



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901579082
Data Deposito	30/11/2007
Data Pubblicazione	30/05/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	01	N		

Titolo

COMPOSIZIONE COMPRENDENTE IONI CALCIO ED ALMENO UN ENZIMA PROTEOLITICO PER L'USO NELLA RIGENERAZIONE IN VITRO E IN VIVO DEL TESSUTO CUTANEO E DEL TESSUTO CONNETTIVO

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Composizione comprendente ioni calcio ed almeno un
enzima proteolitico per l'uso nella rigenerazione *in*
vitro e *in vivo* del tessuto cutaneo e del tessuto
connettivo"

di: Medevice S.r.l., nazionalità italiana, via Cernaia
31, 10121 Torino (Italia)

Inventori designati: Luisa GENNERO; Chiara CESANO;
Carlo VERCELLI; Antonio PONZETTO; Gianfranco MERIZZI.

Depositata il: 30 Novembre 2007

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda una composizione
comprendente la combinazione di almeno due principi
attivi, detta composizione essendo particolarmente
efficace nella rigenerazione del tessuto cutaneo e dei
tessuti connettivi e prestandosi ad essere preparata
in varie forme fisiche e formulazioni specificamente
adattate all'uso previsto. In particolare, la
composizione dell'invenzione può essere preparata ed
utilizzata come composizione cosmetica, mezzo di
coltura cellulare, composizione farmaceutica, *medical*
device, per uso umano o veterinario.

La composizione dell'invenzione è efficace nella
rigenerazione e nella riparazione dei tessuti cutanei

e connettivi sia *in vitro* sia *in vivo*, creando le condizioni fisiologiche adatte per la rigenerazione delle cellule staminali native ed il loro differenziamento fisiologico.

Nell'ambito della presente descrizione, con il termine "tessuti connettivi" si intendono in particolare il tessuto sottocutaneo, il tessuto mucoso, il tessuto connettivo lasso, il tessuto connettivo denso, il tessuto reticolare, il tessuto elastico, il tessuto linfoide, il tessuto adiposo. Con il termine "tessuti cutanei" si intende indicare l'apparato tegumentario nella sua totalità, che include sia la cute, ivi incluso il cuoio capelluto, sia gli annessi cutanei, quali ad esempio peli e capelli.

Il tessuto cutaneo

La parola "pelle" proviene dal latino "pellis" e costituisce il rivestimento del corpo dell'uomo o degli animali [1-13]. Il suo colore varia a seconda del tipo di pigmentazione, l'età ed alla ricchezza della irrorazione sanguigna.

La pelle interscambia informazioni attraverso i suoi sensori con l'ambiente esterno, in modo bio-elettrico e chimico; esercita anche la funzione di termoregolazione e quella immunitaria.

Cenni di anatomia ed istologia di cute e sottocute

La pelle è formata da 3 strati sovrapposti. Il primo è l'Ipoderma che è il più interno; il secondo o intermedio, è il Derma; il terzo, sulla superficie, è l'Epidermide. Lo spessore della pelle varia da 6 mm (sul palmo delle mani e pianta dei piedi che sono soggetti a traumatismi continui la cute è più spessa per proteggersi) in media a 0,5 mm nelle palpebre. La cute e gli annessi cutanei rivestono la totalità della superficie corporea e sono in continuità con le mucose orifizioali.

La cute rappresenta un'importante barriera anatomica e fisiologica ed è costituita da epidermide, derma, strutture annessiali follicolari e ghiandolari. La superficie assoluta della pelle umana viene calcolata, in media, fra 1.30 m² e 2 m² ed il suo peso totale è di circa 5 Kg.

Il PH della cute umana è variabile ed abitualmente compreso fra 4.2. e 5.6.

Epidermide

L'epidermide è costituita da un tessuto epiteliale generalmente pluristratificato di origine ectodermica, con prevalente funzione protettiva nei confronti dell'ambiente esterno. L'epidermide rappresenta lo strato più esterno della cute ed è

formata da cellule indurite dalla presenza di cheratina, chiamate cheratinociti. Alla sua base ci sono numerosi strati di cellule che si riproducono continuamente per sostituire quelle che muoiono e si staccano. L'epidermide non è vascolarizzata e la sua nutrizione è garantita per diffusione dalla contiguità con il derma.

L'epidermide è costituita da 5 strati:

1. basale,
2. spinoso,
3. granuloso
4. trasparente
5. corneo.

L'epidermide si accresce dalle cellule basali verso lo strato corneo, con un processo di cheratinizzazione che ha una durata di 3-4 settimane e che si conclude con la formazione di cheratina (ammassi cornei) a diretto contatto con l'esterno.

Strato basale o germinativo (Stratum germinativum o strato basilare)

E' composto da cellule (cellule cubiche unite tra di loro da desmosomi e melanociti che producono melanina) disposte a palizzata sulla linea di confine con il derma e preposte al rinnovamento delle cellule epidermiche riproducendosi per mitosi: ogni cellula

periodicamente si divide in due e le cellule neonate sono spinte verso la superficie e formano lo strato spinoso.

Strato spinoso o malpighiano (Stratum spinosum)

E' formato da più assise di cellule di aspetto poliedrico, più appiattite rispetto a quelle dello strato basale e separate tra di loro da sostanza intercellulare. Anche le cellule spinose si portano, maturando, verso la superficie epidermica. Nell'epitelio malpighiano le cellule poliedriche presentano un progressivo accumulo di proteine di membrana, granuli lamellati e si intercalano a cellule ramificate di Langerhans con funzioni di difesa.

Strato granuloso (Stratum granulosum)

E' lo strato di transizione tra lo spinoso e il corneo; il suo spessore varia da 1 a 4 file di cellule (cellule pavimentose ricche di cheratina), è più abbondante in sede palmo-plantare e contiene una sostanza (cheratoialina) indispensabile nel processo di cheratinizzazione.

Strato trasparente (Stratum lucidum)

Ha uno spessore molto sottile su quasi tutta la superficie del corpo, tranne che sul palmo delle mani e sulla pianta del piede, dove diventa più spesso. E' uno strato di cellule lucide e trasparenti che

proteggono la pelle dalle abrasioni e dagli urti. Sono queste cellule che provocano la nascita dei calli su mani e piedi.

Strato corneo (*Stratum corneum*)

E' direttamente a contatto con l'esterno ed ha uno spessore variabile a seconda della sede. La cheratinizzazione si conclude nello strato corneo: qui le cellule non contengono più nuclei ed i prodotti terminali del rinnovamento cutaneo, vengono eliminati come lamelle cornee dalla superficie epidermica (cellule apoptotiche ormai ridotte a lamine) e si accompagnano a cellule di Merchel provviste di terminazioni nervose afferenti. Quindi, l'epidermide è composta da uno strato corneo più esterno, uno strato trasparente ed uno strato granuloso al di sotto, uno strato spinoso che comprende tutta la zona intermedia, ed uno strato basale che si attacca, mediante la membrana basale, direttamente al derma. Ha la funzione fondamentale di protezione verso agenti fisici esterni (caldo, freddo, raggi solari, ecc.) e agenti patogeni (batteri, ecc.). Molte sostanze biochimiche sono immagazzinate nel derma e nel tessuto ipodermico, acqua ed elettroliti sono trattenuti dai proteoglicani e dalle altre molecole della matrice intercellulare,

lipidi e molecole idrosolubili sono depositate nell'ipoderma.

Derma

Lo strato profondo (detto anche *corium*) della cute dei Vertebrati, particolarmente spesso negli Uccelli e soprattutto nei Mammiferi.

Fondamentalmente costituito da tessuto connettivo ricco di fibre elastiche e muscolari lisce, di vasi e di nervi, è separato dai tessuti sottostanti dalla tela subcutanea e dalla sovrastante epidermide dalla membrana basale.

Il limite tra i due strati è in gran parte accidentato; dal derma, infatti, si evidenziano una serie di rilievi o papille, i cui capillari nutrono anche lo strato germinativo dell'epidermide, i peli dei Mammiferi e le penne degli Uccelli.

Nel derma si approfondano numerose ghiandole che sono però di origine epidermica; di derivazione dermica sono invece le scaglie dei Pesci. Nel derma sono anche situati i cromatofori, responsabili della colorazione della pelle di alcuni gruppi di Vertebrati (Pesci, Anfibi, Rettili Squamati).

Il derma si trova sotto all'epidermide con la quale ha intimi rapporti, perché la sostiene, la nutre

ed offre sede alle appendici epidermiche, cioè le ghiandole e i peli.

Il derma è spesso circa 2-3 mm. ed è costituito da 2 parti: papillare e reticolare; mentre la prima, che è costituita dalle papille e dallo strato subpapillare ha una vita metabolica molto attiva per la sua vicinanza all'epidermide, la seconda può essere considerata come uno stroma di sostegno.

Costituenti del derma sono: il collagene, che assicura robustezza alla pelle, l'elastina, che la rende elastica e la sostanza fondamentale, formata da mucopolisaccaridi che ha funzioni di cementante.

Nel derma sono presenti i vasi sanguigni, le innervazioni e gli annessi cutanei, cioè le ghiandole sudoripare, i follicoli piliferi, i peli, le ghiandole sebacee e il muscolo del pelo. Nel derma è presente un fitto intreccio di vasi linfatici che si dirigono verso il sottocutaneo o ipoderma.

L'epidermide e il derma sono tra loro in contiguità tramite le papille dermiche, che sono dei prolungamenti conici di tessuto connettivo che dal derma si estendono a compenetrare l'epidermide. I capillari sanguigni si portano fino all'apice delle papille e costituiscono la fonte di nutrimento per l'epidermide che non è vascolarizzata.

Il disegno superficiale della cute è in rapporto al variare della disposizione e dello spessore delle fibre connettive del derma e questo dà origine ad una precisa disposizione papillare. Questo disegno è così tipico che viene usato per l'identificazione di un individuo con l'impronta digitale.

Strutture della membrana basale, del derma e del sottocute: precisazioni

Se si analizzano in dettaglio gli strati cutanei si noterà che:

1. nello stato corneo si trovano le cellule di Merkel che sono in contatto con terminazioni nervose afferenti in grado di generare all'occorrenza un segnale;
2. nello strato spinoso si trovano le cellule di Langerhans; si tratta di cellule dendritiche immature stanziali, che esprimono il recettore CCR6, e pertanto restano nel tessuto che produce il ligando (CCL20). La funzione propria di tali cellule è quella di fagocitare le sostanze estranee ed i germi; dopo aver digerito nei vacuoli lisosomiali tali sostanze, le Langerhans cambiano i recettori di superficie, si staccano dal tessuto di residenza, iniziano un viaggio verso il linfonodo drenante; durante tale percorso

esse si trasformano in cellule dendritiche mature presentanti l'antigene;

3. le uniche cellule dell'epidermide che posseggono la capacità di riprodursi si trovano nello *strato basale*;

4. nel derma sono presenti i vasi sanguigni necessari per il nutrimento dell'epidermide che ne risulta sprovvista;

5. Il cheloide è una formazione ovale di collagene;

6. Il *collagene di tipo 1* ed il *collagene di tipo 4* compongono la membrana basale;

7. La biosintesi del collagene avviene ad opera di fibroblasti o miofibroblasti e delle corrispondenti cellule della cartilagine e dell'osso: condroblasti, condrociti, osteoblasti ed osteociti ed inoltre, in condizioni patologiche, dalle cellule stellate nel fegato. Il processo inizia con la trascrizione del gene o dei geni e la maturazione dell'mRNA. Sono noti 42 geni codificanti per altrettante specifiche catene polipeptiche, che costituiscono i 27 differenti tipi di "collagene" noti nell'uomo (e nei vertebrati). Tali geni vengono trascritti in messaggeri tradotti in peptidi più lunghi rispetto alle molecole di collagene mature. Il collagene nasce come proto-collagene, dotato di due tratti polipeptidici di struttura globulare detti telomeri, uno N-terminale e uno C-

terminale. La traduzione avviene nel REG (*reticolo endoplasmatico granuloso*) e la catena nascente di pro-collagene subisce una serie complessa di modificazioni ad opera di oltre 20 enzimi specifici, necessari per la maturazione dei vari tipi di collagene. Sono necessarie almeno tre idrossilasi, due glicosiltransferasi, due proteinasi specifiche per i peptidi C ed N terminali, una ossidasi per iniziare la formazione dei legami intercatenari, disulfide-isomerasi. Fra le modificazioni essenziali vi sono la rimozione del peptide segnale, la idrossilazione di specifici residui di prolina e lisina ad idrossiprolina e idrossilisina (ad opera di idrossilasi, con cofattore essenziale la vitamina C). La sintesi richiede almeno una specifica chaperonina, la HSP 47: la sua mancanza causa la morte intra-uterina del feto. Si ottiene infine la produzione di catene alfa di collagene (se ne conoscono 42 diverse, come detto). Ogni collagene maturo è costituito da tre catene alfa, in taluni casi identiche l'un l'altra, mentre in altri casi sono composte da due o tre differenti catene alfa. Esse sono avvolte fra loro in una tripla elica sinistorsa: il risultato finale è una struttura molto allungata, simile ad una corda. Quasi

tutti i collagene formano delle strutture sovramolecolari a fibrille, oppure a rete.

Cenni di anatomia ed istologia del tessuto connettivo

La nomenclatura attuale comprende tre tipi di tessuto connettivo: il connettivo propriamente detto, quello osseo e quello cartilagineo. Infine si può riconoscere un ulteriore connettivo, detto mucoso maturo, il quale costituisce lo stroma del cordone ombelicale e diversi aspetti del mesenchima embrionario. Nell'ambito del tessuto connettivo si distinguono il tessuto connettivo propriamente detto, il tessuto cartilagineo, il tessuto osseo e il sangue. Tutti i connettivi sono costituiti da un comparto pauci-cellulare, costituito da fibroblasti e da cellule granulose basofile (mast-Zellen). Queste elaborano la sostanza fondamentale, mentre i fibroblasti producono le fibre collagene. I caratteri morfologici e funzionali dei connettivi sono determinati dai caratteri del materiale extracellulare (la cosiddetta sostanza fondamentale).

Tessuto connettivo propriamente detto

La definizione corrente è basata sulle caratteristiche funzionali. Si distinguono:

a) il connettivo denso, dotato di forma propria;

b) il connettivo lasso, privo di forma propria, e c) il connettivo trofico, o tessuto adiposo.

Il tessuto connettivo denso ha funzioni principalmente meccaniche. Tipici esempi sono costituiti dal connettivo dei tendini, quello dei legamenti, dalle fasce aponevrotiche dei muscoli, dal tessuto a fasci intrecciati del derma e infine dalla cornea. La sostanza fondamentale è molto ricca della parte filamentosa; la parte anista è una mucina poco idrofila, molto stabile.

Il tessuto connettivo lasso costituisce lo stroma interstiziale di tutti gli organi, il connettivo lasso sottocutaneo, il connettivo reticolato del fegato, milza e midollo osseo, e il tessuto linfatico; tutte le membrane basali sono inoltre costituite da questo connettivo (fa eccezione il sistema nervoso dove il tessuto connettivo non è presente ed è sostituito da un tessuto specifico detto nevroglia).

La sostanza fondamentale amorfa

Il tessuto connettivo propriamente detto è ricco di sostanza fondamentale amorfa; essa si presenta come un gel variamente idratato, in cui sono immerse le altre componenti del connettivo. Tale gel è costituito da: acqua (in quantità molto variabile: dal 10% dell'osso al 20% del connettivo adiposo all'80% del

connettivo lasso); proteine; glicoproteine; glicosaminoglicani; proteoglicani; sali minerali; vitamine (ed inoltre ormoni, citochine e fattori di crescita).

Le sostanze nutritive che dal sangue devono giungere alle cellule degli organi transitano attraverso la fase acquosa di questo gel. Nelle preparazioni istologiche la sostanza fondamentale si conserva difficilmente a meno che non si usino metodiche particolari (*freeze drying*, sezioni criostatiche). Quando è conservata nelle sezioni, la sostanza fondamentale amorfa può essere messa in evidenza con il metodo del PAS. Molte glicoproteine presenti nella sostanza fondamentale non hanno origine autoctona, ma sono glicoproteine plasmatiche passate nella matrice extracellulare. Sono anche presenti le glicoproteine proprie della matrice. Queste conferiscono alla sostanza fondamentale la caratteristica PAS-positività. La loro distribuzione è uniforme mentre la loro percentuale non è costante, bensì è correlata all'età del soggetto: essa tende, infatti, ad aumentare nel tempo risultando così un caratteristico marcatore dell'invecchiamento.

Le glicoproteine strutturali hanno il ruolo principale di collegare le varie molecole della

matrice extracellulare alle popolazioni cellulari in essa accolte. In questi ultimi anni sono state isolate glicoproteine di notevole interesse biologico, quali fibronectina, laminina, condronectina, nidogeno o entactina, osteonectina.

I glicosaminoglicani (GAG) sono costituiti da lunghe catene in cui si ripetono unità disaccaridiche, formate quindi da due zuccheri; il peso molecolare può definirsi da alcune centinaia di migliaia fino ad alcuni milioni di daltons. I GAG vengono distinti in solforati (condroitinsolfati A, B e C, cheratansolfato, eparansolfato) e non solforati (acido ialuronico, acido condroitinico).

L'acido ialuronico è il GAG più diffuso nella sostanza fondamentale; la sua distribuzione è praticamente ubiquitaria e controlla la diffusione di sostanze nell'ambito del tessuto connettivo, impedendo per esempio la diffusione di agenti tossici e di batteri. Tuttavia, un enzima, la ialuronidasi, prodotto da alcuni batteri ed estratto dal veleno di alcuni serpenti, è in grado di demolire i grossi polimeri di acido ialuronico, e riesce quindi a ridurre la viscosità del tessuto connettivo aumentandone la permeabilità. Tranne l'acido ialuronico i GAG sono sempre legati covalentemente a

proteine formando enormi complessi macromolecolari detti proteoglicani.

I proteoglicani sono molecole costituite da un singolo filamento proteico su cui si inseriscono numerosi *glicosaminoglicani* (GAG). Le molecole proteoglicaniche sono in grado di interagire formando lattici tridimensionali gelatinosi. L'estrema idrofilia (dovuta ai numerosi gruppi alcolici e acidi dei GAG) conferisce loro la capacità di legare acqua e di ripartirla per tutta la sostanza fondamentale. L'insieme delle molecole proteoglicaniche viene a costituire una rete tridimensionale aggrovigliata che promuove la coesione cellulare e funziona come un setaccio molecolare in grado di impedire il passaggio di alcune molecole, facilitando alternativamente la diffusione di altre.

Le fibre della matrice

Possiamo suddividere le fibre della matrice in:

- Fibre Collagene
- Fibre Reticolari
- Fibre Elastiche

Fibre Collagene

Le fibre collagene sono molto resistenti alla trazione, infatti, l'allungamento della fibra (deformazione) è del tutto trascurabile, essendo

dell'ordine del 2% Nelle sezioni istologiche, tali fibre, risultano acidofile e si colorano in rosa con l'eosina e sono costituite da fibrille, a loro volta costituite da microfibrille di *tropocollagene*.

Nei Vertebrati superiori il collagene rappresenta la proteina più abbondante, costituendo quasi 1/3 delle proteine totali dell'organismo.

Tipi di collagene

1. Collageni fibrillari. I più noti sono:

- Tipo I (tendini, legamenti, derma e osso),
- Tipo II (cartilagine ialina),
- Tipo III (fibre reticolari).

2. Collageni associati ai collageni fibrillari.

- Tipo IX (al tipo II),
- Tipo X e XII (al tipo I),

3. Collageni a catena corta

- Tipo IV, V e VII (membrane basali)

Le fibre reticolari

Sono composte da collagene di tipo III. Non formano fasci grossolani come le fibre collagene, ma costituiscono delle maglie sottili. Le fibre reticolari sono presenti a livello delle strutture di impalcatura (stroma) degli organi. Nel tessuto linfoide formano un sostegno delicato su cui poggiano le cellule tipiche di ciascun organo (cellule

parenchimali). Le fibre reticolari sono fortemente PAS positive e si colorano in nero con il nitrato di Argento (metodo del Bielschowsky).

Le fibre elastiche

Conferiscono una certa elasticità al tessuto e possono estendersi fino al 150% della loro lunghezza originaria (parete delle arterie, ligamenti e organi estensibili come i polmoni). Tali fibre elastiche sono molto sottili e molto resistenti ad agenti chimici e fisici; nel connettivo si riuniscono a formare una rete a maglie lasse. La componente di fibra elastica non si evidenzia con i metodi usuali e si può colorare in marrone-rosso con l'orceina o in blu con la resorcin fucsina (metodo di Weigert). Le fibre elastiche sono costituite da una componente amorfa, ELASTINA, che conferisce la elasticità e da una componente microfibrillare, FIBRILLINA, che conferisce stabilità.

Le cellule del tessuto connettivo propriamente detto

Le cellule fisse con vita relativamente lunga che risiedono sempre nell'ambito del tessuto connettivo sono essenzialmente i fibroblasti i condroblasti, gli osteoblasti, le Mast-zellen o mastociti, e gli adipociti.

Le cellule mobili con vita di breve durata che provengono generalmente dal sangue e sono essenzialmente i granulociti, i linfociti, i macrofagi e le plasmacellule.

I fibroblasti

I fibroblasti producono collagene, fibre elastiche e reticolari, glicosaminoglicano e le glicoproteine che si trovano nella materia extracellulare. Durante la crescita i fibroblasti si dividono e sintetizzano le sostanze di base. Un danno ai tessuti stimola i fibroblasti e ne induce la mitosi. I fibroblasti possono dare origine ad altre cellule come le cellule ossee, gli adipociti e cellule muscolari, tutte di origine mesodermica.

I mastociti

Sono grosse cellule disposte in genere in posizione perivascolare; derivano da precursori presenti nel midollo osseo e contengono numerosi granuli basofili, metacromatici e PAS positivi nel loro citoplasma. I granuli sono ripieni di sostanze come l'istamina e l'eparina.

Sulla loro superficie, i mastociti, contengono recettori per la classe E delle Immunoglobuline (particolarmente abbondanti nei soggetti allergici) ovvero per le reagine cioè gli anticorpi diretti verso

antigeni allergizzanti o allergeni (pollini, polveri ecc.)

Gli adipociti

Gli adipociti sono specializzati nello immagazzinamento e sintesi di sostanze lipidiche. Dato l'ingente accumulo di materiale lipidico hanno al loro interno o una grossa goccia lipidica (adipociti uniloculati) o tante piccole gocce lipidiche (adipociti multiloculati). Possono trovarsi come cellule singole o aggregate in maniera cospicua e allora costituiscono il tessuto adiposo. Le comuni metodiche istologiche non mettono in evidenza tutte le componenti delle cellule adipose il cui contenuto viene disciolto dai solventi; per evidenziare il materiale lipidico si devono usare metodiche come le sezioni criostatiche e quindi coloranti liposolubili (ad es. Sudan nero o Sudan rosso o l'acido osmico).

I macrofagi o istiociti

Originano dai monociti del sangue ed hanno attività fagocitaria producendo varie sostanze (ad es. Lisozima, Interferone, interleuchine, fattore di necrosi tumorale) e presentando l'antigene (Antigen Presenting Cell). In condizioni particolari, per fagocitare corpi estranei di rilevanti dimensioni, possono fondersi tra loro costituendo dei complessi

polinucleati che vengono denominati cellule giganti da corpo estraneo. Insieme ad altre cellule dell'organismo dotate di attività fagocitaria sono raggruppati nel cosiddetto sistema dei macrofagi (microglia, cellule di Von Kupffer, osteoclasti, cellule del Langerhans, cellula alveolare).

I linfociti

Sono piccole cellule con un grande nucleo rotondo e scarso citoplasma e sono cellule responsabili delle difese immunologiche. Si trovano in discreta percentuale (30% circa) tra i globuli bianchi del sangue, ma dal sangue migrano nel connettivo e in alcuni organi diventano molto abbondanti in modo da costituire un tessuto che si dice linfoide (timo, milza, linfonodi, tonsille, appendice, placche del Peyer). Esistono diverse famiglie o sottopopolazioni di linfociti; le principali di queste risultano essere i linfociti B e i linfociti T.

I linfociti B sono le cellule che si trasformano in plasmacellule e provvedono a produrre anticorpi circolanti (risposta umorale). I linfociti T sono responsabili della risposta immunitaria mediata da cellule (linfociti T- citotossici, linfociti T-helper, linfociti T-suppressor).

Le plasmacellule

Derivano dai linfociti B e sono le cellule produttrici degli anticorpi circolanti o Immunoglobuline (IgM, IgG, IgE, IgA, IgD). Hanno forma ovoidale e contengono, in posizione leggermente eccentrica, un nucleo rotondeggiante la cui cromatina è disposta in zolle che assumono un aspetto particolare detto a ruota di carro o a quadrante di orologio. Il citoplasma è molto ricco di reticolo rugoso che serve per la sintesi delle proteine anticorpali ed è perciò intensamente basofilo tranne che nella zona corrispondente all'apparato di Golgi che contiene le proteine sintetizzate e pronte per essere emesse all'esterno. Nel citoplasma sono anche presenti delle granulazioni PAS positive denominate corpi di Russel che probabilmente rappresentano il deposito di prodotti di sintesi non utilizzabili.

Classificazione del tessuto connettivo propriamente detto

La classificazione del tessuto connettivo propriamente detto tiene conto delle componenti che si trovano disposte al suo interno, come segue.

- Tessuto connettivo denso,
- Tessuto connettivo lasso,
(reticolare, elastico, linfoide)
- Tessuto connettivo trofico o adiposo,

- Tessuto mucoso maturo.

Tessuto connettivo denso

In esso si ha una netta prevalenza della componente fibrillare e in particolare delle fibre collagene ed a seconda della disposizione delle medesime può essere ulteriormente distinto in:

- tessuto connettivo denso a fasci intrecciati (capsule di rivestimento degli organi, derma, ecc);
- tessuto connettivo denso a fasci paralleli (tendini);
- tessuto connettivo denso a fasci crociati (cornea).

Tessuto reticolare

Si tratta di un tessuto connettivo lasso in cui la componente fibrillare è prevalentemente costituita da fibre reticolari e costituisce lo stroma (impalcatura interna) delicato degli organi parenchimatosi.

Tessuto elastico

In esso prevalgono le fibre elastiche e si ritrova nella parete delle arterie, nei legamenti gialli delle vertebre, nelle corde vocali.

Tessuto linfoide

In esso prevale la componente cellulare (linfociti), costituisce gli organi linfoidi:

- tonsille
- timo
- milza
- linfonodi
- placche del Peyer
- appendice vermiforme.

Tessuto connettivo lasso

In esso non c'è prevalenza di una componente rispetto all'altra, ma cellule, fibre e sostanza amorfa si equivalgono e si ritrova nel sottocute, nelle tonache mucose e sottomucose degli organi cavi e nell'interstizio (stroma) degli organi.

Tessuto adiposo

In esso prevale la componente cellulare e si distinguono due tipi di tessuto adiposo:

- tessuto adiposo bianco o uniloculato,
- tessuto adiposo bruno o multiloculato.

Il tessuto adiposo è un tipo di tessuto connettivo specializzato nell'accumulo di lipidi.

I lipidi rappresentano la forma più conveniente di materiale ad alto contenuto energetico perché rispetto alle *proteine* e ai *carboidrati*: pesano meno e occupano meno volume/caloria di energia chimica immagazzinata.

Il grasso corporeo è costituito quasi interamente da Tessuto Adiposo bianco.

Il Tessuto Adiposo bruno si trova soprattutto nel feto e nel neonato, in sedi specifiche.

Tessuto adiposo bianco

Caratteristiche

- colore: bianco-giallognolo (per la presenza di carotenoidi)
- Cellule grandi
- Adipociti uniloculari
- Organuli posizionati alla periferia cellulare
- Membrana basale
- Suddivisione in lobi
- Innervazione: gli assoni entrano in contatto solo con i vasi sanguigni
- Sede: sottocutanea-viscerale (regione, omento, mesenterici, retro-peritoneale)
- Funzione: 1)riserva energetica, 2)mantenimento T. corporea, 3)protezione traumi, 4)endocrina.

Tessuto adiposo bruno

Caratteristiche

- colore: rosso-bruno (per la ricca vascolarizzazione e citocromi).
- Cellule più piccole.
- Adipociti multiloculari.

- Organuli non periferici, abbondanti mitocondri.
- Membrana basale.
- Suddivisione in lobi.
- Innervazione: gli assoni entrano spesso in contatto con gli adipociti
- Sede: nuca, ascelle, regione interscapolare, perifarinea e peri-inguinale, peri-cardiaca, peri-renale.
- Funzione: produzione di calore.

Tessuto mucoso maturo

In esso prevale la sostanza amorfa e si ritrova nel connettivo sottodermico dell'embrione, nel cordone ombelicale (gelatina di Wharton) e nella polpa dentaria dell'adulto.

Patogenesi delle ferite cutanee e sottocutanee

La classificazione delle ferite secondo la loro eziologia consente di identificare due gruppi principali di ferite: quelle legate a cause esogene e quelle derivanti da fattori endogeni. Le prime, vengono classicamente suddivise in ferite iatrogene (es. chirurgiche), auto-indotte (legate a sintomatologia pruriginosa, ovvero a cause psicogene o neurologiche), e traumatiche (ferite lacero-contuse o penetranti causate da oggetti contundenti, investimenti, ferite da arma da fuoco e zuffe tra animali). In quanto alle cause endogene, è possibile

annoverare vasculiti, necrosi tissutali (es. piaghe da decubito), e carenze immunitarie innate.

Cenni di patologia umana del tessuto epidermico e connettivo

1. Ferite e cicatrizzazione

La riparazione o cicatrizzazione è una qualità fondamentale dei tessuti viventi, in mancanza di questo si arriverebbe alla rapida estinzione della specie umana.

La cicatrizzazione è un fenomeno vitale che si verifica quando a livello della cute si provoca una qualsiasi soluzione di continuità in seguito ad atti chirurgici traumatici, o ad eventi di origine termica, chimica o meccanica (come nel caso delle ulcere da decubito) che provocano perdita di sostanza.

Il processo riparativo è stato definito in vari modi [14]:

- difesa dell'integrità;
- normale reazione ad una lesione;
- riempimento di un difetto con tessuto connettivo.

Se i margini di una ferita sono riavvicinati e non si sviluppa un processo infettivo si parla di guarigione per prima intenzione. Si parla invece di riparazione per seconda intenzione qualora i bordi della lesione siano distanziati a causa di grosse

perdite di sostanza o nel caso in cui si sia sviluppata una infezione. I due fenomeni di guarigione sono comunque fondamentalmente simili: presentano infatti differenze di ordine quantitativo. Nel processo di guarigione per seconda intenzione, a causa del distanziamento dei margini e della perdita di sostanza, la formazione del tessuto di granulazione si verifica non solo dai margini della ferita, ma anche dal fondo della lesione stessa; la reazione infiammatoria è più estesa, con abbondante essudazione ed il processo riparativo risulta più lento con formazione di cicatrici più estese.

Nel processo di riparazione si susseguono vari fenomeni biologici a cascata quali i processi coagulativi, i fattori vascolari, immunitari e cellulari; si tratta di un meccanismo molto complesso che, a scopo didattico, suddivideremo in tre fasi: fase infiammatoria, fase proliferativa e di maturazione.

Fase infiammatoria

Dopo la comparsa di una lesione si assiste all'isolamento della zona interessata dall'ambiente esterno: si formano degli aggregati di piastrine ed inizia il processo coagulativo, nel contempo a carico dei vasi di calibro maggiore avviene una contrazione

di tessuto muscolare e si viene a determinare la riduzione di diametro del lume del vaso. Sebbene questi due primi meccanismi siano di breve durata, risultano essere importantissimi poiché proteggono l'organismo dall'eccessiva perdita di sangue. Successivamente si assiste all'attivazione del complemento: un gruppo di proteine che si trovano in forma inattiva nel sangue, vengono attivate come risposta a una contaminazione batterica o a complessi antigene anticorpi. Compaiono qui tre azioni fondamentali:

- 1) vasodilatazione capillare,
- 2) migrazione unidirezionale dei leucociti fagocitari nella zona (chemiotassi),
- 3) opsonizzazione, cioè rivestimento dei microbi per una più efficace fagocitosi.

Macroscopicamente è possibile osservare la dilatazione vasale e la migrazione dei liquidi proteici dal letto vascolare allo spazio interessato dalla lesione con i classici indicatori di lesioni tissutali: i classici segni dell'infiammazione: calore arrossamento tumefazione. Nell'area della ferita vi è quindi la presenza di un gran numero di leucociti in grado di ingerire i batteri e di secernere enzimi proteolitici. La presenza di questi ultimi stimola

l'afflusso di altre cellule necessarie per la cicatrizzazione. La prima cellula di tipo fagocitario presente nella zona di lesione è il neutrofilo polimorfonucleato. I neutrofili sono presenti precocemente e transitoriamente nel sito della ferita per eliminare la contaminazione batterica. Dopo 24 ore circa, dal letto vascolare alla zona interessata compare un'altra importante cellula fagocitaria: il macrofago. Oltre a determinare una distruzione dei tessuti necrotici e batterici entra attivamente nel processo di cicatrizzazione per la secrezione di fattori di angiogenesi (AGF; TGF; FGF 1,2,4; VEGF- 1 e 2). Tali sostanze stimolano la comparsa di tessuto endoteliale in prossimità del vaso lesso quando i rispettivi recettori siano espressi. In questi primi momenti del fenomeno di cicatrizzazione, fattori importanti che influenzano sia la funzione dei macrofagi che delle altre cellule sono l'umidità e il grado di ossigenazione: il processo determinato dai macrofagi verrebbe infatti rallentato dall'ipossia o dall'anossia tissutale con conseguente proliferazione batterica e rallentamento del processo di cicatrizzazione. La promozione dell'ossigenazione nella zona lesionata aiuta quindi a determinare un più rapido processo di cicatrizzazione.

Fase proliferativa

Tale fase copre un periodo che va dal 3 al 21 giorno dopo la lesione. In questo periodo la zona interessata è invasa da cellule endoteliali e fibroblasti. Le cellule endoteliali dei capillari determinano le gemmazioni vascolari: abbozzi vascolari che, unendosi, determinano una rete anastomotica da cui si originano i vasi arteriosi e venosi. I capillari appena formati sono molto fragili, per cui tendono facilmente al sanguinamento e a fenomeni di diapedesi leucocitaria tra le cellule endoteliali. Si determina un aumento del processo di mitosi delle cellule dello strato germinativo da cui consegue un aumento dello spessore. Questi elementi cellulari epiteliali si dispongono tra il derma e il coagulo verso il centro della lesione sotto il sangue coagulato che forma la crosta e origina così uno strato continuo, sebbene molto sottile, di cellule. Le cellule epiteliali migrano solo in ambiente umido.

La riepitelizzazione in qualsiasi ferita avviene attraverso le migrazioni cellulari dermiche dalla periferia al centro. La migrazione avviene secondo modalità diverse a seconda che si tratti di ambiente umido o asciutto. In caso di ferite asciutte l'epitelio migra fra il derma essiccato ed il tessuto

adiposo sottocutaneo scollando i tessuti intermedi e perciò questo avviene lentamente. In ambiente umido la migrazione cellulare avviene tra essudato e derma procedendo quindi più velocemente. L'attività ottimale di mitosi viene raggiunta solo in presenza di temperature simile a quella corporea. La proliferazione cellulare raggiunge la massima velocità di replicazione ad una temperatura compresa tra 35-37 gradi.

Il macrofago, oltre la secrezione di fattori di angiogenesi produce anche un altro fattore che stimola la produzione di fibroblasti: questi sintetizzano il collagene e la sostanza interstiziale. Con il collagene e la sostanza interstiziale si crea la trama tissutale e su di essa si viene a costituire la riparazione definitiva. A partire dalla quinta giornata a livello della lesione si può osservare la comparsa di tessuto con caratteristiche di compattezza e di colore rosso brillante determinato dalla rivascolarizzazione; questo tessuto comincia a riempire lo spazio lasciato dalla lesione. La fase proliferativa risulta favorita da un'adeguata nutrizione e da una adeguata ossigenazione della ferita.

Fase di maturazione

Dopo il 21 giorno inizia la fase più lunga del processo di cicatrizzazione. I fibroblasti continuano a secernere collagene. Mentre nel tessuto sano la trama delle fibre è disposta in modo ordinato e parallelo e il tessuto è notevolmente elastico, nel processo di cicatrizzazione le fibre sono disposte in modo disordinato, ne consegue la secrezione di enzimi denominati collettivamente collagenasi; si tratta di una famiglia di metalloproteasi in grado di lisare e di modellare il collagene, che diviene più malleabile, anche se il tessuto di riparazione non avrà mai le caratteristiche del tessuto originario.

2. Cheloidi

Un cheloide è una normale proliferazione fibrosa, localizzata nel derma e caratterizzata da sopraelevazione, estensione in senso laterale nei tessuti circostanti, crescita continuata ad andamento intermittente, assenza di regressione significativa e profonda tendenza a recidivare dopo l'ablazione [14-18].

I sintomi del prurito e del dolore sono presenti contemporaneamente nella maggior parte dei casi.

L'ulcerazione è più rara; piccole aree di infezione con tramiti fistolosi drenanti, ponti cutanei e tasche sono alquanto più comuni. Nel periodo

iniziale o durante i periodi di vivace accrescimento, la lesione tende ad essere rossastra, violacea e tesa, con modesta vascolarizzazione e piccoli vasi visibili sotto la superficie epiteliale.

In periodi più tardivi e durante i periodi di quiescenza, il cheloide è meno denso e vascolarizzato, ma resta sopraelevato e più fisso del tessuto normale. La lesione ha una spiccata predilezione per la metà superiore del corpo, con capo, collo, petto, spalle e braccia come localizzazione comune. In questa area c'è una distribuzione centripeta: la maggior densità delle lesioni si ha nella linea mediana, capo, collo e petto.

Le lesioni post-traumatiche dell'apparato tegumentario sono frequenti e spesso molto rilevanti per il danno non solo estetico ma anche funzionale che determinano. Gli interventi chirurgici eseguiti per lesioni dell'apparato locomotore sovente danno origine ad esiti cicatriziali invalidanti quali i *cheloidi* e le *cicatrici ipertrofiche*.

La regione sternale è la sede più comune di cheloidi insorgenti su traumi sconosciuti non apparenti. Comunque, anche le cicatrici addominali sono frequentemente sede di insorgenza di cheloidi, specie in sede ombelicale o pubica.

In generale, i cheloidi tendono a crescere lungo, piuttosto che attraverso le linee cutanee, qualunque sia l'iniziale orientamento della lesione. Nonostante molti cheloidi siano clinicamente inconfondibili, bisogna insistere sul fatto che alcune delle loro caratteristiche sono comuni anche alle cicatrici ipertrofiche. Questa è sopraelevata, rossastra, tesa, pruriginosa e dolente, e, all'inizio della sua evoluzione, mostra segni di accrescimento.

Tali cicatrici possono recidivare dopo l'asportazione specie se quei fattori - come la tensione e la forma - inizialmente responsabili della eccessiva formazione di tessuto cicatriziale, non sono stati modificati nella revisione.

I segni distintivi del cheloide - mancanza di regressione nel tempo, tendenza alla recidiva, estensione dentro il tessuto normale lateralmente - si manifestano col tempo.

Anatomia patologica del cheloide

Il cheloide è una massa di tessuto connettivo denso, malamente circoscritto, localizzato nel derma. Questa localizzazione dermica è significativa, in quanto i cheloidi sottomucosi sono rari o inesistenti. Non ci sono cheloidi comparsi primitivamente sotto la mucosa, ed i pochi casi riportati nella letteratura

non reggono ad una critica approfondita. Lo strato di epitelio stratificato sovrastante la lesione dermica, è appiattito e spesso assottigliato. Gli intrecci della rete e i gomitoli delle papille così come le papille dermiche, possono essere assenti e le appendici epidermiche sono ridotte o mancanti. Le fibrille elastiche sono anch'esse, in genere, assenti. Caratteristica è la presenza di fibre collagene abnormemente larghe, rigonfie, eosinofile, intrecciate, di aspetto vetroso, che formano la massa della lesione. Il margine tra la lesione ed i tessuti circostanti è stato oggetto di molti studi ed interpretazioni diverse. Qualcuno vide il cheloide come estendentesi dentro il tessuto normale per espansione e descrive un margine discreto e formato da tessuto cicatriziale compresso ma normale. Altre interpretazioni suggeriscono una progressiva trasformazione della cicatrice circostante nella caratteristica morfologica del cheloide. Negli ultimi cinquant'anni sono stati presentati diversi valori della frequenza e della attività delle mastcellule attorno al cheloide.

L'esatto punto di origine del cheloide rimane oscuro. E' stato suggerito che le lesioni si formino nella avventizia dei vasi e che la estensione

ramificante del cheloide ne sia una conseguenza. Il tessuto connettivo che chorion e gli involucri delle ghiandole sudoripare e dei follicoli piliferi sono stati anch'essi chiamati in causa. Piccoli fasci di fibre collagene anormali sono state notate nel derma di lesioni cheloidi recenti.

La presenza di fibroblasti nelle sezioni istologiche di routine di un cheloide, è irrilevante. L'attività mitotica non è marcata nei cheloidi recenti ed è molto rara nelle lesioni mature. Un esempio inequivocabile di trasformazione maligna in cheloidi non irradiati non è stato ancora dato.

Diagnosi differenziale: cicatrice ipertrofica o cheloide?

Sebbene nella pratica clinica sia alquanto difficile distinguere tra la cicatrice ipertrofica ed il cheloide, tale distinzione è di cruciale importanza sia ai fini terapeutici che prognostici. Infatti, mentre la prima può evolvere anche spontaneamente verso la guarigione, il secondo ha un esito sempre irreversibile se non addirittura suscettibile di una ulteriore evoluzione morbosa.

Macroscopicamente le caratteristiche differenziali sono:

a) la cicatrice ipertrofica rimane circoscritta nell'ambito della lesione e con il tempo può attenuarsi o regredire;

b) il cheloide si estende alla cute circostante mediante tralci fibrosi, tende a cronicizzare o addirittura ad aumentare nel tempo;

Tuttavia le differenze più importanti si apprezzano solo all'esame microscopico.

Gli studi più recenti evidenziano le notevoli differenze anatomo-patologiche e istologiche tra le due lesioni. In entrambe vi è certamente un abnorme accumulo di collagene prodotto dai fibroblasti ma, mentre nella cicatrice ipertrofica predomina l'evoluzione dei fibroblasti in mio-fibroblasti e cioè in elementi cellulari dotati di attività contrattile, nel cheloide tale evoluzione è inesistente. Ne deriva che la cicatrice ipertrofica ha capacità retrattili di tipo "cellulare" mentre il cheloide ne è privo perché essenzialmente "acellulare" [18].

Tale profonda diversità è stata ben documentata da numerosi studi.

In estrema sintesi si può dire che l'evoluzione cicatrizzale di una lesione cutanea è regolata da due fattori normalmente in equilibrio tra di loro: il TGF- β (*cytochine transforming growth factor β*) e l'ossido

nitrico(NO). Entrambi sono in grado di stimolare la produzione del collagene.

Tuttavia mentre il TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) stimola la trasformazione dei fibroblasti in mio-fibroblasti [19], l'NO la inibisce [20].

In condizioni di normalità esiste un sostanziale equilibrio tra i due fattori e la cicatrice evolverà fisiologicamente. Laddove invece si verifichi il predominio dell'uno rispetto all'altro si determinerà l'evoluzione o in cicatrice ipertrofica o in cheloide.

L'aumento di ossido nitrico nel tessuto cheloide è determinato dalla maggiore attività dell'enzima i-NOS (*inducibile nitric oxide synthase*) in luogo del normale bilanciamento tra forma costitutiva (c-NOS) e quella inducibile i-NOS [21-22].

Come si vede, anche nel caso delle lesioni cutanee, così come in tanti altri processi patologici dell'organismo, l'ossido nitrico i-NOS dipendente gioca un ruolo fondamentale.

E' stato inoltre riscontrato un notevole aumento della vascolarizzazione locale sia nelle cicatrici ipertrofiche che nei cheloidi anche se molti di questi vasi risultano in parte o del tutto occlusi [23].

L'iper-vascularizzazione è comune ai due processi in quanto può essere indotta tanto dall'ossido nitrico quanto dal fattore TGF- β .

Eziologia

Molti fattori eziologici sono stati ritenuti responsabili della insorgenza dei cheloidi.

La razza e l'eredità sembrano più importanti nella suscettibilità al cheloide, che qualunque altro fattore generale conosciuto.

I fattori locali sembrano giocare un ruolo importante nel problema, in quanto molti individui con cheloidi hanno altre cicatrici, il cui comportamento ed aspetto sono normali.

Cosa siano questi fattori locali, è difficile da stabilire. Può essere attribuita una certa importanza alla tensione della ferita, l'orientamento di questa rispetto alle linee cutanee, la presenza o assenza d'infezione e se vi fu o no una guarigione per *primam*.

Infine la notoria predilezione dei cheloidi per le razze e per zone cutanee più fortemente pigmentate si spiega considerando che l'ossido nitrico influisce notevolmente anche sulla biosintesi della melanina da parte dei melanociti mediante l'attivazione dell'enzima tirosinasi [24].

Quindi laddove esista già normalmente una maggiore produzione di ossido nitrico ai fini della formazione di melanina più facilmente potrà verificarsi l'insorgenza di un cheloide.

Cheloide: incidenza

La mancanza di una conferma anatomo-patologica che conforti la diagnosi clinica, confonde la maggior parte degli studi sul problema dei cheloidi.

L'attuale incidenza dei cheloidi in ogni vasto gruppo di popolazione, resta indeterminata.

Poiché i cheloidi sono certamente più frequenti nei negri che nei bianchi, la relativamente asintomatica natura di molti cheloidi e la ripugnanza della maggior parte degli individui a perder tempo per cercare un trattamento per problemi minori, deve essere tenuto presente nella valutazione delle cifre per la relativa incidenza nelle due razze.

Le parodontopatie

Le parodontopatie sono infiammazioni del parodonzio, ovvero dei tessuti di sostegno del dente. Esse possono interessare il parodonzio marginale (gengiviti) e profondo (parodontiti). Solitamente le parodontopatie sono determinate da fattori locali (placca batterica) ma possono concorrervi anche fattori iatrogeni (otturazioni e protesi mal

eseguite), e fattori generali. I fattori "generali" predisponenti all'insorgenza delle gengiviti e parodontopatie sono:

- fattori endocrini,
- fattori ematologi,
- fattori nutrizionali,
- fattori farmacologici.

Anche le malocclusioni, il digrignamento dei denti, e il fumo sono correlati all'insorgenza di gengiviti e parodontiti. L'accumulo di placca batterica e tartaro, legati a scarsa igiene orale, sono le cause più frequenti di gengiviti e parodontiti.

Le gengiviti si manifestano inizialmente con arrossamento e tumefazione della gengiva e sanguinamento gengivale durante lo spazzolamento dei denti.

Le parodontiti si verificano a seguito dello scollamento del bordo gengivale dal dente e della formazione delle "tasche parodontali". Con l'interessamento dei tessuti profondi di sostegno del dente si ha un progressivo aumento della mobilità dentale, accompagnato da retrazione della gengiva e, talvolta, da dolore e formazione di pus per ascesso

parodontale. Se non contrastato, questo processo patologico porta alla perdita del dente.

La causa diretta della gengivite è l'accumulo della placca sull'orlo gengivale.

Stadio 1: la gengivite è caratterizzata da un'infiemmazione delle gengive che incominciano a scollarsi dai denti;

Stadio 2: se non viene trattata, la gengivite degenera in parodontite; in questa fase le gengive continuano a ritirarsi e il tessuto osseo sottostante comincia a deteriorarsi;

Stadio 3: la parodontite avanzata è caratterizzata da grave perdita dell'osso alveolare e ulteriore scollamento.

Congiuntivite

La congiuntiva è quella membrana trasparente che si trova sopra la parte bianca dell'occhio. L'infiemmazione di questa membrana è chiamata congiuntivite. Le congiuntiviti, sono le più comuni infezioni oculari e sono caratterizzate da edema palpebrale, iperemia congiuntivale, a volte secrezione catarrale o mucopurulenta, lacrimazione, senso di corpo estraneo ed eventuale presenza di emorragie sotto-congiuntivali.

Congiuntivite: sintomi e segni. Il più ovvio sintomo della congiuntivite è il rossore all'occhio, dovuto ad una infiammazione. Le congiuntiviti possono anche causare dolori o prurito. La congiuntivite si differenzia, in relazione alla gravità dell'infiammazione, in congiuntivite semplice, congiuntivite infettiva, congiuntivite allergica, congiuntivite giganto-papillare.

Congiuntivite semplice. Scatenata da agenti esterni, quali polvere o abbagliamento, provoca un fenomeno infiammatorio con conseguente fotofobia, dolore e lacrimazione.

Congiuntivite infettiva. Causata dalla presenza nel sacco congiuntivale di una infezione con sintomi di maggiore intensità rispetto ad una congiuntivite semplice. La congiuntivite virale di solito si presenta in un solo occhio e causa un'eccessiva lacrimazione e leggera secrezione purulenta. La *congiuntivite batterica* interessa entrambi gli occhi e causa una pesante secrezione purulenta, a volte verdognola.

Congiuntivite allergica. Interessa entrambi gli occhi e causa prurito e arrossamento negli occhi e qualche volta nel naso, così come eccessiva lacrimazione. Le forme allergiche, in assoluto le più frequenti, sono

spesso stagionali, croniche, caratterizzate da esacerbazione e remissioni. Possono comparire in soggetti atopici, associate ad eczemi o più raramente a broncospasmo. Il segno clinico distintivo è la presenza di prurito accompagnato e sostituito da manifestazioni "ticcoidi". In genere sono ben controllate da colliri antistaminici. Una forma più rara e severa è la congiuntivite primaverile (vernal secondo gli autori americani) è una manifestazione oculare atopica mediata dalle IgE. Oggi si ritiene che sia l'esposizione alle radiazioni UV ad avere un effetto scatenante. I sintomi sono rappresentati da prurito e fotofobia, che spesso si associano a lacrimazione intensa e secrezione viscosa e si accentuano in condizioni ambientali caldo-umide (peggiora spesso in estate).

Congiuntivite giganto-papillare. Di solito interessa entrambi gli occhi e causa intolleranza alle lenti a contatto, prurito e pesante secrezione purulenta e lacrimazione. Le alterazioni congiuntivali interessano prevalentemente la congiuntiva tarsale e sono costituite da papille, secondarie all'ipertrofia dei follicoli linfatici ivi presenti, che danno alla mucosa un aspetto caratteristico ad "acciottolato romano". Le papille possono essere di dimensioni così

importanti da determinare una sofferenza corneale per il continuo sfregamento durante i movimenti di ammiccamento. L'ipertrofia dei follicoli linfatici limbari può produrre delle lesioni epiteliali biancastre denominate noduli di Trantas.

La poliposi nasale

La poliposi nasale può essere definita una malattia cronica della mucosa nasale; frequentemente si associa a malattie allergiche, ad intolleranze ad alcuni farmaci (acido acetilsalicilico, penicillina e derivati) e a disordini immunitari. L'eziologia è del tutto ignota. Il polipo nasale, quindi, non rappresenta la malattia, ma il "sintomo" più evidente di essa. La poliposi nasale è una malattia che si riscontra nel 1-4% della popolazione. Tale incidenza aumenta notevolmente se vengono presi in considerazione alcuni gruppi di persone con diverse patologie nasali.

I polipi nasali derivano da un edema (processo infiammatorio) della mucosa che riveste la parete alta delle fosse nasali. Da questa area, denominata etmoide anteriore, originano i polipi che tendono ad espandersi e quindi ad ostruire le cellule etmoidali, i seni paranasali (mascellare, frontale, ed in qualche caso sfenoidale) e le fosse nasali. La prima

manifestazione dei polipi è un ispessimento diffuso o circoscritto associato ad un rigonfiamento della mucosa. Se i fattori eziologici continuano ad agire, il passaggio successivo è la formazione di un'area mucosa alterata, a base ampia, più o meno definita, dalla quale si sviluppano i polipi. L'aspetto di queste neoformazioni è di solito traslucido, di consistenza molle e colore giallastro, anche se non mancano variazioni in relazione al tipo di paziente ed all'estensione della patologia. Nella patogenesi della poliposi nasale un ruolo importante è svolto da una sindrome allergica o iperergica (oltre 50-60% dei casi), o da una anomalia del metabolismo dell'acido arachidonico (contenuto in molti alimenti), per cui i pazienti affetti dalla malattia devono evitare l'assunzione di frutta secca, salmone, ostriche, caviale e di tutti gli oli di semi, aspirina e FANS.

La cellulite o pannicolopatia edemato-fibro-sclerotica

Indica una condizione alterata del tessuto sottocutaneo ricco di cellule adipose. Si tratta di una alterazione del tessuto connettivo sottocutaneo caratterizzato da ipertrofia delle cellule adipose, ritenzione idrica e stasi di liquidi negli spazi intercellulari. L'equilibrio del sistema venoso e linfatico (la linfa è un liquido che raccoglie i

materiali di scarto dell'organismi e scorre in canali del sangue) è modificato con un rallentamento del flusso sanguigno e una ritenzione di liquidi da parte dei tessuti. Esistono diverse tipologie di cellulite determinate dalla prevalenza di una delle tre fasi di progressione della patologia:

- Fase edematosa: si crea un edema o accumulo di liquidi nel tessuto adiposo sottocutaneo, soprattutto intorno alle caviglie, ai polpacci, alle cosce e alle braccia.

- Fase fibrosa: alla ipertrofia iniziale del tessuto adiposo segue una fibrosi di tutto il tessuto connettivo sottocutaneo con la formazione di piccoli noduli e cute a buccia d'arancia.

- Fase sclerotica: alle due fasi precedenti segue una sclerosi diffusa del tessuto connettivo sottocutaneo con la conseguente formazione di noduli duri di grandi dimensioni. La superficie è fredda e dolente.

La cellulite compatta colpisce soprattutto i soggetti in buona forma fisica con una muscolatura tonica poco mobile: la zona più interessata è spesso dolente e sulla cute compaiono delle smagliature, si localizza sulle ginocchia, cosce e sui glutei. Raramente dolorosa al tatto o spontaneamente, si accompagna quasi sempre a segni di affaticamento

venoso o linfatico di ritorno degli arti inferiori. Si notano: facilità all'ematoma ed alle smagliature, espressione quest'ultima di un disagio delle fibre elastiche del derma (secondo strato della pelle). È la forma più facile da trattare ed i risultati possono essere talvolta spettacolari.

La cellulite flaccida colpisce persone di mezza età che hanno tessuto ipotonico o in soggetti che variano di peso. La cellulite molle è costituita da infiltrati mobili con presenza di noduli sclerotizzati; si localizza all'interno delle cosce e delle braccia.

La cellulite edematosa è caratterizzata dalla presenza di una componente idrica: ristagno liquido dei glutei e del bacino conferiscono ai tessuti un aspetto gonfio e spugnoso. È molto dolente al tatto e spesso anche spontaneamente. È sempre associata ad una cattiva circolazione venosa e linfatica degli arti inferiori: inizialmente compare solo un senso di pesantezza e di tensione alle gambe ed ai piedi; col passare degli anni si possono aggiungere segni più marcati di insufficienza venosa fino ad avere la presenza di gonfiori tali che la digitopressione lascia un incavo (fovea) persistente sulla pelle. Questa forma costituisce lo stadio finale della

degenerazione ed è caratterizzata da tessuto spugnoso, cascante in posizione eretta ed oscillante durante la deambulazione. Alla palpazione il tessuto muscolare è praticamente inconsistente. La terapia è estremamente difficile ed inizialmente deludente. Gli esercizi ginnici mirati giocano un ruolo fondamentale. Colpisce prevalentemente la parte bassa delle gambe, i piedi e le caviglie dando origine alle cosiddette "gambe a colonna".

Patologie di interesse veterinario

Le ferite si presentano come soluzioni di continuo del tegumento associate ad edema, emorragia, essudazione ed eventuale suppurazione, accompagnate o meno da tessuto di granulazione. Sono eventi frequenti in medicina veterinaria in relazione a morsicature o traumi di varia natura (stradali e non). Se tali ferite non vengono prontamente trattate con terapia antibiotica sistemica tendono a svilupparsi infezioni batteriche che alterano il processo di guarigione e riparazione dei tessuti coinvolti.

Dermatite pìotraumatica

E' una malattia dovuta ad autotraumatismo ed indotta dal cane stesso in risposta ad uno stimolo pruriginoso o doloroso: In molto casi è secondaria ad uno stimolo allergico, parassitario od irritativo.

Sono predisposti soggetti di razze a pelo lungo e con folto sottopelo quali il Golden Retriever, il Labrador Retriever, il Collie, il Pastore Tedesco ed il San Bernardo. Clinicamente si osserva una lesione singola formatasi in poche ore, dopo leccamento e mordicchiamento, caratterizzata da alopecia, eritema ed essudato fibrino granulocitario. La superficie può essere colonizzata secondariamente da batteri. Le zone corporee interessate sono la groppa, la base della coda e la regione preauricolare. Ai fini della risoluzione della dermatite è fondamentale indagare e trattare la possibile malattia predisponente.

Dermatite ulcerativa scrotale

E' una malattia ulcerativa scrotale secondaria a cause irritative, allergie da contatto, dermatite atopica od eruzioni fisse da farmaci. Clinicamente si caratterizza per la presenza di eritema, erosioni ed ulcerazioni confluenti della cute scrotale, estremamente dolorose ed accompagnate da essudato fibrino granulocitario con sovracrescita batterica. La risoluzione della malattia è correlata al controllo delle cause predisponenti.

Dermatite acrale da leccamento (granuloma apicale da leccamento)

E' una lesione cutanea indotta dall'animale stesso localizzata sulla parte dorsale dell'estremità degli arti. Si presenta come una lesione alopecica ulcerata ed ispessita , abitualmente localizzata alle estremità degli arti in posizione dorsale. Il costante leccamento e mordicchiamento possono esitare nella comparsa di infezioni batteriche secondarie e fibrosi con comparsa di lesioni nodulari od a placca simil neoplastiche.

Dermatite autotraumatica della testa e del collo

Nel gatto si tratta di una lesione alopecia, ulcerativa e crostosa su base autotraumatica con complicanze batteriche secondarie che può essere secondaria a malattia pruriginosa cronica di origine parassitaria od allergica. Il protratto autotraumatismo produce inoltre marcata fibrosi.

I trattamenti terapeutici

La ferita cutanea può essere considerata appunto "patologia nella patologia" e riguardare per questo una grande varietà di specializzazioni. In dermatologia si vede la lesione cutanea come conseguenza del prurito; in chirurgia si è costretti a provocarla per accedere alle strutture sottostanti; in ortopedia ci si imbatte nel problema nella ricomposizione di una frattura esposta; in neurologia

si affronta la piaga da decubito conseguente alla paresi.

Inoltre l'invecchiamento dell'epidermide determina una certa rarefazione della riproduzione cellulare, tipica dello strato germinativo della pelle e la diminuzione dello strato di cellule malpighiane di estrema importanza per l'epidermide; lo strato corneo con il passare del tempo appare incartapecorito, ruvido e disidratato.

Appare chiaro come l'esito della riparazione e cicatrizzazione di cute e/o sottocute danneggiati dipenda da diversi fattori quali: le caratteristiche e l'entità della lesione; l'età del soggetto; la specie e la razza; le caratteristiche individuali del soggetto (genetiche, ormonali, immunitarie); il sesso.

Tra i requisiti indispensabili per il trattamento della ferita, il primo posto va senz'altro attribuito ad una accurata pulizia della sede interessata dalla soluzione di continuo. Solo dopo queste necessarie premesse è possibile procedere alla ricostruzione vera e propria, prestando attenzione ad osservare alcuni principi basilari, che prevedono, tra l'altro, l'accortezza di ripristinare il più possibile i rapporti anatomici originali e l'attenzione a limitare la tensione tra i lembi della ferita. Difficoltà di

trattamento possono derivare sia dalla tipologia della ferita (tagli slabbrati, in particolare a forma di 7, tendono ad ostacolare la corretta riparazione), sia dalla localizzazione della stessa (ferite che interessano labbra, narici o palpebre creano non pochi problemi sia estetici che funzionali). Notevole importanza viene infine attribuita alla profilassi delle infezioni e al controllo dell'eventuale esuberanza del tessuto di granulazione.

L'esperienza in medicina umana insegna comunque che la conoscenza della biologia cellulare e molecolare della cute, unitamente all'analisi dei processi infiammatori che si instaurano in questo distretto, rappresentano una componente vitale per lo sviluppo di metodi migliori nella gestione terapeutica delle ferite. *In primis*, appare fondamentale l'inquadramento della cicatrizzazione cutanea come processo dinamico, basato su una serie di interazioni integrate tra cellule e matrice connettivale, in cui una precoce reazione infiammatoria acuta si rivela essenziale e benefica, mentre viraggi infiammatori cronici danneggiano il tessuto ed inibiscono la riparazione. Un ruolo chiave nel controllo della cicatrizzazione viene attribuito alle citochine, che modulano le diverse fasi della chiusura e del

rimodellamento di una ferita. La secrezione ed il rilascio di queste sostanze può essere influenzato in vari modi, compreso l'uso controllato di laser a basso livello di ultrasuoni: i modelli finora sviluppati per studiare *in vitro* l'azione di questi ed altri stimoli consentono ad oggi di far avanzare più rapidamente le ricerche in questo campo. Un altro importante settore, in cui il *management* delle ferite è significativamente avanzato nell'uomo, riguarda lo sviluppo di medicazioni (*dressing*) interattive. La loro funzione è quella di proteggere la ferita, promuovendo nel contempo la rimozione di essudati prodotti in eccesso e di materiali tossici, e consentendo gli scambi gassosi.

Quando se ne rende necessaria la sostituzione, essi vengono rimossi facilmente, con minimo trauma per il sottostante tessuto neoformato.

Cambiare la medicazione è importante, non solo per creare un ambiente pulito nella zona in cicatrizzazione, ma anche per garantire tipi di medicazione in sequenza, adatti allo stadio di riparazione in cui viene a trovarsi la ferita.

Sebbene si siano effettuati importanti progressi nello sviluppo di modelli animali sia *in vitro* che *in vivo*, per testare medicazioni e terapie, il

trattamento delle ferite in ambito veterinario è ancora agli albori.

Le esigenze sono per molti aspetti diverse rispetto all'uomo, non ultimo per la presenza di pelo e per il movimento dell'animale che creano significativi problemi nella capacità di trattenere *in situ* una medicazione.

I veterinari stanno lavorando sia nel piccolo animale che nel cavallo, per comprendere a fondo i meccanismi di riparazione cicatriziale dei diversi tipi di ferita, per modificare prodotti usati in campo umano, o altresì per elaborare nuovi prodotti veterinari, idonei all'applicazione pratica.

SINTESI DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione una soluzione valida ed efficace per indurre la rigenerazione del tessuto cutaneo e la rigenerazione dei tessuti connettivi *in vitro* ed *in vivo*, in ambito umano e veterinario, attraverso la creazione delle condizioni fisiologiche biochimiche e di microambiente ottimali per stimolare la vitalità e migliorare il trofismo di tessuti compromessi.

Secondo la presente invenzione tale scopo è raggiunto grazie alla composizione definita nelle

annesse rivendicazioni.

La composizione dell'invenzione è basata sulla combinazione di ioni calcio ed un enzima proteolitico, preferibilmente la papaina.

A seconda delle applicazioni e degli usi previsti, la composizione dell'invenzione può essere una composizione farmaceutica (in differenti formulazioni tessuto-specifiche), un *medical device*, una composizione cosmetica, o un mezzo di coltura cellulare per uso *in vitro*.

Come verrà descritto in maggiore dettaglio nella sezione relativa agli esempi, la composizione dell'invenzione, basata sulla combinazione di ioni calcio ed enzima proteolitico, è stata testata sia *in vitro* sia *in vivo*. I risultati ottenuti confermano la formazione di una rigenerazione e ritrofizzazione della cute, del sottocute, delle mucose e del tessuto connettivo in genere. particolarmente significativi sono i risultati istologici ottenuti *in vitro* dopo sei mesi di trattamento. La ritrofizzazione dei tessuti indotta dalla composizione dell'invenzione è morfologicamente comparabile alla condizione trofica dei tessuti integri *in vivo*, con caratteristiche istofunzionali ottimali. Si segnala che con i normali mezzi di coltura *in vitro* i tessuti provenienti da

biopsie cutanee non superano generalmente il mese di vita.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Come menzionato sopra, la presente invenzione mette a disposizione una soluzione valida ed efficace per stimolare la crescita di tessuto epidermico, dermico, mucoso e connettivo in genere, migliorare la vitalità ed il trofismo di tali tessuti quando compromessi, attraverso la creazione di condizioni adatte a favorire la rigenerazione ed il differenziamento di cellule staminali pluripotenti, native e non.

L'invenzione si fonda sull'osservazione di un particolare stimolo pro-proliferativo esercitato dalla combinazione di ioni calcio e agenti proteolitici, quali ad esempio la papaina, sulla cute, le mucose, il sottocute ed il tessuto connettivo in genere.

Gli ioni calcio attivano il processo coagulativo (la trombina si attiva in presenza di ioni calcio, dalla reazione di fosfolipidi liberati dalle cellule dei tessuti danneggiati e dalle piastrine aggregate), con un afflusso di piastrine nel derma ed il conseguente rilascio spontaneo da parte di queste di diversi fattori di crescita. In parallelo all'azione indotta dagli ioni calcio, l'enzima proteolitico (che

preferibilmente è papaina) promuove due funzioni fondamentali, ovvero: (i) l'attivazione dei fattori di crescita presenti fisiologicamente nel microambiente presenti nei tessuti danneggiati o senescenti, e (ii) l'attivazione degli stessi fattori di crescita piastrinici richiamati dagli ioni calcio, con conseguente induzione chemiotattica del comparto staminale residenziale ad un rapido differenziamento riparativo. La chemiotassi è il processo attraverso cui una cellula è in grado di rilevare gradienti di segnali chimici extra-cellulari e di muoversi nella direzione del gradiente di concentrazione. La chemiotassi gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo, nel sistema immunitario e nella rigenerazione dei tessuti.

Inoltre, ioni calcio e papaina svolgono due funzioni sinergiche fra loro, ossia: (i) con gli ioni calcio sotto forma di sali si procura una micro-dissecazione ed una esfoliazione superficiale delle ferite, eliminando le cellule seriamente danneggiate e correggendo la *disemia* (squilibrio di sali minerali nel sangue che affluisce nei capillari del derma in seguito a lesione) periferica che compare nel derma dopo un trauma; (ii) con la papaina si accelera l'assorbimento dei nutrienti presenti nella

preparazione. Inoltre, con la papaina in dose elevata, le cellule di Langerhans (strato spinoso) sono stimulate ad inglobare le sostanze estranee (eccesso di collagene) e digerirle. Tale meccanismo si è rivelato particolarmente utile nel trattamento dei cheloidi. Inoltre è noto che la papaina, oltre ad esercitare un'azione cheratolitica, possiede anche proprietà esfolianti ed antimicrobiche sull'epidermide, facilitando l'eliminazione del tessuto necrotico, la formazione di tessuto di granulazione ed impedendo fenomeni di sovrainfezione batterica o virale in sede di lesione. La papaina coadiuva inoltre il trattamento degli edemi sia post-traumatici che di origine infiammatoria, mediante un meccanismo proteolitico sulla fibrina, facilitando il drenaggio del focolaio infiammatorio ed il riassorbimento del travaso emorragico.

Queste osservazioni hanno condotto alla creazione di una composizione basata sulla combinazione di ioni calcio (Ca^{2+}) (introdotti nella composizione sotto forma di sali di calcio, preferibilmente cloruro di calcio) ed almeno un enzima proteolitico, preferibilmente la papaina.

I risultati istologici ottenuti *in vitro* dopo trattamento con la composizione dell'invenzione

confermano l'induzione di una rigenerazione e ritrofizzazione di cute, annessi cutanei, sottocute, mucose e tessuto connettivo, che si presentano morfologicamente comparabili ai tessuti integri in vivo e con caratteristiche isto-funzionali ottimali (vedere Esempio 1).

Il trattamento di tessuto bioptico senescente o compromesso in vitro con la composizione dell'invenzione risulta in una sorprendente riparazione dei danni ed in un totale recupero del trofismo originario. Tutti i tessuti rappresentati nei campioni bioptici trattati sono soggetti ad una rigenerazione completa, funzionale e morfologica, conseguente ad una possibile assenza o ridotta presenza dei processi di invecchiamento.

I risultati istologici ottenuti in vivo a partire da 7 giorni di trattamento con la composizione oggetto della presente invenzione e le sue formulazioni tessuto-specifiche (vedere la sezione relativa agli Studi Clinici), confermano all'esame istologico la formazione di una rigenerazione e ritrofizzazione di cute e sottocute, mucose e connettivo in genere con caratteristiche isto-funzionali ottimali, morfologicamente comparabili a tessuti cutanei e sottocutanei, mucosi e connettivi integri in vivo.

In dettaglio, la composizione oggetto della presente invenzione comprende i seguenti elementi essenziali:

- un agente proteolitico, preferibilmente papaina; e
- ioni calcio, come sali di calcio o calcio in oligoelementi.

Inoltre, in una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la composizione basata sui due componenti essenziali sopra definiti comprende anche ulteriori ingredienti attivi, selezionati per la loro attività potenziante e sinergica ai due principi attivi sopra definiti, in modo specifico per ogni tipologia tissutale da trattare. Sono state ideate diverse modalità di realizzazione di composizioni specifiche, destinate al trattamento cosmetico e/o alla riparazione tissutale cutanea, sottocutanea, mucosa (per esempio nasale, congiuntivale), connettivale (per esempio parodontale). Tali composizioni sono definite nelle annesse rivendicazioni, che formano parte integrante della descrizione brevettuale. Tali composizioni sono state testate fornendo risultati ottimali, in termini di crescita e sviluppo di tessuto cutaneo, sottocutaneo, mucoso e connettivo con caratteristiche istofunzionali normali. Le composizioni dell'invenzione

preparate come mezzi di coltura sono inoltre state testate per verificare la loro efficacia nella conservazione della vitalità di campioni biotici. Tutti i campioni biotici di tessuto cutaneo e connettivo testati hanno risposto positivamente all'impiego dei mezzi di coltura dell'invenzione restando vitali, depositando matrice ed avendo una distribuzione ordinata e tridimensionale durante almeno sei mesi di coltura *in vitro*, contro i 20-30 giorni di vita raggiungibili con i normali mezzi di coltura. Senza volersi vincolare ad alcuna teoria specifica al riguardo, i presenti inventori ritengono che i risultati ottenuti con i mezzi di coltura oggetto della presente invenzione abbiano permesso di dimostrare che lo stato di atrofia cutanea in corso in processi degenerativi è recuperabile.

Esempi di composizioni tessuto specifiche

1) *Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.*

Composizione QParodontal-BASE

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Eccipienti	
Acido glicirretico	2000 mg/L

Calcio Gluconato	100 mg/L
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

2) Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.

Composizione QParodontal-BASE-Plus

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Eccipienti	
Acido glicirretico	2000 mg/L
Calcio Gluconato	100 mg/L
Propoli in sol.idroalcoolica (15 ml)	45 ml per 1 L di soluzione
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

3) Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.

Composizione QParodontal-BASE-Gel

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Eccipienti	
Acido glicirretico	2000 mg/L
Calcio Gluconato	100 mg/L
cellulosa polvere	50 g/L (soluzione al 5%)
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

4) Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.

Composizione Q-Parodontal-BASE-GelPlus

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Eccipienti	
Acido glicirretico	2000 mg/L
Calcio Gluconato	100 mg/L
cellulosa polvere	60 g/L (soluzione al 6%)
Propuli in sol.idroalcoolica (15ml)	45 ml per 1 L di soluzione
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

5) Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.

Composizione QParodontal-Ial

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L (0,1g/L)
Acido glicirretico	2000 mg/L
Calcio Gluconato	100 mg/L
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

6) Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.

Composizione QParodontal- Ial-Plus

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L (0,1g/L)
Acido glicirretico	2000 mg/L
Calcio Gluconato	100 mg/L
Propoli in sol. idroalcoolica (15 ml)	45 ml per 1 L di soluzione
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

7) Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.

Composizione QParodontal- Ial-Gel

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Acido Ialuronico	10000,00 mg/L (10g/L)
Acido glicirretico	2000 mg/L
Calcio Gluconato	100 mg/L
cellulosa polvere	60 g/L (soluzione al 6%)
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

8) Tessuto mucosa orale e tessuto parodontale.

Composizione Q-Parodontal- Ial-GelPlus

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	

Calcio Cloruro	1200 mg/L
Papaina FU	2,00 mg/L
Acido Ialuronico	10000,00 mg/L (10g/L)
Acido glicirretico	2000 mg/L
Calcio Gluconato	100 mg/L
cellulosa polvere	60 g/L (soluzione al 6%)
Propuli in sol.idroalcoolica (15ml)	45 ml per 1 L di soluzione
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

9) Tessuto mucosa nasale

Composizione QNasal-BASE

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	1200 mg/kg
Papaina FU	0,20 mg/kg
Eccipienti	
Sodio fosfato bibasico	0,18 g/kg
Sodio fosfato monobasico	0,17 g/kg
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

10) Tessuto mucosa oculare.

Composizione QOcular-BASE

Sostanza	Concentrazione
Principi attivi	
Calcio Cloruro	450 mg/L
Papaina FU	0,02 mg/L

Eccipienti	
Sodio cloruro	0,1%
Benzalconio Cloruro	0,1%
Blu di metilene	2,5 mg/L
Acqua distillata	q.b. per 1 L di soluzione

11) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

Composizione Q-BASE-MD GEL (medical device)

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/kg
Papaina FU	22,00 mg/kg
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/kg o $10^{-7}M$
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/Kg
Acido Retinoico	0,0020 mg/kg
Acido Ialuronico	10.000 mg/kg
Acido Ascorbico	400,00 (2,2gr/Kg)
Argento proteinato	400 mg/kg
Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/kg
BASE in gel (carbopol o derivati della cellulosa)	q.b. per kg di prodotto

12) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

Composizione Q-BASE-CREMA

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/kg
Papaina FU	22,00 mg/kg

Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/kg o 10 ⁻⁷ M
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/kg
Acido Retinoico	0,0020 mg/kg
Acido Ialuronico	10.000 mg/kg
Acido Ascorbico	400,00 mg/kg
Argento proteinato	400 mg/kg
Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/kg
BASE in forma di crema o emulsione (O/A oppure A/O) (quale: acqua, vaselina bianca, cetostearil alcool, paraffinum liquidum, ceteth-20, sodio fosfato, p-cloro-m-cresolo, acido fosforico)	q.b. per kg di prodotto

13) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

Composizione Q-BASE-INFUS (liquido infusione)

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/L
Papaina FU	22,00 mg/L
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/L o 10 ⁻⁷ M
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/L
Acido Retinoico	0,0020 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L
Acido Ascorbico	400,00 mg/L
Argento proteinato	400 (0,4gr/L)

Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/L
Soluzione fisiologica	q.b. per L di soluzione

14) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

Composizione QCell-BASE-CREMA

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/kg
Papaina FU	22,00 mg/kg
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/kg o $10^{-7}M$
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/kg
Acido-Gamma-Amino-Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Retinoico	0,0020 mg/kg
Acido Ialuronico	1000 mg/kg
Acido Ascorbico	400,00 (2,2g/kg)
Carnitina	0,05 % p/v totale
Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/kg
BASE in forma di crema o emulsione (O/A oppure A/O) (quale: acqua, vaselina bianca, cetostearil alcool, paraffinum liquidum, ceteth-20, sodio fosfato, p-cloro-m-cresolo, acido fosforico)	q.b. per kg di prodotto

15) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

Composizione QCell-BASE-Gel

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/kg
Papaina FU	22,00 mg/kg
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/kg o 10 ⁻⁷ M
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/kg
Acido-Gamma-Amino-Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Retinoico	0,0020 mg/kg
Acido Ialuronico	1000 mg/kg
Acido Ascorbico	400,00 mg/kg
Carnitina	0,05 % p/v totale
Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/kg
BASE in gel (carbopol o derivati della cellulosa)	q.b. per kg di prodotto

16) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

Composizione QCell-BASE-Infus

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/L
Papaina FU	22,00 mg/L
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/L o 10 ⁻⁷ M
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/L
Acido-Gamma-Amino-Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Butirrico	0,06 % p/v totale

Acido Retinoico	0,0020 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L
Acido Ascorbico	400,00 mg/L
Carnitina	0,05 % p/v totale
Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/L
Soluzione fisiologica	q.b. per L di prodotto

17) Biopsie di Tessuto cutaneo e/o connettivo.

Mezzo di coltura Q-BASE

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/L
Papaina FU	22,00 mg/L
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/L o $10^{-7}M$
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/L
Acido Retinoico	0,0020 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L
Acido Ascorbico	400,00 mg/L
Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/L
Terreno di coltura F12	10 ml
Soluzione MEM di aminoacidi non essenziali	20 ml
Soluzione di HANK	2 ml
Siero autologo o suo sostitutivo	4 ml
D-MEM	q.b. a 1 L di soluzione

18) Biopsie di tessuto cutaneo e/o connettivo.

Mezzo di coltura Q-BASE-Gel

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/L
Papaina FU	22,00 mg/L
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/L o 10^{-7} M
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/L
Acido Retinoico	0,0020 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L
Acido Ascorbico	400,00 mg/L
Miscela degli L-aminoacidi naturali	28,5g/L
Terreno di coltura F12	10 ml
Soluzione MEM di aminoacidi non essenziali	20 ml
HANK'S solution	2 ml
Siero autologo o suo sostitutivo	4 ml
D-MEM	q.b. a 1 L di soluzione
Scaffold di collagene per colture gel	q.b.

19) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

composizione QAntiAging-BASE-Gel

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/Kg
Papaina FU	22,00 mg/Kg

Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/Kg o 10 ⁻⁷ M
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/Kg
Acido-Gamma-Amino-Butirrico	0,06% p/v totale
Acido Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Retinoico	0,0020 mg/kg
Acido Ialuronico	1000 mg/kg
Acido Ascorbico	400,00 mg/kg
Carnitina	0,05 % p/v totale
BASE in gel (carbopol o derivati della cellulosa)	q.b. per kg di prodotto

20) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

composizione QAntiAging-BASE-CREMA

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/kg
Papaina FU	22,00 mg/kg
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/kg o 10 ⁻⁷ M
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/kg
Acido-Gamma-Amino-Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Retinoico	0,0020 mg/kg
Acido Ialuronico	1000 mg/kg
Acido Ascorbico	400,00 mg/kg
Carnitina	0,05 % p/v totale

BASE in forma di crema o emulsione (O/A oppure A/O) (quale: acqua, vaselina bianca, cetostearil alcool, paraffinum liquidum, ceteth-20, sodio fosfato, p-cloro- m-cresolo, acido fosforico)	q.b. per kg di prodotto
--	-------------------------

21) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

composizione QAntiAging-BASE-INFUS

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/L
Papaina FU	22,00 mg/L
Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/L o $10^{-7}M$
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/L
Acido-Gamma-Amino-Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Retinoico	0,0020 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L
Acido Ascorbico	400,00 mg/L
Carnitina	0,05% p/v totale
Soluzione fisiologica	q.b. per L di prodotto

22) Tessuto cutaneo e sottocutaneo.

composizione QAntiAging-BASE-Lozione

Sostanza	Concentrazione
Calcio Cloruro	1100 mg/L
Papaina FU	22,00 mg/L

Desametasone 21-fosfato disodico	44 ug/L o $10^{-7}M$
Scopolamina (Butilbromuro)	4 mg/L
Acido-Gamma-Amino-Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Butirrico	0,06 % p/v totale
Acido Retinoico	0,0020 mg/L
Acido Ialuronico	100,00 mg/L
Acido Laurico (e/o Olio di canfora)	0,2% Totale in p/v
Acido Ascorbico	400,00 mg/L
Carnitina	0,05% p/v totale
Soluzione fisiologica	q.b. per L di prodotto

Razionale di composizione

La presente invenzione si fonda sull'osservazione di un particolare stimolo pro-proliferativo esercitato dalla combinazione di ioni calcio e agenti proteolitici, preferibilmente la papaina, eventualmente addizionati di ulteriori componenti attivi, quali acido retinoico, scopolamina, desametasone, acido ialuronico, acido butirrico e/o GABA, acido laurico e/o canfora, acido ascorbico, carnitina o suoi sali ed esteri, sulla cute, sulle mucose, sul sottocute e sui tessuti connettivi.

Le attività degli ioni calcio e degli enzimi proteolitici, in particolare la papaina, sono già

state ampiamente illustrate nella presente descrizione brevettuale.

Gli ioni calcio vengono preferibilmente introdotti nelle composizioni dell'invenzione sotto forma di sali di calcio, preferibilmente sali inorganici. Oltre al cloruro di calcio menzionato nelle precedenti tabelle, citiamo a titolo esemplificativo il gluconato di calcio, fosfato di calcio, il nitrato di calcio e le loro combinazioni.

Come enzimi proteolitici, oltre alla già citata papaina, possono venire utilizzati ad esempio collagenasi (preferibilmente di tipo Ia, tipo II, tipo IV), serratiopeptidasi, eparanasi, DNAsi, elastasi, bromelaina, bradichinasi, *Clostridium* peptidasi, enzimi espressi da *Lactobacillus acidophilus*, enzimi espressi dal genere *Aspergillus*, proteasi, aliinasi, fibrinolisinasi.

L'acido retinoico (vitamina A) e la retinaldeide (retinoide) potenziano una nutrizione corretta dei tessuti, portando al graduale ripristino fisiologico del microambiente di cute e sottocute (ripristino del corretto pH e potere antiossidante). Inoltre, più in generale, le vitamine nell'organismo svolgono numerose funzioni biologiche relative al complesso processo del differenziamento cellulare. In più, alcune patologie

interessanti la cute e sottocute (ad esempio atrofie o distrofie cutanee) sono causate dalla carenza o dal mancato assorbimento di vitamine.

L'acido ascorbico (vitamina C) viene aggiunto in alcune forme di realizzazione della composizione in quanto esso promuove la rigenerazione (formazione e maturazione) del collagene nel derma danneggiato e nella membrana basale.

Il desametasone (corticosteroide) e la scopolamina (parasimpaticolitico), utilizzati a dosi prive di qualsiasi effetto farmacologico, contribuiscono alla normalizzazione del microambiente loco-regionale, promuovendo un ideale scambio ionico sodio-calcio e favorendo la correzione della concentrazione elettrolitica alterata a valori fisiologici: essi sostengono un ruolo ausiliario nel consolidamento dal punto di vista osmotico, di viscosità e di pH del microambiente extracellulare in cui cute e sottocute vivono. Inoltre, ripristinando un microambiente fisiologico è possibile favorire l'attivazione nell'organismo di due meccanismi riparativi: il richiamo delle cellule staminali dal torrente circolatorio ed una accelerata specializzazione delle cellule staminali residenziali nella pelle verso un rapido differenziamento in cellule mature destinate a

ripristinare i tessuti danneggiati. In alternativa al desametasone può essere utilizzato qualsiasi altro glucocorticoide o corticosteroide, quale betametasone-di sodio-fosfato, idrocortisone, metilprednisolone, metilprednisolone emisuccinato sodico, cortisone, cortisolo, loro precursori o derivati, naturali o di sintesi.

In alternativa alla scopolamina possono essere utilizzati altri parasimpaticolitici quali adifenina, amminocarbofluorene, anisotropina, anticolinesterasici, atropina, benzatropina, ciclopentolato, clidinio, diciclomina, dicicloverina, diossilina, esociclio, etaverina, glicopirrolato, imbacina, ipratropio, mcn-a-343 (m-clorofenil-carbamolo-ossibutinil-trimetil-ammonio-cloruro), metil-scopolamina, metocramina, mepenzolato, metantelina, muscarina, omatropina, ossifenciclimina, ossifenonio, oxotremorina, piperidolato, poldina, pipenzolato, pirenzepina, pirenzepina analogo (AF-DX 116), pralidossina, propantelina, propantelina bromuri, prifinio, tiemonio, tiotropio, tolterodina, tripitramina, tropicamina, trospio, scopolamina, o scopolamina butilbromuro, N-metil-bromuro di joscina, i loro derivati e i loro alcaloidi naturali e di sintesi, nonché le loro combinazioni.

L'acido butirrico, altresì chiamato acido n-butanoico, è un acido grasso, ossia un acido monocarbossilico alifatico e come tale è un ingrediente costitutivo di quasi tutti i lipidi complessi e dei grassi vegetali e animali. All'acido butirrico è stata attribuita l'abilità di inibire le funzioni dell'enzima istone deacetilasi. Di conseguenza, esso è in grado di favorire uno stato acetilato degli istoni nella cellula. Gli istoni acetilati hanno un'affinità minore per il DNA rispetto agli istoni non acetilati, a causa della neutralizzazione delle interazioni di carica elettrostatica. Si pensa generalmente che i fattori di trascrizione non possano accedere a regioni dove gli istoni siano strettamente associati al DNA (come l'eterocromatina, che non è acetilata). Quindi, si pensa che l'acido butirrico aumenti l'attività trascrizionale verso quei fattori tipicamente messi a silenzio o inibiti a causa dell'attività di deacetilasi. Nelle formulazioni, oggetto della presente invenzione, ove inserito a basse concentrazioni sembra portare al graduale ripristino fisiologico del microambiente soprattutto sottocutaneo contrastando attivamente gli inestetismi causati dalla cellulite e promuovendo la biosintesi del collagene

da parte dei fibroblasti loco regionali (effetto anti-aging).

L'acido γ -amminobutirrico (GABA), o secondo la nomenclatura IUPAC acido 4-amminobutanoico, *in vivo* viene rilasciato da neuroni dei circuiti locali presenti nel cervello, i quali presentano un piccolo corpo neuronale e arborizzano a breve distanza formando principalmente sinapsi asso-assoniche con i neuroni di proiezione (eccitatori). Il GABA è un messaggero ubiquitario e l'attivazione o l'antagonismo a livello dei suoi recettori è il meccanismo d'azione di un gran numero di farmaci sedativi, miorilassanti, ipnotici, antiepilettici etc. *In vitro* coadiuva l'attività dell'acido butirrico promuovendo il processo di differenziamento fibroblastico e la deposizione del collagene nel pannicolo sottocutaneo.

L'efficacia dell'acido laurico e dell'olio di canfora si può ipotizzare che possa essere indotta dall'insieme di diversi meccanismi d'azione:

- 1) antagonismo selettivo locale del legame tra diidrotestosterone e recettore per gli androgeni;
- 2) inibizione della 5-alfa-reduttasi, enzima implicato nella trasformazione del testosterone in diidrotestosterone, il quale stimola la proliferazione cellulare;

- 3) azione antinfiammatoria e antiedemigena, dimostrata dalla ridotta permeabilità capillare indotta dall'istamina;
- 4) effetto antiestrogenico, dato da una forte diminuzione dei recettori per gli estrogeni,
- 5) effetto loco-regionale antisettico con funzione micro-batterio-statica.

Le attività più conosciute della carnitina e dei suoi sali ed esteri sono la beta-ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a lunga catena (dal punto di vista biochimico la carnitina svolge le proprie funzioni partecipando ad un complesso meccanismo chiamato carnitina acil-CoA transferasi) e la regolazione dell'utilizzo del glucosio. Nell'invecchiamento cutaneo si assiste all'aumento delle dimensioni degli adipociti localizzati nel tessuto sottocutaneo ed alla diminuzione sia della numerosità che delle dimensioni dei fibroblasti residenziali; la carnitina e i suoi sali ed esteri sembra possano modulare questi fenomeni istologicamente e biochimicamente. E' stato dimostrato che la componente fibrosa del tessuto connettivo dermico è soggetta a cambiamenti nel numero e nello spessore delle fibre collagene (incremento dei legami crociati dei collagene) e nell'attività metabolica dei

polisaccaridi presenti nel derma. La carnitina e i suoi esteri intervengono anche in questo caso determinando la stabilizzazione delle membrane, elemento essenziale ai fini dei processi di riparazione cellulare e per la funzionalità della stessa cellula. Ai cambiamenti sopra menzionati, si sovrappongono fattori endogeni (la produzione di radicali liberi dell'ossigeno è una delle maggiori cause di invecchiamento) e ambientali (la radiazione solare) che determinano sia un'accelerazione dei processi di invecchiamento cutaneo che una trasformazione patologica del processo stesso. La capacità ottimale di reazione cellulare a stimoli nocivi durante l'invecchiamento passa attraverso il mantenimento della produzione energetica e del bilanciamento osmotico. La carnitina è coinvolta nel metabolismo intermedio dei lipidi e dei carboidrati, essenziale per la funzione cellulare.

L'acido ialuronico (preferibilmente sotto forma di sale sodico o lisinato), che è fisiologicamente presente circa all'1% nella matrice amorfa di un tessuto connettivo, ha lo scopo di ripristinare il grado di idratazione, turgidità, plasticità e viscosità della cute danneggiata. L'acido ialuronico *in vivo* è anche in grado di agire come sostanza

cementante e come molecola anti-urto nonché come efficiente lubrificante prevenendo il danneggiamento delle cellule del tessuto da stress fisici. Questa impalcatura molecolare garantisce una azione di sostegno profondo e di rigenerazione del tessuto sottocutaneo. Inoltre, si crea un *filtro* contro la diffusione libera nel tessuto di particolari sostanze, batteri, agenti infettanti.

In alternativa all'acido ialuronico possono essere utilizzati altri glicosaminoglicani, come ad esempio dei condroitinsolfati.

Le composizioni cosmetiche, farmaceutiche e del tipo *medical device* oggetto della presente invenzione possono inoltre comprendere ulteriori elementi accessori quali eccipienti e veicoli, la cui scelta e il cui impiego rientrano nelle capacità del tecnico medio del settore senza che ciò richieda l'esercizio di alcuna attività inventiva.

Anche i mezzi di coltura oggetto dell'invenzione possono comprendere ulteriori ingredienti, quali ad esempio gli usuali sali inorganici, zuccheri, peptidi, aminoacidi e vitamine necessari per il mantenimento e/o la crescita in coltura di cellule di mammifero, nonché gli eventuali agenti antibiotici e/o antimicrobici necessari ad evitare contaminazioni

delle colture.

Tra gli aminoacidi che possono essere presenti nelle composizioni dell'invenzione citiamo a titolo esemplificativo metionina, cistina, N-acetilcisteina, cisteina, glicina, leucina, isoleucina, prolina, glutamina, arginina, acido glutamico, istidina, istidina-HCl, lisina, lisina-HCl, fenilalanina, serina, treonina, triptofano, tirosina, tirosina-sale disodico, valina, prolina, idrossiprolina. Tali aminoacidi spesso sono utilizzati in miscele comprendenti un numero elevato di differenti aminoacidi. Oltre agli aminoacidi le composizioni dell'invenzione possono anche comprendere peptidi e proteine, quali glutatione, collagene, elastina, estratto di frumento, e simili.

Tra le vitamine che possono essere presenti nelle composizioni dell'invenzione citiamo, a titolo esemplificativo, acido retinoico, retinaldeide, retinolo, alfa-tocoferolo, beta-carotene, acido ascorbico, acido pantotenico, D-calcio pantotenato, piridoxina, piridoxina-HCl, acido folico, niacinamide, riboflavina, cobalamina, acido para-aminobenzoico, biotina.

Esempi di soluzioni per coltura cellulare sono ad esempio RPMI 1640 (terreno per colture cellulari),

DMEM-LG (terreno per colture cellulari), AIM-V (terreno per colture cellulari), D-MEM modificato ad alta concentrazione di glucosio (terreno per colture cellulari), EBM (terreno per colture cellulari), albumina umana, FBS (siero bovino fetale per colture cellulari), F12 (soluzione per colture cellulari contenente una fonte aminoacidica completa), soluzione di HANK (soluzione per colture cellulari contenente bicarbonato di sodio).

Infine, nella categoria degli antibiotici e antimicrobici citiamo a titolo esemplificativo gentamicina, penicillina, streptomina, ciprofloxacina, levofloxacina, metronidazolo, clorexidina; amfotericina B, fluconazolo, itraconazolo, antimicotici triazolici, argento (ha un'attività batteriostatica).

ESEMPIO 1. Biopsie e soluzioni-prototipo

Biopsie

I campioni biopsici in studio sono elencati di seguito:

- biopsie di cuoio capelluto umano;
- biopsie di cute e sottocute;
- biopsie di tessuto parodontale.

Tutti i campioni sono stati lavati tre volte con soluzione fisiologica ed antibiotici (100 unità/ml

di penicillina + 100 ug/ml streptomina + 160 mg/L gentamicina, fluconazolo 0,2 mg/ml) per 10 min a temperatura ambiente.

Le biopsie sono quindi state sezionate in tre parti (due controlli e un campione da trattarsi per ciascun paziente) e sospese in una soluzione *Mezzo di coltura Q-BASE Infus* dentro piastre (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Danimarca) di 15-cm.

Sono state preparate due tipologie di controlli, un controllo negativo (1) trattato esclusivamente con soluzione fisiologica e antibiotici (come sopra descritto), e un controllo negativo (2) trattato con terreni per coltura cellulare comuni.

1. i reperti biotici di controllo sono stati sospesi in soluzione fisiologica dentro piastre (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) di 15-cm.

2. reperti biotici di controllo sono quindi stati posti dentro piastre (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) di 15-cm in terreno D-MEM supplementato con:

10% FBS (Celbio, Milano, Italy)

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomina

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

0,2 mg/ml fluconazolo (Pfizer Italia S.r.l.),

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium).

Tutti i campioni sono stati posti in un incubatore Heraeus termostaticamente controllato alla temperatura di 37°C con una atmosfera contenente l'8% di apporto costante di CO₂ (v/v in aria).

Tutti tessuti bioptici, utilizzati in coltura costituiscono un possibile supporto opzionale co-condizionante per la crescita tridimensionale dei campioni di cellule studiati.

Protocollo di colorazione

Dopo tre lavaggi per 10 min a temperatura ambiente in PBS (pH 7,4), i campioni sono stati risospesi in una soluzione fissante di paraformaldeide al 4% in D-MEM (Gibco) con pH 7,4, per 1 ora a temperatura ambiente. Tutte le biopsie oggetto di studio sono state trattate con azzurro di Alcian blue. Questo colorante è costituito da un gruppo dei colori basici polivalenti solubili in acqua. Il colore blu è dovuto alla presenza di rame nella molecola. L'azzurro di Alcian blue in soluzione con PBS (pH 7,4) all'1% di concentrazione finale p/v viene addizionato ad una soluzione di acido acetico al 3% (pH 2,5). Questa composizione, dopo incubazione di 2 ore a temperatura ambiente, colora indelebilmente legando i mucopolisaccaridi acidi e le glicoproteine

sia solfonati che carbossilati. Per ogni campione sono stati allestiti controlli specifici. Tutti i campioni sono stati lavati 3 volte con PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente per cinque minuti e poi osservati al microscopio ottico. Si nota un netto aumento di collagene tipo 2 e collagene tipo 4, che si colorano di blu, nei campioni trattati con la soluzione *Mezzo di coltura Q-BASE* rispetto al controllo 1 ed al controllo 2 [13].

RISULTATI

Colorazione con metodo colorimetrico Alcian blue

- Controllo 1 trattato con fisiologica: lievissima colorazione di fondo appena percettibile (punteggio=+/-).
- Controllo 2 trattate con comune terreno di coltura per biopsie D-MEM, 10% FBS addizionato, come descritto sopra. Si nota una lievissima colorazione di fondo azzurrina pallida diffusa (Alcian blue, (punteggio=++)).
- Campione trattato con la soluzione *Mezzo di coltura Q-BASE*. Si nota come le cellule, in cui si è indotta una ri-deposizione di mucopolisaccaridi e glicoproteine, si colorino nettamente con Alcian blue crescendo in strati sovrapposti (punteggio=+++++).

Western blot

I campioni sono stati sottoposti ad analisi fenotipiche con Western Blot per i marcatori anti collagene tipo II (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti collagene tipo IV (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratine 1, 5, 10, 14 (Santa Cruz Biotechnology, America, California). Dopo cinque lavaggi, le membrane sono state incubate con i relativi anticorpi secondari (1:1000) coniugati con perossidasi di rafano (HRP, SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California USA) per 1h a temperatura ambiente, come riportato nelle tabelle da 4 a 10 che seguono.

Caratterizzazione del tessuto cutaneo trattato con Mezzo di coltura Q-BASE versus controlli non trattati

I risultati relativi all'espressione di collagene tipo II, collagene tipo IV e delle citocheratine 1, 5, 10 e 14 sono stati espressi con una scala quantitativa come segue:

Tabella 3

<i>Marcatori</i>	Controllo 1	Controllo 2	Campione
collagene tipo II	-/+	++	+++++
collagene tipo IV	-/+	++	+++
citocheratina 1	++	++++	+++++
citocheratina 5	+++	++++	+++++
citocheratina 10	++	++++	+++++

Marcatori	Controllo 1	Controllo 2	Campione
citocheratina 14	+++	++++	+++++

Legenda

- = assenza di banda
- /+ = lieve presenza di banda
- + = banda presente sottile
- ++ = banda presente media
- +++ = banda presente estesa
- ++++ = banda presente alta
- +++++ = banda presente effusa

ESEMPIO 2. STUDI CLINICI IN VIVO

Formulazione Q-BASE CREMA.

STUDI CLINICI IN VIVO I.

E' stato condotto uno studio clinico atto a valutare la tollerabilità e l'efficacia terapeutica nella rigenerazione e riparazione della cute e sottocute di un prodotto denominato Q-BASE-CREMA.

Il presente studio è stato condotto su di un campione costituito da otto cani e due gatti di razze e taglie diverse che presentavano lesioni cutanee ascrivibili a patologie differenti (canidi: ferite lacero contuse, deiscenza di ferita chirurgica, dermatite ulcerativa scrotale, dermatite piotraumatica, dermatite acrale da leccamento ed

ustioni; felini: dermatite autotraumatica della faccia e del collo).

Alla visita d'inclusione erano stati selezionati i soggetti affetti dalle lesioni sopra indicate. Si eseguiva un esame citologico per apposizione per valutare la presenza di sovra-infezioni in atto.

Se si osservavano infezioni concomitanti veniva prescritto un antibiotico sistemico.

La parte affetta veniva trattata con applicazione topica di soluzione fisiologica per allontanare meccanicamente la presenza di essudato e croste e poi si procedeva all'applicazione del preparato Q-BASE-CREMA due volte al dì.

L'animale veniva condotto alla visita clinica di controllo settimanalmente sino a guarigione e sottoposto all'esame citologico ed alla valutazione di estensione e profondità della lesione cutanea.

Caso 1

Boxer femmina di anni 9 operata di mastocitoma di secondo grado in area ascellare destra. Al quindicesimo giorno dall'intervento, dopo la rimozione dei punti di sutura (vicril riassorbibile 4/0), il cane presentava una deiscenza parziale della ferita a causa di auto traumatismo.

Esame clinico. Deiscenza parziale della ferita chirurgia su un tratto di 5 cm circa di lunghezza per un diametro trasversale di circa 3cm. I bordi della ferita si presentavano edematosi e congesti. Si notava un essudato siero-ematico.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava neutrofili degenerati e batteri (cocchi) in posizione intra ed extracitoplasmatici. Si rilevava una sovra infezione batterica nella parte di ferita deiscente.

Terapia. Si somministrava marbofloxacina per os a 2,5 mg /Kg per 7 gg. Si eseguiva detersione della ferita con soluzione fisiologica ed applicazione del preparato Q-BASE-CREMA due volte al di.

Visite di controllo. Dopo una settimana si osservava tessuto di granulazione con riduzione delle dimensioni della ferita pari alla metà circa, mentre citologicamente erano assenti colonie batteriche sia extra- che intra-citoplasmatiche. Alla fine della seconda settimana si rilevava la completa guarigione della ferita con formazione di un tessuto cicatriziale stabile.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo un mese dalla sospensione del trattamento la cicatrice appariva di colore biancastro, di normale resistenza e consistenza.

Caso 2

Shi-t-zu di 5 anni maschio veniva presentato alla visita clinica per una grave dermatite ulcerativa scrotale.

Esame clinico. Eritema ed edema della cute scrotale con erosioni ed ulcere, marcata dolorabilità alla palpazione. Presenza di essudato purulento. Quadro clinico riferibile a dermatite ulcerativa scrotale da contatto.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava abbondanti neutrofili degenerati e batteri (cocchi) in posizione intra ed extracitoplasmatici e presenza di numerose emazie. Si rilevava un'infezione batterica nella lesione ulcerata.

Terapia. Inizialmente si somministrava prednisone ad 1mg/kg per tre giorni per diminuire l'essudazione e marbofloxacina per os a 2,5 mg /Kg per 7 gg, con detersione della ferita con iodio-povidone giornaliera. Dopo una settimana si rilevava miglioramento del dolore, dell'edema e la scomparsa dell'infezione, ma persisteva una difficoltà alla cicatrizzazione dei tessuti cutanei ulcerati, pertanto si eseguiva detersione della ferita con soluzione fisiologica ed applicazione del preparato Q-BASE-CREMA due volte al di.

Visite di controllo. Dopo una settimana si osservava che le lesioni ulcerative erano ridotte a scarse erosioni superficiali (pari al 20 % della lesione iniziale), citologicamente erano assenti batteri; alla fine della seconda settimana si rilevava la completa guarigione della cute scrotale con progressiva pigmentazione della cute.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo due settimane dalla sospensione del trattamento si osservava normalizzazione della cute con ricrescita dei peli.

Caso 3

Cane pastore tedesco 5 anni maschio veniva presentato alla visita clinica per una lesione autotraumatica ed essudativa sul dorso (area lombosacrale).

Esame clinico. Eritema ed edema della cute con erosioni, ulcere, croste, marcata dolorabilità alla palpazione. Presenza di essudato purulento. Quadro clinico riferibile a dermatite piotraumatica secondaria a dermatite allergica da morso di pulce.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava abbondanti neutrofili degenerati e batteri (cocchi) in posizione extracitoplasmatici e presenza di alcune

emazie. Si rilevava una sovrainfezione batterica nella lesione ulcerata.

Terapia. Inizialmente si somministrava una terapia antiparassitaria spot-on adulticida (fipronil) e prednisone ad 1 mg/kg per 2 giorni, per diminuire l'essudazione ed il prurito, si detergeva la ferita con iodio-povidone il primo giorno, procedendo poi a detergere la ferita con soluzione fisiologica e ad applicare il preparato Q-BASE-CREMA 2 volte al dì nei restanti 7 giorni.

Visite di controllo. Dopo una settimana si rilevava un miglioramento del dolore, dell'edema, la scomparsa dell'infezione e la completa cicatrizzazione del tessuto.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo 2 settimane dalla sospensione del trattamento, si osservava la normalizzazione della cute con ricrescita di nuovi peli.

Caso 4

Cane pastore tedesco 11 anni femmina veniva presentato alla visita clinica per una lesione del nervo peroneo e conseguentemente appoggio dorsale del piede e lesioni autotraumatiche da leccamento sulla cute. Si eseguiva la correzione chirurgica con trasposizione del tendine flessore delle dita che

viene ancorato al tendine dell'estensore delle dita, migliorando la postura e permettendo un appoggio corretto dell'estremità distale del arto. Nonostante la guarigione motoria persistevano le lesioni cutanee da cronico leccamento.

Esame clinico. Eritema, erosioni, ulcere, croste, ed ispessimento cutaneo conseguente a fibrosi della porzione dorsale del metacarpo e delle falangi. Presenza di focale essudato purulento. Quadro clinico riferibile a dermatite autotraumatica cronica complicata da infezioni superficiali secondarie.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava neutrofili degenerati e batteriococchi in posizione intracitoplasmatici e presenza di alcune emazie ed era indicativo di un'infezione batterica della lesione ulcerata.

Terapia. Si somministrava una terapia antibiotica sistemica con enrofloxacin 5mg/kg per os per tre settimane. Si effettuava detersione della ferita con iodio-povidone il primo giorno, procedendo poi alla detersione della ferita con soluzione fisiologica ed applicazione del preparato Q crema due volte al di per 14 giorni.

Visite di controllo. Dopo una settimana si rilevava miglioramento dell'infezione e

cicatrizzazione del tessuto al 50 %. Dopo due settimane si osservava scomparsa dell'infezione ed ulteriore riduzione delle lesioni.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo due settimane dalla sospensione del trattamento si osservava completa cicatrizzazione della cute con riduzione della fibrosi dermica.

Caso 5

Meticcio maschio di anni 6 veniva portato alla visita per trauma stradale con lesioni cutanee multiple del bacino e degli arti posteriori.

Esame clinico e diagnosi. Si osservavano abrasioni, escoriazioni, ulcere e zone prive di cute con esposizione di grasso e tessuto muscolare sulla faccia mediale della coscia e sulla zona dorsale della tibia ed in area iliaca. I bordi della ferita si presentavano edematosi e congesti con essudazione sieroematica.

Terapia. Si somministrava cefalessina per os a 25 mg /Kg per 7 gg. Si eseguiva detersione della ferita con soluzione fisiologica ed applicazione del preparato Q crema due volte al giorno.

Visite di controllo. Dopo 24 e 36 ore si osservava formazione di croste e presenza di sepsi superficiale sul lato mediale suppurazione della

ferita in zona iliaca. Dopo 50 ore si rilevava formazione di tessuto di granulazione con ottima riduzione delle lesioni (inferiori al 50 %). Dopo 72 ore vi era guarigione sul lato mediale (lesioni inferiori al 10%). Dopo 90 ore vi era cicatrizzazione completa dello strato profondo. Dopo una settimana si rilevava la completa guarigione della ferite con formazione di tessuto cicatriziale stabile.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo un mese dalla sospensione del trattamento le cicatrici apparivano di colore biancastro, di normale resistenza e consistenza.

Caso 6

Cane Yorkshire terrier maschio di anni 11 operato per epiteloma di ghiandole epatoidi in area perianale sinistra. All'ottavo giorno dallo intervento il cane presentava una deiscenza parziale della ferita chirurgica a causa di auto traumatismo.

Esame clinico. Deiscenza parziale della ferita chirurgia su un tratto di 1 cm circa di lunghezza per un diametro trasversale di circa 0,5 cm. I bordi della ferita si presentavano congesti. Si notava un essudato sieroso-ematico.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava emazie, neutrofili degenerati e batteri (cocchi) in posizione

intra ed extracitoplasmatici indicativi di sovra infezione batterica della ferita per autotraumatismo (leccamento).

Terapia. Si somministrava marbofloxacina per os a 2,5 mg /Kg per 7 gg. Si eseguiva detersione della ferita con iodio-povidone iodato ed applicazione del preparato Q-BASE-CREMA due volte al di.

Visite di controllo. Dopo una settimana si osservava tessuto di granulazione con riduzione delle dimensioni della ferita al 10% circa ed alla fine della seconda settimana si rilevava la completa guarigione della ferita con formazione di un tessuto cicatriziale stabile

Esito clinico. Al successivo controllo dopo un mese dalla sospensione del trattamento la cicatrice appariva di colore biancastro, di normale resistenza e consistenza.

Caso 7

Cane Yorkshire terrier femmina di anni 12 diabetica veniva portato alla visita per la presenza di ustioni multiple dorsali causate da semolino (lesione accidentale).

Esame clinico. Lesioni a carta geografica del dorso (occupanti il 50 % circa della superficie

cutanea della schiena) con essudazione e formazione di croste inglobanti peli.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava emazie, neutrofili degenerati e batteri cocchiformi in posizione intra ed extracitoplasmatici indicativi di sovra infezione batterica della ferita da ustione.

Terapia. Si somministrava marbofloxacina *per os* a 2,5 mg /Kg per 21 gg. Si eseguiva tosatura del pelo e detersione della ferita con iodio-povidone iodato seguita da applicazione del preparato Q-BASE-CREMA due volte al di.

Visite di controllo. Dopo una settimana si osservava tessuto di granulazione con riduzione delle dimensioni della lesioni al 20% circa ed alla fine della seconda settimana si rilevava la completa guarigione della ferite con formazione di un tessuto cicatriziale stabile.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo un mese dalla sospensione del trattamento la cicatrice appariva di colore biancastro, di normale resistenza e consistenza.

Caso 8

Cane meticcio terrier femmina di anni 10 veniva portato alla visita per la presenza di lesioni cutanee sui fianchi e sul dorso della schiena comparse una

settimana circa da un intervento chirurgico per sterilizzazione.

Esame clinico. Lesioni a carta geografica del dorso (occupanti il 10 % circa della superficie cutanea della schiena) con essudazione e formazione di croste nerastre e necrosi cutanea a tutto spessore secondarie ad ustione per effetto termoelettrico (da termocauterio).

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava emazie, neutrofili degenerati e batteri (cocchi) in posizione intra ed extracitoplasmatici indicativi di sovra infezione batterica della lesioni.

Terapia. Si somministrava enrofloxacin per os a 5 mg /Kg per 21 gg. Si eseguiva tosatura del pelo, rimozione delle croste e detersione della ferita con iodio-povidone iodato seguita da applicazione del preparato Q-BASE-CREMA due volte al di.

Visite di controllo. Dopo una settimana si osservava tessuto di granulazione con riduzione delle dimensioni della lesioni di circa la metà e dopo un'altra settimana cicatrizzazione completa.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo un mese dalla sospensione del trattamento si osservava alopecia post cicatriziale.

Caso 9

Gatto europeo 2 anni maschio veniva presentato alla visita clinica per una lesione auto-traumatica ed essudativa sul dorso in zona interscapolare.

Esame clinico. Eritema ed edema della cute con erosioni, ulcere, croste (diametro circa 2 cm). Presenza di essudato purulento. Quadro clinico riferibile a dermatite pio-traumatica secondaria ad inoculo di vaccino.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava abbondanti neutrofili degenerati e batteri (cocchi) in posizione extracitoplasmatici e presenza di rare emazie. Si rilevava una sovrainfezione batterica nella lesione ulcerata.

Terapia. Si somministrava terapia antibiotica sistemica con amoxicillina ed acido clavulanico (12,5 mg/kg bid per 7 gg). Si effettuava detersione della ferita con iodio-povidone il primo giorno, procedendo poi alla detersione della ferita con soluzione fisiologica ed applicazione del preparato Q-BASE-CREMA una volta al dì nei restanti 7 giorni, mantenendo fasciato l'animale per impedire ulteriore autolesionismo.

Visite di controllo. Dopo una settimana si rilevava completa cicatrizzazione del tessuto.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo due settimane dalla sospensione del trattamento si osservava normalizzazione della cute con ricrescita di nuovi peli.

Caso 10

Gatto europeo 5 anni maschio veniva presentato alla visita clinica per prurito ed una lesione autotraumatica ed essudativa sul collo.

Esame clinico. Eritema ed edema della cute con erosioni, ulcere, croste (diametro circa 3 cm). Quadro clinico riferibile a dermatite autotraumatica secondaria a d inoculo di vaccino.

Diagnosi. L'esame citologico evidenziava alcuni neutrofili degenerati e cocchi in posizione extracitoplasmatica e presenza di rare emazie. Si rilevava una sovrainfezione batterica della lesione ulcerata. La presenza di prurito veniva indagata applicando uno stretto controllo antiparassitario e somministrando una dieta ipoallergica (idrolisato proteico).

Terapia. Si somministrava terapia antibiotica sistemica con cefadroxil 25 mg/kg die per 7 gg per os. Si effettuava detersione della ferita con iodio-povidone il primo giorno, procedendo poi alla detersione della ferita con soluzione fisiologica ed

applicazione del preparato Q-BASE-CREMA una volta al dì nei restanti 14 giorni, mantenendo fasciato l'animale per impedire ulteriore autolesionismo.

Visite di controllo. Dopo una settimana si rilevava cicatrizzazione del tessuto al 50 % e alla seconda settimana completa guarigione della ferita.

Esito clinico. Al successivo controllo dopo due settimane dalla sospensione del trattamento proseguendo la dieta ipo-allergenica si osservava scomparsa del prurito e normalizzazione della cute.

Formulazione Q-BASE CREMA

STUDI CLINICI IN VIVO II

E' stato condotto uno studio clinico atto a valutare l'efficacia terapeutica nella rigenerazione e riparazione della cute e del sottocute di un prodotto denominato Q-BASE-CREMA.

Nel periodo compreso fra marzo e maggio 2007 si includevano su base volontaria nello studio clinico un gruppo misto costituito da 5 cani e 1 gatto, due donne ed un uomo.

Caso 1

Gatto, di razza persiano, sesso maschile e 3 mesi d'età.

Anamnesi e protocollo terapeutico

Nell'area ventrale del corpo, in zona sternale si osservava una lesione da morso, essudativa e purulenta con aree di necrosi cutanea. Il gatto era in discrete condizioni cliniche, con moderata ipertermia. Si somministrava una terapia antibiotica sistemica con cefovecin iniettabile 20 mg/kg/q15gg. Al momento dell'inclusione si eseguiva una tricotomia della parte e si disinfettava la ferita con iodio povidone al 10% e si procedeva ad applicare Q-BASE-CREMA due volte al di.

Giorno 0. Area necrotica cutanea delle dimensioni di circa 4-6 cm in diametro con essudato purulento e parziale erosione dei piani muscolari sottostanti.

Giorno 3. Inizio della formazione del tessuto di granulazione ed assenza di materiale purulento.

Giorno 10. L'area lesionale presenta una cicatrizzazione pari al 90% della superficie interessata.

Riassunto dell'evoluzione clinica

L'applicazione della crema Q-BASE-CREMA ha favorito la cicatrizzazione. Assenza di materiale essudativo purulento già il giorno 3.

Caso 2

Uomo, Africano, 57 anni di età.

Anamnesi e protocollo terapeutico

Il paziente presentava una ferita traumatica da graffio sul volto presente da 48 ore, trattata unicamente con iodio povidone al 10%. Al momento dell'inclusione (giorno 0) si applicava Q-BASE-CREMA base due volte al dì per 21 giorni.

Giorno 0. Presenza di erosioni, ulcerazioni e depigmentazione perilesionale associate a crosta sierocellulare area irregolare del diametro di circa 2 cm).

Giorno 7. La crosta sierocellulare presente al momento della visita era regredita e la profondità della lesione era diminuita del 50%.

Giorno 14. Residuavano piccole cicatrici lineari superficiali depigmentate.

Giorno 21. Si rilevava alla visita finale l'appiattimento delle cicatrici e la progressiva ripigmentazione della cute.

Riassunto dell'evoluzione clinica

Il paziente presentava predisposizione a formazione di cicatrici esuberanti. L'applicazione del Q-BASE-CREMA ha ovviato a questo problema.

Caso 3

Cane, razza Pastore Tedesco, sesso maschile, 7 anni di età.

Anamnesi e protocollo terapeutico

Il cane presentava neurodermatite all'arto posteriore sinistro per ernia discale tra T5 e L2 e lesione da decubito sul calcaneo. Al momento dell'inclusione era stata eseguita una terapia antibiotica sistemica con enrofloxacin 5 mg/kg/q24h/30 giorni.

La zona del callo da decubito era trattata due volte al di, con il preparato dermatologico Q-BASE-CREMA, mentre la zona della neurodermatite era usata come area di paragone (assenza di trattamenti con prodotti topici di qualsiasi genere).

Giorno 0. L'esame clinico evidenziava un'area ulcerata calcaneale del diametro di circa 2 cm ed un'area di pigmentazione ed ulcerazioni multiple sul dorso dell'area metatarsale.

Giorno 30. Cicatrizzazione completa del callo da decubito con parziale miglioramento dell'area ulcerata metatarsale (neurodermatite).

Riassunto dell'evoluzione clinica.

L'area lesionale del callo da decubito è regredita totalmente e la lesione sull'arto con neurodermatite è migliorata del 60% circa.

Caso 4

Donna, Caucasica di 41 anni.

Anamnesi e protocollo terapeutico

La paziente presentava deiscenza di sutura chirurgica (intervento ernia cervicale C6-C7) e reazione allergica da contatto (cerotto). Le era stata somministrata una terapia sistemica iniettabile di cefalosporina in unica somministrazione.

Giorno 0. Presenza di eritema e dermatite da contatto. La ferita chirurgica di circa 6 cm in lunghezza presentava deiscenza nell'area centrale associata a presenza di materiale purulento.

Giorno 7. Dopo aver eseguito solo disinfezione locale con iodio povidone, non si verificavano variazioni della lesione.

Si evidenziava solo un progressivo miglioramento della dermatite da contatto.

Giorno 14. Si procedeva ad applicare localmente solfadiazina argentea in pomata una volta al giorno per 7 giorni prima del controllo clinico.

In tale periodo non si rilevavano miglioramenti clinici di sorta.

Giorno 21. Al controllo, in presenza di ulteriore assenza di guarigione della lesione si applicava Q-BASE-CREMA ogni 12 ore.

Giorno 30. Al controllo la lesione presentava guarigione e tessuto cicatriziale.

Riassunto dell'evoluzione clinica

Prima settimana. Deiscenza della sutura e ritrazione dei margini della ferita; la seconda settimana si notava la presenza di materiale purulento essudativo e persistenza della mancata cicatrizzazione.

Il cambio della terapia topica con Q-BASE-CREMA ha consentito la chiusura della ferita in 4° settimana dopo 9 giorni di utilizzo.

Caso 5

Cane, meticcio, maschio, 14 anni di età.

Anamnesi e protocollo terapeutico

Il cane veniva portato alla visita clinica per una ferita chirurgica conseguente all'asportazione di un emangiopericitoma (ferita all'arto) e di un lipoma (ferita ascellare).

Si sceglieva per un trattamento della ferita all'arto con fasciatura senza uso di topici, mentre nella zona ascellare si applicava ogni 12 ore Q-BASE-CREMA per 7 giorni.

L'animale riceveva una terapia sistemica con marbofloxacina 2,5 mg/kg/q24h/7 giorno.

Giorno 0. Presenza di essudato sieroso su entrambe le lesioni nelle aree di sutura.

Giorno 7. Cicatrizzazione della ferita trattata con Q-BASE-CREMA, mentre presenta un moderato essudato e croste sulla lesione non trattata.

Riassunto dell'evoluzione clinica

La ferita chirurgica non trattata presenta materiale crostoso adeso ai punti di sutura, mentre la parte su cui è stata applicata Q-BASE-CREMA presenta normale evoluzione cicatriziale che ha permesso in settima giornata di rimuovere i punti di sutura.

Caso 6

Donna, caucasica di 17 anni.

Anamnesi e protocollo terapeutico

La paziente era portata alla visita per la presenza di un cheloide presente da 4 anni nella zona pre-tibiale delle dimensioni di 1 cm. Si procedeva ad una terapia topica con applicazioni giornaliere per 2 mesi di Q-BASE-CREMA.

Giorno 0. La lesione nell'area tibiale era di circa 1 cm iperplastica e con modesto eritema perilesionale.

Giorno 60. Al controllo la lesione era diminuita del 60% rispetto all'inizio della terapia.

Riassunto dell'evoluzione clinica

In questo caso si è verificata una progressiva riduzione dello spessore del cheloide (60%).

Caso 7

Segnalamento. Cane Golden retriever maschio 5
mesi.

Anamnesi. Dalla nascita problemi di lacerazioni cutanee spontanee con infezioni secondarie e disturbi di cicatrizzazione. Prima della visita di consulto erano stati effettuati numerosi tentativi di revisione chirurgica e sutura delle ferite. Il paziente era stato precedentemente sottoposto a numerose terapie: tetracicline per os per 1 mese associata a cortisonico deposito, disinfezioni locali nelle aree lesionali con aminosidina solfato + prednisolone e clostebol acetato. Nonostante i trattamenti non vi erano stati risultati apprezzabili. Clinicamente il cane mostrava iperestensibilità cutanea. Si eseguivano biopsie cutanee multiple che evidenziavano un'alterazione delle fibre di collagene compatibile con Sindrome di Ehlers-Danlos.

Giorno 0. Le ferite e le lacerazioni cutanee erano trattate con polivinil-pirrolidone due volte al dì e Q-BASE-CREMA con bendaggio occlusivo sugli arti e applicazione libera, senza bendaggi, in area ischiatica.

Si associava una terapia antibiotica sistemica con amoxicillina e clavulanico 12,5mg /kg Bid per controllare le infezioni secondarie.

Giorno 30. Dopo 30 giorni si osserva ri-epitelizzazione di tutte le ferite trattate con Q-

BASE-CREMA. Residuano piccole aree erosive ed ulcerative in aree di appoggio (gomiti).

L'uso di Q-BASE-CREMA ha permesso di ottenere la cicatrizzazione nell'arco di soli 30 giorni di ampie ferite cutanee che da mesi erano complicate da sovrainfezioni, a causa della malattia genetica del collagene presente dalla nascita.

Caso 8

Segnalamento. Cane, volpino nero, 8 anni, sesso maschile.

Anamnesi. Il cane veniva portato alla visita clinica per lesioni agli arti anteriori secondarie a trauma stradale. Alla visita clinica il paziente aveva riportato a carico degli arti anteriori completa asportazione del tessuto cutaneo con esposizione delle strutture tendinee ed ossea sottostanti.

Giorno 0. Si procedeva all'applicazione di Q-BASE-CREMA con bendaggio occlusivo ed alla somministrazione per via sistemica di amoxicillina + ac. clavulanico 12,5 mg/kg/bid/os associata ad enrofloxacin 5 mg/gk/sid/os.

Giorno 7 e Giorno 15. Si osservava progressiva formazione del tessuto di granulazione.

L'applicazione di Q-BASE-CREMA ha permesso di ottenere in tempi brevi la formazione di tessuto di

granulazione che ha iniziato a rivestire i tendini ed il tessuto osseo precedentemente esposti.

Il trattamento è ancora in corso.

Caso 9

Segnalamento. Cane WHWT, maschio 10 anni di età.

Anamnesi. Il cane presentava da circa un anno amatomî (aree nodulari cutanee di displasia fibro-annessiale) interdigitali agli arti anteriori che erano progressivamente aumentati di diametro negli ultimi 2 mesi fino a raggiungere le dimensioni di circa 4 cm di diametro. Si eseguiva asportazione chirurgica e terapia antibiotica con cefalessina 20 mg/kg/bid per 15 giorni. Alla visita di controllo dopo 4 giorni si evidenziava un'area di necrosi cutanea (diametro 2,5 cm) su base ischemica per fasciatura eccessivamente compressiva e parziale deiscenza della sutura chirurgica sull'arto anteriore destro.

Giorno 0. Si procedeva alla disinfezione con iodopovidone ed all'applicazione di Q-BASE-CREMA nella area infradigitale una volta al giorno con bendaggio occlusivo fino al controllo.

Si continuava la terapia antibiotica sistemica con cefalessina agli stessi dosaggi.

Giorno 15. Alla visita di controllo si notava remissione della lesione.

L'applicazione di Q-BASE-CREMA ha permesso di ottenere una ri-epitelizzazione dell'area cutanea necrotica in tempi rapidi con una normale guarigione della ferita chirurgica.

Conclusioni generali

Su tutti i pazienti si è osservata una più rapida cicatrizzazione dei tessuti in rapporto ad altre terapie topiche precedentemente usate.

Formulazione QParodontal-BASE e QParodontal-BASE-Gel

STUDI CLINICI IN VIVO III.

E' stato condotto uno studio clinico atto a valutare la tollerabilità e l'efficacia terapeutica nella rigenerazione delle mucose orali e del tessuto parodontale di un prodotto denominato QParodontal-BASE e QParodontal-BASE-Gel. Il presente studio è stato condotto su di un campione costituito da 5 casi veterinari.

Caso 1

Barbone nano bianco, 3 anni.

Seduta di igiene orale prima di una esposizione canina.

Condizioni cliniche: presenza di tartaro prevalentemente sulle arcate dentali superiori, in particolare sui premolari e molari; moderata gengivite; nessuna difficoltà masticatoria.

Terapia: detartrasi e lucidatura; inizio della terapia con gel due volte a settimana per trenta giorni.

Esito: ottimo esito della terapia con miglioramento della gengivite e scomparsa dell'alitosi.

Caso 2

Barbone nano maschio, 8 mesi.

Condizioni cliniche: lieve gengivite causata dalla recente perdita dei denti decidui e dall'alimentazione prevalentemente umida; alitosi moderata.

Terapia: nessun trattamento di detartrasi; inizio della terapia con gel una volta a settimana per trenta giorni.

Esito: modico miglioramento della gengivite; ottimo miglioramento dell'alitosi.

Caso 3

Gatto tigrato maschio castrato, 9 anni.

Condizioni cliniche: grave alitosi; difficoltà masticatorie; parodontopatia con conseguente mobilità dei denti premolari e molari superiori e inferiori.

Terapia: estrazione dei denti mobili; detartrasi; lucidatura; inizio della terapia con gel quattro volte a settimana per trenta giorni.

Esito: netto miglioramento della gengivite; scomparsa dell'alitosi; scomparsa delle difficoltà masticatorie.

Caso 4

Gatto certosino femmina, 6 anni. Proveniente da un allevamento, in attesa di adozione avendo terminato la carriera riproduttiva.

Condizioni cliniche: presenza di grave gengivo/stomatite e farcite; totale impossibilità di masticare per l'intenso dolore; presenza di proliferazioni gengivali sanguinanti e tondeggianti in corrispondenza di molari e premolari inferiori.

Accertamenti diagnostici: profilo biochimico in norma. Test FIV e FeLV negativi.

Esame citologico: stomatite linfoplasmocitaria.

Esame istologico: epulide fibromatosa con flogosi plasmacellulare.

Trattamento: estrazione dei molari inferiori situati in corrispondenza delle proliferazioni gengivali; terapia con gel quattro volte a settimana per trenta giorni.

Esito: cessazione del dolore e ritorno alla masticazione corretta; miglioramento dell'alitosi e lieve miglioramento della flogosi; lieve regressione delle proliferazioni gengivali.

Caso 5

Cane, meticcio maschio, 11 anni.

Condizioni cliniche: gravissima alitosi; difficoltà masticatorie; parodontopatia grave con conseguente mobilità dei denti premolari e molari superiori e inferiori.

Terapia: estrazione dei denti mobili; detartrasi; lucidatura; inizio della terapia con gel quattro volte a settimana per trenta giorni.

Esito: netto miglioramento della gengivite; scomparsa dell'alitosi; scomparsa delle difficoltà masticatorie.

Formulazione QNasal-BASE.

STUDI CLINICI IN VIVO IV.

E' stato condotto uno studio clinico atto a valutare la tollerabilità e l'efficacia terapeutica nella rigenerazione delle mucose nasali di un prodotto denominato QNasal-BASE. Il presente studio è stato condotto su di un campione costituito da due casi clinici.

Sono stati trattati due pazienti affetti da poliposi nasale recidivante, già operati.

Caso 1

Femmina di anni 54, caucasica.

La paziente era stata operata tre volte negli ultimi 10 anni per poliposi etmoidale recidivante.

La paziente non lamentava allergie a nessuno degli antigeni testati (assenza di positività ai tests epi-cutanei); non assumeva acido acetilsalicilico né FANS. Nel corso dell'anno 2006 e dei primi mesi del 2007 lamentava recidiva di poliposi nasale (delle celle etmoidali), non responsiva a nessuna comune terapia farmacologia.

La paziente è stata trattata per trenta giorni; la paziente ha manifestato una netta riduzione dei sintomi, con sua viva soddisfazione. All'esame endoscopico la dimensione dei polipi appariva diminuita del 70%. La paziente prosegue il trattamento.

Caso 2

Paziente maschio, caucasico, 60 anni.

Operato tre anni prima per poliposi nasale, recidivata. Non allergie. Non assunzione di farmaci. A causa di sintomatologia violenta è stato proposto per reintervento chirurgico.

Inizia invece il trattamento con *QNasal-BASE* con ottimi risultati soggettivi ed oggettivi, la dimensione dei polipi appariva diminuita del 50% dopo venti giorni di trattamento.

Formulazione *QOcular-BASE*.

STUDI CLINICI IN VIVO V.

E' stato condotto uno studio clinico atto a valutare la tollerabilità e l'efficacia terapeutica nella rigenerazione delle mucose oculari di un prodotto denominato *QOcular-BASE*. Il presente studio è stato condotto su di un campione costituito da 9 cani ed 1 gatto.

E' stato trattato solo l'occhio destro con una applicazione bi-giornaliera di due gocce di collirio *QOcular-BASE* per un mese, l'occhio sinistro è stato usato come controllo per ogni caso clinico.

Si è valutata alla visita di inclusione la tolleranza locale del prodotto in uso, il grado di iperemia congiuntivale, la quantità di lacrime prodotte mediante Shirmer test e la presenza di secrezioni mucose o mucopurulente. La pressione endoculare è stata misurata mediante tonometria per appianazione (tonopen). In ogni paziente è stata valutata l'integrità della cornea con test alla fluoresceina, completando la visita con biomicroscopio

(lampada a fessura), oftalmoscopio diretto e indiretto.

Gli stessi parametri sono stati valutati dopo trenta giorni alla visita finale.

Sono stati inclusi cinque cani con congiuntivite moderata bilaterale di probabile patogenesi allergica, un caso di congiuntivite follicolare in un cane, un caso di congiuntivite cronica in un gatto secondaria ad Herpes virus e tre casi di congiuntivite *sicca*.

Risultati

I cinque casi di congiuntivite moderata di probabile patogenesi allergica erano rappresentati da 3 maschi e due femmine, di razze differenti (1 Bulldog, 1 bulldog francese, 1 barboncino e 2 meticci, di età compresa fra i due e i 5 anni)

La tollerabilità locale del prodotto è stata ottimale; l'iperemia congiuntivale rispetto all'occhio controlaterale non trattato si è attenuata sostanzialmente durante il periodo di trattamento.

Il quantitativo di lacrime prodotto è rimasto stabile, nella norma.

La pressione oculare si è mantenuta nell'intervallo fisiologico.

Non si sono rilevate alterazioni dell'epitelio e dello stroma corneale.

Si è osservato un buon potere detergente nei confronti delle secrezioni mucose durante l'uso sugli occhi trattati.

Il caso di congiuntivite follicolare in un Labrador femmina di 6 mesi ha dimostrato ottima tollerabilità locale del prodotto. L'iperemia congiuntivale e la dimensione dei follicoli congiuntivali, rispetto all'occhio controlaterale non trattato, si sono attenuate durante il periodo di trattamento.

Il quantitativo di lacrime prodotto è rimasto stabile, nella norma.

La pressione oculare si è mantenuta nell'intervallo fisiologico.

Non si sono rilevate alterazioni dell'epitelio e dello stroma corneale

Si è osservato un buon potere detergente nei confronti delle secrezioni mucose al momento dell'applicazione del prodotto.

Nel caso di congiuntivite cronica in un gatto (persiano maschio) di 5 anni secondaria ad infezione da Herpes virus si è osservata ottima tollerabilità locale del prodotto. L'iperemia congiuntivale e l'edema della congiuntiva, rispetto all'occhio

controlaterale non trattato, si sono ridotti durante il periodo di trattamento.

Il quantitativo di lacrime prodotto è rimasto stabile, nella norma.

La pressione oculare si è mantenuta nell'intervallo fisiologico.

Non si sono rilevate alterazioni dell'epitelio e dello stroma corneale

Si è osservato un buon potere detergente nei confronti delle secrezioni mucose sia della congiuntiva che delle palpebre al momento dell'applicazione del prodotto.

Nei tre casi di congiuntivite secca rappresentati da due femmine ed un maschio di età compresa fra 7 e i 10 anni di razze diverse (west hyghland whyte terrier, yorkshire terrier, meticcio) la tollerabilità locale del prodotto è stata ottimale; l'iperemia congiuntivale rispetto all'occhio controlaterale non trattato, si è modificata sostanzialmente durante il periodo di trattamento, attenuandosi.

Il quantitativo di lacrime prodotto che alla visita di inclusione era pari $5+/-3$ non ha presentato variazioni significative alla fine del trattamento.

La pressione oculare si è mantenuta nell'intervallo fisiologico.

Non si sono rilevate alterazioni dell'epitelio e dello stroma corneale

Si è osservato un buon potere detergente nei confronti delle secrezioni mucose e mucopurulente durante l'uso sugli occhi trattati.

Conclusioni

Nei casi studiati (9 cani ed 1 gatto) il collirio Ocular-BASE utilizzato ha dimostrato un buon potere detergente nei confronti di secrezioni mucose o mucopurulente ed in tutti i soggetti trattati si è osservata un'ottima tollerabilità all'applicazione ed una riduzione dell'edema e dell'iperemia congiuntivale.

Non si sono osservate modificazioni della pressione oculare, dell'integrità della cornea, della quantità del film lacrimale prodotto.

BIBLIOGRAFIA

1. Robinson M, Reynolds AJ, Gharzi A, Jahoda CA. *In vivo* induction of hair growth by dermal cells isolated from hair follicles after extended organ culture. *J Invest Dermatol.* 2001 Sep;117(3):596-604.
2. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001.
3. Griffith, L. G. & Naughton, G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002;295:1009-1014 .
4. Wagers, A. J., Christensen, J. L., & Weissman, I. L. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther.* 2002;9:606-612 .
5. Bianco, P. and Cossu, G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res.* 1999 Sep 15;251(2):257-63.
6. Rabinovitch, M. & De Stefano, M. J. Cell shape changes induced by cationic anesthetics. *J. Exp. Med.* 1976;143: 290-304.
7. Parker F.: "Cute e ormoni" in Williams R.H. eds: "Trattato di Endocrinologia". III° edizione italiana, Piccin, Padova. 1979; vol II°, cap 23:

1115-19.

8. Miller EJ. A review of biochemical studies on the genetically distinct collagens of skeletal system. Clin Orthop. 1973;92:260-80.
9. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg. 1993;75/A:532-53.
10. Nelea V, Luo L, Demers CN, Antoniou J, Petit A, Lerouge S, Wertheimer M, Mwale F. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma. J Biomed Mater Res A. 2005 Oct 1;75(1):216-23.
11. Glowacki J, Yates KE, Maclean R, Mizuno S. In vitro engineering of cartilage: effects of serum substitutes, TGF-beta, and IL-1alpha. Orthod Craniofac Res. 2005 Aug;8(3):200-8.
12. Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BH. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. Eur Cell Mater. 2005 Jun 17;9:58-67; discussion 67.

13. French MM, Smith SE, Akanbi K, Sanford T, Hecht J, Farach-Carson MC, Carson DD. Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. *J Cell Biol.* 1999 May 31;145(5):1103-15.
14. Costa AM, Peyrol S, Porto LC, Comparin JP, Foyatier JL, Desmouliere A. Mechanical forces induce scar remodeling. Study in non-pressure-treated versus pressure-treated hypertrophic scars. *Am J Pathol.* 1999 Nov;155(5):1671-9.
15. Alster TS, Tanzi EL. Hypertrophic Scars and Keloids: Etiology and Management. *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4(4): 235-243.
16. Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr Opin Pediatr.* 2006 Aug;18(4):396-402.
17. Ong CT, Khoo YT, Tan EK, Mukhopadhyay A, Do DV, Han HC, Lim IJ, Phan TT. Epithelial-mesenchymal interactions in keloid pathogenesis modulate vascular endothelial growth factor expression and secretion. *J Pathol.* 2007 Jan;211(1):95-108.
18. Cobbold CA. The role of nitric oxide in the formation of keloid and hypertrophic lesions. *Med*

Hypotheses. 2001 Oct;57(4):497-502.

19. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. The trans-forming growth factor β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122:103-1.
20. Schaffer MR, Efron PA, Thornton FJ, Klingel K, Gross SS and Barbul A. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immun.* 1997;158:2375-81.
21. Tuan T and Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today.* 1998;4:9-24.
22. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol.* 1996 Mar;106(3):419-27.
23. Ehrlich PH, Desmouliere A, Diegelmann RF, Cohen IK, Comp-Ton CC, Garner WL, Kapanai Y and Gabbiani G. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol.* 1994;145:105-113.
24. Novellino L, D'ischia M and Prota G. Nitric oxide-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-

dihydroxyindole-2-carboxylic acid under aerobic conditions: non-enzymatic route to melanin pigments of potential relevance to skin (photo)protection. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1425:27-35.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente la combinazione di ioni calcio e almeno un enzima proteolitico, ed opzionalmente un veicolo, un diluente e/o uno o più eccipienti fisiologicamente accettabili.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui la concentrazione di ioni calcio è maggiore o uguale a 3,6 mM.
3. Composizione secondo la rivendicazione 2, in cui la concentrazione di ioni calcio è nell'intervallo da 7 a 27 mM.
4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui l'enzima proteolitico è ad una concentrazione nell'intervallo da 0,1 µm/L o µm/kg a 50 mg/L o mg/kg.
5. Composizione secondo la rivendicazione 4, in cui l'enzima proteolitico è ad una concentrazione nell'intervallo da 2 a 30 mg/L o mg/kg.
6. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui l'enzima proteolitico è scelto dal gruppo che consiste di papaina, collagenasi, serratiopeptidasi, eparanasi, DNasi, elastasi, bromelaina, bradichinasi, *Clostridium* peptidasi, enzimi proteolitici espressi da *Lactobacillus acidophilus*, enzimi proteolitici

espressi dal genere *Aspergillus*, proteasi, alinasi e fibrinolisi.

7. Composizione secondo la rivendicazione 6, in cui l'enzima proteolitico è papaina.

8. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, in cui gli ioni calcio sono introdotti nella composizione sotto forma di sale inorganico di calcio.

9. Composizione secondo la rivendicazione 8, in cui il sale inorganico di calcio è scelto nel gruppo che consiste di cloruro di calcio, gluconato di calcio, fosfato di calcio, nitrato di calcio.

10. Composizione secondo la rivendicazione 9, in cui il sale è cloruro di calcio.

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10, comprendente almeno un ulteriore componente attivo scelto dal gruppo che consiste di vitamina A, acido retinoico, retinaldeide e loro derivati, parasimpaticolitici, corticosteroidi, mucopolisaccaridi, acidi grassi, GABA, acido laurico, olio di canfora, acido ascorbico, carnitina e sali ed esteri da essa derivati, nonché qualsiasi combinazione dei suddetti componenti attivi.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, in cui il corticosteroide è desametasone.

13. Composizione secondo la rivendicazione 11 o 12, in cui il parasimpaticolitico è scelto dal gruppo che consiste di adifenina, amminocarbofluorene, anisotropina, anticolinesterasici, atropina, benzatropina, ciclopentolato, clidinio, diciclomina, dicicloverina, diossilina, esociclio, etaverina, glicopirrolato, imbacina, ipratropio, mcn-a-343 (m-clorofenil-carbamolo-ossibutininil-trimetil-ammonio-cloruro), metil-scopolamina, metocramina, mepenzolato, metantelina, muscarina, omatropina, ossifenciclimina, ossifenonio, oxotremorina, piperidolato, poldina, pipenzolato, pirenzepina, pirenzepina analogo (AF-DX 116), pralidossina, propantelina, propantelina bromuri, prifinio, tiemonio, tiotropio, tolterodina, tripitramina, tropicamina, trospio, scopolamina, o scopolamina butilbromuro, N-metil-bromuro di joscina; loro derivati e loro alcaloidi naturali e di sintesi.

14. Composizione secondo la rivendicazione 13, in cui il parasimpaticolitico è scopolamina.

15. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 11 a 14, in cui l'acido grasso è acido butirrico.

16. Composizione cosmetica, farmaceutica o *medical device* destinata in particolare al trattamento della mucosa orale e del tessuto parodontale, comprendente

cloruro di calcio ad una concentrazione nell'intervallo di 500-1500 mg/L o mg/kg e papaina ad una concentrazione nell'intervallo di 0,1-20 mg/L o mg/kg in soluzione acquosa.

17. Composizione cosmetica, farmaceutica o *medical device* destinata in particolare al trattamento della mucosa nasale, comprendente cloruro di calcio ad una concentrazione nell'intervallo di 500-1500 mg/L e papaina ad una concentrazione nell'intervallo di 0,1-10 mg/L in soluzione acquosa.

18. Composizione cosmetica, farmaceutica o *medical device* destinata in particolare al trattamento della mucosa oculare, comprendente cloruro di calcio ad una concentrazione nell'intervallo di 100-500 mg/L e papaina ad una concentrazione nell'intervallo di 0,01-1 mg/L in soluzione acquosa.

19. Composizione cosmetica, farmaceutica o *medical device* destinata in particolare al trattamento di cute e sottocute, comprendente cloruro di calcio ad una concentrazione nell'intervallo di 500-1500 mg/L o mg/kg e papaina ad una concentrazione nell'intervallo di 5-50 mg/L o mg/kg.

20. Composizione secondo la rivendicazione 19, comprendente acido retinoico ad una concentrazione nell'intervallo di 0,001-1 mg/L. o mg/kg

21. Composizione secondo la rivendicazione 19 o 20, comprendente desametasone ad una concentrazione nell'intervallo di 10^{-4} - 10^{-8} M .
22. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 21, comprendente scopolamina ad una concentrazione nell'intervallo di 0,1-50 mg/L o mg/kg.
23. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 22, comprendente acido ialuronico ad una concentrazione nell'intervallo di 100 mg/kg o mg/L a 15 g/kg o g/L.
24. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 23, comprendente acido butirrico ad una concentrazione nell'intervallo di 0,01-2% p/v della composizione.
25. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 24, comprendente GABA ad una concentrazione nell'intervallo di 0,01-2% p/v della composizione.
26. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 25, comprendente carnitina o uno suo estere o un suo sale ad una concentrazione nell'intervallo di 0,01-10% p/v della composizione.
27. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 26, comprendente acido laurico ad

una concentrazione nell'intervallo di 0,01-2% p/v della composizione.

28. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 27, comprendente olio di canfora ad una concentrazione nell'intervallo di 0,01-2% p/v della composizione.

29. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 a 28, che è in forma di gel, crema, emulsione, soluzione, sospensione, dispersione, polvere, liofilizzato.

30. Mezzo di coltura in particolare per il mantenimento e/o la rigenerazione di colture cellulari e/o biopsie di tessuto cutaneo o connettivo, comprendente cloruro di calcio ad una concentrazione nell'intervallo di 500-1500 mg/L o mg/kg e papaina ad una concentrazione nell'intervallo di 5-50 mg/L o mg/kg e gli usuali sali inorganici, amminoacidi e vitamine necessari per il mantenimento e/o la crescita di cellule di mammifero.

31. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 30, comprendente acido retinoico ad una concentrazione nell'intervallo di 0,001-1 mg/L o mg/kg.

32. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 30 o 31, comprendente desametasone ad una concentrazione nell'intervallo di 10^{-4} - 10^{-8} M.

33. Mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 30 a 32, comprendente scopolamina ad una concentrazione nell'intervallo di 0,1-50 mg/L o mg/kg.

34. Mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 30 a 33, comprendente acido ialuronico ad una concentrazione nell'intervallo di 100 mg/kg o mg/L a 15 g/kg o g/L.

35. Uso di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 29 per la preparazione di un medicamento o un *medical device* per uso umano o veterinario per la rigenerazione di tessuti cutanei e/o tessuti connettivi.

36. Uso secondo la rivendicazione 35, in cui il medicamento è per il trattamento di una patologia scelta nel gruppo che consiste di ferite e lesioni cutanee di ogni tipo, cheloidi, parodontopatie, congiuntiviti, poliposi nasali e auricolari, lesioni erpetiche, dermatiti umane e animali, cellulite (lipodistrofia edemato fibromatosa).

37. Uso di un mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 30 a 34, per mantenere in vita in coltura continua biopsie di tessuti cutanei e/o connettivi.

38. Uso secondo la rivendicazione 37, in cui dette

biopsie *in vitro* sono mantenute vitali in coltura continua per un tempo superiore ai 6 mesi.

39. Uso di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 29, per il trattamento cosmetico della pelle, in particolare il trattamento anti-invecchiamento e rigenerativo della pelle e degli apparati tegumentari .