



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

Dipartimento di Scienze Biomediche

Dottorato di ricerca in Scienze Morfologiche e Funzionali

Settore scientifico disciplinare BIO/16

**Lesioni degenerative e meccanismi di riparo della superficie
oculare: lo pterigio e le deficienze delle cellule staminali del
limbo (LSCD).**

Studio immunoistochimico e tecniche di coltura cellulare.

Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche e Funzionali

Dott.ssa Michela Corrias

Tutore: Prof.ssa Maria Teresa Perra

Coordinatore: Prof.ssa Valeria Sogos

ANNI ACCADEMICI: 2012-2013

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
I. La superficie oculare	pag. 4
I.1. La cornea	pag. 4
I.2. Il limbo	pag. 8
I.3. La congiuntiva	pag. 11
I.4. Il film lacrimale	pag. 12
II. Meccanismi di controllo della proliferazione cellulare	pag. 14
II.1. La neoangiogenesi	pag. 14
II.2. Il sistema Renina-angiotensina (RAS)	pag. 20
III. Patologie oculari	pag. 23
III.1. Lo pterigio	pag. 23
III.2. Le deficienze staminali del limbo (LSCD)	pag. 26
III.2.1. Coltura di cellule staminali limbiche per l'allestimento di modelli di cornea in vitro	pag. 28
SCOPO DELLA TESI	pag. 34
MATERIALI E METODI	pag. 35
I. Casistica ed allestimento dei preparati	pag. 35
I.1. Colture cellulari	pag. 37
I.1.1. Origine delle cellule e creazione di banche cellulari	pag. 39
a. Le cellule staminali del limbo (LSC)	pag. 39
b. I Cheratociti	pag. 41

c. Fase di congelamento	pag. 42
I.1.2. Ricostruzione di un modello di emicornea	pag. 43
a. Preparazione dello stroma equivalente (SE)	pag. 43
b. Coltura delle LSC sullo SE	pag. 46
c. Modelli utilizzati	pag. 48
I.1.3. Determinazione del potenziale clonogenico	pag. 49
I.1.4. Analisi istologica	pag. 49
I.1.5. Osservazione e fotografia	pag. 49
I.2. Analisi immunoistochimica	pag. 50
a. Sezioni paraffinate	pag. 50
b. Cellule in coltura	pag. 52
I.2.1. Analisi statistica	pag. 53
I.2.2. Osservazione e fotografia	pag. 53
RISULTATI	pag. 54
I. Espressione di ACE I nello pterigio	pag. 54
I.1 Istologia dello pterigio	pag. 54
I.2. Caratterizzazione fenotipica cellulare	pag. 54
I.3. Immunolocalizzazione ed espressione di ACE I	pag. 56
a. Sezioni paraffinate	pag. 56
b. Cellule in coltura	pag. 58
I.4. Analisi statistica	pag. 59
II. Ricostruzione di un modello di emicornea a partire da banche di LSC e cheratociti	pag. 60

II.1. Validazione delle banche cellulari di cheratociti e LSC	pag. 60
a. Validazione delle banche di cheratociti	pag. 61
b. Validazione delle banche di LSC	pag. 63
c. Potenziale clonogenico delle cellule epiteliali limbiche	pag. 66
II.2. Controllo di disepitelizzazione della membrana amniotica	pag. 68
II.3. Analisi istologica dei modelli di emicornea	pag. 69
DISCUSSIONE	pag. 72
BIBLIOGRAFIA	pag. 78
ICONOGRAFIA	pag. 90

INTRODUZIONE

I. La superficie oculare

La superficie oculare (Fig. 1), secondo il concetto elaborato da Thoft e Friend nel 1977 [1], rappresenta un'unica unità funzionale composta dal film lacrimale e da tre tipi di epitelio stratificati non cheratinizzati: l'epitelio corneale, l'epitelio congiuntivale e, al confine tra i due, una zona di transizione rappresentata dall'epitelio limbare. Tali epitelio, pur essendo adiacenti, presentano fenotipi differenti e garantiscono la protezione dell'occhio da agenti patogeni, dall'ingresso di corpi estranei e dalla secchezza oculare [2]. Il film lacrimale, secreto dalle ghiandole primarie ed accessorie dell'occhio, contribuisce invece alla difesa, alla lubrificazione, alla trasparenza ottica ed alla pulizia dell'intera superficie oculare [3].

I.1. La cornea

La cornea è una membrana trasparente convessa anteriormente che costituisce la porzione anteriore della tonaca fibrosa del bulbo oculare. Insieme al cristallino, al corpo vitreo e all'umor acqueo costituisce l'apparato diottrico dell'occhio [4]. Ha uno spessore totale di circa 550µm, è trasparente e non vascolarizzata. Essa è costituita da cinque strati istologicamente distinti: l'epitelio, la membrana di Bowman o membrana elastica anteriore, il parenchima corneale, la membrana di Descemet o membrana elastica posteriore e l'endotelio (Fig. 2).

L'epitelio corneale è di tipo pavimentoso stratificato non cheratinizzato composto da 5-7 strati di cellule epiteliali e rappresenta circa il 10% dello spessore corneale. Microscopicamente appare basofilo, con i nuclei delle cellule che lo compongono di

forma diversa a seconda del livello che viene considerato. Le giunzioni cellulari sono giunzioni strette (tight junctions). Come tutti gli epitelii di superficie anche l'epitelio corneale si rinnova costantemente durante la vita di un individuo; tale rinnovamento nell'uomo avviene all'incirca ogni 9-12 mesi ed è garantito dalle cellule staminali del limbo. Le cellule epiteliali in base al loro grado di differenziazione si ripartiscono in tre livelli : le cellule basali, le cellule intermedie e le cellule superficiali o alari direttamente a contatto con il film lacrimale.

Le cellule basali formano un unico strato di cellule cuboidali con nucleo leggermente spostato verso l'apice della cellula. Il loro citoplasma contiene granuli di glicogeno che svolgono un ruolo di riserva energetica nelle situazioni di stress cellulare. Mediante emidesmosomi queste cellule sono attaccate alla sottostante lamina basale e, attraverso desmosomi e numerose interdigitazioni, alle cellule intermedie. Le cellule basali sono deputate al rimpiazzo delle cellule superficiali durante il normale ciclo vitale ed in seguito a lesioni della cornea. Le cellule intermedie si ripartiscono in 2-3 strati di cellule al centro della cornea e 4-5 file di cellule alla periferia. Hanno una forma poligonale con nucleo allungato lungo l'asse della cellula e presentano numerosi desmosomi. Le cellule superficiali o alari sono appiattite, provviste di microvilli e di creste apicali, dense e altamente differenziate. Invecchiando, perdono progressivamente i loro organelli cellulari tanto che lo strato più superficiale consta di cellule anucleate. Le cellule superficiali, per il loro turnover fisiologico, dopo aver perso tutte le loro caratteristiche si desquamano e vengono eliminate con il film lacrimale. A diretto contatto con lo strato basale epiteliale si trova la membrana di Bowman, una struttura acellulare che deriva da una

condensazione di fibre collagene e di proteoglicani ed alla quale i complessi di adesione dell'epitelio sono ancorati. Al microscopio ha un aspetto amorfo e basofilo. Non possiede capacità rigenerativa ed una volta distrutta viene sostituita da tessuto fibroso.

Lo stroma corneale ha uno spessore di circa 500 μm e rappresenta il 90% dell'intera cornea. È un tessuto non vascolarizzato e composto essenzialmente da matrice extracellulare (ECM) ricca in proteoglicani e in fibre collagene; tra esse vi sono intercalati dei caratteristici fibroblasti dendritici chiamati cheratociti e fibre nervose. Nella ECM il collagene ed i proteoglicani formano impilamenti di strati ortogonali, gli uni in rapporto con gli altri, garantendo così la trasparenza corneale. I cheratociti sono gli unici elementi cellulari dello stroma corneale e svolgono il ruolo essenziale di preservare la matrice extracellulare, permettendo la fine regolazione della sua sintesi e della sua degradazione [3]. Sono cellule normalmente quiescenti che sintetizzano collagene ad un tasso molto lento. In caso di lesioni corneali si differenziano in fibroblasti i quali possono, o andare incontro ad apoptosi, promuovendo in tal modo la rigenerazione corneale, oppure possono dare origine ad una cicatrice fibrotica. Infatti, i fibroblasti attivati possiedono la capacità di differenziarsi ulteriormente in miofibroblasti. Questi possono determinare, nei casi di ferite allo stroma, la formazione di cicatrici che appaiono opache. Tuttavia, mentre i miofibroblasti possiedono la caratteristica di poter ritornare allo stato di fibroblasti una volta terminato il processo di contrazione delle ferite, i fibroblasti non sono in grado di ritornare allo stato di cheratociti [5].

Situata posteriormente allo stroma corneale si trova la membrana di Descemet, una membrana collagenica acellulare sintetizzata dalle cellule endoteliali sottostanti di cui costituisce la membrana basale. Ha uno spessore variabile da 4 a 12 μm , è elastica, molto resistente ai traumi, tende ad ispessirsi con l'età e una volta lesa può rigenerarsi. Al microscopio appare amorfa e ha un carattere più basofilo rispetto alle membrane di Bowman. L'endotelio corneale è uno strato unicellulare di cellule esagonali appiattite situato tra la membrana di Descemet e l'umor acqueo. Le sue cellule non si dividono ma sono capaci di migrare e proliferare in condizioni patologiche. La funzione principale dell'endotelio è quella di mantenere costante il tasso di idratazione della cornea in seguito all'attivazione di un sistema regolato da pompe Na/K/ATPase. Pertanto, un danno all'endotelio si traduce in una perdita della trasparenza della cornea. Infatti l'acqua presente nell'umor acqueo infiltrandosi nella cornea provoca edema dello stroma e compromissione della visione [3]. Le funzioni che la cornea assolve sono essenzialmente tre:

- la trasmissione della luce verso le strutture interne dell'occhio
- la rifrazione dei raggi luminosi verso la fovea retinica
- la protezione delle strutture intraoculari da abrasioni e patogeni

I.2. Il limbo

Il limbo è una regione anatomica che corrisponde alla zona di transizione fra la cornea e la congiuntiva. Dal punto di vista istologico l'epitelio del limbo è più spesso di quello corneale e congiuntivale, constando di 10 strati cellulari (Fig. 3A). La membrana basale del limbo, a differenza di quella della cornea, ha un aspetto ondulato per la presenza di papille o "pegs" di stroma che si estendono verso l'alto. Lo stroma presenta fibre collagene disposte non regolarmente come nella cornea, nervi e vasi sanguigni che garantiscono l'apporto di nutrienti che diffondono verso il centro della cornea [6]. Funzionalmente, il limbo è molto importante in quanto è la sede delle cellule staminali limbiche (LSC), indispensabili per il rinnovamento e la rigenerazione dell'epitelio corneale. Inoltre rappresenta una barriera attiva contro l'invasione della congiuntiva (congiuntivalizzazione) sulla cornea ed è la sede del drenaggio della maggior parte dell'umor acqueo dalla camera anteriore del bulbo oculare.

Una cellula staminale (SC) è definita come una cellula in grado di mantenere la propria popolazione, non solo fornendo delle cellule figlie capaci di rimpiazzare le cellule perdute, ma in grado di rigenerare essa stessa [7]. Nel 1990, Potten e Loeffler [8] hanno definito la cellula staminale come una piccola cellula con citoplasma primitivo, un ciclo cellulare lento, indifferenziata e con una spiccata capacità di proliferazione, auto-rinnovamento e rigenerazione dei tessuti. Le cellule staminali limbiche assicurano il rinnovamento dell'epitelio corneale, il quale si rinnova normalmente ogni anno, generando cellule amplificatrici transitorie (TAC), ad alta capacità proliferativa, le quali, sia in condizioni normali, ma soprattutto nei processi

di guarigione delle ferite, migrano verso lo strato basale della cornea prima di subire una differenziazione (Fig. 3B). Tale differenziazione è responsabile delle modificazioni morfologiche e biochimiche negli strati intermedi e superficiali corneali. Le LSC si trovano in specifiche invaginazioni o nicchie dello strato basale dell'epitelio limbare chiamate Palizzate di Vogt (Fig. 3A) maggiormente presenti nella porzione superiore ed inferiore del limbo [9,10]. Le Palizzate di Vogt sono altamente pigmentate infatti, oltre alle LSC, contengono melanociti ma anche cellule di Langerhans [11]. Ad oggi, in assenza di marcatori specifici di cellule staminali, la determinazione del potenziale clonogenico, messo a punto da Barrandon e Green [12], resta il metodo d'elezione per la caratterizzazione delle SC. Nel 1987 Barrandon e Green [13], inoltre, hanno mostrato che solo le cellule di piccolo diametro (inferiore a $11\mu\text{m}$) sono in grado di formare dei cloni, mentre le altre cellule seguono la via della differenziazione. Anche marcatori immunoistochimici potenzialmente espressi dalle cellule staminali, come ad esempio p63 e ABCG2 [14], permettono una loro caratterizzazione la quale rimane però non univoca.

Tre tipi di cellule staminali sono state identificate ed isolate dall'epidermide in funzione del loro potenziale di crescita: gli olocloni, i meroclioni ed i paracloni [12]. Le cellule progenitrici di olocloni possiedono il più ampio potere proliferativo. Possono indurre da 80 fino a 100 divisioni cellulari originando grandi cloni aventi un'area di circa $10\text{-}20\text{ mm}^2$, dal diametro circolare e contenenti piccole cellule addensate soprattutto lungo il diametro della colonia. Solamente le cellule staminali sono in grado di dare origine a olocloni. I paracloni, invece, corrispondono alle TAC e possono indurre fino ad un massimo di 15 divisioni cellulari generando piccoli

cloni, dal diametro irregolare, di cellule grandi, appiattite e terminalmente differenziate. Cellule con caratteristiche intermedie fra gli olocloni e i paracloni sono rappresentate dai merocloni. Essi sono capaci di produrre da 25 fino a 60 divisioni cellulari, formano colonie di cellule che occupano solitamente un'area inferiore ai 5 mm² e dal perimetro irregolare. Lo studio delle LSC ha acquisito in questi ultimi decenni sempre più considerazione. Nuove strategie nel campo della terapia genica e cellulare sono in fase di studio e validazione. Infatti, ad oggi, autentici foglietti coesivi di epitelio sono già stati generati ed utilizzati per ripristinare la superficie corneale danneggiata [15,16].

I.3. La congiuntiva

La congiuntiva è una membrana mucosa trasparente che riveste la superficie interna delle palpebre da cui si riflette a ricoprire la parte anteriore del bulbo oculare [4]. Sebbene la congiuntiva sia una membrana unica la si può suddividere anatomicamente in tre porzioni: la congiuntiva palpebrale, la congiuntiva dei fornici e la congiuntiva bulbare. La tonaca congiuntivale delle palpebre o congiuntiva palpebrale è una membrana sottile, trasparente, rossa o rosea, che tappezza la faccia posteriore delle palpebre. Il fornice congiuntivale rappresenta la porzione di congiuntiva che, dalla più estrema regione palpebrale, si riflette su se stessa per ricoprire la superficie anteriore del bulbo oculare. La congiuntiva bulbare è la parte di congiuntiva a diretto contatto con il bulbo oculare, coprendo la maggior parte del segmento anteriore. È liscia, molto sottile e trasparente, lasciando così intravedere il colore bianco della sclera ed i vasi congiuntivali [3]. Istologicamente, analogamente alla cornea, la congiuntiva mostra un epitelio organizzato in più livelli non cheratinizzato, costituito mediamente da due a tre strati cellulari. Caratteristica peculiare dell'epitelio della congiuntiva è la presenza di numerose cellule caliciformi mucipare chiamate goblet cells (Fig. 4). Attraverso il loro secreto rilasciano le mucine, glicoproteine la cui funzione principale è quella di lubrificare la superficie oculare, prevenire l'essiccazione della cornea ed impedire l'infiltrazione di patogeni [17]. A questo proposito è riconosciuta anche la funzione immunologica della congiuntiva, svolta dalle cellule di Langherans residenti e dai macrofagi tissutali. L'epitelio congiuntivale è capace di invadere la cornea in seguito a distruzione delle cellule staminali limbiche [18]. Lo stroma della congiuntiva è formato da tessuto

connettivo fibroso vascolare contenente vasi sanguigni, vasi linfatici e differenti tipi cellulari (mastociti, linfociti e neutrofilo polinucleati).

Negli ultimi decenni ha preso sempre più corpo la teoria che anche l'epitelio congiuntivale possa essere popolato da cellule staminali; a supporto di ciò Pellegrini e collaboratori [9] hanno dimostrato la presenza di cellule clonogeniche con un'elevata capacità di divisione cellulare sia nell'epitelio della congiuntiva bulbare che in quello del fornice. Inoltre, diversi markers associati a cellule staminali del limbo sono stati usati per tentare di localizzare le presunte cellule staminali o progenitrici nella congiuntiva bulbare umana [19]. Tuttavia ad oggi, la localizzazione definitiva delle SC congiuntivali non è stata ancora identificata.

I.1.4. Il film lacrimale

Il film lacrimale è composto dai secreti delle ghiandole lacrimali principali ed accessorie, delle ghiandole palpebrali e delle goblet cells della congiuntiva. Esso consta di tre differenti strati sovrapposti: mucoso, acquoso e lipidico. Nello strato mucoso, il più profondo, si trovano disperse le mucine, glicoproteine prodotte dalle cellule caliciformi mucipare della congiuntiva, acqua, immunoglobulina A, enzimi ed elettroliti. Lo strato acquoso, intermedio, contiene principalmente acqua, elettroliti, proteine ed enzimi. Lo strato lipidico, il più superficiale, è secreto dalle ghiandole di Meibomio ed è costituito da una miscela di idrocarburi, esteri delle cere, colesterolo libero, trigliceridi ed acidi grassi liberi. Il film lacrimale è deputato a svolgere l'importante funzione di proteggere la cornea e la congiuntiva dall'essiccazione. Assicura inoltre una adeguata ossigenazione alla cornea,

rappresenta una difesa contro gli agenti patogeni contenendo sostanze immunologicamente attive e sostanze con potere antibatterico e funge da superficie rifrattiva anteriore contribuendo al potere rifrattivo oculare [21].

II. Meccanismi di controllo della proliferazione cellulare

II.1. La neoangiogenesi

Il processo di angiogenesi (neoangiogenesi o neovascolarizzazione) gioca un ruolo fondamentale sia nella sviluppo embrionale che nella vita adulta. In condizioni fisiologiche è direttamente coinvolta nei processi di rigenerazione dei tessuti e nel ciclo riproduttivo femminile [22]. Essa svolge un ruolo centrale anche in alcune condizioni patologiche, come la crescita tumorale e l'infiammazione cronica. Nell'uomo la vascolarizzazione deriva da una rete di vasi sanguigni inizialmente formati nell'embrione mediante vasculogenesi, processo mediante il quale si sviluppa il sistema vascolare. E' uno dei primi eventi nell'embriogenesi. Durante il primo sviluppo embrionale, infatti, le cellule mesodermiche si differenziano in emangioblasti, progenitori sia delle cellule ematopoietiche che di cellule endoteliali (EC) dando origine ai vasi sanguigni. Durante la differenziazione gli emangioblasti producono gli angioblasti. Gli angioblasti, proliferando, conducono alla formazione di strutture che andranno a costituire molteplici e differenti parti del sistema circolatorio. La fusione di queste strutture porta alla comparsa di capillari sottili formati da EC, che acquisiranno le caratteristiche di vene o di arterie. La fase della vasculogenesi è completata dalla formazione di plessi vascolari primari e da tutte le ulteriori trasformazioni della rete vascolare ottenute mediante angiogenesi [23]. L'angiogenesi consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da un rete vascolare già esistente, creando in questo modo una rete vascolare più complessa con relativo aumento del numero dei vasi. Quindi, le cellule endoteliali della parete dei vasi esistenti, in risposta a vari stimoli fisiologici, vengono attivate ed iniziano a

rilasciare diversi fattori di crescita [24]. L'angiogenesi è infatti un fenomeno complesso, strettamente controllato da un equilibrio dinamico tra fattori pro- ed anti-angiogenici. Lo spostamento di tale equilibrio verso i fattori anti-angiogenici garantisce che nell'individuo adulto sano le EC si trovino in uno stato di quiescenza. D'altra parte, in particolari situazioni patologiche, si verifica la rottura di questo equilibrio ("switch" angiogenico), con una up-regolazione di fattori pro-angiogenici o down-regolazione di fattori anti-angiogenici e conseguente inizio del processo angiogenico [25]. Classici mediatori ad azione anti-angiogenica sono i mediatori solubili come ad esempio la trombospondina-1 (TSP-1), la quale è considerata la principale inibitrice fisiologica della genesi vascolare, essendo costitutivamente prodotta dalle cellule normali e la cui over-espressione causa inibizione del processo angiogenico [26]; l'angiostatina e l'endostatina che agiscono inibendo la migrazione e la proliferazione delle EC [27,28]; fattori genetici come il gene *p53* codificante per l'omonima proteina. Quest'ultima, appartenente alla famiglia degli oncosoppressori, sembra essere coinvolta nella degradazione del fattore ipossia inducibile (HIF-1) il quale favorisce l'espressione di induttori angiogenici [29]. Per quanto riguarda i principali fattori induttori dell'angiogenesi questi possono essere suddivisi in tre classi:

- fattori ad azione diretta (citochine, chemochine ed enzimi angiogenici) aventi come bersaglio le EC, come ad esempio il Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) che induce molteplici risposte biologiche tra cui proliferazione, migrazione e differenziazione delle EC, produzione di proteasi ed angiogenesi [30].

- fattori ad azione indiretta, che agiscono stimolando le cellule accessorie (monociti, mastociti, cellule T e EC) a produrre fattori ad azione proangiogenica come il Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) e Transforming Growth Factor β (TGF- β) [31].
- fattori ad azione specifica sulle EC come la famiglia del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e le angiopoietine. Il VEGF e i suoi recettori costituiscono il maggior sistema regolatore dello sviluppo vascolare e ricoprono un ruolo assai importante in particolare nella vasculogenesi e nell'angiogenesi sia fisiologica che patologica [32]. Il sistema del VEGF è up-regolato in molti tessuti e in molte cellule quando l'angiogenesi è attiva. I suoi livelli sono invece bassi quando il processo angiogenico non è in corso [25]. In vitro è stato dimostrato che il VEGF stimola la degradazione della matrice extracellulare (ECM), la proliferazione, la migrazione, la formazione di tubuli di EC e promuove l'espressione di MMP-1 [32]. Inoltre si è osservato che il VEGF regola la permeabilità vascolare necessaria per dare l'avvio al processo angiogenico [33]. Il VEGF è anche in grado di stimolare la proliferazione e migrazione delle EC attraverso numerosi pathway che coinvolgono l'attivazione di MAPK, ERK, p-38, JNK e membri della famiglia delle Rho GTPasi [34].

Altre molecole attivamente coinvolte nel processo angiogenico sono state oggetto di studio. Questi effettori biologici, appartenenti a sistemi "alternativi", sembrano possano partecipare attivamente al processo di angiogenesi. Tra questi possiamo ad esempio citare l'endotelina 1 (ET-1) e l' ANG II [25].

L'ET-1 fa parte della famiglia dei peptidi delle endoteline (ET). Le ET esplicano le loro azioni in seguito all'interazione con due classi di recettori accoppiati a proteine G, il recettore ET_A-R e ET_B-R. In particolare, ET-1 esplica la sua azione pro-angiogenica in seguito al legame con il recettore ET_B-R, promuovendo la proliferazione e la migrazione delle EC in vitro. Inoltre è stato dimostrato che l'ET-1 agisce come fattore anti-apoptotico per le EC. Evidenze scientifiche hanno anche dimostrato che l'ET-1 ed il VEGF interagiscono reciprocamente stimolando la proliferazione delle EC: il VEGF aumenta sia l'espressione dell'mRNA che la secrezione di ET-1 dalle EC [35], mentre ET-1, legandosi al recettore ET_A-R, stimola l'espressione e la secrezione di VEGF nelle Vascular Smooth Muscle Cells (VMSC) [36].

L'ANG II è stato dimostrato possedere effetti pro-angiogenici in vivo, stimolando la crescita di EC quiescenti e venendo co-secreta insieme ad ET-1 nelle EC [37]. Diversi studi hanno evidenziato che l'ANG II stimola la neovascolarizzazione per attivazione delle NADP(H) ossidasi (NOX), enzimi responsabili della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel sistema vascolare. Infatti l'ANG II, in seguito al legame con il suo recettore AT1, può indurre attivazione delle NOX le quali portano alla formazione di ROS, tra cui l'H₂O₂. Quest'ultima stimola la neoangiogenesi per incremento dell'espressione del recettore di tipo 2 (VEGF-R2) per il VEGF e del fattore di ipossia inducibile (HIF-1) che a sua volta determina un aumento dell'espressione del VEGF [38,39].

La formazione e la crescita angiogenica di nuovi vasi sanguigni è un processo che avviene in fasi distinte (Fig. 5). In risposta a stimoli angiogenici (lesioni,

infiammazione, ipossia) le EC attivandosi stimolano la produzione e il rilascio di fattori di crescita e citochine. Inoltre in presenza di molecole biologicamente attive, come l'ossido nitrico, si verifica vasodilatazione ed un aumento della permeabilità vascolare in risposta al VEGF, con conseguente rilascio nell'ambiente extracellulare di proteine plasmatiche le quali costituiscono uno "scaffold" provvisorio per la migrazione delle EC. Si ha così una perdita di connessioni tra le EC e tra EC e cellule di supporto (periciti e cellule muscolari lisce) con conseguente formazione di fenestrazioni, destabilizzazione delle pareti vasali e degradazione della membrana basale [40]. A questo punto le EC sono in grado di secernere e attivare fattori proteolitici come le MMPs, che degradano la ECM facilitando la migrazione delle EC. In seguito alla migrazione attraverso la matrice degradata, le EC sono indotte a proliferare grazie agli stimoli di molti fattori angiogenici endogeni (taluni risultanti dalla stessa degradazione della ECM), quali fattori di crescita, come ad esempio i fattori appartenenti alla famiglia del VEGF, mediatori dell'infiammazione, enzimi, ormoni, molecole di adesione cellulare e fattori emopoietici. I processi appena descritti fanno sì che le EC si possano riorganizzare a formare un capillare che successivamente svilupperà un lume attraverso due processi [41]:

- Un processo di canalizzazione intracellulare che avviene per fusione di vescicole citoplasmatiche.
- Un processo alternativo di canalizzazione intercellulare nel quale il lume è creato dall'apposizione di membrane di due differenti cellule.

L'intercalarsi delle EC in cooperazione con la fusione di vasi preesistenti permettono un incremento del diametro e della lunghezza dei vasi. La stabilizzazione, la

maturazione e la fase conclusiva dei nuovi capillari è assicurata dalla produzione di diversi fattori quali ang1, ang2 e Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). In particolar modo il PDGF gioca un ruolo centrale nel processo di maturazione dei nuovi vasi che è inoltre supportato dal reclutamento di periciti e di cellule muscolari lisce che stabilizzano la morfologia dei vasi e prevengono la regressione delle EC. Una volta che i nuovi vasi si sono formati, la proliferazione e la migrazione delle EC vengono inibite, viene secreta la nuova membrana basale (BM) e le EC ritornano quiescenti.

II.2. Il sistema Renina-angiotensina (RAS)

Il sistema Renina-angiotensina (RAS) è noto per essere un importante sistema ormonale che regola la pressione sanguigna, il volume plasmatico (volemia) ed il tono della muscolatura arteriosa [42]. Il suo principale effettore biologico è l'angiotensina II (ANG II), un potente octapeptide vasocostrittore generato dal decapeptide angiotensina I (ANG I), per azione dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE, o ACE I, dipeptidil-carbossipeptidasi) che rimuove dall'ANG I un dipeptide carbossi-terminale [43]. L'ANG II media le proprie funzioni attraverso dei recettori membranali specifici, di cui si conoscono due principali sottotipi: il sottotipo AT1 ed il sottotipo AT2 entrambi appartenenti alla superfamiglia dei GPCRs (G-Protein Coupled Receptors) (Fig. 6) [44,45].

Il recettore AT1, espresso in svariati tessuti adulti, media le principali funzioni dell'ANG II tra cui vasocostrizione ed aumento della pressione sanguigna. Inoltre la sua attivazione è stata dimostrata essere implicata nei fenomeni di proliferazione cellulare, stress ossidativo, disfunzione endoteliale, angiogenesi, infiammazione, inibizione del riassorbimento di sodio [46].

Contrariamente, il sottotipo AT2 è espresso abbondantemente nei tessuti fetali, in minore misura nei tessuti adulti differenziati e solo in particolari condizioni patologiche come la fibrosi, l'ipertensione e l'infarto del miocardio. Determina effetti pressoché opposti a quelli del recettore AT₁. Infatti la sua attivazione media vasodilatazione, ipotensione, apoptosi, riduzione dello stress ossidativo ed una possibile inibizione del recettore AT₁ [47,48]. L'ANG II può legare anche altri sottotipi recettoriali, i recettori AT₃ e AT₄, la cui funzione biologica però è tuttora in

via di definizione. Un altro importante componente del sistema RAS è l'enzima ACE, una zinco-metallopeptidasi, la quale non possiede unicamente la capacità di catalizzare la trasformazione dell'ANG I in ANG II, ma è altrettanto in grado di inattivare i peptidi vasoattivi bradichidina e sostanza P [49]. Nell'uomo sono state identificate due isoforme distinte dell'ACE, entrambe proteine transmembrana: l'ACE somatico (sACE) espresso in alte concentrazioni nelle cellule endoteliali, nelle cellule epiteliali e neuroepiteliali, e l'ACE germinativo o testicolare (tACE) espresso esclusivamente nel sistema riproduttivo maschile ed essenziale per la fertilità maschile [50]. L'isoforma somatica di ACE (Fig. 7) è composta da due regioni omologhe rappresentate dal dominio extracellulare N-terminale ed un corto dominio citoplasmatico C-terminale. Entrambi i domini contengono la sequenza consenso aminoacidica HEMGH, che lega lo zinco, fondamentale per l'attività enzimatica dell' sACE. L'isoforma testicolare di ACE, invece, è composta unicamente dal dominio N-terminale. Questo fa sì che tale isoforma possieda un solo dominio catalitico [51]. Secondo alcuni autori l'ACE testicolare può rappresentare l'isoforma primordiale dell'enzima di conversione dell'angiotensina. Recenti studi hanno dimostrato che l'ACE non solo si può comportare da enzima di conversione, ma in talune circostanze, pur essendo una proteina extracellulare, può essere reclutato intracellularmente e comportarsi da fattore di trascrizione nucleare [52]. A questo riguardo Ignjacev e collaboratori [53]. hanno dimostrato che l'ACE esogeno o extracellulare, aggiunto a cellule muscolari lisce di ratto in coltura, viene internalizzato nel nucleo, stimolando la trascrizione dei geni che codificano per i recettori B1 e B2 della bradichinina.

Recente è la scoperta dell'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE II), una carbossipeptidasi che, a differenza dell'ACE I stacca un singolo amminoacido dal C-terminale convertendo l'ANG I in ANG 1-9. Inoltre è in grado di convertire l'ANG II in ANG 1-7 la quale, a sua volta, è in grado di legarsi al proprio recettore specifico chiamato MAS. Esso sembra mediare effetti opposti a quelli del recettore di tipo AT1, come vasodilatazione, azione antiproliferativa ed antifibrotica [54,55]. In virtù di queste evidenze, è stato ipotizzato un possibile ruolo antagonista mediato da ACE 2, attraverso l'azione di ANG 1-7 nel delicato equilibrio ANG I-ACE-ANG II [56]. Recenti studi hanno suggerito che, accanto al sistema renina-angiotensina circolante, sembrerebbe esistere anche un sistema renina-angiotensina a carattere locale o tessuto-specifico definito anche sistema RAS locale (local angiotensin generating system) [57]. I due sistemi sembrano essere collegati fra loro, ma allo stesso modo sembra possano funzionare indipendentemente l'uno dall'altro; quello circolante con un meccanismo endocrino e quello tissutale con un meccanismo autocrino e/o paracrino [58]. La presenza di tutti i componenti RAS, inclusi renina, angiotensinogeno, ACE, ANG I, ANG II è stata dimostrata in differenti tessuti come cuore, cervello, rene, testicoli, pancreas e tessuto adiposo [59]. Inoltre espressione di mRNA e proteine per ACE, ANG II, ed i suoi recettori sono stati identificati in retina umana [60], corpo ciliare corioide umani [61] e cornea di coniglio [62].

III. Patologie oculari

III.1. Lo pterigio

Lo pterigio (Fig. 8A-B) è un processo degenerativo e iperplastico della congiuntiva, caratterizzato da una duplicatura della congiuntiva bulbare che si estende sulla cornea [63]. Spesso tale duplicatura, anche se lentamente, tende a progredire in senso centripeto fino ad invadere la cornea. Tale invasione può addirittura protrarsi fino ad occludere l'asse visivo causando, oltre al danno estetico, anche astigmatismo, lacrimazione, secchezza oculare ed annebbiamento del campo visivo [64]. Lo pterigio non è solo un processo degenerativo, ma è un vero e proprio disordine della superficie oculare a distribuzione mondiale [65]. Il suo nome deriva dall'aspetto ad ala d'insetto (dal greco πτερόγιο) con il quale si presenta. Macroscopicamente lo pterigio appare come un velo congiuntivale a forma di triangolo localizzato nella fessura intrapalpebrale, per lo più dal lato nasale, ma occasionalmente situato anche nel lato temporale. Dati epidemiologici dimostrano che colpisce normalmente soggetti adulti ed è più frequente nelle zone calde, assolate e polverose e sottoposte a forte incidenza solare, come le regioni del bacino mediterraneo, la Sardegna compresa, l'Australia, e il Texas. La condizione è comune nella cosiddetta "pterygium zone" che è definita geograficamente a nord e a sud del 40° grado di latitudine dall'equatore. Nelle popolazioni facenti parte di questa fascia geografica, è stata riportata un'incidenza di questa patologia fino al 22%. Per contro, nei paesi al di fuori di questa fascia, sia a nord che a sud, la sua incidenza usualmente non va oltre il 2% e la maggior parte delle lesioni, sono state riscontrate in persone che esercitavano il proprio lavoro all'aria

aperta [66]. Studi hanno dimostrato che nella patogenesi dello pterigio hanno importanza, oltre i fattori climatici, l'ereditarietà e il tipo di attività condotta dai soggetti affetti. Per quanto riguarda l'ereditarietà, Murken e Dannheim [67] in un loro studio hanno concluso che la familiarità nello pterigio è un tratto autosomico dominante con circa il 70% di penetranza. Hecht e Shoptaugh [68] hanno inoltre proposto che, in base alla trasmissione, lo pterigio può essere classificato in tre diverse categorie: congenito, dei giovani adulti (età compresa tra 18 e 22 anni) e degli adulti; questi autori hanno inoltre suggerito che in tutti i tipi di pterigio sono coinvolti caratteri autosomici dominanti, codificati da alleli localizzati in un singolo locus genico o in loci distinti. Per quanto riguarda l'attività condotta dai soggetti che ne sono portatori, Khoo e collaboratori [69] hanno trovato una relazione significativa tra i lavoratori che svolgono la propria attività all'aperto e l'insorgenza dello pterigio; questo potrebbe essere associato all'azione irritativa della polvere e alla forte esposizione ai raggi solari. L'eziopatogenesi dello pterigio non è ancora del tutto chiara ed è tuttora discussa. In merito sono state fatte alcune ipotesi quali, esiti di reazioni infiammatorie, una primaria degenerazione della cornea seguita da una proliferazione fibroblastica, fattori genetici, infezioni virali, meccanismi immunopatologici, un disordine delle cellule staminali del limbo e fattori promotori di angiogenesi [70,71,72]. Recentemente, Di Girolamo e collaboratori [73], hanno dimostrato come l'angiogenesi sembra essere importante per la sopravvivenza e la crescita dello pterigio ed hanno identificato nello pterigio alcuni effettori strettamente correlati con l'infiammazione, con la fase proliferativa cellulare e con il rimodellamento. Questi effettori includono l'interleuchina (IL)-6, IL-8, alcune

metalloproteinasi (MMPs) e il VEGF. La presenza e l'over-espressione di questi effettori è stata confermata su colture cellulari di pterigio sottoposte ad irradiazione UVB, suggerendo che l'esposizione a radiazioni UV è un importante fattore nello sviluppo dello pterigio [74]. Una up-regolazione del VEGF è stata in particolare riscontrata nell'epitelio dello pterigio tramite analisi immunohistochimica e molecolare. I livelli di tale effettore sono stati sensibilmente più alti comparati con quelli di congiuntiva normale [75]. Il VEGF, inoltre, è stato ampiamente dimostrato essere uno dei maggiori mediatori dell'angiogenesi tumorale. Tuttavia il fattore scatenante, scientificamente accettato come principale responsabile della patologia, è la cronica esposizione alle radiazioni UV [76].

L'evidenza sempre più marcata di possedere tipiche caratteristiche tumorali quali, una marcata proliferazione cellulare, un'elevata propensione ad invadere i tessuti normali, gli alti tassi di recidiva entro un anno dall'escissione chirurgica (97%), rafforza l'ipotesi che lo pterigio non rappresenti unicamente una condizione degenerativa benigna ma un vero e proprio disordine della crescita simil-tumorale [77]. Descritto in letteratura come un "ophthalmic enigma" [78], lo pterigio rappresenta una patologia di grande interesse, sia per gli operatori sanitari in campo oculistico che per i pazienti.

III.2. Le deficienze staminali del limbo (LSCD)

Le cellule staminali del limbo sono le cellule responsabili del rinnovamento dell'epitelio corneale. Una loro alterazione, in seguito a traumi severi o malattie oculari gravi, come le ustioni chimiche o termiche, malattie infiammatorie come lo pterigio, la sindrome di Stevens-Johnson, il pemfigoide cicatriziale oculare [79] e patologie genetiche o ereditarie come le aniridie [80], si traduce in patologie a carico della superficie corneale chiamate deficienze delle cellule staminali del limbo (LSCD). Comunemente si parla di LSCD quando una riduzione del numero di cellule staminali limbiche o una loro disfunzione provoca una riduzione del potenziale proliferativo delle LSC rispetto a quello delle cellule epiteliali congiuntivali. Ciò viene innescato da anomalie cellulari intrinseche o da modificazione del microambiente con conseguente invasione dell'epitelio della congiuntiva bulbare (congiuntivalizzazione) sulla superficie della cornea [10]. Il processo di congiuntivalizzazione si traduce in un epitelio corneale addensato, ispessito, instabile, spesso con neo-vascularizzazione ed infiltrazione di cellule infiammatorie. Queste alterazioni epiteliali della cornea possono portare alla formazione di ulcere corneali, cicatrici e, nei casi più gravi, ad una vera e propria perdita della vista. Alla luce di ciò, una carenza di LSC comporta una perdita delle caratteristiche corneali necessarie per una corretta visione, ovvero uno stroma avascolare e l'integrità epiteliale. Per garantire tali fondamentali caratteristiche, tramite l'ingegneria tissutale, si stanno cercando di sviluppare tecniche di rigenerazione tissutale basate sulla creazione di foglietti epiteliali corneali a partire da LSC coltivate [14]. Il metodo di indagine diagnostico d'elezione per la valutazione delle LSCD è

l'impressione citologica. Essa valuta l'eventuale presenza di cellule epiteliali della congiuntiva e di goblet cells sulla superficie dell'epitelio della cornea. Inoltre, anche la perdita delle Palizzate di Vogt, rilevata attraverso un esame della cornea mediante lampada a fessura, può dare un'indicazione clinica delle LSCD. La colorazione con fluoresceina utilizzata principalmente per la valutazione della congiuntivalizzazione della cornea, può rappresentare un altro metodo di indagine delle LSCD [81,82]. Le LSCD possono essere a carico di un singolo occhio (unilaterali) o nei casi più gravi, a carico di entrambi gli occhi (bilaterali). Ancora, le LSCD possono essere parziali, quando viene intaccata una sola parte del limbo, o totali quando l'intera circonferenza limbare risulta essere danneggiata. Per quanto riguarda le deficienze unilaterali parziali il trapianto di LSC non è richiesto; si può infatti ricostruire la superficie oculare semplicemente per rimozione del tessuto epiteliale congiuntivalizzato con o senza membrana amniotica (MA). Al contrario, nelle LSCD unilaterali totali (Fig. 9A-C) il trapianto autologo di limbo, per applicazione diretta di questo nell'occhio malato o dopo l'espansione *ex-vivo* di LSC, è stato ampiamente sperimentato [15]. Invece, nei casi di danno bilaterale totale, il trapianto allogenico di limbo o di LSC coltivate *ex-vivo*, provenienti da un donatore vivente o da cadavere, è la sola alternativa che può condurre alla rigenerazione dell'epitelio corneale. Tuttavia lo svantaggio di questa procedura è rappresentato dall'elevato rischio di rigetto immunologico che comporta terapie immunosoppressive sistemiche [83,84]. Per cercare di ovviare al problema del rigetto immunitario molteplici studi stanno valutando la possibilità delle cellule staminali adulte di transdifferenziarsi in LSC. A tale riguardo Burillon e collaboratori [85] hanno portato avanti uno studio in cui sono

riusciti a dimostrare, mediante l'allestimento di colture autologhe di cellule epiteliali della mucosa orale (CAOMECS), la capacità di quest'ultime di differenziarsi in cellule epiteliali della cornea. Pertanto il trapianto con innesto autologo di mucosa orale sulla superficie oculare di pazienti con LSCD bilaterale totale, non richiedendo terapie immunosoppressive, può rappresentare un valida alternativa di intervento.

III.2.1. Coltura di cellule staminali limbiche per l'allestimento di modelli di cornea in vitro

Lo sviluppo dell'ingegneria tissutale applicata alla cornea è stato motivato dall'esigenza clinica di un possibile trattamento delle LSCD, ma soprattutto per le applicazioni farmaco-tossicologiche come metodo alternativo al test di irritazione oculare chiamato test Draize. Quest'ultimo viene utilizzato per valutare la tossicità di sostanze chimiche, prodotti farmaceutici e l'efficacia di prodotti cosmetici sulla cornea e sulla congiuntiva animale [16,86]. Da qui, la necessità sia etica che scientifica di sviluppare dei modelli di cornea in vitro sia per la valutazione dell'irritazione oculare ma anche per il trattamento delle LSCD. Ad oggi esistono tre modelli di epitelio corneale umano utilizzati unicamente in campo farmaco-tossicologico: il modello HCE[®] (Epitelio Corneale Umano) di SkinEthic [87], il modello di EpiOcular[®] di MatTek [88], ed il modello Clonetics[®] di Lonza [89]. Sebbene questi modelli presentino una architettura simile all'epitelio della cornea, la mancanza di un compartimento stromale popolato da cheratociti e di un monostrato di cellule endoteliali li rende dei modelli di cornea incompleti, non rassomiglianti ad una cornea umana fisiologica e dunque non utilizzabili in campo oftalmologico. D'altra parte modelli di epitelio ottenuti per coltura

autologa di LSC sono stati ampiamente sperimentati in vivo. Ad esempio, Rama e collaboratori nel 2001 [90], successivamente all'allestimento di colture autologhe di LSC su un substrato di fibrina, hanno trapiantato i foglietti epiteliali così ottenuti sulla cornea di pazienti a cui era stata diagnosticata una LSCD unilaterale totale. Già entro la prima settimana nella maggior parte dei pazienti esaminati è stata notata una riepitelizzazione della cornea, riduzione della neovascolarizzazione e dell'infiammazione, e a distanza di un anno i pazienti hanno mostrato un miglioramento della acuità visiva.

La ricostruzione di modelli in vitro di cornea completa (epitelio,stroma,endotelio), è resa difficile dalla scarsa reperibilità di cellule endoteliali umane. Infatti le cellule endoteliali che si riescono ad estrarre da una cornea sono poche ed inoltre scarsamente divisibili. Per questo motivo modelli in vitro di cornea completa sono spesso realizzati a partire da linee cellulari animali e/o immortalizzate. Ad oggi, l'uso di cellule endoteliali immortalizzate rappresenta dunque l'unica alternativa possibile per ottenere una cornea completa, interamente di origine umana. La situazione ideale sarebbe quella di utilizzare cellule umane non trasformate. A questo proposito Proulx e collaboratori [91] sono riusciti ad ottenere un modello completo di cornea usando cellule epiteliali, cellule endoteliali e cheratociti tutti di origine umana. Tale modello, se da un parte risulta essere difficilmente sfruttabile nell'ambito delle applicazioni farmaco-tossicologiche che richiedono infatti la creazione di consistenti banche di cellule per ottenere un numero riproducibile di modelli, si spera diventi al più presto utilizzabile per scopi clinico - terapeutici. Contrariamente alle cellule endoteliali, i cheratociti possono essere amplificati numerose volte permettendo quindi la creazione di banche cellulari. Per

quanto riguarda le LSC, esse possono essere amplificate al massimo sino al 3-4 passaggio dopo di che perdono il loro potenziale clonogenico. Inoltre bisogna sempre valutare le difficoltà che si riscontrano durante il processo di estrazione che rendono le cellule poco disponibili o comunque in numero non adeguatamente sufficiente. Sulla base di queste considerazioni risulta più semplice allestire dei modelli di stroma epitelizzato piuttosto che modelli di cornea completa. A tale proposito diversi studiosi sono riusciti a sviluppare modelli in vitro di emicornea (epitelio+stroma o stroma epitelizzato) [92]. Per ottenere un modello di emicornea in vitro è necessario allestire colture cellulari di LSC ed ottenere uno stroma equivalente (SE) allo stroma della cornea normale. Foglietti epiteliali di cornea sono stati ottenuti per coltura di cellule epiteliali del limbo su supporti differenti. Ad oggi i supporti più utilizzati sono il gel di fibrina, supporto naturale ideale in quanto non altera le caratteristiche di staminalità delle cellule e la membrana amniotica (MA) [93]. Le principali caratteristiche che motivano una loro scelta come materiali di supporto per la coltura di LSC sono riassunte nella seguente tabella:

Tabella 1: Effetti positivi e negativi dei supporti di coltura cellulare

	GEL DI FIBRINA	MEMBRANA AMNIOTICA
Crescita LSC e cheratociti	+	+
Attività antivirale ed antibatterica	+	++
Attività antinfiammatoria ed antifibrotica	+	++
Attività antiangiogenica	+	+
Facilità di manipolazione	++	-
Trasparenza della cornea post- trapianto	++	-
Degradazione post- trapianto	+++	+
Necessità di sutura	-	+
Possibilità di infezioni post- trapianto	-	+

Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che le LSC possiedono un tasso di crescita maggiore su MA denudata (o disepitelizzata) che su MA intatta, ovvero con lo strato unicellulare di epitelio intatto [94]. Ad oggi nessuno studioso è riuscito ad ottenere uno SE a quello corneale, a causa della complessa organizzazione ultrastrutturale che lo caratterizza e dalla quale dipende la trasparenza della cornea. Tuttavia vari tentativi per ottenere uno SE sono stati effettuati. Ad esempio uno SE è stato ottenuto per disepitelizzazione della cornea umana o coltivando i cheratociti su uno stroma decellularizzato attraverso procedura chimica [95]. Nel 2007, Builles e collaboratori [16] hanno ottenuto uno SE seminando cheratociti estratti da cornea umana, su una matrice di collagene-glicosaminoglicano-chitosano (CGC). Successivamente, seminando sullo SE così ottenuto le SLC, sono riusciti a costruire un modello di emicornea con cellule umane primarie in cui sia l'epitelio che lo stroma sono morfologicamente simili a quelli della cornea fisiologica. Tuttavia non essendo ancora un modello di emicornea trasparente il suo uso clinico-terapeutico non è stato ammesso. Dunque, accertata la difficoltà di ottenere dei modelli in vitro di emicornea per mancanza di vere e proprie banche di cellule epiteliali limbiche, si stanno portando avanti studi allo scopo di trovare nuove fonti di cellule staminali in grado di differenziarsi in cellule epiteliali della cornea. Interessante la recente scoperta di Aberdam e collaboratori [96] riguardo la capacità delle Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) di differenziarsi in cellule di tipo epiteliali corneali. Dunque, terapie corneali che si basino sul trapianto autologo di hiPSCs potrebbero aggirare i problemi tipici dei trapianti allogenici, ovvero il rigetto e la carenza di donatori di cornee.

Ad oggi l'uso di un modello di emicornea e di cornea umana, sia per scopi clinico-terapeutici che per applicazioni farmaco-tossicologiche, non è stato ancora reso possibile. In questa direzione, uno degli obiettivi dell'ingegneria tissutale applicata alla cornea sarà dunque quello di ottenere in vitro un modello di emicornea e/o cornea umana che possa trovare applicazioni nel trattamento di disturbi corneali come le LSCD.

SCOPO DELLA TESI

Il sistema renina-angiotensina (RAS), ed in particolare il peptide ANG II generato per azione dell'enzima di conversione dell'angiotensina I (ACE I), è stato ampiamente dimostrato essere attivamente coinvolto nei meccanismi di proliferazione cellulare e apoptotici, nelle risposte infiammatorie e angiogeniche. Recenti studi hanno individuato inoltre la presenza di sistemi RAS a carattere locale anche nell'occhio umano. Alla luce di queste evidenze, obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quindi valutare la possibile overespressione dell'enzima ACE I, in campioni biotici di pterigio provenienti da pazienti sardi. Parallelamente è stato creato un modello in vitro di pterigio, tramite coltura di cellule provenienti da frammenti biotici, che è stato studiato e comparato con un modello cellulare di congiuntiva normale umana.

Ancora, considerando che lo pterigio è stato annoverato tra le cause delle LSCD e che lo stesso sembra essere il risultato di una parziale LSCD causata dal danno diretto delle radiazioni UV alle cellule staminali limbiche, in un secondo momento si è cercato di ricostruire un modello di emicornea umana allestendo colture cellulari di LSC su una matrice di cheratociti.

MATERIALI E METODI

I. Casistica ed allestimento dei preparati

Le indagini sono state condotte su un totale di 23 campioni di pterigio (17 pterigi primari e 6 pterigi ricorrenti) e su 13 campioni di congiuntiva normale tutti provenienti da pazienti sardi (14 femmine e 22 maschi) e su 3 cornee umane prelevate post-mortem da pazienti francesi. I pazienti sono stati sottoposti ad un questionario dal quale è emerso che l'età dei pazienti sardi era compresa tra i 38 e 57 anni ed erano tutti individui che svolgevano la loro attività all'aria aperta. La maggior parte delle lesioni (16) erano localizzate dalla parte nasale e solo la testa dello pterigio è stata considerata come campione d'analisi. Per l'escissione dello pterigio i pazienti sono stati sottoposti ad un intervento basato sulla tecnica della sclera nuda ("bare sclera technique") mentre il prelievo della congiuntiva è avvenuto durante interventi di strabismo, entrambi effettuati presso la Clinica Oculistica dell'Università di Cagliari, Sardegna. I pazienti non sono stati sottoposti ad alcun trattamento farmacologico prima dell'operazione chirurgica eccetto per la somministrazione dell'anestetico topico a livello locale. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico per la ricerca ed inoltre ogni paziente ha sottoscritto il proprio consenso informato, in accordo con la World Medical Association Declaration of Helsinki. Le cornee umane sono state prelevate da 3 pazienti francesi deceduti (tra i 40 e 80 anni), sono state raccolte in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki e con il consenso delle famiglie all'uso clinico e scientifico ed infine registrate alla Banca delle Cornee presso l'Hôpital E. Herriot (Lione,

Francia). Dopo il prelievo dei frammenti, 10 congiuntive e 20 pterigi sono stati fissati in un fissativo a base di zinco [97] per 18 ore. Dopo la fissazione, i tessuti sono stati accuratamente lavati con tampone fosfato ed inclusi in paraffina per la valutazione istologica e per le indagini immunoistochimiche. Inoltre 3 congiuntive e 3 pterigi dopo il prelievo chirurgico sono state, invece, conservate in terreno di coltura e destinate all'allestimento di colture cellulari; le cellule così ottenute sono state infine sottoposte ad analisi immunoistochimica. Le cornee sono state sottoposte ad un esame con una lampada a fessura immediatamente dopo l'escissione chirurgica. Dopo la valutazione della bassa densità di cellule endoteliali corneali e la conseguente inadeguatezza ai fini terapeutici, le cornee sono state giudicate idonee per lo studio.

I.1. Colture cellulari

Subito dopo l'espianto, i frammenti di pterigio e congiuntiva sono stati posti in culture dish da 8 cm² (Corning-Incorporate; Corning, NY) contenenti 500 µl di terreno di coltura serum free Earle's MEM (Invitrogen Corporation; Carlsab, CA) e posti in incubatore a 37°C, in atmosfera anidra e con una percentuale di CO₂ pari al 5%. Gli espienti sono stati lasciati aderire al supporto di coltura per almeno 18-24 ore, dopo di che sono stati aggiunti 2 ml di EMEM supplementato con siero bovino fetale al 10% (FBS; Invitrogen Corporation), 100 U/ml di penicillina (Invitrogen), 100µg/ml di streptomina (Invitrogen) e 2 mM di L-glutamina (Invitrogen) (Tab. 2). Onde evitare una possibile "contaminazione" fibroblastica, dopo circa 10 giorni gli espienti sono stati rimossi e le cellule così adese sono state lasciate crescere. Il cambio di terreno è stato effettuato tre volte alla settimana sino a confluenza. Le cellule sono state quindi tripsinizzate usando una soluzione di tripsina/EDTA allo 0,5% (Invitrogen) per 10 minuti a 37°C, lavate con PBS sterile (Life Technologies; Ontario, CA), contate nella camera di Burker e riseminate in fiasche da 75 cm² (Corning). Per l'analisi immunostochimica sono state usate le cellule epiteliali al passaggio 6 e 12.

Tabella 2: Terreno di crescita per cellule epiteliali.

Componenti	Concentrazione	Quantità per 500 ml
EMEM	-	442.5ml
FBS	10%	50ml
GLUTAMINA		5ml
PENICILLINA G	100UI/ml	1.25ml
STREPTOMICINA	100µg/ml	1.25ml

Tre cornee umane sono state utilizzate per creare banche di cheratociti e cellule staminali limbiche (LSC). In seguito alla creazione di banche cellulari, queste sono state usate per la ricostruzione di un modello di emicornea in vitro. Gli espianti di cornea sono stati conservati a temperatura ambiente in terreno di coltura presso la banca delle cornee dell'Ospedale Edouard Herriot (Francia), per un massimo di 21 giorni dall'escissione chirurgica. Da ogni espianto è stata dapprima isolata la regione limbare e successivamente lo stesso è stato utilizzato per l'estrazione dei cheratociti.

I.1.1. Origine delle cellule e creazione di banche cellulari

a. Le cellule staminali del limbo (LSC)

Una biopsia di limbo di circa 1-2 mm² è stata prelevata da ciascuna cornea mediante l'utilizzo di pinze chirurgiche e sotto la luce di un microscopio binoculare. Questa è stata processata per l'estrazione delle LSC, secondo il metodo della digestione frazionata messo a punto da Pellegrini e collaboratori e quindi sottoposta all'azione enzimatica della tripsina/EDTA (tripsina 0.025%/EDTA 0,01%) (Sigma Chemicals; St. Louis, MO, USA) [9]. Ciascuna frazione di cellule così ottenuta è stata raccolta e posta in terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Glutammato (Gibco Life Technologies; Saint Aubin, France) con siero fetale bovino (FBS; HyClone™ FetalClone™ II Serum, Logan, UT, USA) al fine di arrestare l'azione della tripsina. Le estrazioni successive sono state effettuate sino ad esaurimento delle cellule. Le cellule estratte sono state contate nella camera di Malassez ed amplificate. Dunque, 1.0 x 10⁴ cellule/cm² sono state seminate in plastiche di coltura contenenti un feeder layer di fibroblasti umani irradiati (4.0 x 10³ fibroblasti/cm² irradiati a 6000 rad) estratti da prepuzio umano e seminate in terreno di coltura Green (Tab. 3). Le cellule sono state poste in incubatore a 37°C, in atmosfera anidra e con una percentuale di CO₂ pari al 5%. A ciascun passaggio le cellule sono state tripsinizzate con tripsina. In seguito alla tripsinizzazione una parte di cellule è stata destinata allo stoccaggio in azoto liquido per la creazione di banche di cellule staminali limbiche, mentre un'altra parte è stata amplificata per poter determinare il potenziale clonogenico e per poter quindi essere usata nella

ricostruzione di un'emicornea. Per la costituzione di un modello in vitro di emicornea sono state usate le cellule al passaggio 2.

Tabella 3: Terreno di coltura per cellule epiteliali (Green).

Componenti	Concentrazione	Quantità per 500 ml
DMEM/GLUTAMAX HAM-F12 (Gibco)	-	280ml
FBS (HyClone™ FetalClone™ II Serum; Logan, UT, USA)	10%	50ml
IDROCORTISONE (Calbiochem; La Jolla, MO, USA)	0.4µg/ml	1ml
INSULINA (Sigma Chemicals)	0.12UI/ml	600µl
ADENINA (Sigma)	24.3µg/ml	5ml
ISOPROTERENOLO (Sandoz Canada; Boucherville, QC, Canada)	0.4µg/ml	1ml
T3(triiodotironina) (Sigma)	2nM	500µl
PENICILLINA G (Sigma)	100UI/ml	250µl
STREPTOMICINA (Sigma)	100µg/ml	250µl
AMFOTERICINA B (Sigma)	1µg/ml	500µl
Fattore di crescita dell'epidermide (EGF; Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA)	10ng/ml	500µl

b. I cheratociti

La cornea è stata trattata con 15 ml di tripsina/EDTA per 30 minuti a 37°C per eliminare l'epitelio e l'endotelio. Successivamente è stata sezionata in 4 parti ed incubata in 10 ml di una soluzione di collagenasi A (Roche) per permettere l'estrazione dei fibroblasti corneali. Questa soluzione è stata sottoposta ad agitazione meccanica a 37°C per 1 ora. Il surnatante è stato aspirato e quindi eliminato. La cornea è stata nuovamente digerita in 10 ml di soluzione di collagenasi per 2 ore a 37°C sotto agitazione. Il surnatante è stato a questo punto raccolto e purificato usando dei filtri da 70µm (BD Falcon), lavato con terreno di coltura per cheratociti e centrifugato a 3000 rpm. Le cellule sono state contate e seminate (1.0×10^4 cellule/cm²) in supporti di coltura contenenti media per fibroblasti, composto da DMEM/Glutammato, 5 ng/ml di fattore di crescita per fibroblasti (bFGF; Sigma), 10% di siero fetale bovino (FBS; HyClone™ FetalClone™ I Serum, Logan, UT, USA), antibiotici ed incubate a 37°C (5% CO₂) (Tab. 4). A ciascun passaggio i cheratociti sono stati tripsinizzati. Una parte di cellule è stata destinata alla crioconservazione per la creazione di banche di cheratociti, mentre la restante parte è stata amplificata e seminata su membrana amniotica per creare uno stroma equivalente (SE) sul quale sono state poi seminate le LSC. Per la realizzazione dello SE sono stati utilizzati cheratociti al passaggio 3.

Tabella 4: Terreno di crescita per i fibroblasti.

Componenti	Concentrazione	Quantità per 500 ml
DMEM/GLUTAMMATO HAM-F12	-	450ml
bFGF	5ng/ml	50µl
FBS (HyClone™ FetalClone™ I Serum; Logan, UT, USA)	10%	50ml
PENICILLINA G	100UI/ml	250µl
STREPTOMICINA	100µg/ml	250µl
AMFOTERICINA B	1µg/ml	500µl

c. Fase di congelamento

Per la crioconservazione le cellule sono state inserite in criotubi contenenti 500 µl di una soluzione di congelamento composta da dimetilsolfossido (DMSO; Sigma) al 20% e siero fetale di bovino al 10%. I criotubi sono stati poi inseriti in scatole Nalgene® (Thermo Scientific) garantendo così una diminuzione della temperatura di 1°C al minuto quando posti a -80°C, prima di essere congelati in azoto liquido.

I.1.2. Ricostruzione di un modello di emicornea

a. Preparazione dello stroma equivalente (SE)

La membrana amniotica

La MA è stata prelevata durante parti cesarei programmati dopo aver fornito alle pazienti informazioni riguardo la sicurezza e l'utilità del prelievo dell'amnios e quindi dopo aver recuperato il consenso. Ciascun prelievo è stato collocato, con l'epitelio rivolto verso l'alto, su una membrana di nitrocellulosa di circa 4 cm² e conservato a -80°C in flaconi sterili contenenti una soluzione di congelamento al 57% in glicerolo (Haemonatics). Solamente dopo aver ricevuto i risultati delle analisi virologiche, istologiche e di sterilità, sia della placenta che della MA, quest'ultima è stata ritenuta idonea per la preparazione dello SE.

I flaconi contenenti la MA sono stati scongelati a temperatura ambiente per 30 minuti e lavati con della soluzione fisiologica al fine di eliminare il glicerolo. Successivamente, per eliminare l'epitelio (disepitelizzazione), la MA è stata posta su una piastra petri circolare, ricoperta da 5 ml di una soluzione di tripsina/EDTA ed inserita in incubatore a 37°C per 20 minuti. Una verifica dell'avvenuta disepitelizzazione è stata effettuata su un frammento di MA fissato al 4% in formalina, incluso in paraffina. e tagliato con un microtomo a slitta in sezioni dello spessore di 5µm. Dopo una notte in incubatore a 42°C le sezioni sono state sparaffinate e colorate con ematossilina-floxin-safran (HPS). Una volta disepitelizzata, la MA è stata montata su un anello CellCrowntm (Sigma) specifico per una piastra da 12 pozzetti, come riportato in Fig. 10:

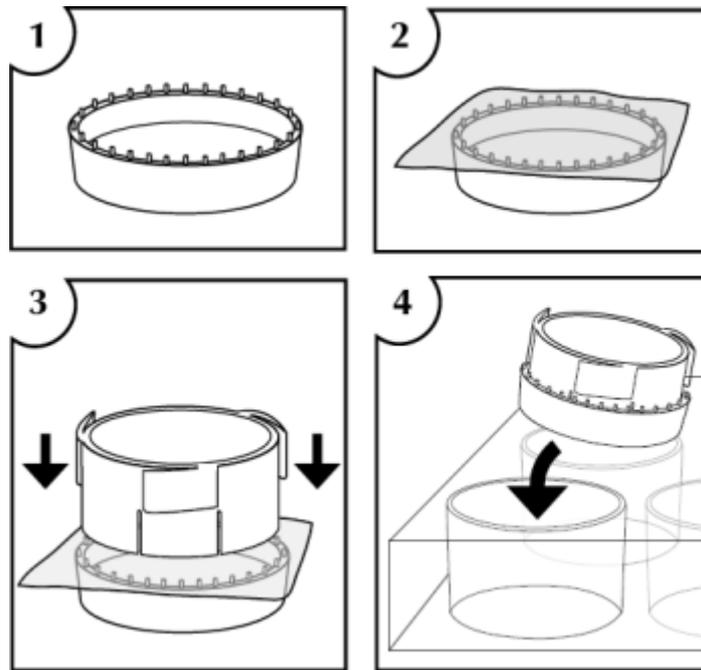


Fig. 10: Anello Cell Crown (1). La MA è posizionata sul corpo dell'anello (2) con la parte stromale rivolta verso l'alto. La seconda parte dell'inserto viene inserito sul corpo in maniera tale da fissare la MA al dispositivo e quindi formare il supporto di cultura (3) che verrà inserito nei pozzetti (4).

Coltura dei cheratociti su MA

I cheratociti provenienti dal passaggio 3 sono stati tripsinizzati e seminati sul lato stromale della MA alla densità di 2.0×10^4 cellule/cm² e fatti crescere in un terreno specifico per la coltura dello stroma equivalente (Tab. 5). Il primo cambio di terreno è stato effettuato due giorni dopo la seminazione dei cheratociti e successivamente, quotidianamente per 21 giorni.

Tabella 5: Terreno di crescita per lo SE.

Componenti	Concentrazione	Quantità per 500 ml
DMEM/GLUTAMMATO HAM-F12	-	450ml
bFGF	5ng/ml	50µl
FBS (HyClone™ FetalClone™ I Serum)	10%	50ml
PENICILLINA G	100UI/ml	250µl
STREPTOMICINA	100µg/ml	250µl
AMFOTERICINA B	1µg/ml	500µl
VITAMINA C (estemporanea) (Bayer; Berlin, Germany)	50µg/ml	250µl

b. Coltura delle cellule staminali limbiche sullo stroma equivalente (SE)

➤ Coltura emicornea in immersione

Le LSC sono state seminate al passaggio 3 sulla superficie dello SE (dal lato disepitelizzato) alla densità di 2.0×10^5 cellule/cm² e fatte crescere per 7 giorni in immersione (Fig. 11A) nel media per le cellule epiteliali (terreno Green) contenente anche acido ascorbico preparato estemporaneamente ed effettuando il cambio di terreno quotidianamente.

➤ Coltura emicornea all'interfaccia aria/liquido (A/L)

Dopo 7 giorni di coltura in immersione l'emicornea è stata elevata all'interfaccia A/L per favorire una buona differenziazione delle LSC (Fig. 11B-C). A questo scopo il supporto Cell Crown contenente il tessuto ricostruito è stato prelevato dai pozzetti e posizionato su una griglia in acciaio inossidabile sterile rivestita con carta da filtro sterile (Bio-rad). Il tutto è stato inserito in una Petri contenente terreno per la coltura all'interfaccia A/L (Tab. 6). L'emicornea è stata coltivata per 14 giorni con cambio di terreno tre volte alla settimana.

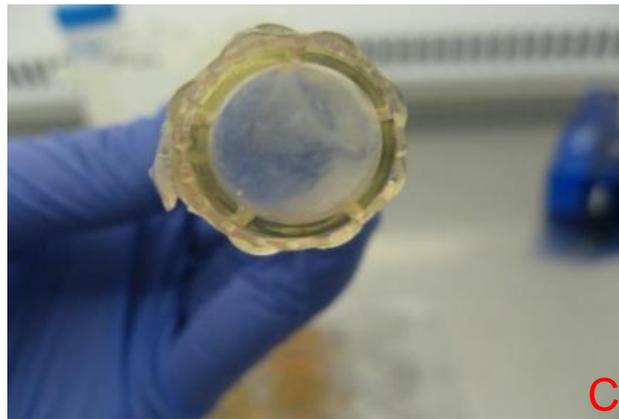
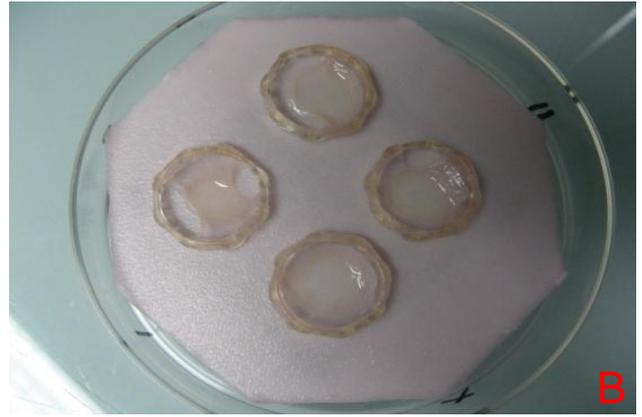
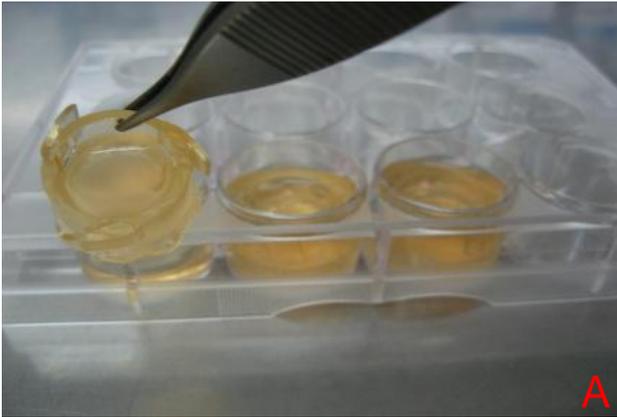


Fig. 11: **A.** Coltura dell'emicornea in immersione. **B.** Coltura dell'emicornea all'interfaccia A/L. **C.** Emicornea all'interno dell'anello Cell Crown.

Tabella 6: Terreno per la coltura all'interfaccia A/L.

Componenti	Concentrazione	Quantità per 500 ml
DMEM/ HAM-F12	-	330/150ml
ALBUMINA	200µg/ml	20ml
IDROCORTISONE	0.4µg/ml	1ml
INSULINA	0.12UI/ml	600µl
PENICILLINA G	100UI/ml	250µl
STREPTOMICINA	100µg/ml	250µl
AMFOTERICINA B	1µg/ml	500µl
Vitamina C (estemporaneo)	5µg/ml	250µl

c. Modelli utilizzati

➤ **Modello flip-flop**

Questo modello consiste nel seminare i cheratociti sul lato stromale della MA e le LSC sul lato disepitelizzato della MA. Dopo 21 giorni di coltura lo SE è stato tolto dall'inserito Cell Crown, capovolto e reinserito nel supporto di coltura. A questo punto sono state seminate le LSC.

➤ **Modello a contatto diretto**

Questo modello consiste nel seminare le LSC e i cheratociti dalla stessa parte della MA. Dopo 21 giorni di coltura dello SE, le LSC sono state seminate direttamente sullo SE senza dover ricorrere al suo capovolgimento.

I.1.3. Determinazione del potenziale clonogenico

La Cloning Forming Unit (CFU) corrisponde al numero di colonie che si formano dopo seminazione delle cellule epiteliali su feeder layer (da 250 a 500 cellule/25cm²) e coltivate per 12 giorni. Dopo 12 giorni di coltura le cellule sono state colorate con la Rodamina B (Sigma) in maniera da visualizzare le colonie e poter determinare il CFU. Gli olocloni, grandi colonie dal bordo regolare che garantiscono la presenza di LSC, e i paracloni sono stati contati.

I.1.4. Analisi istologica

Per l'analisi istologica i modelli di emicornea sono stati fissati in una soluzione al 4% di formalina. Dopo disidratazione i campioni sono stati inclusi in paraffina e tagliati con un microtomo a slitta in sezioni da 5µm di spessore. Dopo una notte in incubatore a 42°C le sezioni sono state sparaffinate e colorate con ematossilina-floxina-safran (HPS).

I.1.5. Osservazione e fotografia

I differenti stadi di colorazione sono stati automatizzati mediante l'uso di un Varistian 24-4 di SHANDON. Le sezioni sono state nuovamente disidratate e montate su vetrini. L'osservazione dei preparati è stata effettuata mediante il supporto di un microscopio Eclipse 50i (Nikon, Champigny sur Marne, France) e le sezioni sono state fotografate utilizzando una Nikon.

I.2. Analisi immunohistochimica

a. Sezioni paraffinate

Da ogni blocchetto paraffinato sono state ottenute, mediante l'utilizzo di un microtomo a slitta, sezioni seriate dello spessore di 5µm. Queste sono state raccolte su vetrini polarizzati e processate, dapprima per l'analisi istopatologica e, successivamente, per le indagini immunohistochimiche come segue:

- Sparaffinatura in xilene per 5 minuti (2 passaggi)
- Idratazione in scala decrescente degli alcoli:
 - Alcool assoluto per 5 minuti (2 passaggi)
 - Alcool 95° per 5 minuti (2 passaggi)
 - Alcool 80° per 3 minuti (2 passaggio)
 - Idratazione in acqua distillata per 5 minuti
- Lavaggio in PBS 0.1M, pH 7.4, per 5 minuti

Il protocollo classico, dopo l'idratazione, richiederebbe lo smascheramento antigenico dei siti di legame parzialmente "mascherati" dai ben noti legami crociati che la formalina al 4% provoca tra i siti attivi delle proteine e il fissativo stesso. In questo caso avendo utilizzato come fissativo una soluzione a base di zinco, esente da tale caratteristica, tale step non è stato necessario.

Le sezioni sono state trattate per la rivelazione immunohistochimica di ACE I usando il metodo dell'avidina-biotina coniugata con perossidasi ed utilizzando come cromogeno finale per la rivelazione la 3,3'-Diaminobenzidina (DAB).

Le sezioni sono state incubate dapprima in una soluzione di H₂O₂ al 30% e metanolo per 20 minuti per inattivare le perossidasi endogene fisiologicamente presenti nelle cellule e poi, successivamente incubate per 45 minuti in una soluzione al 4% di skim milk in PBS 0.1M per inattivare i siti aspecifici di legame ed evitare, quindi, la possibilità di segnali aspecifici. L'anticorpo primario utilizzato per la rivelazione è stato un monoclonale isolato da mouse (clone 2E2, Santa Cruz Biothecnology Inc, CA, 1:50). Il tempo di incubazione è stato di 60 minuti, in camera umida a temperatura ambiente. L'anticorpo secondario utilizzato è stato invece un anticorpo goat anti-mouse coniugato con perossidasi (Chemicon International, Billerica, MA, 1:200). Il tempo di incubazione è stato di 30 minuti, in camera umida a temperatura ambiente. Per la valutazione della reazione, come cromogeno finale è stata utilizzata la DAB. Le sezioni, da ultimo, sono state contro colorate in ematossilina di Mayer e successivamente montate in gel glicerolo. Entrambi gli anticorpi sono stati diluiti in PBS 0.1M prima del loro utilizzo e tra uno step e il successivo della reazione sono sempre stati effettuati 3 lavaggi da 5 minuti in PBS 0.1M. Tutte le reazioni sono state condotte in triplicato e in ogni esperimento sono sempre stati compresi un controllo normale, rappresentato da sezioni di congiuntiva normale, un controllo positivo per ACE I, rappresentato da sezioni di rene umano non patologico, ed infine un controllo negativo ottenuto per omissione dell'anticorpo primario o tramite controllo di isotipo.

b. Cellule in coltura

Per la rivelazione immunoistochimica di ACE I nelle cellule provenienti dagli espianti di pterigio e congiuntiva, queste sono state seminate in *chambre slide*tm system 8 wells (Lab Tek; Nunc Rochester, NY) in numero di 1.0×10^4 cellule/wells. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state fissate per 5 minuti in metanolo precedentemente mantenuto a -20°C per 24 ore. La scelta del metanolo come mezzo di fissazione ha permesso, grazie alle sue caratteristiche, di fissare e permeabilizzare le cellule in un unico passaggio, evitando, quindi, un ulteriore step. Analogamente alle sezioni paraffinate, le cellule sono state delicatamente processate per la rivelazione di ACE I. Anche in questo caso l'esperimento è stato condotto in triplicato. La valutazione della positività è stata ottenuta tramite conta manuale delle cellule positive, esaminando 10 campi random ad un ingrandimento di 400x e fissando il cutoff a 60% di cellule positive per campo.

Le cellule provenienti dagli espianti di pterigio e congiuntiva sono state inoltre esaminate per la rivelazione immunoistochimica di marcatori di cellule epiteliali (citocheratine), endoteliali e cellule di Langerhans. Gli anticorpi utilizzati per la rivelazione delle citocheratine sono stati l'anticorpo monoclonale isolato da topo citocheratina 19 (clone RCK 108, DAKO, Glostrup, Denmark) e l'anticorpo monoclonale isolato da topo anti-human citocheratina (clone AE1/AE3, Dako). Per valutare l'espressione di cellule endoteliali e cellule di Langerhans sono stati usati rispettivamente il fattore di von Willebrand (Dako) e il CD1 (CLONE O10, Dako). La valutazione della positività è stata ottenuta tramite conta manuale delle cellule

positive, esaminando 10 campi random ad un ingrandimento di 400x e fissando il cutoff a 95% di cellule positive per campo.

I.2.1. Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati elaborati attraverso l'analisi della varianza (test esatto di Fischer) e per mezzo del SPSS statistical software package, versione 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). I risultati di P così ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per valori ≤ 0.05 .

I.2.2. Osservazione e fotografia

I preparati sono stati osservati con fotomicroscopio Zeiss AxioPhot2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos, Germany). Le foto sono state scattate utilizzando una macchina fotografica digitale Canon, PowerShot A620, e immagazzinate su scheda digitale SD (Secure Digital) da 2 GB. L'elaborazione delle immagini è stata effettuata utilizzando Adobe Photoshop 14.0 e Microsoft PowerPoint 2007.

RISULTATI

I. Espressione di ACE I nello pterigio

I.1. Istologia dello pterigio

Istologicamente lo pterigio ha la stessa struttura della congiuntiva a cui possono aggiungersi piccole formazioni cistiche o ghiandolari. L'epitelio presenta un'alternanza di zone più assottigliate relative ad un'atrofia con zone più ispessite proliferative, creando un caratteristico aspetto festonato, in cui, comunque, le cellule mantengono inalterata la loro morfologia senza mostrare alcuna atipia. Come nella congiuntiva normale, anche nello pterigio sono presenti le cellule calciformi mucipare liberamente distribuite nell'epitelio (Fig. 12A-B).

I.2. Caratterizzazione fenotipica cellulare

Le analisi immunoistochimiche dimostrano come le popolazioni cellulari ottenute per coltura degli espianti di pterigio e congiuntiva risultano composte da cellule epiteliali, in quanto esprimono la citocheratina 19 e la citocheratina. Inoltre il fattore di von Willebrand ed il CD1 non risultano espressi suggerendo, quindi, che le popolazioni di cellule ottenute non sono contaminate da cellule endoteliali e da cellule di Langerhans.

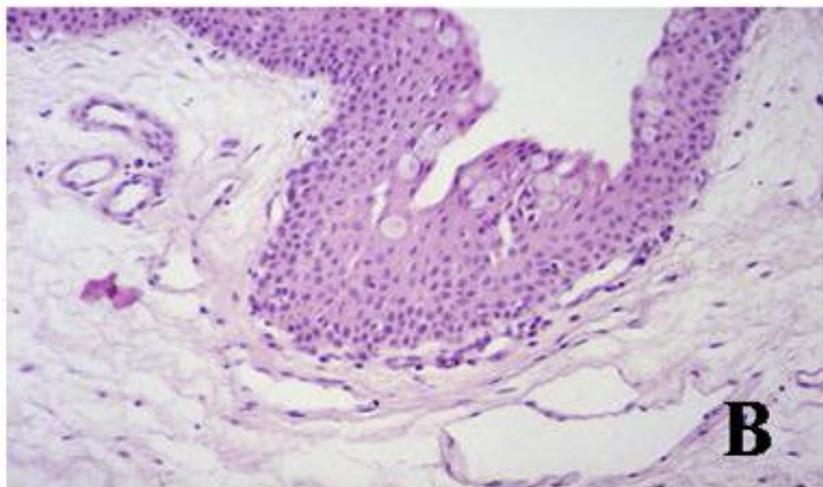
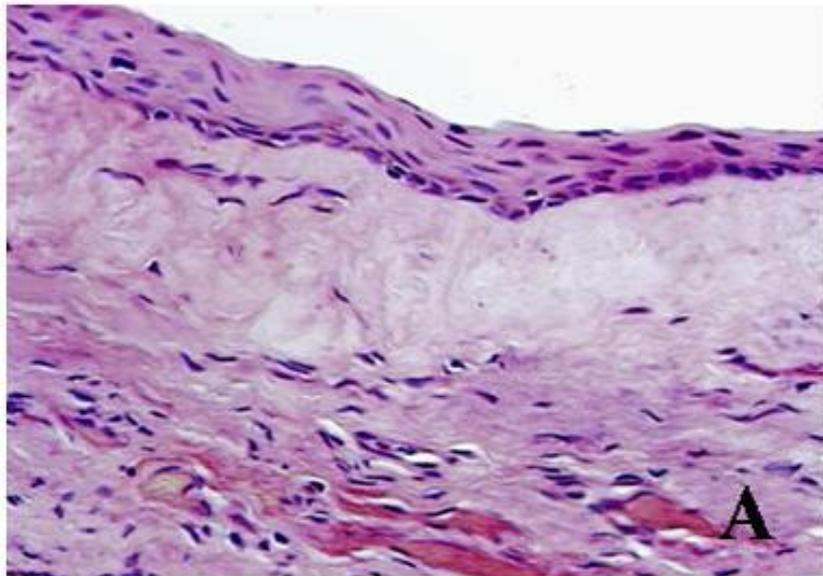


Fig. 12: A-B. Pterigio. Istologicamente lo pterigio ha la stessa struttura della congiuntiva. Nello stroma è visibile un incremento della vascolarizzazione dovuto ad un'intensa angiogenesi. È visibile la degenerazione delle fibre elastiche del connettivo sottoepiteliale. Ematossilina-Eosina. **A:** 400x. **B:** 200x.

I.3. Immunolocalizzazione ed espressione di ACE I

a. Sezioni paraffinate

L'espressione di ACE I è stata osservata in tutti i campioni di pterigio e congiuntiva esaminati (Fig. 13).

Nella congiuntiva è stata osservata una immunoreattività da moderata a forte principalmente nelle cellule epiteliali basali (Fig. 13A). Occasionalmente è stata osservata una moderata immunoreattività nucleare. Inoltre, debole localizzazione di ACE è stata identificata in alcuni vasi sanguigni; tuttavia nessuna positività è stata riscontrata nelle cellule dello stroma.

Nello pterigio, l'immunoreattività è stata localizzata principalmente nei nuclei di tutti gli strati cellulari epiteliali (Fig. 13B-D). Tuttavia qualche cellula ha mostrato immunoreattività sia nucleare che citoplasmatica (Fig. 13B). Tale immunopositività è apparsa da forte a molto forte a livello dei nuclei, da lieve a moderata a livello citoplasmatico. Inoltre, nello stroma, cellule con morfologia di tipo fibroblastico ("fibroblast-like cells") hanno presentato immunoreattività per ACE (Fig. 13B-C, frecce). Una moderata positività è stata rilevata nei vasi del tessuto connettivo sottoepiteliale.

Nel controllo negativo, effettuato sia su congiuntiva che su pterigio, non è stata osservata nessuna positività (Fig. 13E-F). Il controllo positivo, ottenuto utilizzando sezioni di rene normale, ha mostrato una forte immunoreattività per ACE nel citoplasma e nella membrana delle cellule dei tubuli prossimali (Fig. 13G-H).

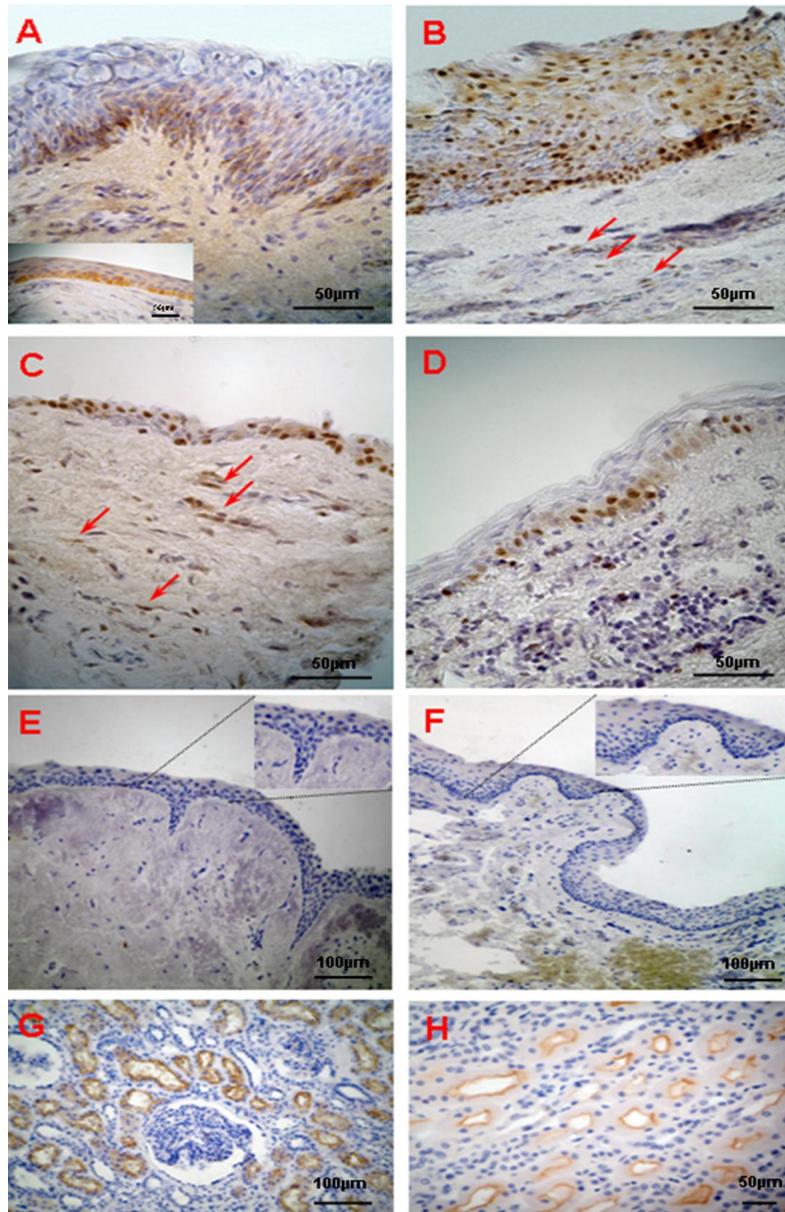


Fig. 13: Immunolocalizzazione ed espressione di ACE in congiuntiva (A) e pterigio (B-C-D). A. Elevata immunopositività citoplasmatica nelle cellule degli strati basali dell'epitelio congiuntivale. B-C. Immunolocalizzazione nucleare di ACE in tutti gli strati epiteliali dello pterigio ed immunopositività dei “fibroblast-like cells” (frece). D. Immunoreattività nucleare localizzata esclusivamente nelle cellule epiteliali degli strati basali dello pterigio. E-F. I controlli negativi di congiuntiva normale e di pterigio non mostrano alcuna immunoreattività. G-H. Il controllo positivo di rene mostra immunoreattività per ACE. A-D. 400x. E-G. 200x. H. 630x.

b. Cellule in coltura

I risultati ottenuti hanno evidenziato una positività da moderata a forte nel citoplasma e una debole positività nei nuclei delle cellule epiteliali della congiuntiva (Fig. 14A). È stato interessante notare come nelle cellule epiteliali dello pterigio, l'immunoreattività era debole nel citoplasma e quasi assente nei nuclei (Fig. 14B). Il controllo negativo di congiuntiva o pterigio, ottenuto omettendo l'anticorpo primario, non ha mostrato alcuna positività (Fig. 14C-D).

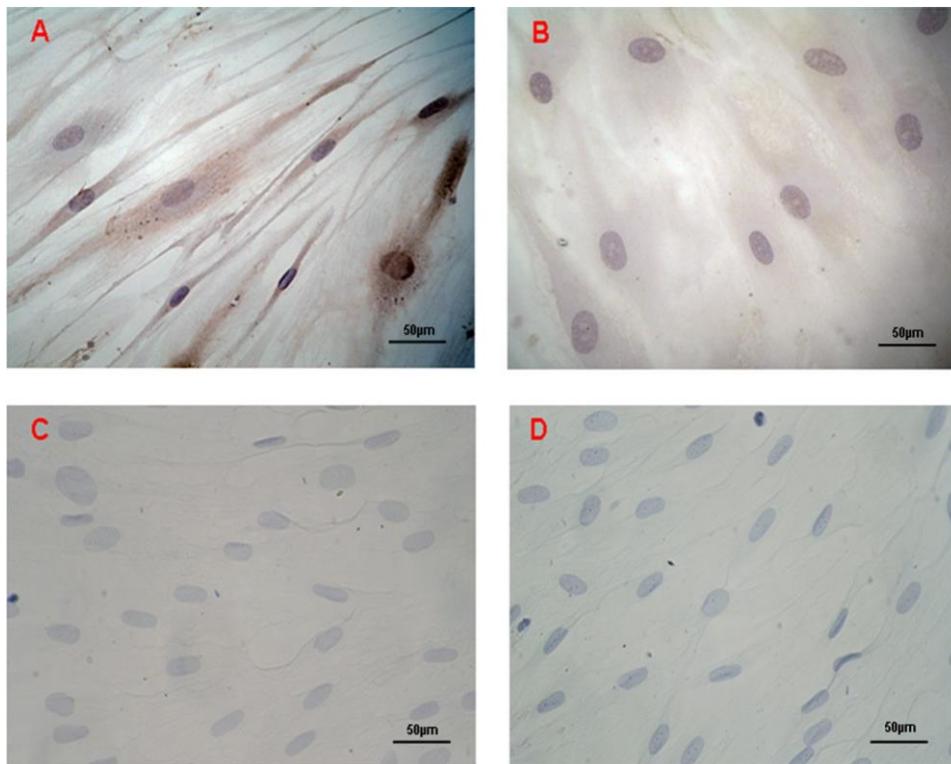


Fig. 14: Espressione di ACE nelle cellule di coltura cellulare. Si osserva una immunopositività per ACE sia nella congiuntiva (**A**) che nello pterigio (**B**). Le cellule in **A** presentano una forte e specifica positività citoplasmatica. In **B** le cellule epiteliali di pterigio mostrano una debole immunocolorazione. Nessuna immunoreattività è stata osservata nei controlli negativi sia di congiuntiva (**C**) che di pterigio (**D**). 400x.

I.4. Analisi statistica

L'analisi statistica non ha mostrato alcuna correlazione significativa tra l'espressione di ACE e le variabili clinico-patologiche quali, localizzazione nasale o temporale della lesione, pterigi primari o ricorrenti, e caratteristiche cliniche come l'età e il sesso ($P \geq 0.05$). Inoltre non è stata trovata alcuna correlazione tra localizzazione nasale o temporale e caratteristiche cliniche come l'età e il sesso; allo stesso modo non è stata osservata alcuna associazione tra pterigio primario e ricorrente e le suddette caratteristiche cliniche ($P \geq 0.05$).

II. Ricostruzione di un modello di emicornea a partire da banche di LSC e cheratociti

II.1. Validazione delle banche di cheratociti e LSC

Essendo la disponibilità di banche cellulari uno dei prerequisiti dell'ingegneria tissutale, è stato necessario validare le banche di LSC e cheratociti prima di procedere alla ricostruzione di un modello di emicornea. A questo scopo, la validazione delle banche cellulari è stata condotta tenendo conto dei risultati ottenuti alle estrazioni, alle amplificazioni e ai congelamenti. Le banche di LSC e cheratociti sono state ritenute conformi solo con risultati ottenuti rispondenti alle esigenze riportate nella seguente tabella 7:

Tabella 7: Valori conformi che permettono di validare le banche di cheratociti e LSC.

TAPPE PER LA CREAZIONE DI BANCHE CELLULARI		CHERATOCITI	LSC
ESTRAZIONE	Numero di cellule estratte/cornea	$\geq 3.0 \times 10^5$	$\geq 1.0 \times 10^4$
	Vitalità cellulare (%)	90%	90%
AMPLIFICAZIONE	Tasso di Crescita (TC)	$> 0.5 P2$	-
	Efficienza di formazione colonie (CFE)	-	$> 1\% P0-P1$
CONGELAMENTO	Numero di cellule congelate/ampolla	$\geq 1.0 \times 10^6 P2$	$\geq 1.0 \times 10^6 P1$

a. Validazione delle banche di cheratociti

I cheratociti mostrano un basso TC nei primi passaggi, probabilmente dovuto al tempo che le cellule impiegano ad adattarsi, il quale invece tende ad aumentare dal passaggio 1, raggiungendo una media di $0,8 \pm 0,2$ al passaggio 3. Inoltre tutte le popolazioni di cheratociti hanno mostrato un $TC \geq 0,5\%$ al passaggio 2 (Tab. 8).

Tabella 8: Calcolo del tasso di crescita (TC).

N° cornea		Estrazione/P0	P1	P2	P3	PD totale
1	Numero di cellule seminate (E)	3.8×10^5	7.9×10^5	1.5×10^6	2.2×10^6	9
	Numero di cellule ottenute (T)	7.9×10^5	3.3×10^6	1.0×10^7	3.0×10^7	
	Numero di giorni in coltura	5	4	3	4	
	T/E	2	4.1	6.9	13.5	
	PD (Raddoppio della popolazione)	1	2	2.8	4.8	
	TC	0.2	0.5	0.9	0.9	
2/3	N°cellule seminate (E) Vitalità: 92%	9.8×10^5	1.5×10^6	1.5×10^6	2.2×10^6	12
	N°cellule ottenute (T) Vitalità: 90%	2.8×10^6	6.8×10^6 Vitalità: 99%	1.0×10^7 Vitalità: 85%	1.1×10^7 Vitalità: 90%	
	N° giorni di coltura	5	4	5	3	
	T/E	2.8	4.5	7.1	5.3	
	PD (Raddoppio della popolazione)	1.5	2.2	2.8	2.4	
	TC	0.3	0.5	0.6	0.8	
	Media TC/passaggio	0.25	0.5	0.75	0.85	

Banche di cheratociti sono state create a partire da due donatori differenti di cornea (Tab. 9). È stato possibile ottenere più di 1.0×10^6 cellule al passaggio 1. Essendo le banche di cheratociti create conformi alle esigenze descritte in tabella 7, queste sono state validate. In Fig. 15 si può osservare la caratteristica morfologia dendritica dei cheratociti.

Tabella 9: Banche di cheratociti.

N° cornea	N° Passaggio	N° cellule congelate
1	P0	-
	P1	1.1×10^6
	P2	7.0×10^6
	P3	2.7×10^7
2/3	P0	1.0×10^6
	P1	9.0×10^6
	P2	4.0×10^6
	P3	1.1×10^7



Fig. 15: Caratteristico aspetto dendritico dei cheratociti. 100x.

b. Validazione delle banche di LSC

A causa delle piccole dimensioni della biopsia di limbo prelevata, la quantità di cellule che si è riusciti ad ottenere all'estrazione è stata bassa, non essendo superiore a 59.4×10^3 cellule (Tab. 10). Tuttavia, il numero totale di cellule staminali che è stato ottenuto alle estrazioni è in tutti i casi $>10.0 \times 10^3$, come riportato in tabella 7, e la vitalità cellulare sempre $>90\%$. Le cellule sono dunque risultate conformi.

Tabella 10: Risultati delle estrazioni delle LSC.

N° cornea	Taglio del prelievo	Importanza delle Palizzate di Vogt	Cellule all'estrazione	Cellule fine P0	Cellule fine P1
1	3 mm ²	3	1.2×10^4 Vitalità: 91%	6.6×10^5	4.8×10^6
2	3 mm ²	1	1.3×10^4 Vitalità: 92%	8.6×10^5	6.8×10^6
3	4 mm ²	2	5.9×10^4 Vitalità: 90%	1.5×10^6	2.1×10^7

Importanza delle Palizzate di Vogt :

1= Palizzate poco visibili

2= Palizzate mediamente visibili

3= Palizzate molto visibili

Tutte le cellule epiteliali limbiche estratte hanno permesso di creare delle banche di LSC, con almeno 1.0×10^6 di cellule al P1 ed un massimo di 2.1×10^7 (Tab. 11).

Tabella 11: Banche di LSC.

N° cornea	N° Passaggi	N° di cellule congelate
1	P0	-
	P1	4.8×10^6
2	P0	-
	P1	6.8×10^6
3	P0	-
	P1	2.1×10^7

Per quanto riguarda la morfologia delle cellule epiteliali limbiche allo stadio di pre-confluenza al P0 e al P1, queste presentano un aspetto pavimentoso caratteristico delle cellule epiteliali (Fig. 16). Ancora, si può osservare che lo stadio di pre-confluenza è più lungo al P0 rispetto al P1, in quanto le cellule appena estratte comprendono cellule a tutti gli stadi di differenziazione e poche sono le cellule proliferative.

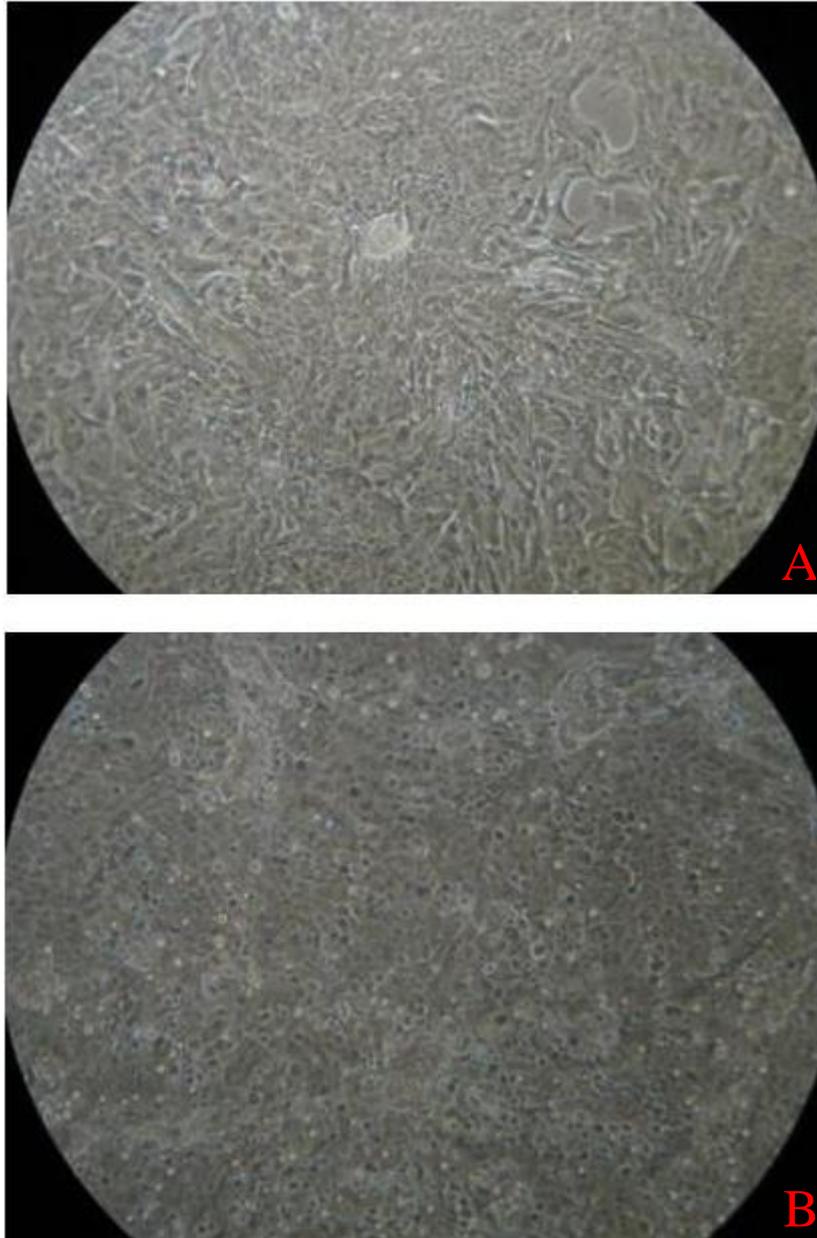


Fig. 16: Aspetto morfologico delle cellule LSC seminate su feeder layer di fibroblasti irradiati. **A:** Pre-confluenza/P0 al giorno 6. **B.** Pre-confluenza/P1 al giorno 4. 100x.

c. Potenziale clonogenico delle cellule epiteliali limbiche

Il potenziale clonogenico delle cellule epiteliali limbiche al P0 e P1 è stato determinato (Fig. 17). Tutte le cellule presentano una Colony Forming Efficiency (CFE) >1% (Tab. 12), dunque sono conformi ai criteri di validazione riportati in tabella 7. Inoltre, le cellule provenienti rispettivamente dalle cornee numero 1 e 2 hanno dato i risultati migliori per quanto riguarda il CFE (5% e 2,87% rispettivamente).

Tabella 12: Potenziale clonogenico delle LSC.

N°cornea/ Passaggio		Fiasca 1	Fiasca 2	Fiasca 3	CFU medio	CFE medio (%)
1/P1	CFU	3	13	12	9.83	1.87
2/P0	CFU	26	23	26	25	5
3/P0	CFU	11	17	15	14.3	2.87



Fig. 17: CFU delle cellule epiteliali dopo colorazione con Rodamina B. **A:** CFU della cornea n°1. **B.** CFU della cornea n°2. **C.** CFU della cornea n°3.

II.2. Controllo di disepitelizzazione della membrana amniotica

I risultati ottenuti mostrano la validazione della metodica di disepitelizzazione della MA, messa a punto nel Laboratorio dei Sostituti Cutanei di Lione. Nella sezione istologica (Fig. 18A-B) è stato osservato che, in seguito al trattamento enzimatico subito, la MA è stata privata dell'epitelio rispetto al controllo. Su 6 MA trattate, sono state ottenute 6 MA completamente disepitelizzate. Dunque, la metodica di disepitelizzazione della MA è stata validata.

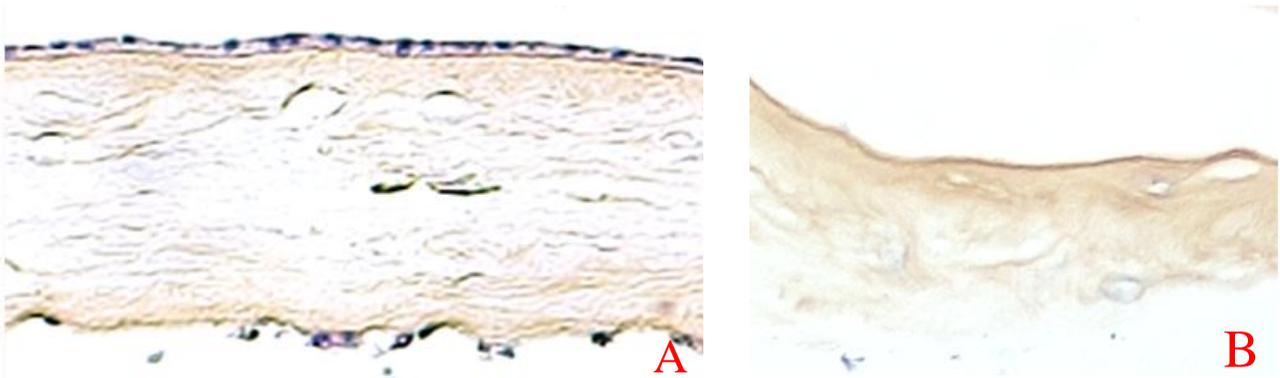


Fig. 18: Controllo dell'avvenuta disepitelizzazione della MA. **A.** MA con epitelio **B.** MA senza epitelio.

II.3. Analisi istologica dei modelli di emicornea

I modelli di emicornea ricostruita presentano un epitelio costituito da almeno 5 strati di cellule organizzate in maniera tale da formare un epitelio pluristratificato e differenziato. Si può notare che l'epitelio ottenuto secondo il modello flip-flop (Fig. 19A) è più omogeneo e coesivo rispetto al modello a contatto diretto (Fig. 19B). Tuttavia, dopo 4 settimane di coltura all'interfaccia A/L, il modello a contatto diretto permette ancora il rinnovamento dell'epitelio che rimane stratificato presentando curiosamente un strato simile allo strato corneo dell'epidermide (Fig. 19D). Al contrario, dopo 4 settimane di coltura all'interfaccia A/L, nel modello flip-flop l'epitelio è completamente differenziato, senza cellule viventi (Fig. 19C). Inoltre nel modello flip-flop l'epitelio corneale possiede uno spessore che si avvicina a quello della cornea umana normale (50 μ m) e le cellule dello strato basale mostrano un caratteristico aspetto cuboidale (Fig. 20A-B) Infine, nel modello a contatto diretto lo stroma è risultato più spesso rispetto a quello ottenuto con il modello flip-flop (Fig. 20C-D).

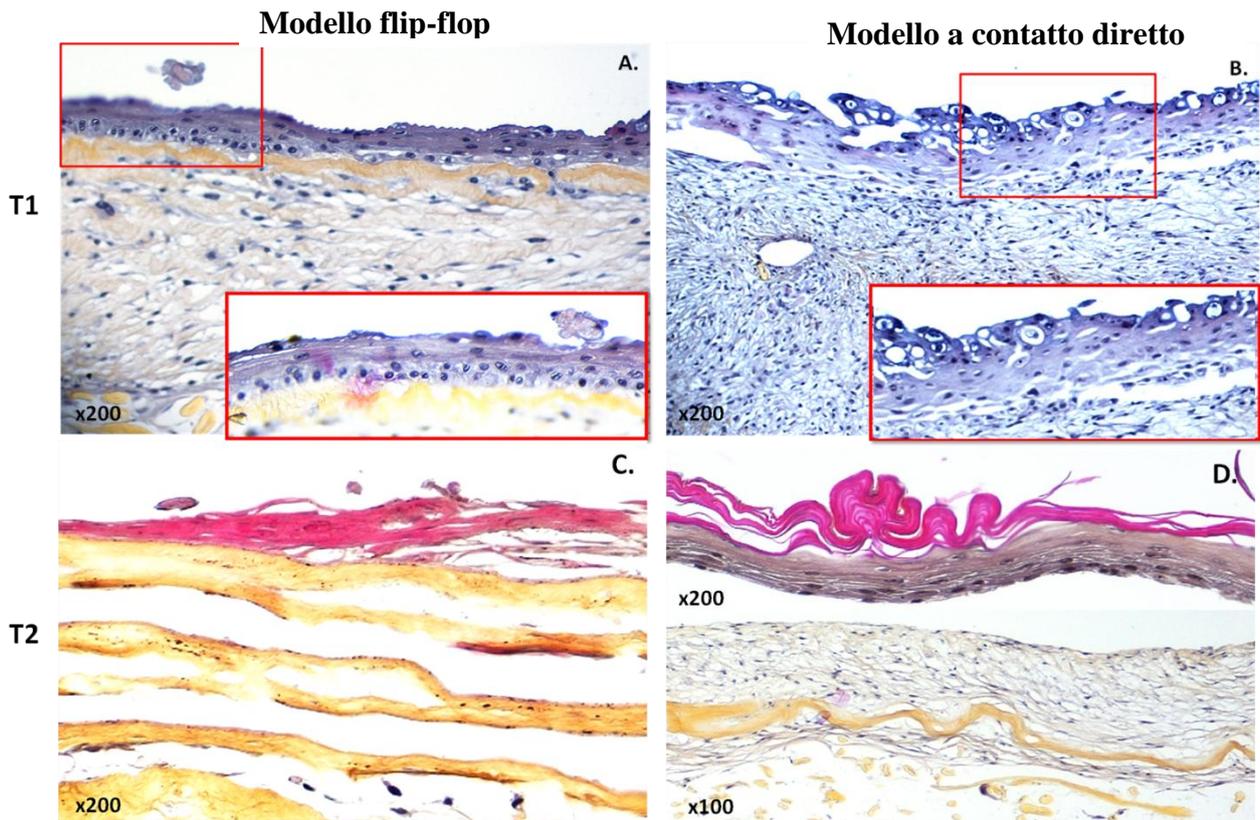


Fig. 19: Risultati delle emicorne ottenute a partire dalle LSC secondo il modello flip-flop (A-C) e il modello a contatto diretto (B-D) coltivate per 7 giorni in immersione (T1) e successivamente per 14 giorni all'interfaccia A/L (T2).

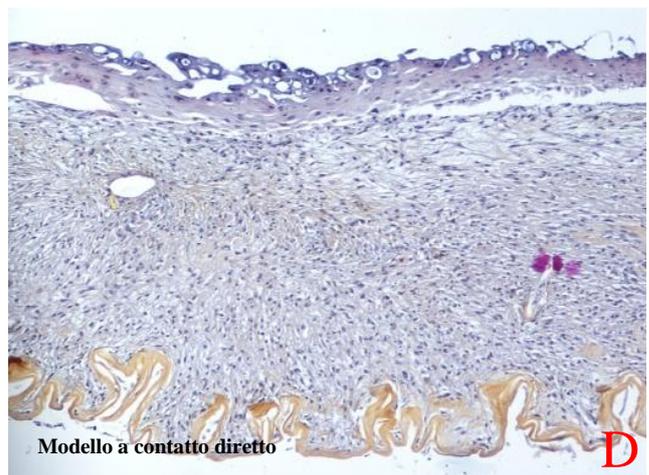
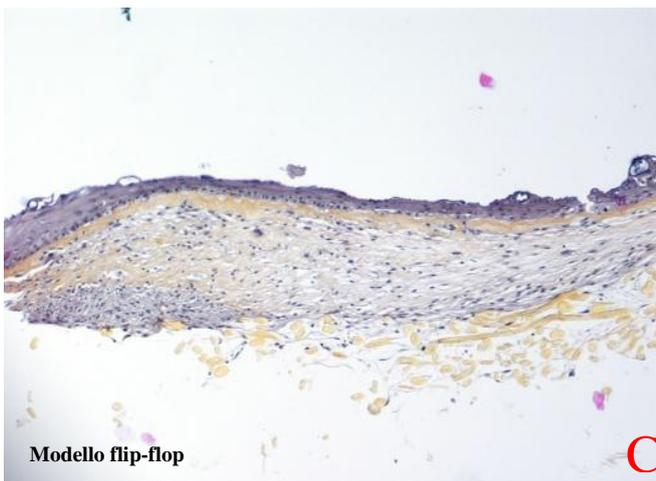
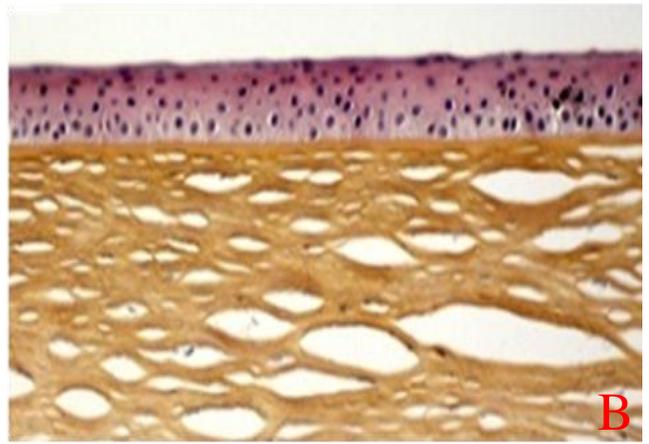
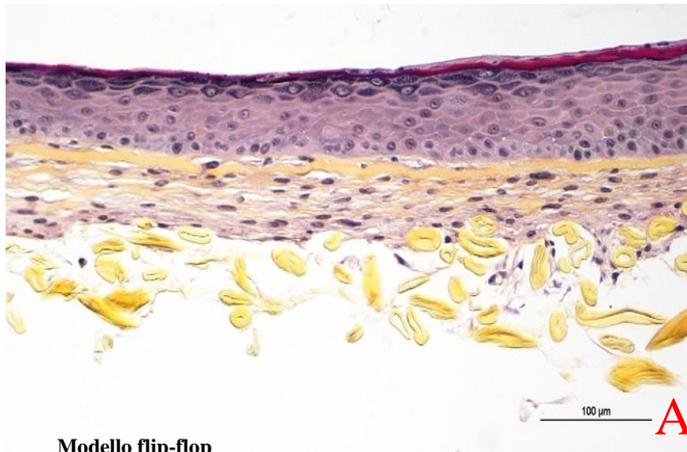


Fig. 20: Analisi istologica delle emicornee ricostruite a partire dalle LSC. **A** e **C**. Modelli di emicornee ricostruite secondo il modello flip-flop. **B**. Cornea umana normale. **D**. Modello di emicornea secondo il modello a contatto diretto. 100x.

DISCUSSIONE

L'enzima ACE I, uno dei fondamentali componenti del sistema RAS, oltre all'importante funzione di regolazione della pressione, è altresì coinvolto nel promuovere vasocostrizione, infiammazione, trombosi e rimodellamento vascolare. Recentemente il ruolo del sistema RAS, ed in particolare dell'ACE, è stato notevolmente ampliato. Infatti, ACE I non è visto unicamente come l'enzima di conversione dell'ANG I in ANG II, ma sembra essere in grado anche di innescare cambiamenti nell'espressione genica [98]. Infatti in epatociti di ratto è stata dimostrata una immunoreattività per ANG II a livello nucleare, suggerendone quindi un ruolo nella regolazione della trascrizione genica [99]. Inoltre, esperimenti di stimolazione della trascrizione genica, effettuati in cellule della muscolatura liscia vascolare e in cellule endoteliali, hanno suggerito un meccanismo "alternativo" di ANG II mediato da ACE. È stato osservato infatti che ANG II è in grado di stimolare l'espressione dell' mRNA per il fattore di permeabilità vascolare (VPF o VEGF), influenzando direttamente la permeabilità, la crescita, la funzione dell'endotelio vascolare e quindi svolgendo un'azione indipendente dalla sua nota funzione emodinamica [100].

I risultati del presente studio hanno dimostrato l'immunolocalizzazione e l'espressione dell'enzima ACE I in campioni di congiuntiva normale e di pterigio. In particolare la localizzazione di ACE I è risultata predominante nei nuclei delle cellule epiteliali dello pterigio. Questa evidenza potrebbe suggerire un tentativo del sistema RAS, ed in particolare dell'ACE, di promuovere un percorso antiinfiammatorio attraverso un'azione di regolazione trascrizionale dell'ACE

esogeno, che spiegherebbe la sua abbondante localizzazione nucleare [52]. Differentemente da quanto si è osservato nello pterigio, nelle cellule epiteliali di congiuntiva normale, la predominante espressione di ACE si osserva a livello citoplasmatico. Questa osservazione potrebbe essere interpretata come un meccanismo di non attivazione trascrizionale mediato dall'ACE nel tessuto normale. Per quanto riguarda l'espressione di ACE nello stroma, unicamente nello pterigio alcune cellule riconducibili per morfologia a fibroblasti ("fibroblast-like cells") sembrano essere immunopositive. A questo proposito è importante tenere presente che accanto ad un sistema RAS circolante, esiste anche un sistema RAS locale tessuto-specifico. Elevati livelli di ACE sono stati ritrovati in fibroblasti corneali di coniglio [62] ma anche nei miofibroblasti di cuore di ratto [101]. È ben noto che alti livelli di ACE possono promuovere elevate quantità di ANG II, la quale può modulare l'espressione di fibronectina, collagene ed altre proteine della ECM [102]. Dunque, tenendo conto dei risultati ottenuti in questo studio, è probabile che un sistema RAS locale sia presente nello pterigio; la presenza di ACE nei fibroblasti, quindi, potrebbe essere il risultato di un'attivazione del sistema RAS tessuto-specifico durante i processi di fibrosi e di guarigione delle ferite fortemente attivi nel quadro istopatologico dello pterigio. Tuttavia, ulteriori studi saranno necessari per chiarire il significato dell'espressione di ACE nei fibroblasti. Inoltre, è stato possibile osservare una forte immunoreattività nel citoplasma delle cellule provenienti dalla coltura della congiuntiva normale. Per contro, rare cellule hanno mostrato positività nucleare; come riportato da Lucero e collaboratori [52] questo potrebbe suggerire che il livello nucleare di ACE, relativo ad uno stato fisiologico della cellula, quale quello

della congiuntiva normale può andare incontro ad un turnover dinamico o che la localizzazione nucleare di ACE è un evento caratteristico solo di determinate fasi del ciclo cellulare. Per quanto riguarda la differente espressione di ACE osservata tra le sezioni istologiche ed i modelli di coltura di pterigio, è scientificamente accertato che un modello in vitro è un sistema chiuso in un ambiente controllato, al di fuori di un organismo vivente. Dunque, in un modello di tessuto in coltura possono esistere delle differenze, in termini di espressione o di segnalazione cellulare, rispetto al tessuto che si trova all'interno di un organismo.

Questo studio ha mostrato l'immunolocalizzazione nucleare dell'enzima ACE nelle cellule epiteliali e nelle cellule "fibroblast-like" di pterigio. Il differente pattern di espressione osservato tra pterigio e congiuntiva normale, nelle sezioni istologiche, sottolinea il ruolo di ACE come trasduttore di segnale per l'attivazione di meccanismi anti-infiammatori e anti-proliferativi, che rappresenterebbero un ruolo "alternativo" mediato da ANG II. L'immunolocalizzazione nelle cellule "fibroblast-like cells" di pterigio potrebbe significare un diretto coinvolgimento di un sistema RAS locale. Infine, ipotizziamo che l'Ang II, generata per azione dell'ACE, potrebbe avere un ruolo chiave nello sviluppo dello pterigio. Le recenti scoperte circa i molteplici ruoli "alternativi" di ACE, oltre al suo classico e ben noto ruolo di azione enzimatica, sono molto interessanti e potranno essere approfondite in futuro.

Per quanto riguarda l'elaborazione di un modello di emicornea, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato focalizzato sui seguenti punti:

- definire la dimensione del prelievo di limbo in grado di fornire una quantità elevata di LSC all'estrazione.
- ottimizzare il metodo di estrazione delle LSC, in maniera tale da poter creare delle banche di cellule epiteliali per realizzare un modello di emicornea riproducibile e quindi utilizzabile per le applicazioni farmaco-tossicologiche e/o cliniche.
- ottimizzare la metodica di disepitelizzazione della MA utilizzata come supporto di coltura cellulare.

È stato possibile utilizzare tutte le LSC e i cheratociti estratti da tre cornee provenienti da due donatori differenti. Infatti tutte le cellule ottenute hanno permesso di creare delle banche cellulari avendo mostrato un CFE >1% al P0. Le analisi istologiche dei modelli di emicornea ottenuti hanno permesso di dimostrare che la MA sembra essere un buon supporto di coltura cellulare; è stato infatti osservato uno stroma abbastanza sviluppato e una stratificazione degli epiteli ottenuti. Ad oggi, non è disponibile nessun modello di stroma equivalente su MA. Infatti, in letteratura la MA è stata utilizzata solamente per la coltura di un epitelio semplice destinato per le applicazioni cliniche [103]. Dunque, per la prima volta, presso la banca delle cornee dell'ospedale Edouard Herriot di Lione, la MA è stata usata per la creazione di un modello più complesso (epitelio+stroma) associato a due tipi cellulari: le LSC e i cheratociti. Tuttavia, durante la coltura del modello di emicornea secondo il modello flip-flop, sono emerse diverse criticità fra cui la manipolazione della MA con i

relativi rischi di contaminazione, e soprattutto la retrazione della MA durante il suo capovolgimento, che si è visto determinare la morte delle cellule epiteliali. Per queste motivazioni, si è pensato di realizzare il modello a contatto diretto, seminando direttamente le LSC sullo SE, senza quindi dover ricorrere ad un capovolgimento della MA. Con il modello flip-flop, in cui la MA riproduce la membrana di Bowman, è stato osservato un epitelio più organizzato e meglio ancorato allo stroma ma con tendenza a perdere rapidamente la capacità di rinnovamento. Al contrario, con il modello a contatto diretto, l'epitelio ottenuto non era ancora completamente differenziato; presentava, tuttavia, uno strato superficiale simile allo strato corneo dell'epidermide, probabilmente dovuto all'assenza, nei modelli ricostruiti, delle lacrime. Infatti, quest'ultime, in condizioni fisiologiche, grazie al movimento delle palpebre permettono l'eliminazione delle cellule morte. Entrambi i modelli utilizzati, hanno permesso di ottenere uno stroma sviluppato che, tuttavia, è risultato più spesso nel modello a contatto diretto, presumibilmente per le interazioni tra le cellule epiteliali e i cheratociti necessarie per la proliferazione cellulare dei cheratociti.

I risultati ottenuti sono ancora troppo preliminari per decidere quale, tra il modello flip-flop e quello a contatto diretto, sia più opportuno utilizzare per la realizzazione di un modello di emicornea rassomigliante alla cornea umana. Un obiettivo futuro sarà quello di effettuare un'analisi al microscopio elettronico a trasmissione e un'analisi immunostochimica su ciascun modello, per valutare l'organizzazione strutturale dello stroma e per ottenere informazioni circa il fenotipo delle cellule epiteliali e stromali. Al momento i modelli di emicornea sviluppati in laboratorio, non essendo riproducibili per la mancanza di grandi quantità di LSC e non

presentando le caratteristiche ultrastrutturali della cornea umana, non possono ancora essere utilizzati per le applicazione farmaco-tossicologiche e/o clinico terapeutiche. Le prospettive future, infatti, saranno anche tese a trovare fonti cellulari alternative all'uso delle LSC.

BIBLIOGRAFIA

1. **Thoft RA, Friend J.** Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977; 16: 14-20.
2. **Chen WY, Mui MM, Kao WW, Liu CY, Tseng SCG.** Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K12 keratin is restricted to corneal epithelium. *Curr Eye Res.* 1994; 13: 765–778.
3. **Scuderi G.** La cornea. Elsevier.
4. **Anastasi G. et al.,** Trattato di Anatomia Umana, volume III, Milano, Edi.Ermes. 2007.
5. **Xu ZZ, Li ZJ, Du LX, Li J, Wang LY.** Using bovine pituitary extract to increase proliferation of keratocytes and maintain their phenotype in vitro. *Int J Ophthalmol.* 2013; 6: 758-765.
6. **Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC.** Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.* 2007; 17: 26-36.
7. **Schofield R.** The stem cell system. *Biomed Pharmacother.* 1983; 37: 375-380.
8. **Potten CS, Loeffler M.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 1990; 110: 1001-1020.
9. **Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M.** Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol.* 1999; 145: 769-782.
10. **Ahmad S.** Limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1: 110-115.
11. **Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC.** Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.* 2007; 17: 26-36.

12. **Barrandon Y, Green H.** Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 5390-5394.
- 13 **Barrandon Y, Green H.** Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 2302-2306.
14. **Saghizadeh M, Soleymani S, Harounian A, Bhakta B, Troyanovsky SM, Brunken WJ, Pellegrini G, Ljubimov AV.** Alterations of epithelial stem cell marker patterns in human diabetic corneas and effects of c-met gene therapy. *Mol Vis.* 2011; 17: 2177-2190.
15. **Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M.** Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet.* 1997; 349: 990-993.
16. **Builles N, Bechetoille N, Justin V, André V, Barbaro V, Di Iorio E, Auxenfans C, Hulmes DJ, Damour O.** Development of a hemicornea from human primary cell cultures for pharmacotoxicology testing. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23: 279-292.
17. **Bucci MG.** Oftalmologia, SEU. 2001.
18. **Pellegrini G, Rama P, De Luca M.** Vision from the right stem. *Trends Mol Med.* 2010; 17: 1-7.
19. **Qi H, Zheng X, Yuan X, Pflugfelder SC, Li DQ.** Potential localization of putative stem/progenitor cells in human bulbar conjunctival epithelium. *J Cell Physiol.* 2010; 225: 180-185.
20. **Lambiase A, Micera A, Pellegrini G, Merlo D, Rama P, De Luca M, Bonini S.** In vitro evidence of nerve growth factor effects on human conjunctival epithelial cell differentiation and mucingene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50: 4622-4630.
21. **Azzolini C., Carta F., Marchini G., Menchini U.** Clinica dell'aparato visivo. Elsevier. 2010.

22. **Klagsbrun M, Moses MA.** Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 1999; 6: 217-224.
23. **Risau W, Flamme I.** Mechanisms of Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91.
24. **Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386: 671-674.
25. **Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG.** Nonclassic endogenous regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2007; 59: 185-205.
26. **Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, Lawler J, Detmar M.** Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1999; 155: 441-452.
27. **Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Højrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV.** Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 2811-2816.
28. **Gendron G, Simard B, Gobeil F, Sirois P, D'Orleans-Juste P, Regoli D.** Human urotensin-II enhance extravasation in specific vascular districts in Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004; 82: 16-21.
29. **Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dilleay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A.** Regulation of tumor angiogenesis by p-53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 Alpha. *Genes Dev.* 2000; 14: 34-44.
30. **Schlessinger J, Lax I, Lemmon M.** Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell.* 1995;83(3):357-360.
31. **Liekens S, De Clercq E, Neyts J.** Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61: 253-270.

32. **Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L.** VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nature Rev.* 2006; 7: 359-371.
33. **Zachary I.** VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 1171-1177.
34. **Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1029-1039.
35. **Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M.** Stimulatory interactions between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension.* 1998; 32: 89-95.
36. **Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER.** Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem.* 1997; 272: 17097-17103.
37. **Kusaka Y, Kelly RA, Williams GH, Kifor I.** Coronary microvascular endothelial cells cosecrete angiotensin II and endothelin-1 via a regulated pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: 1087-1096.
38. **Cai H, Griendling KK, Harrison DG.** The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 471-478.
39. **Wilkinson-Berka JL, Rana I, Armani R, Agrotis A.** Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clin Sci (Lond).* 2013; 124: 597-615.
40. **Bouïs D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GA.** A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacol Res.* 2006; 53: 89-103.

41. **Egginton S, Gerritsen M.** Lumen formation: in vivo versus in vitro observations. *Microcirculation*. 2003 ; 10: 45-61.
42. **Peach MJ.** Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1977; 57: 313-370.
43. **Volpe M, Tocci G, Pagannone E.** Activation of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Biol Chem*. 1992; 267: 9455-9458.
44. **Sandberg K, Ji H, Clark AJ, Shapira H, Catt KJ.** Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *Ital Heart J*. 2005; 6: 16S-23S.
45. **Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ.** Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 203: 1842-1850.
46. **Kikkawa F, Mizuno M, Shibata K, Kajiyama H, Morita T, Ino K, Nomura S, Mizutani S.** Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2004; 190: 1258–1263.
47. **Dasgupta C, Zhang L.** Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discov Today*. 2011; 16: 22-34.
48. **AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Qwitterer U.** The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*. 2001; 276: 39721-39726.
49. **Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F.** Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem*. 1993; 268: 9496-9503.
50. **Rivière G.** Angiotensin-converting enzyme: a protein conserved during evolution. *J Soc Biol*. 2009;203: 281-293.

51. **Bernstein KE, Shen XZ, Gonzalez-Villalobos RA, Billet S, Okwan-Duodu D, Ong FS, Fuchs S.** Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Curr Opin Pharmacol.* 2011; 11: 105-111.
52. **Lucero HA, Kintsurashvili E, Marketou ME, Gavras H.** Cell signaling, internalization, and nuclear localization of the angiotensin converting enzyme in smooth muscle and endothelial cells. *J Biol Chem.* 2010; 285: 5555-5568.
53. **Ignjacev-Lazich I, Kintsurashvili E, Johns C, Vitseva O, Duka A, Shenouda S, Gavras I, Gavras H.** Angiotensin-converting enzyme regulates bradykinin receptor gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289: H1814-1820.
54. **Soler MJ, Ye M, Wysocki J, William J, Lloveras J, Batlle D.** Localization of ACE2 in the renal vasculature: amplification by angiotensin II type 1 receptor blockade using telmisartan. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296: F398-405.
55. **Clarke NE, Turner AJ.** Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade. *Int J Hypertens.* 2012; 2012: 307315.
56. **Fleming I, Kohlstedt K, Busse R.** The tissue renin-angiotensin system and intracellular signaling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15: 8-13.
57. **Danser AHJ.** Renin-Angiotensin System: Plasma versus Tissues. In: Unger T, Scholkens BA Angiotensin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2004; 1: 129-147.
58. **Dzau VJ, Pratt RE.** Local Cardiac, Vascular and Renal Renin-Angiotensin Systems in Physiology and Disease. In: Robertson JIS, Nicholls MG The Renin-Angiotensin System. Gower Medical Publishing London New York. 1993; 1: 42.1-42.11.
59. **Abadir PM, Walston JD, Carey RM.** Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides.* 2012; 38: 437-445.

60. **Savaskan E, Löffler KU, Meier F, Müller-Spahn F, Flammer J, Meyer P.** Immunohistochemical localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in human ocular tissues. *Ophthalmic Res.* 2004; 36: 312-320.
61. **Cullinane AB, Leung PS, Ortego J, Coca-Prados M, Harvey BJ.** Renin-angiotensin system expression and secretory function in cultured human ciliary body non-pigmented epithelium. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 676-683.
62. **Sharma A, Bettis DI, Cowden JW, Mohan RR.** Localization of angiotensin converting enzyme in rabbit cornea and its role in controlling corneal angiogenesis in vivo. *Mol Vis.* 2010; 16: 720-728.
63. **Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D.** Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23: 195-228.
64. **Heindl LM, Cursiefen C.** Pterygium. Etiology, clinical aspects and novel adjuvant therapies. *Ophthalmologe.* 2010; 107: 517-520, 522-524.
65. **Karukonda SR, Thompson HW, Beuerman RW, Lam DS, Wilson R, Chew SJ, Steinemann TL.** Cell cycle kinetics in pterygium at three latitudes. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79: 313-317.
66. **Detorakis ET, Spandidos DA.** Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic pterygium: trends and perspectives. *Int J Mol Med.* 2009; 23: 439-47.
67. **Murken JD, Dannheim R.** On the genetic problems of corneal pterygium. *Klin Monbl Augenheilkd* 1965; 147: 574-579.
68. **Hecht F, Shoptaugh MG.** Winglets of the eye: dominant transmission of early adult pterygium of the conjunctiva. *J Med Genet.* 1990; 27: 392-394.

69. **Khoo J, Saw SM, Banerjee K, Chia SE, Tan D.** Outdoor work and the risk of pterygia: a case-control study. *Int Ophthalmol.* 1998; 22: 293-299.
70. **Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D.** Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23: 195-228.
71. **Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, Di Girolamo N.** Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol.* 2011; 178: 817-827.
72. **Demurtas P, Di Girolamo N, Corrias M, Zucca I, Maxia C, Diana A, Piras F, Lai S, Sirigu P, Perra MT.** Immunohistochemical analysis of angiotensin converting enzyme in Sardinian pterygium. *Histol Histopathol.* 2013; 28: 759-766.
73. **Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT.** UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 2430-2437.
74. **Tonthat CV, Di Girolamo N.** Nestin expression in pterygia: potential role in angiogenesis. *Br J Ophthalmol.* 2013.
75. **Detorakis ET , Spandidos DA.** Pathogenetic mechanisms and treatment options for ophthalmic pterygium: trends and perspectives . *Int J Mol Med.* 2009 ;23 :439-447.
76. **Perra MT, Maxia C, Corbu A, Minerba L, Demurtas P, Colombari R, Murtas D, Bravo S, Piras F, Sirigu P.** Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Mol Vis.* 2006; 12: 1136-1142.
77. **Hirst LW, Sebban A, Chant D.** Pterygium recurrence time. *Ophthalmology.* 1994; 101: 755-8.
78. **Coster D.** Pterygium-an ophthalmic enigma. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79: 304-305.
79. **Samson CM, Nduaguba C, Baltatzis S, Foster CS.** Limbal stem cell transplantation in

chronic inflammatory eye disease. *Ophthalmology*. 2002; 109: 862-868.

80. **Tseng S.C., Li D.Q.** Comparison of protein kinase C subtype expression between normal and aniridic human ocular surfacesimplications for limbal stem cell dysfunction in aniridia. *Cornea*. 1996; 168–178.

81. **Poli M, Janin H, Justin V, Auxenfans C, Burillon C, Damour O.** Keratin 13 immunostaining in corneal impression cytology for the diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52: 9411-9415.

82. **Health quality Ontario.** Limbal stem cell transplantation: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2008; 8: 1-58.

83. **Eberwein P, Böhringer D, Schwartzkopff J, Birnbaum F, Reinhard T.** Allogenic limbo-keratoplasty with conjunctivoplasty, mitomycin C, and amniotic membrane for bilateral limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2012; 119: 930-937.

84. **Daya SM, Bell RW, Habib NE, Powell-Richards A, Dua HS.** Clinical and pathologic findings in human keratolimbal allograft rejection. *Cornea*. 2000; 19: 443-450.

85. **Burillon C, Huot L, Justin V, Nataf S, Chapuis F, Decullier E, Damour O.** Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53: 1325-1331.

86. **Doucet O, Lanvin M, Thillou C, Linossier C, Pupat C, Merlin B, Zastrow L.** Reconstituted human corneal epithelium: a new alternative to the Draize eye test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20: 499-512.

87. **Doucet O, Lanvin M, Thillou C, Linossier C, Pupat C, Merlin B, Zastrow L.** Reconstituted human corneal epithelium: a new alternative to the Draize eye test for the

assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20: 499-512.

88. **Jones PA, Budynsky E, Cooper KJ, Decker D, Griffiths HA, Fentem JH.** Comparative evaluation of five in vitro tests for assessing the eye irritation potential of hair-care products. *Altern Lab Anim*. 2001; 29: 669-692.

89. **Becker U, Ehrhardt C, Schneider M, Muys L, Gross D, Eschmann K, Schaefer UF, Lehr CM.** A comparative evaluation of corneal epithelial cell cultures for assessing ocular permeability. *Altern Lab Anim*. 2008; 36: 33-44.

90. **Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, Pellegrini G.** Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbalstem cell deficiency. *Transplantation*. 2001; 72: 1478-1485.

91. **Proulx S, d'Arc Uwamaliya J, Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Giasson CJ, Guérin SL, Auger FA, Germain L.** Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types *Mol Vis*. 2010; 16: 2192-21201.

92. **Builles N, Janin-Manificat H, Malbouyres M, Justin V, Rovère MR, Pellegrini G, Torbet J, Hulmes DJ, Burillon C, Damour O, Ruggiero F.** Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration. *Biomaterials*. 2010; 31: 8313-8322.

93. **Levis H, Daniels JT.** New technologies in limbal epithelial stem cell transplantation. *Curr Opin Biotechnol*. 2009; 20: 593-597.

94. **Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ.** Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 2506–2513.

95. **Shafiq MA, Gemeinhart RA, Yue BY, Djalilian AR.** Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012; 18: 340-348.
96. **Shalom-Feuerstein R, Serror L, De La Forest Divonne S, Petit I, Aberdam E, Camargo L, Damour O, Vigouroux C, Solomon A, Gaggioli C, Itskovitz-Eldor J, Ahmad S, Aberdam D.** Stem Cells. Pluripotent stem cell model reveals essential roles for miR-450b-5p and miR-184 in embryonic corneal lineage specification. *Stem Cells*. 2012; 30: 898-909.
97. **Jensen UB, Owens DM, Pedersen S, Christensen R.** Zinc fixation preserves flow cytometry scatter and fluorescence parameters and allows simultaneous analysis of DNA content and synthesis, and intracellular and surface epitopes. *Cytometry A*. 2010; 77: 798-804.
98. **Kohlstedt K, Busse R, Fleming I.** Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension*. 2005; 45: 126-132.
99. **Erdmann B, Fuxe K, Ganten D.** Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Hypertension*. 1996; 28, 818-824.
100. **Williams B., Baker A.Q., Gallacher B. Lodwick D.** Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1995; 25: 913-917.
101. **Weber KT, Sun Y, Katwa LC.** Myofibroblasts and local angiotensin II in rat cardiac tissue repair. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 1997; 29, 31-42.
102. **Sun Y, Weber KT.** Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1996; 28, 851-858.

103. **Fatima A, Sangwan VS, Iftekhar G, Reddy P, Matalia H, Balasubramanian D, Vemuganti GK.** Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. *J Postgrad Med.* 2006; 52: 257-261.

ICONOGRAFIA

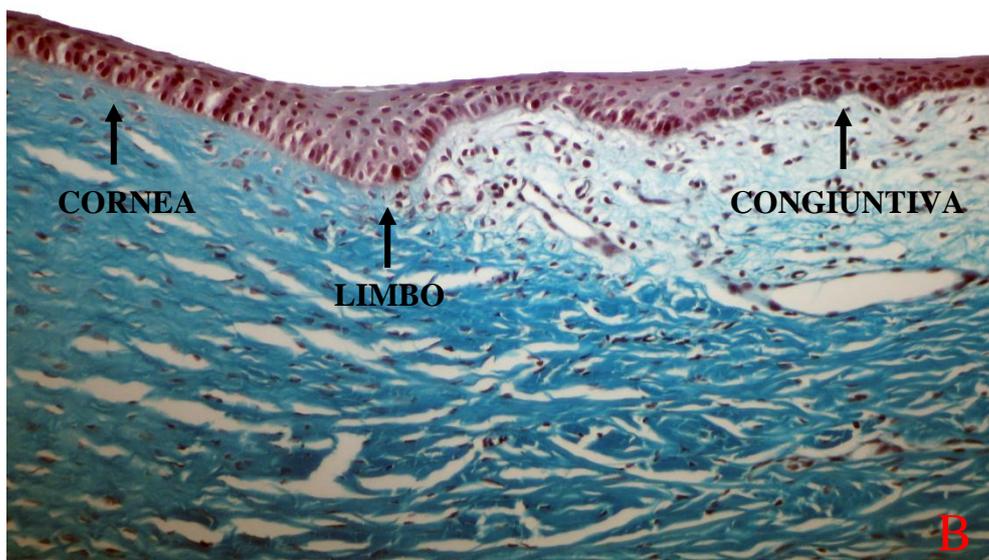
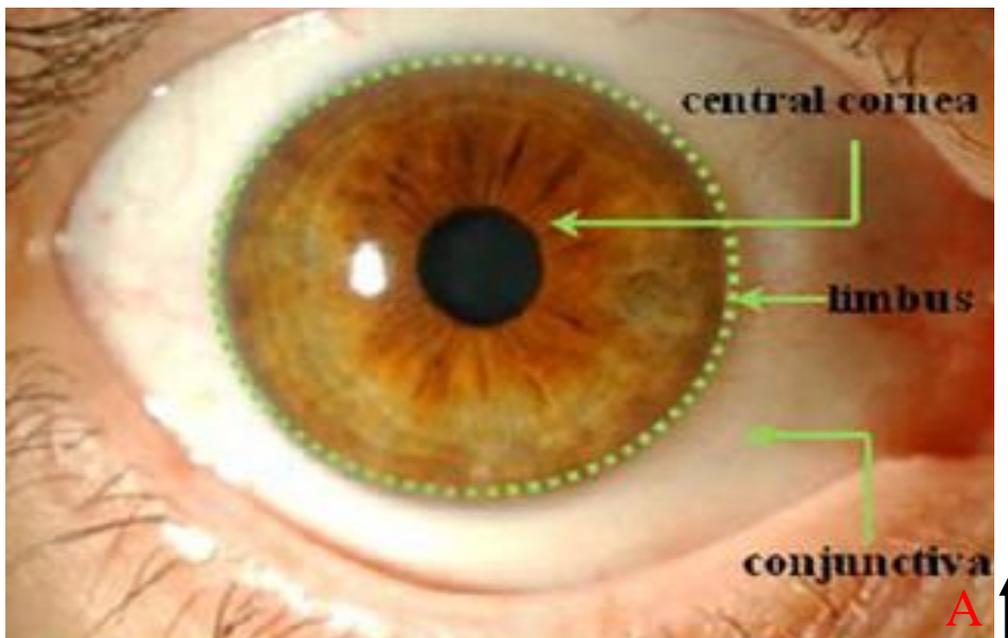


Fig. 1: Anatomia macroscopica (A) e microscopica (B) della superficie oculare. Si noti come la cornea e la congiuntiva sono separate da una zona di transizione chiamata limbo (da Echevattia et al. Tissue-Regenerating, Vision-Restoring Corneal Epithelial Stem Cells. 2011; 7: 256-268). Tricromica di Masson. 200x.

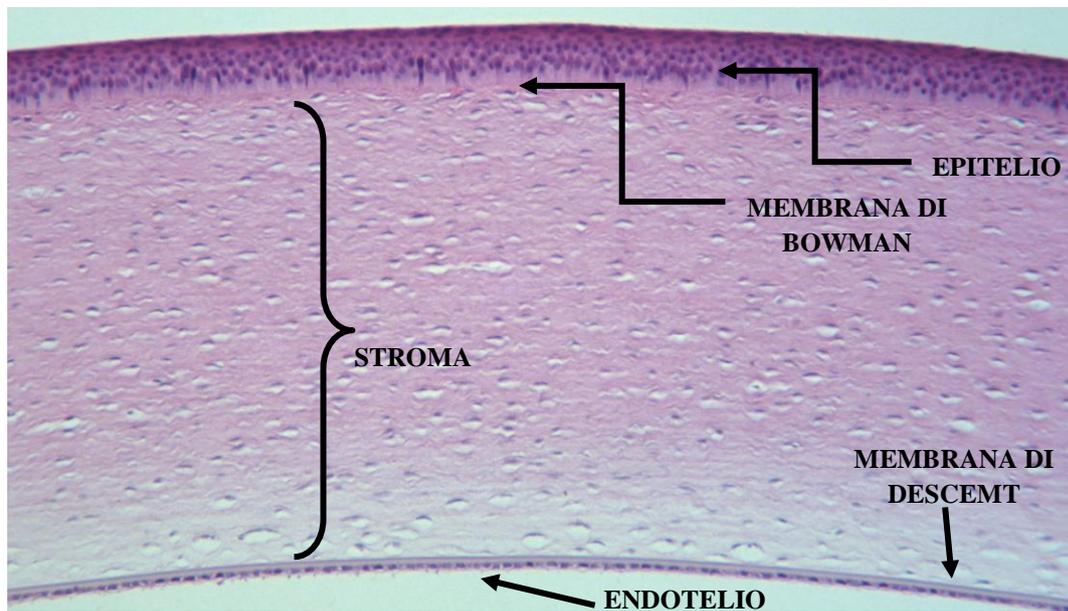


Fig. 2: Aspetto microscopico della cornea. Sono evidenti i distinti strati della cornea: l'epitelio, la membrana di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e l'endotelio (da <http://www.rutilioculista.it/anatomia-fisiologia/cornea>).

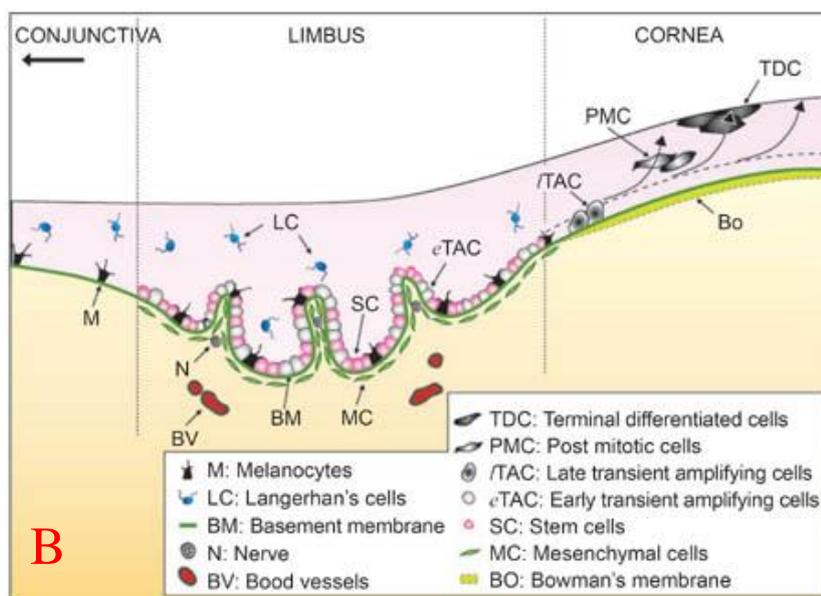


Fig. 3: Aspetto microscopico del limbo e mantenimento della superficie oculare. **A.** Si noti la presenza delle Palizzate di Vogt (*freccie*), sede delle cellule staminali della cornea. **B.** Il mantenimento della superficie oculare è garantita dalle SC degli strati basali dell'epitelio limbico, le quali migrano in direzione centripeta verso la cornea differenziandosi dapprima in cellule amplificatrici transitorie ed infine in cellule terminalmente differenziate (da Echevarria et al. 2011).

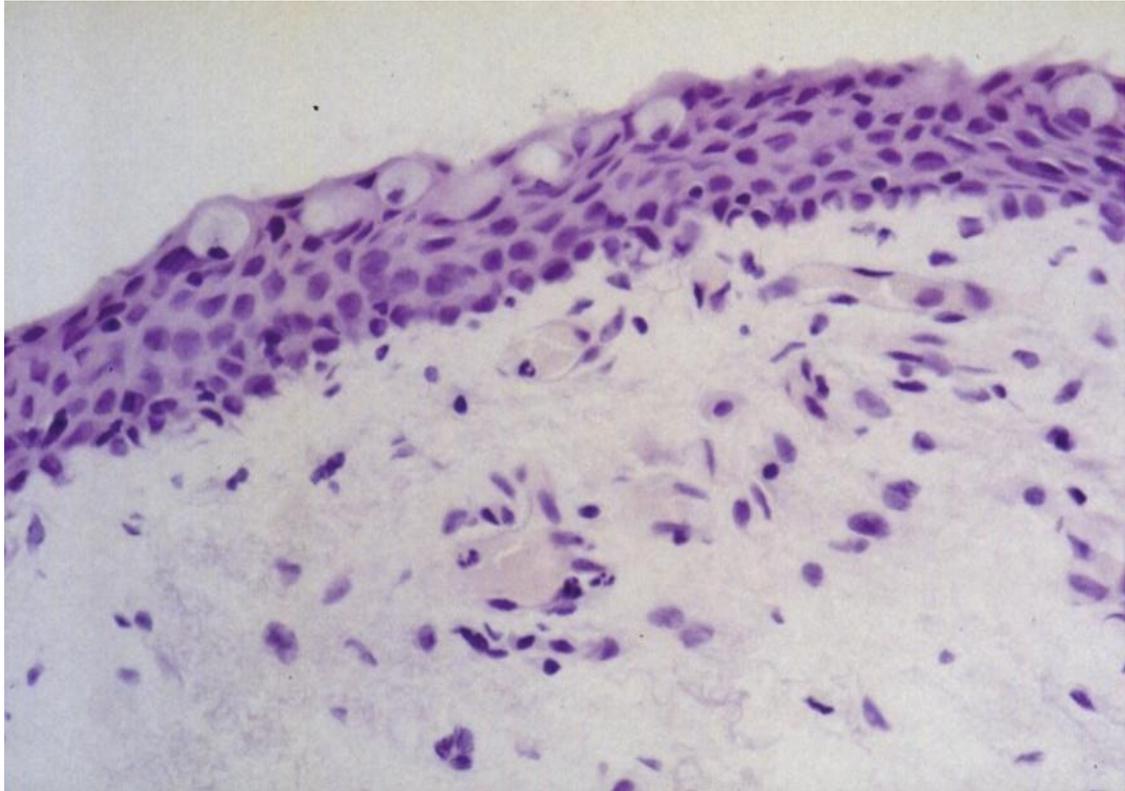


Fig. 4: Aspetto microscopico della congiuntiva. Si può osservare la mucosa congiuntivale costituita da un epitelio cubico stratificato. Nell'epitelio sono visibili le cellule caliciformi mucipare. Ematossilina-eosina. 400x.

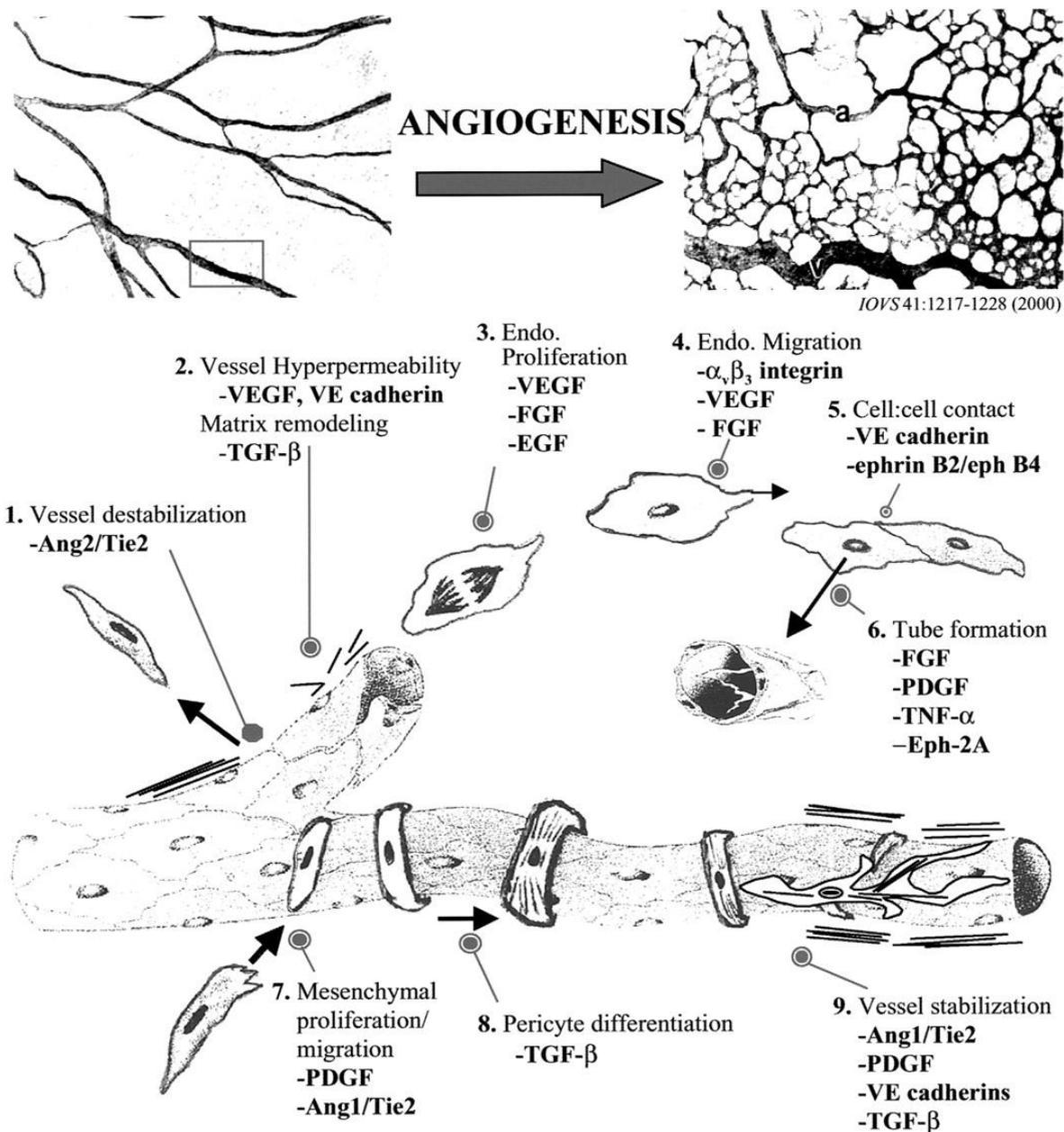


Fig. 5: Meccanismo dell'angiogenesi fisiologica. Rimozione dei periciti dall'endotelio del vaso e destabilizzazione (1). Aumento della permeabilità vascolare con fuoriuscita di proteasi e componenti della ECM (2). Proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali (3-4). Adesione tra le cellule endoteliali (5). Formazione del tubo attraverso il quale il sangue può fluire (6). Proliferazione, migrazione delle cellule mesenchimali verso il nuovo vaso sanguigno e loro differenziazione in periciti (7-8). Stabilizzazione del nuovo vaso (9) (da Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis.).

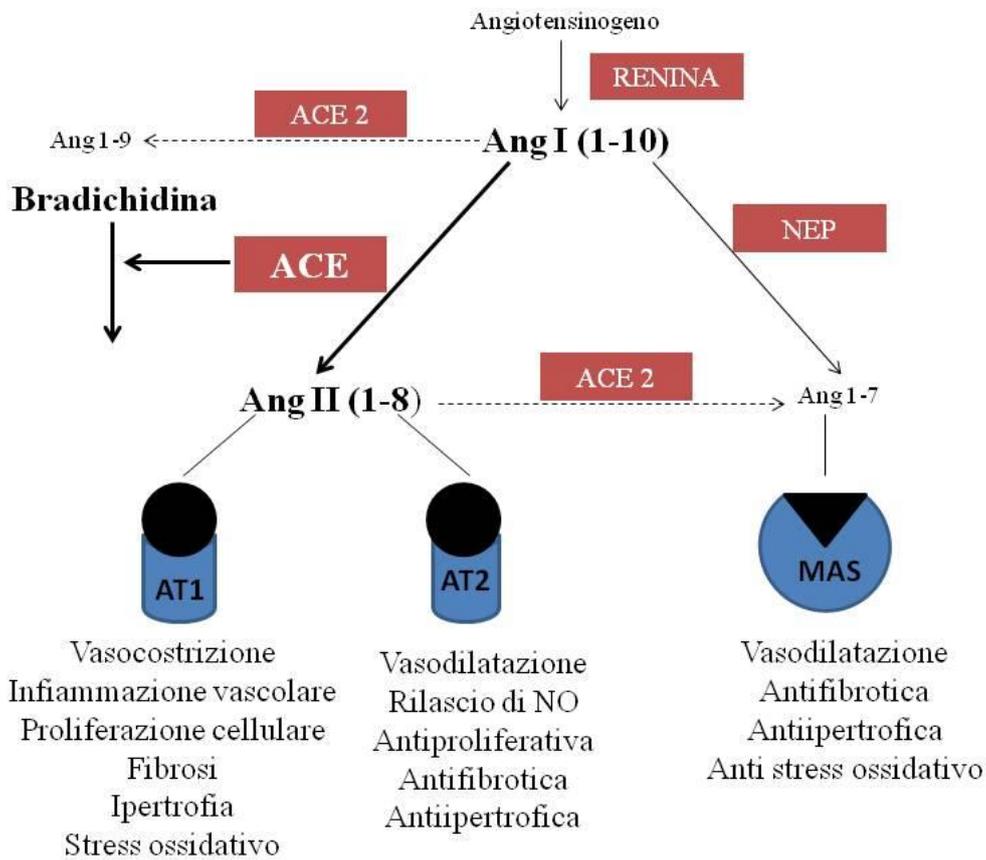


Fig. 6: Schema del sistema renina-angiotensina. Si noti il classico ruolo enzimatico di conversione dell'ANG I in ANG II dell'enzima ACE. Si possono osservare i recettori **AT1** e **AT2** per l'ANG II, il recettore **MAS** per l'ANG 1-7 e gli effetti da loro esercitati.

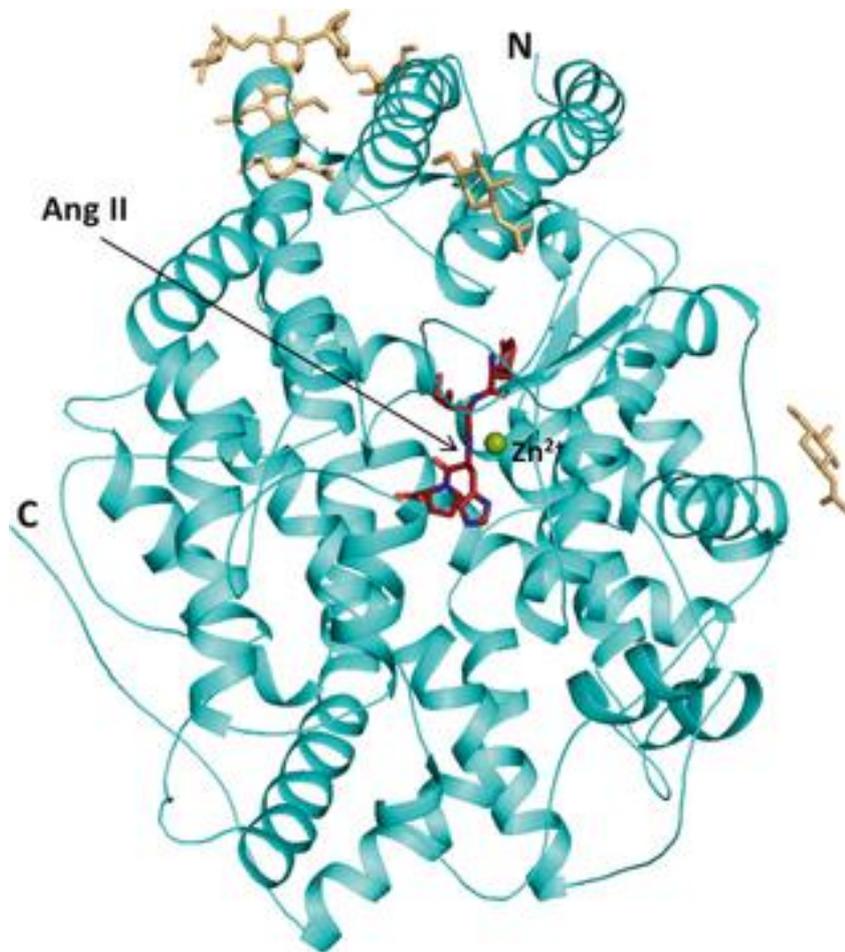


Fig. 7: Struttura cristallina dell'ACE somatico. Si noti il dominio extracellulare N-terminale ed il dominio citoplasmatico C-terminale dell'enzima. La sfera verde rappresenta lo ione zinco. (da Akif M, Masuyer G, Bingham RJ, Sturrock ED, Isaac RE, Acharya KR. Structural basis of peptide recognition by the angiotensin-1 converting enzyme homologue AnCE from *Drosophila melanogaster*).

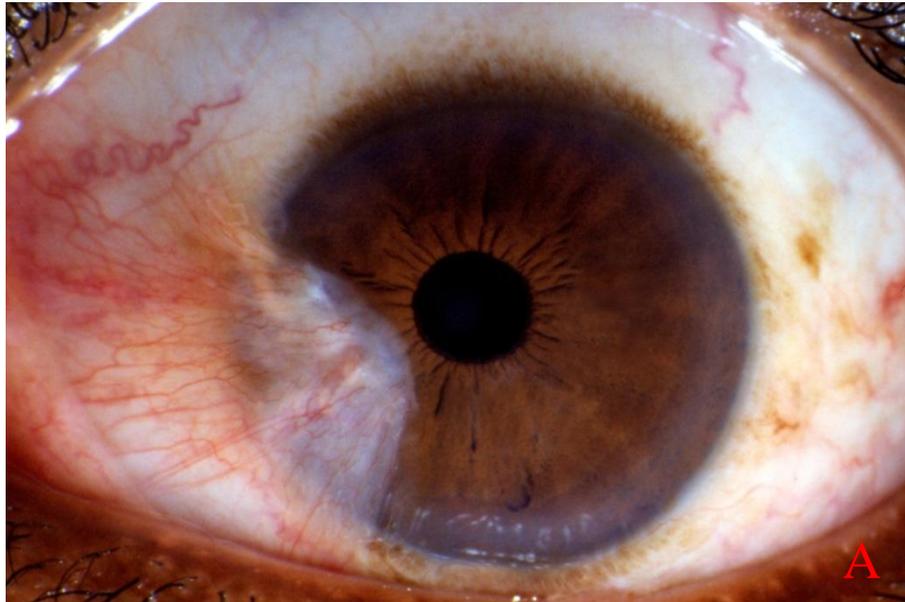


Fig. 8: A-B. Pterigio. In **A** è evidente la marcata neovascolarizzazione e l'arrossamento dato dai vasi sanguigni ipertrofici che dal corpo dello pterigio vanno verso la testa. In **B** si osserva una pronunciata invasività che si protrae sino alla pupilla, invadendo l'asse visivo.

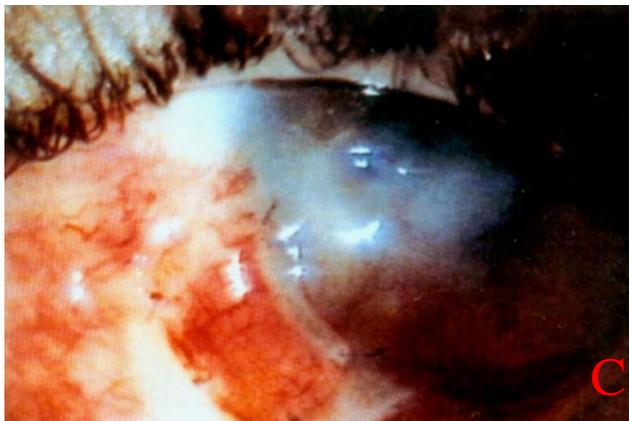
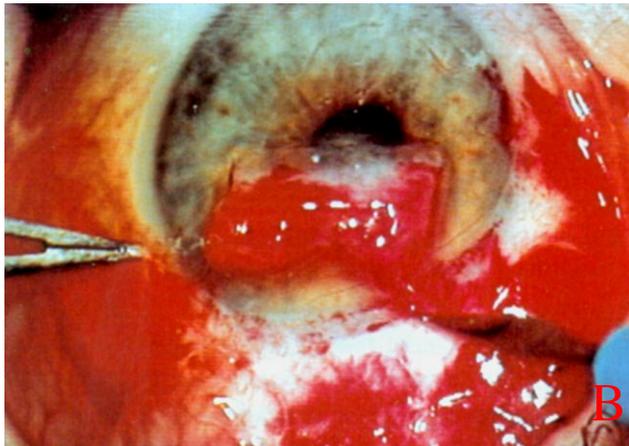


Fig. 9: A. Si noti l'invasione della congiuntiva, la neovascolarizzazione e l'opacità della cornea in seguito ad una deficienza unilaterale totale di cellule epiteliali limbiche. B-C. Trapianto autologo di limbo in presenza di deficienze di cellule staminali limbiche unilaterali totali.