrambe le immagini ottenute (**Figure C3a e C3b**) mostrano una colorazione verde con espressione e specificità per il marker Muc1, mentre non è presente alcuna colorazione rossa (cK12).

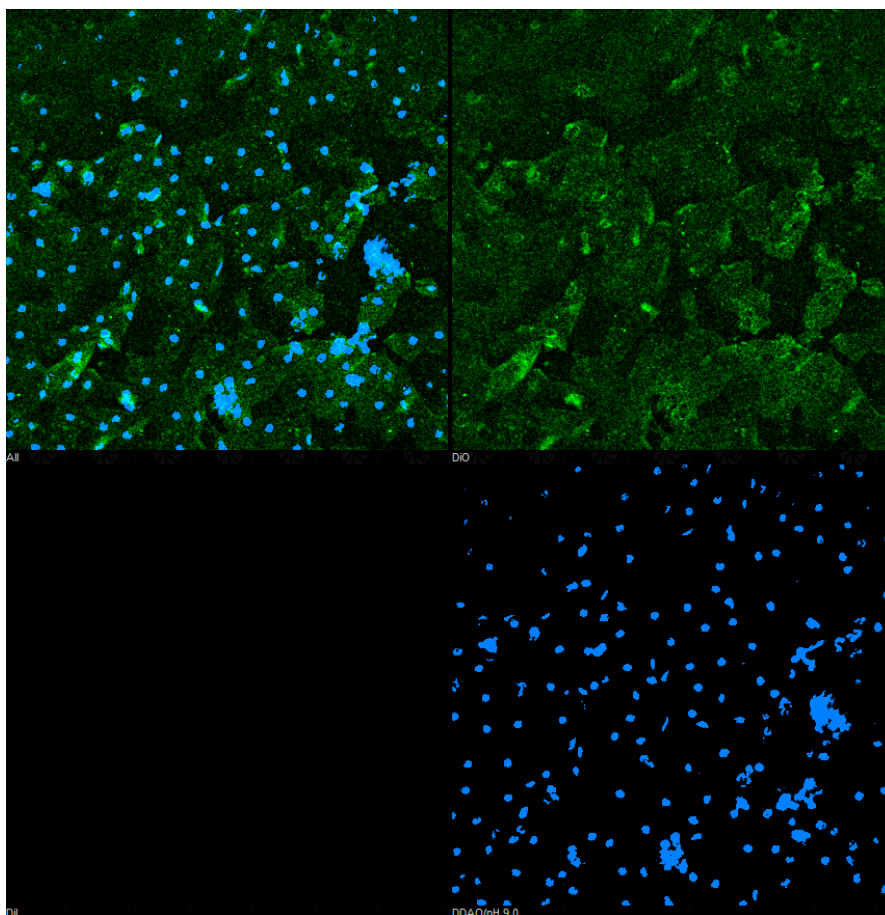


Figura C3a: cornea con positività per Muc1.
Non c'è positività per cK12

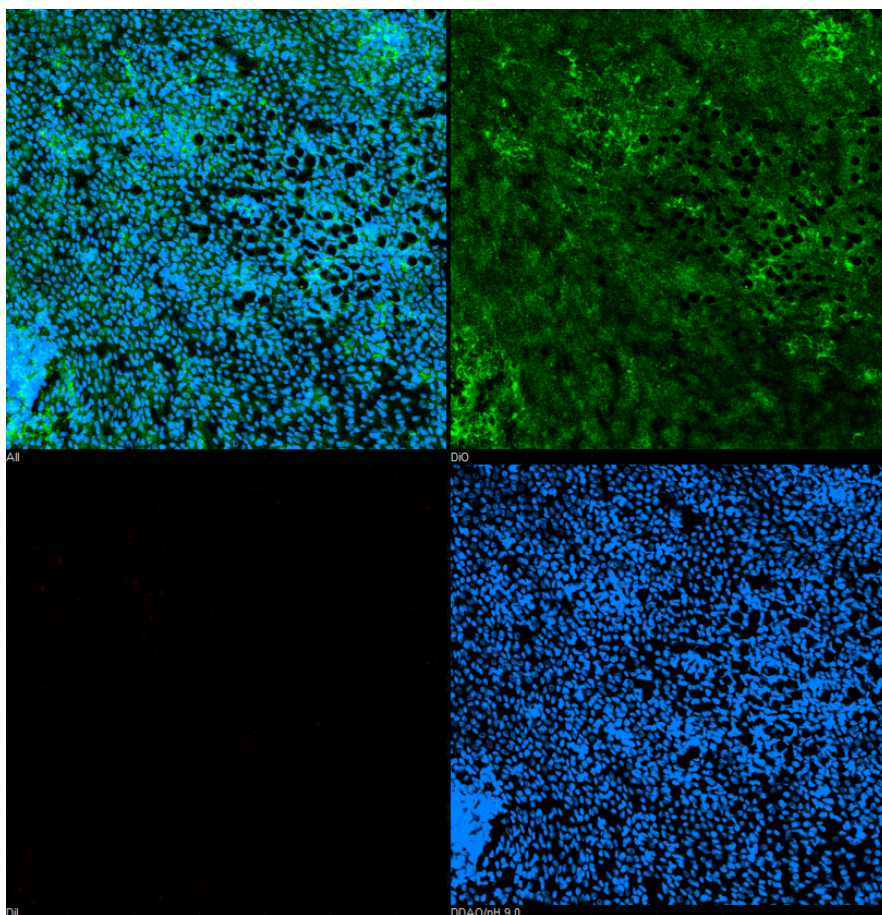


Figura C3b: congiuntiva con positività per Muc1.
Non c'è positività per cK12

Caso 4

Razza	Boxer
Sesso	M
Età	2 anni
Causa decesso	No decesso
Distanza prelievo dal decesso	Prelievo in anestesia generale
Occhio	Dx
Punto Prelievo	C4a: cornea C4b: limbus
Risultati Citologia Impressione	Campione non acquisibile

Caso 5

Razza	Bullmastiff
Sesso	M
Età	2 anni
Causa decesso	No decesso
Distanza prelievo dal decesso	Prelievo in anestesia generale
Occhio	Dx
Punto prelievo	C5a: cornea C5b: limbus
Risultati Citologia Impressione	Campione non acquisibile

Gatti

Caso 1

Razza	Comune europeo
Sesso	F
Età	9 anni
Causa decesso	Eutanasia per forma tumorale
Distanza prelievo dal decesso	5 minuti dopo
Occhio	Sx (cornea) Dx (limbus)
Punto prelievo	G1a: cornea G1b: limbus
Risultati Citologia Impressione	Cornea (G1a): positività cK12 Limbus (G1b): positività Muc1

Nel caso 1 sono state campionate la cornea dell'occhio sinistro e il limbus dell'occhio destro, 5 minuti dopo il decesso, avvenuto tramite eutanasia per forma tumorale. Nell'immagine ottenuta dal campione corneale (**Figura G1a**) si evidenzia una colorazione rossa (più nitida rispetto alla colorazione ottenuta nel caso 1 della specie canina), che indica una specificità per il marker corneale cK12.

Nel secondo campione, a livello limbare (**Figura G1b**) è presente una diffusa e marcata colorazione verde (anche in questo caso più nitida e di migliore qualità rispetto alla colorazione ottenuta nel cane), che indica un'espressione e una specificità per il marker Muc1.

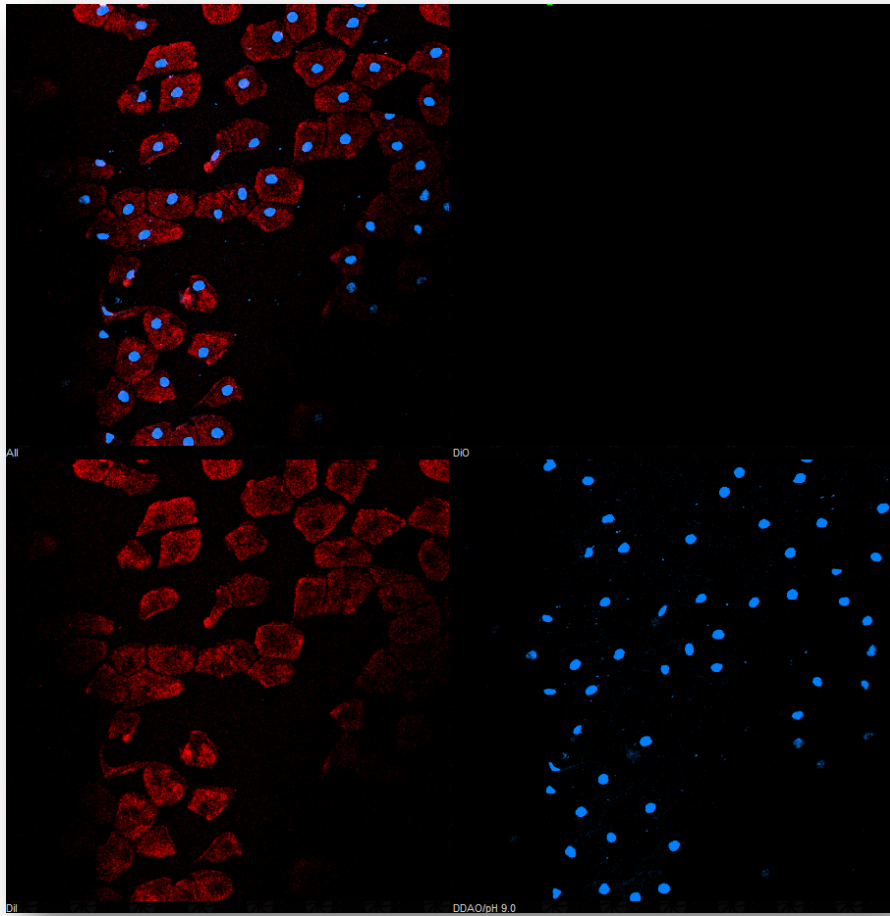


Figura G1a: cornea con positività per cK12

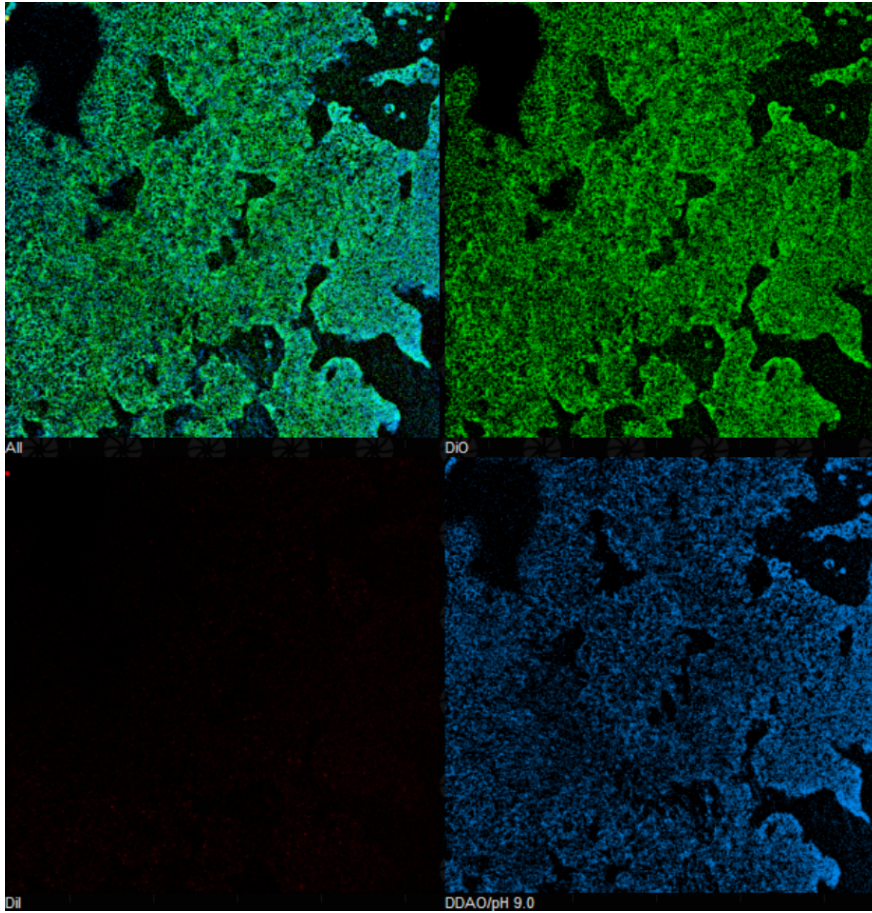


Figura G1b: limbus con positività per Muc1

Caso 2

Razza	Comune europeo
Sesso	M
Età	16 anni
Causa decesso	Eutanasia per forma tumorale
Distanza prelievo dal decesso	5 minuti prima
Occhio	Sx
Punto prelievo	G2a: cornea G2b: limbus
Risultati Citologia Impressione	Cornea (G2a): positività cK12 Limbus (G2b): positività Muc1

Nel caso 2, sono stati campionati cornea e limbus, entrambi dell'occhio sinistro. Il prelievo è avvenuto 5 minuti prima del decesso (eutanasia).

L'immagine ottenuta dal campione corneale (**Figura G2a**) mostra una marcata positività per il marker corneale cK12, indicato dalla diffusa colorazione rossa. Non è presente alcuna positività per Muc1 nel tessuto corneale.

L'immagine ottenuta dal campione limbare (**Figura G2b**) mostra una positività per il marker Muc1, con una colorazione verde marcata.

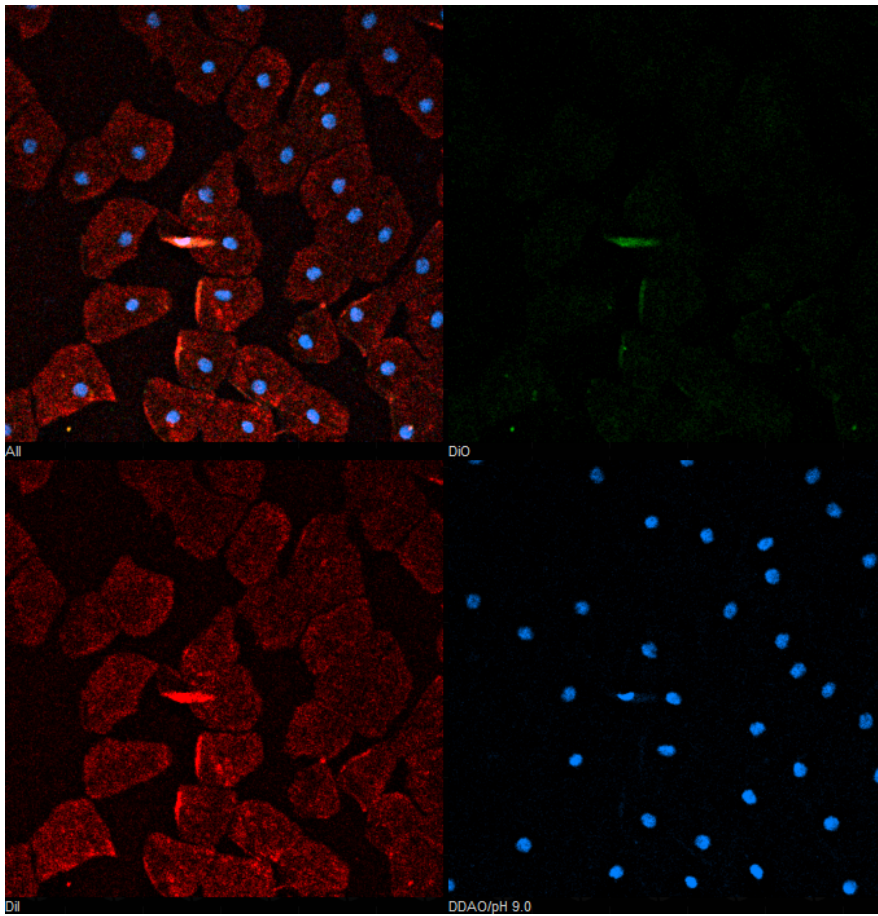


Figura G2a: cornea con positività per cK12

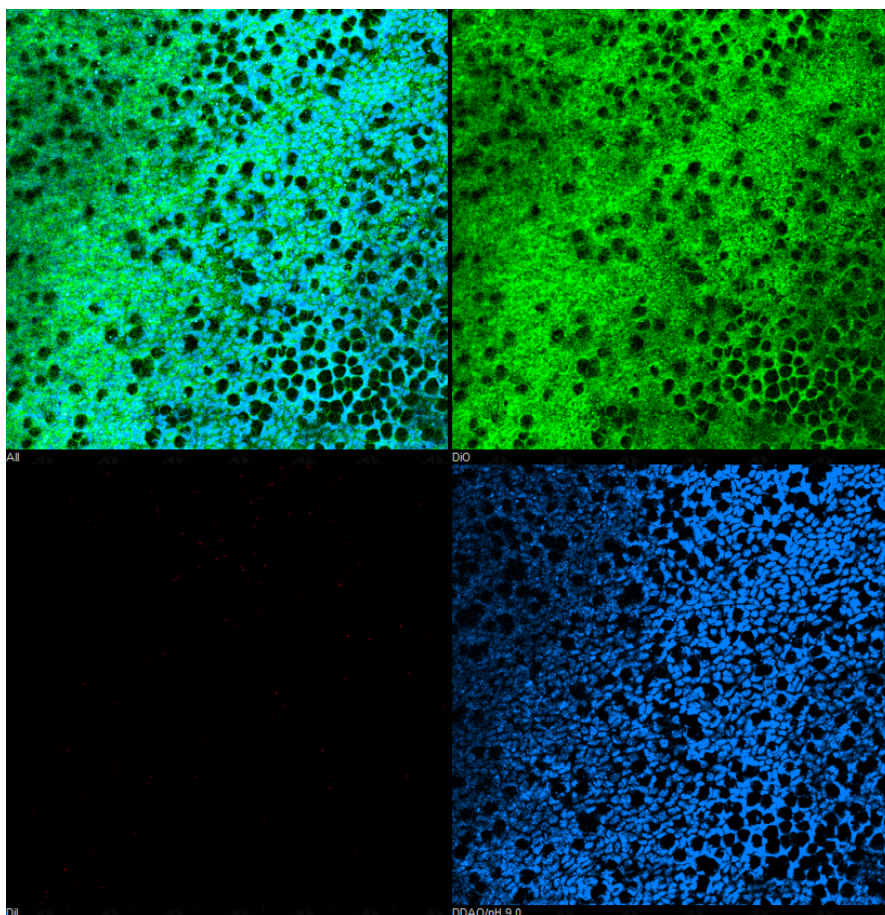


Figura G2b: limbus con positività per Muc1

Caso 3

Razza	Comune europeo
Sesso	M
Età	14 anni
Causa decesso	Eutanasia per tromboembolismo
Distanza prelievo dal decesso	5 minuti prima
Occhio	Dx
Punto prelievo	G3a: cornea G3b: limbus
Risultati Citologia Impressione	Cornea (G3a): positività cK12 Limbus (G3b): positività cK12

Nel caso 3, sono stati campionati cornea e limbus dell'occhio destro. Il prelievo è avvenuto, anche in questo caso, cinque minuti prima del decesso (eutanasia).

Le immagini ottenute da entrambi i prelievi (**Figure G3a e G3b**) mostrano una colorazione rossa, che indica un'espressione ed una specificità marcata per il marcatore corneale cK12. Non è presente alcuna espressione del marker Muc1.

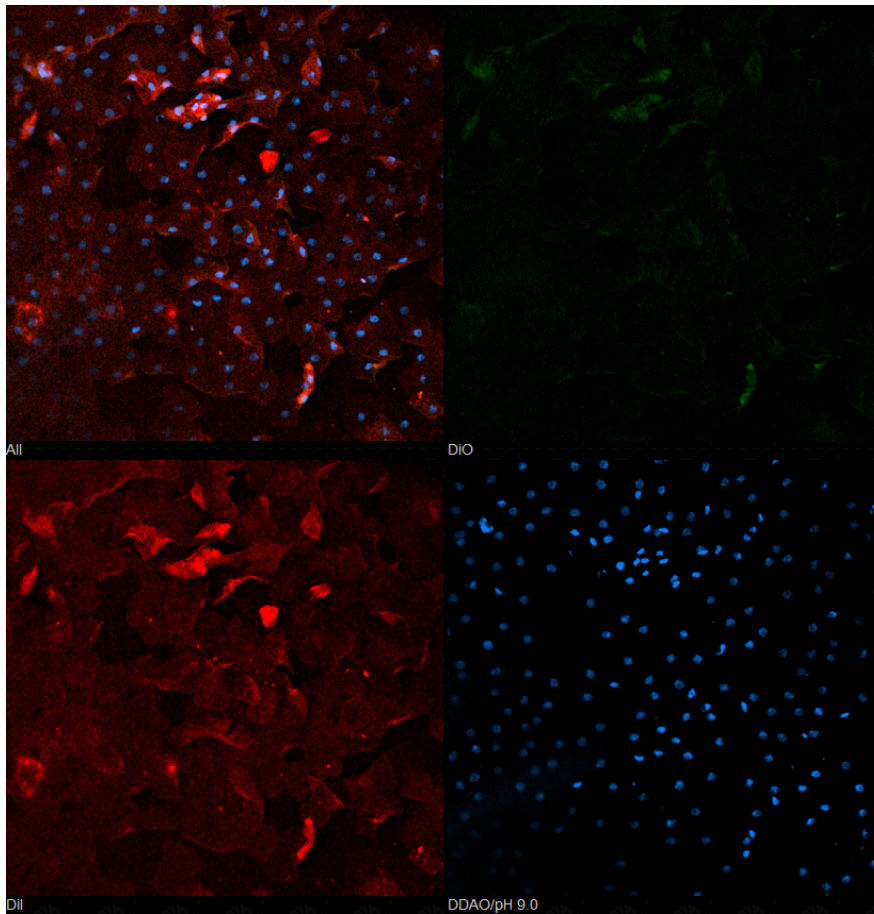


Figura G3a: cornea con positività per cK12

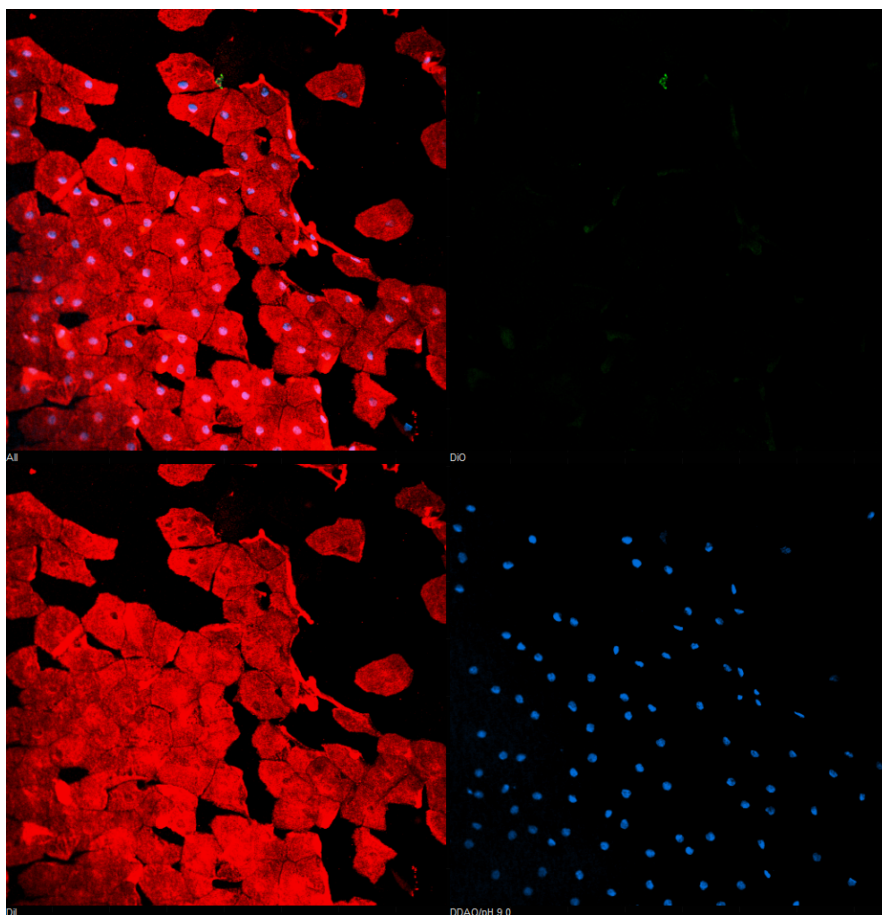


Figura G3b: limbus con positività per cK12

7.3 Discussione

Prima di discutere i risultati ottenuti dal nostro lavoro è opportuno precisare che si tratta di uno studio pilota, un primo passo per cercare di esaminare la superficie oculare attraverso la citologia ad impressione utilizzando l'immunofluorescenza. Sono stati ottenuti campioni corneali e congiuntivali sia da cane che da gatto.

I risultati ottenuti sono parziali e si nota una discrepanza tra i risultati riscontrati nelle due specie.

Per quanto riguarda la specie felina, sono stati campionati 3 soggetti sani, esenti da patologie oculari. Il basso numero dei soggetti testati si ritiene che non vada a inficiare la veridicità dei risultati ottenuti. I risultati ottenuti sono in linea con quanto si osserva nell'uomo: la colorazione risulta nitida in entrambi i colori (rosso e verde), di qualità quasi pari a quella ottenuta dai campioni umani. In tutti e tre i casi la cornea esprime solo il marker cK12, mentre è assente Muc1. Il fatto che nei casi G2a e G3a sia presente una leggerissima colorazione verde non è indicativo: infatti tra i due marker cK12 è molto più specifico rispetto a Muc1 (è la presenza di cK12 che identifica il tessuto corneale).

La zona limbare invece è un'area di "passaggio" tra cornea e sclera. Nei campioni G1b e G2b si osserva una positività per Muc1, mentre nel campione G3b si osserva una positività per cK12. Tale risultato è considerato normale: essendo il limbus una zona in cui l'epitelio congiuntivale si continua con quello corneale, il risultato da noi ottenuto probabilmente dipende da quale zona del limbus è stata campionata.

Per quanto riguarda la specie canina, sono stati campionati allo stesso modo 5 soggetti sani, esenti da patologie oculari. In questo caso i risultati non sono stati quelli attesi. Il primo soggetto campionato mostra un'espressione di cK12 a livello corneale, e un'espressione di Muc1 a livello congiuntivale. Tuttavia i successivi 2 casi mostrano un risultato opposto: la cornea esprime Muc1 mentre non viene espressa cK12. Negli ultimi due casi addirittura non è stato possibile acquisire immagini rappresentative tramite il microscopio confocale.

Per il cane purtroppo, la qualità e la nitidezza della colorazione sono risultate di gran lunga inferiori rispetto a quelle ottenute nel gatto e nell'uomo (**Figura 7.3.1 e Figura 7.3.2**): nonostante il primo caso avesse dato dei buoni risultati esprimendo

cK12 a livello corneale, in realtà l'intensità della colorazione non risultava comunque paragonabile a quella espressa nella citologia umana e felina. Si è scelto quindi di testare altri soggetti per valutare se il problema potesse essere legato alla modalità di prelievo o a qualche errore procedurale verificatosi con i campioni canini 2 e 3 ma si è visto che, anche negli ultimi 2 casi campionati, la colorazione non è riuscita per nessuno dei due anticorpi testati (né cK12 né Muc1).

A questo punto ci siamo chiesti se fosse un problema relativo all'anticorpo utilizzato o alla non presenza dei marker nel cane.

La seconda ipotesi è stata scartata in quanto le ricerche iniziali effettuate avevano già confermato la presenza di cK12 e Muc1 nel cane. Ovviamente quando si deve adattare un anticorpo ad un'altra specie si effettuano dei test preliminari; tra questi un metodo molto utilizzato è il "BLAST", un software gratuito disponibile in internet che permette di valutare l'allineamento delle proteine tra specie diverse. Le stesse proteine in specie diverse possono presentare infatti differenze più o meno marcate; pertanto gli anticorpi, che si legano alle proteine, si legheranno in modo differente nelle diverse specie. Da tali ricerche è emerso che la percentuale di allineamento con l'uomo è compresa tra il 70 e l'80 % sia per cK12 sia per Muc1, sia per il cane che per il gatto. Questo screening iniziale ha dato quindi un ottimo punto di partenza per il nostro studio; queste piccole differenze nel gatto non hanno inficiato la reazione di immunofluorescenza, cosa che invece è avvenuta nel cane.

I risultati negativi ottenuti nel cane quindi possono essere spiegati con la non specificità dell'anticorpo utilizzato.

Trattandosi di uno studio preliminare infatti, sono stati utilizzati degli anticorpi specifici per l'uomo, grazie alla collaborazione della Fondazione Banca degli Occhi del Veneto e del Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Padova. Non sono stati quindi disegnati anticorpi specifici né per il cane né per il gatto.

La conferma del fatto che il problema è relativo all'anticorpo è stata data dai risultati ottenuti tramite la PCR effettuata successivamente sull'intero occhio del cane. Secondo tali risultati, cK12 e Muc1 sono presenti all'interno dell'occhio: non si conosce la loro esatta localizzazione, ma sicuramente sono presenti. L'assenza

del dato morfologico è appunto dovuta alla mancanza di specificità dell'anticorpo, che non si lega bene e quindi non colora come ci si aspettava.

Lo step successivo del nostro studio comporterà la ricerca di nuovi e specifici anticorpi che possano essere testati nel cane, e l'utilizzo di tale procedura di citologia ad impressione in gatti che presentino una manifesta patologia oculo-congiuntivale, per identificare la popolazione presente ed eventuali deficit di cellule staminali limbari.

Figura 7.3.1: Confronto colorazione cK12 positiva in uomo, gatto e cane.

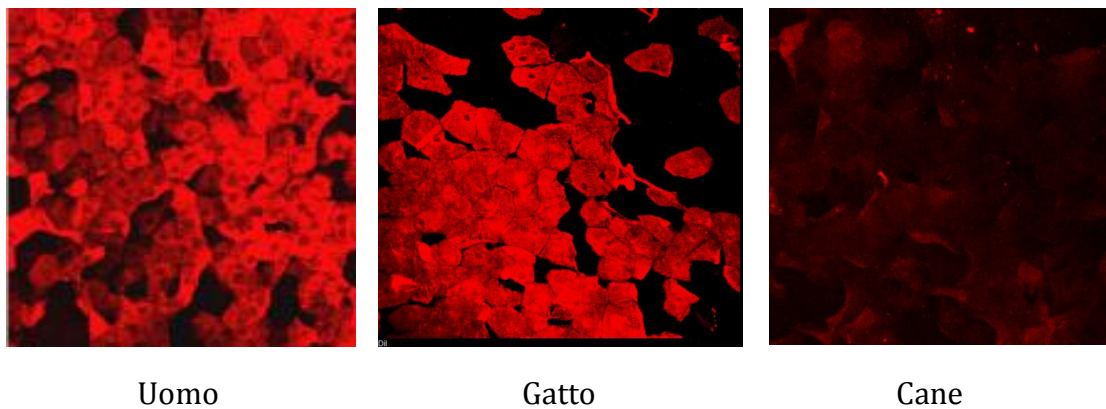
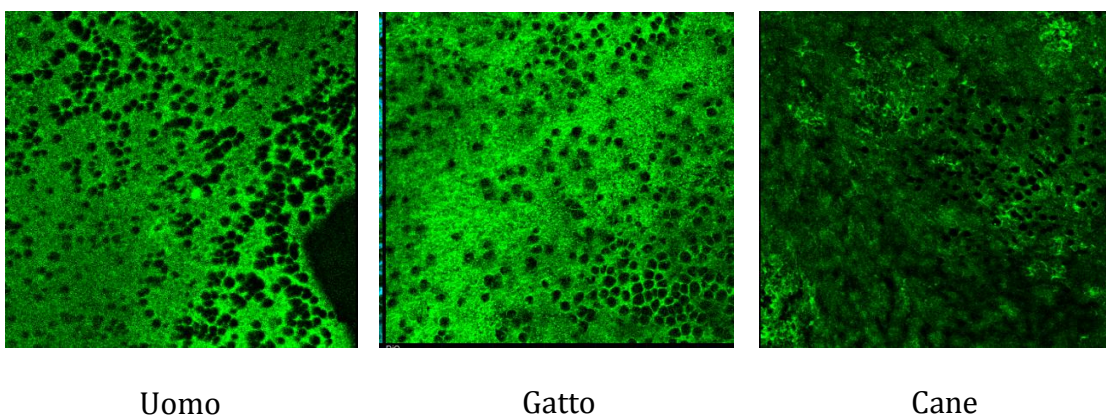


Figura 7.3.2: Confronto colorazione Muc1 positiva in uomo, gatto e cane.



Capitolo 8

Conclusioni e considerazioni personali

Concludendo si può ragionevolmente affermare che nel gatto la citologia ad impressione con doppia immunofluorescenza può essere considerata un'efficace metodo diagnostico, utilizzando lo stesso protocollo operativo esistente per l'uomo e proposto dalla Banca degli Occhi del Veneto. La colorazione risulta di elevata qualità e i risultati ottenuti hanno confermato che l'occhio del gatto si comporta come quello umano, almeno per quanto riguarda i marcatori considerati, con un'espressione di cK12 a livello corneale e con una sua scomparsa a livello congiuntivale.

La citologia ad impressione risulterebbe utile in questa specie non soltanto per l'osservazione di una normale superficie oculare in tutte le sue caratteristiche, ma anche per la diagnosi di molte patologie corneali. In tal senso in futuro potrebbe essere interessante andare a testare alcuni soggetti patologici. Utilizzando lo stesso protocollo sarebbe interessante notare se in gatti con danni corneali si osservino congiuntivalizzazione e di conseguenza espressione di Muc1 e scomparsa di cK12 in funzione della gravità del danno.

Nel cane invece la colorazione non è riuscita né per cK12 né per Muc1. Il risultato ottenuto non deve far pensare che il cane non esprima cK12 a livello corneale, o che esprima diffusamente Muc1 in tutte le parti dell'occhio, ma semplicemente ad oggi è definibile come un problema tecnico dovuto alla non specificità dell'anticorpo: cK12 e Muc1 sono presenti ma non si vedono perché l'anticorpo non è specifico.

Ad oggi tale metodo non è ancora utilizzabile nel cane; se si vuole continuare a investire in tal senso, sarebbe opportuno testare altri anticorpi che possano essere maggiormente specifici, o utilizzare direttamente anticorpi specifici per il cane.

Capitolo 9

Bibliografia

1. **Ahmad S., Osei-Bempong C., Dana R., Jurkunas U.,** 2010. The culture and transplantation of human limbal stem cells, *Journal of Cellular Physiology*, n.225, pp.15-19
2. **Balicki I., Radziejewski K., Bielecki W.,** 2011. Evaluation of corneal and conjunctival epithelium with the use of impression cytology in mixed-breed dogs diagnosed with keratoconjunctivitis sicca, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, n.55, pp.493-499
3. **Barbaro V., Ferrari S., Fasolo A., Pedrotti E., Marchini G., Sbabo A., Nettis N., Ponzin D., Di Iorio E.,** 2010. Evaluation of ocular surface disorders: a new diagnostic tool based on impression cytology and confocal laser scanning microscopy, *British Journal of Ophthalmology*, n.94, pp.926-932
4. **Baudouin C., Haouat N., Brignole F., Bayle J., Gastaud P.,** 1992. Immunopathological findings in conjunctival cells using immunofluorescence staining of impression cytology specimens, *British Journal of Ophthalmology*, n.76, pp.545-549
5. **Bolzan A.A., Brunelli A.T.J., Castro M.B., Souza M.A., Souza J.L.,** 2005. Conjunctival impression cytology in dogs, *Veterinary Ophthalmology*, n.8, pp.401-405

6. **Brunelli A.T.J., Vicente F.A.M., Chahud F., Orià A.P., Bolzan A.A., Campos C.F., Doria Neto F.A., Laus J.L.,** 2007. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v.59, n.5, pp.1194-1204

7. **Calonge M., Diebold Y., Saéz V., Enríquez de Salamanca A., García-Vásquez C., Corrales R.M., Herreras J.M.,** 2003. Impression cytology of the ocular surface: a review, *Experimental Eye Research*, n.78, pp.457-472

8. **Cozzi B., Granato A., Merighi A.,** 2009. Neuroanatomia dell'uomo. *Antonio Delfino Editore*, cap.14, pp.119-123

9. **Dart J.,** 1997. Impression cytology of the ocular surface: research tool or routine clinical investigation?, *British Journal of Ophthalmology*, n.81, p.930

10. **Davanger M., Evensen A.,** 1971. Role of pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium, *Nature*, n.229, pp.560-561

11. **Di Girolamo N.,** 2011. Stem cells of the human cornea, *British Medical Bulletin*, n.100, pp.191-207

12. **Di Iorio E.,** 2010. Innovative method for the treatment of total limbal stem cells deficiency (LSCD) through a tissue-engineered hemicornea. *Ricerca finalizzata, Bando Progetti di Ricerca Giovani Ricercatori*.

13. **Donisi P.M., Rama P., Fasolo A., Ponzin D.,** 2003. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology, *Cornea*, n.22, pp.533-538

14. **Dos Santos Honsho C., Dos Santos Apericida F., Gonçalves Dias F.G., Momo C., Ferreira de Souza F.,** 2012. Avaliação comparativa de dois métodos de citologia conjuntival em felinos, *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia*, v.8, n.15, p.2616

15. **Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G.**, 2006. Testo di Anatomia Veterinaria. *Antonio Delfino Editore*, cap.9, pp.323-336

16. **Dyrlund T.F., Poulsen E.T., Scavenius C., Lund Nikolajsen C., Thøgersen I.B., Vorum H., Enghild J.J.**, 2012. Human cornea proteome: identification and quantitation of the proteins of the three main layers including epithelium, stroma and endothelium, *Journal of Proteome Research*, n.11, pp.4231-4239

17. **Eördögh R., Schwendenwein I., Tichy A., Nell B.**, 2014. Introduction of a standard technique of impression cytology on the cat eye, *European College of Veterinary Ophthalmologist, 2014 Annual Scientific Meeting*, p.73

18. **Gelatt K.N.**, 2007. *Veterinary Ophthalmology. Blackwell Publishing*

19. **Guandalini A., Peruccio C., Pizzirani S.**, 2006. *Oftalmologia. Poletto Editore*

20. **Ksenija V., Pirkić B., Popović I., Borošak H., Hohšteter M., Kiš I., Matijatko V., Muljačić A., Špoljarić D., Popović M.**, 2010. In vitro cultivation of canine limbal transplant, *Acta Veterinaria (Beograd)*, v.80, n.5-6, pp.437-447

21. **Mags D.J., Miller E.P., Ofri R.**, 2008. *Slatter's fundamentals of Veterinary Ophthalmology. Saunders Elsevier*, cap.1, cap.3, cap.6, cap.8, cap.16

22. **Mann I.**, 1944. A study of epithelial regeneration in the living eye, *British Journal of Ophthalmology*, n.28, pp.26-40

23. **Martin L.C.**, 2010. *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine. Manson Publishing*, cap.6, pp.113-116; cap.8, pp.183-185; cap.10, pp.241-245; cap.11, pp.298-303; cap.13, pp.369-373; cap.14, pp.401-413

24. **Martinez A.J., Mills M.B., Jaceldo K.B., Tio F.O., Aigbiybalu I.B., Hilsenbeck S.B., Yee R.W.,** 1995. Standardization of conjunctival impression cytology, *Cornea*, n.14, pp. 515-522
25. **Moore C.P., Collier L.L.,** 1990. Ocular surface disease associated with loss of conjunctival goblet cells in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, n.26, pp.458-466
26. **Moore C.P., Wilsman N.J., Nordheim E., Majors L.J., Collier L.L.,** 1987. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, n.28, pp.1925-1932
27. **Nubile M., Lanzini M., Miri A., Pocobelli A., Calienno R., Curcio C., Mastropasqua R., Dua S., Mastropasqua L.,** 2013. In vivo confocal microscopy in diagnosis of limbal stem cell deficiency, *American Journal of Ophthalmology*, n.155, pp.220-232
28. **Peterson-Jones S., Crispin S.,** 2002. BSAVA Manual of Small Animal Ophthalmology. *BSAVA*
29. **Poli M., Janin H., Justin V., Auxenfans C., Burillon C., Damour O.,** 2011. Keratin 13 immunostaining in corneal impression cytology for the diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.52, n.13, pp.9411-9415
30. **Rama P., Bonini S., Lambiase A., Golisano O., Paterna P., De Luca M., Pellegrini G.,** 2011. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*, n.72, pp.1478-1485

31. **Ramirez-Miranda A., Nakatsu M.N., Zarei-Ghavanati S., Nguyen C.V., Deng S.X.**, 2011. Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than Keratin 19. *Molecular Vision*, n.17, pp.1652-1661
32. **Salvalaio G., Fasolo A., Bruni A., Frigo A.C., Favaro E., Ponzin D.**, 2003. Improved preparation and preservation of human keratoplasty lenticules. *Ophthalmic research*, n.35, pp.313-318
33. **Sherwood L., Klandorf H., Yancey P.**, 2006. Fisiologia degli Animali. *Zanichelli*, cap.6, pp. 203-219
34. **Shiraishi A., Converse R.L., Liu C.Y., Zhou F., Candace W.- Kao C., Winston W.- Kao Y.**, 1998. Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.39, n.13, pp.2554-2561
35. **Singh R., Joseph A., Umapathi T., Tint N.L., Dua H.S.**, 2005. Impression cytology of the ocular surface. *British Journal of Ophthalmology*, n.89, pp.1655-1659
36. **Thatcher R.W., Darougar S., Jones B.R.**, 1977. Conjunctival impression cytology. *Archives of Ophthalmology*, n.95, pp.678-681
37. **Thiel M.A., Bossart W., Bernauer W.**, 1997. Improved impression cytology techniques for the immunopathological diagnosis of superficial viral infections. *British Journal of Ophthalmology*, n.81, pp.984-988
38. **Thoft R.A., Friend J.**, 1983. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, n.24, pp.1442-1443

39. **Tseng S.C.G.**, 1985. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology, *Ophthalmology*, n.92, pp.728-733
40. **Vemuganti G.K., Fatima A., Madhira S., Basti S., Sangwan V.**, 2009. Limbal stem cells: Application in ocular biomedicine. *International Review of Cell and Molecular Biology*, n.275, pp.133-181

Pagine web consultate

41. www.adoces.it (Associazione Donatori Cellule Staminali)
42. www.biessea.com (BiEsseA Laboratorio Analisi Veterinarie, 2008, Utilizzo dell'imprinting congiuntivale in oftalmologia, Dott.ssa Simona Destefanis – DVM, Clinica Veterinaria Sempione, Milano; Dott.ssa M.Cristina Muscolo – DVM, Clinica Veterinaria Basiglio, Milano; Dott.ssa Daniela Olivero – DVM, BiEsseA Laboratorio di Analisi Veterinarie, Milano)
43. www.fbov.org (Fondazione Banca degli Occhi del Veneto Onlus)
44. www.oftaunibologna.it (Unità Operativa di Oftalmologia a Direzione Universitaria del Policlinico S.Orsola-Malpighi)
45. www.sindrome-eec.it (p63 Syndrome International Net Work World Onlus)
46. www.trapiantionline.com (Il Trapianto di cellule staminali, Intervista ad Emilio Balestrazzi, Ordinario Di Oftalmologia e Direttore dell'Unità Operativa di Oculistica, Università Cattolica di Roma, 2005, *Trapianti*, pp.84-86)

Ringraziamenti

Arrivata alla fine di tutto dovrei ringraziare giusto qualcuno, anche se la sintesi non è il mio forte ed è probabile che sarò logorroica anche nei ringraziamenti...

Grazie alla Prof.ssa Ilaria Iacopetti, al Dott. Di Iorio e soprattutto ad Anna, Maria Assunta, Paolo ed Angelo per la pazienza, la simpatia e l'estrema disponibilità.

Il grazie più grazie di tutti ai miei genitori che mi hanno sempre appoggiata e sostenuta in ogni mia scelta e per aver creduto in me nei miei sogni e nelle mie passioni!!!

Grazie a Giuly e Frank per essere così tanto diversi tra loro e da me e per essere stati ed essere sempre vicino a me in un modo o nell'altro...Vi voglio tanto bene...ma con chi mangerò il riso basmati col tonno e i pomodorini ora che parti Giuly? Sigh! Piango!!!

Grazie ai miei nonni, che in questo momento sono certa saranno molto felici e orgogliosi di me!!

Grazie alla Mary e alla Gol, prove viventi del fatto che a volte un amico ti conosce meglio di quanto non ti conosca tu stesso... Grazie Gol mia adorabile svampita dagli occhi marroni per essere così persa nel tuo mondo e per permettere a me di entrarci, grazie per le giornate in simbiosi in qualunque luogo esistente, per le risate, le litigate storiche e il non aver bisogno neanche di parole per capirsi....grazie Pi squarta pulcini-odia bambini, un po' acidella ma sensibile e presente come poche persone al mondo, grazie per accorgerti di tutto quello che mi succede anche quando sembra che non sia così, grazie per sapere cosa penso a volte anche prima di me..vai tu al posto mio?

Grazie Gaspa, monosillabica per messaggi ma in realtà poi mi ascolti anche quando attacco a parlare a macchinetta e nessuno ce la fa più...neanche tu, ma cerchi di non darlo a vedere!! Grazie alle tue suonerie da boara da vergognarsi e al primo anno misto Sia-Stan che ti ha fatto conoscere questo branco di matte!! Grazie a tutte e tre per far parte della mia vita, perché con

voi ci si può divertire anche a non fare niente o a fare le boare sugli autoscontri, !! Grazie per questi anni di amicizia vera e sincera e per quelli che spero e so che verranno!!

Grazie anche alla Stefy unica persona normale del gruppo, ogni tanto so che pensi oh ma queste che problemi hanno :-)) e all'Ila e ai suoi "no no non so niente ho avuto culo" e perché dovunque va mette il buon umore.

Grazie alla Lussi e a colui che quella volta ti ha passata al 2°anno (te l'avevo detto che l'avrei fatto), grazie per essere stata in questi anni la mia "coscienza scolastica " ma non solo...per i pomeriggi a studiare e ripetere, le "gite in macchina" per andare all'università sempre in ritardo, i "passi tu o passo io", palestra, cazzeggio, vacanze, consigli, confidenze, isterismi...la lista è lunga e io son logorroica e mi fermo qui...

Grazie Lau...le serate, l'inbloom, le passeggiate sull'argine a rifarsi gli occhi, spettegolare e molto altro...grazie!! A Pietro ed Ale, e ancora a tutti e quattro...grazie per le risate, le lezioni saltate, le mattine in necro,in mensa,i tirocinii, per le giornate perse sul prato a non fare niente, le vacanze e le serate !! Grazie perché questi cinque anni non sarebbero stati così belli se non avessi incontrato voi...grazie perché so già ora che mi mancheranno!!!

Grazie a Vittorio, il migliore coinquilino in assoluto che si possa desiderare, per le cene(cioè tu che cucini), le serate valenciane e non, gli scherzi casalinghi!! Grazie a Chicca, Ilaria e Fra!! Ognuno in modo diverso, difficile da spiegare in poche righe...grazie perché un anno come il nostro vale molto molto di più di un anno...e perché so e spero che questo sia solamente l'inizio di una lunga serie!!

I miei ringraziamenti si fermano qui con la Maya e Macchia perché é soprattutto per loro che spero che un giorno non tanto lontano sarò in grado di fare qualcosa !!!

Viva ☺