

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI



A.D. MDLXII

Corso di Dottorato di Ricerca Scienze Biomediche

Curriculum in Neuroscienze

Coordinatore Prof.: Andrea Piana

TESI DI DOTTORATO

Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da Oestrus ovis:

progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico

Tutor

Ch.mo Prof.

Antonio Pinna

Co-Tutor

Ch.mo Prof.

Giovanni Garippa

Candidato

Giuseppe D'Amico Ricci

Matricola: 50016491

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

Sommario

| | |
|---|------------|
| PARASSITOSI..... | 3 |
| <i>Cenni storici</i> | 3 |
| MIASI..... | 4 |
| <i>Generalità</i> | 5 |
| <i>Ditteri</i> | 6 |
| <i>Stadi</i> | 6 |
| <i>Riproduzione</i> | 8 |
| <i>Importanza</i> | 9 |
| <i>Classificazione delle miasi</i> | 10 |
| <i>Manifestazioni cliniche nell'uomo</i> | 12 |
| MIASI DA OESTRUS OVIS..... | 14 |
| <i>Oftalmomiasi</i> | 16 |
| <i>Classificazione</i> | 16 |
| <i>Trattamento</i> | 20 |
| DISEGNO DELLO STUDIO | 23 |
| FASE I..... | 23 |
| <i>Farmaci</i> | 23 |
| <i>Soluzioni</i> | 26 |
| FASE II..... | 29 |
| <i>Modelli cellulari</i> | 30 |
| <i>Test di tossicità</i> | 32 |
| FASE III..... | 37 |
| <i>Modelli animali</i> | 38 |
| COSTI DELLO STUDIO..... | 40 |
| TEMPI DI ESECUZIONE..... | 40 |
| OBIETTIVI E VANTAGGI..... | 41 |
| TRATTAMENTO TOPICO DELLA OFTALMOMIASI ESTERNA DA OESTRUS OVIS: PROGETTAZIONE E SVILUPPO DI UN NUOVO PREPARATO GALENICO | 42 |
| FASE I..... | 42 |
| <i>Materiali e metodi</i> | 42 |
| <i>Analisi statistica</i> | 46 |
| <i>Risultati</i> | 47 |
| <i>Discussione</i> | 51 |
| FASE II..... | 53 |
| <i>Materiali e metodi</i> | 53 |
| <i>Analisi Statistica</i> | 67 |
| <i>Risultati</i> | 68 |
| <i>Discussione</i> | 81 |
| FASE III..... | 83 |
| <i>Materiali e metodi</i> | 85 |
| <i>Analisi Statistica</i> | 87 |
| <i>Risultati</i> | 87 |
| <i>Discussione</i> | 91 |
| CONCLUSIONI..... | 93 |
| RINGRAZIAMENTI..... | 96 |
| INDICE DELLE FIGURE | 98 |
| INDICE DELLE TABELLE | 99 |
| BIBLIOGRAFIA | 100 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Parassitosi

Il parassitismo è una associazione tra individui di specie diversa nella quale uno degli associati, il parassita, trae vantaggio a spese e a danno dell'altro, detto ospite. Ciò che caratterizza il parassita, sia esso unicellulare o pluricellulare, è la sua peculiarità di vivere a spese dell'organismo che li ospita traendo da esso il nutrimento necessario alla sua sopravvivenza, nonché alla crescita ed alla riproduzione. Il parassita non si limita a nutrirsi a spese dell'ospite, ma utilizza quest'ultimo come propria nicchia ecologica e gli affida, in parte o totalmente, il compito della regolazione dei rapporti di entrambi con l'ambiente esterno. Pertanto i parassiti sono per definizione patogeni.

Cenni storici

La prima descrizione di questa tipologia di malattie sembra risalire al periodo egizio (c.a 1900 a.C.) nel papiro di Kalum, in cui viene trattata l'ipodermosi bovina. Seguono poi descrizioni in scritti dell'antica Grecia e della Roma Imperiale: Aristotele (384-332 a.C.) conosceva alcuni Ditteri miasigeni, in particolare il *Gasterophilus sp.*, Virgilio (70-19 a.C.) riporta nelle Georgiche i problemi connessi con l'ipodermosi (miasi sottocutanea) nelle capre, Plinio (23-79 a.C.) tratta nei propri scritti le miasi cutanee.

Le descrizioni delle parassitosi però cominciano a farsi più esaurienti nel XVII secolo grazie ai fondamentali studi condotti da Francesco Redi (1626-1697) con le sue particolareggiate descrizioni di una larva di *Oestrus sp.*, e da Vallisnieri (1661-1730). Segue Linneo (1707-1778) che cita, nella sua opera fondamentale "Systema naturae", alcuni parassiti della cute tra cui *Oestrus*

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

sp., che verrà poi ripreso da Clark, che nel 1815 pubblicò un lavoro fondamentale sui generi *Oestrus* e *Cuterebra*^[1].

Nel 1840 Hope coniò il termine “miasi” per indicare la specifica parassitosi provocata dalle larve di Ditteri, differenziandola quindi dalle parassitosi causate dalle larve di insetti in generale ^[2].

Miasi

Il termine miasi (dal greco Μύια (Myía) “mosca”), indica le parassitosi provocate da larve di ditteri *Cyclorrhapha* che per un tempo variabile si alimentano di tessuti vivi o morti, o di liquidi corporei dell’ospite ^[3].

Il parassitismo di queste larve può essere sia obbligato (come molte specie della Famiglia Oestridae), ovvero necessitano di una determinata specie animale per svolgere il proprio ciclo biologico e sono quindi in grado di penetrare anche in tessuti integri, oppure occasionale, in quanto sono capaci di svolgere il proprio ciclo biologico indipendentemente dall’ospite e sono spesso favorite dalla presenza di ferite sulla cute dell’ospite.

Più nello specifico, le larve di ditteri miasigeni obbligati, mostrano un alto potenziale biotico che li rende in grado di superare ostacoli anatomici non indifferenti, e la loro migrazione è predeterminata e connessa sia all’evoluzione morfologica larvale, sia ai tessuti dell’ospite. Può tuttavia accadere che le larve migrino in organi diversi da quelli abituali per il loro ciclo biologico, come ad esempio nell’ipodermosi equina o umana, dove si osserva una localizzazione aberrante delle larve in sede intracraniale, sottocutanea o oculare. Si ritiene che queste localizzazioni aberranti siano dovute al malfunzionamento del sistema sensoriale distribuito sul corpo delle larve da cui consegue una difficoltà di percezione e orientamento del parassita^[1, 4].

Giuseppe D’Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Generalità

In relazione all'adattamento ambientale delle specie di ditteri, le miasi sono diversamente distribuite nelle aree a clima tropicale, subtropicale o temperato.

In Italia le più diffuse che colpiscono gli animali sono^[1]:

- gasterofilosi degli equini (*Gasterophilus spp.*);
- estrosi degli ovini (*Oestrus ovis*);
- ipodermosi dei bovini (*Hypoderma spp.*);
- miasi traumatica degli ovini (*Wolfarthia spp.*, e *Lucilia sericata spp.*);
- miasi sottocutanea dei caprini (*Przhelvaskiana selenus*).

A queste si aggiungono le miasi di minore incidenza, ma di grande interesse dal punto di vista epidemiologico, quali la miasi foruncolosa del cane da *Cordylobia antropophaga*, osservata su soggetti di ritorno da zone dove questo dittero è endemico, o la miasi degli animali domestici da *Dermatobia hominis*, endemica nella fascia tropicale del Sud America.

Esistono inoltre miasi, generalmente causate dalle mosche del genere *Cuterebra*, *Oestrus* e *Wohlfahrtia*, che possono occasionalmente infestare l'uomo^[5]: è infatti possibile riscontrare forme di miasi esotiche in turisti di ritorno dalle aree equatoriali o subequatoriali dell'Africa o dell'America centro-meridionale rendendo così queste malattie di interesse attuale^[1].

Le più diffuse sono ^[6-9]:

- *Cochliomyia hominivorax* diffusa in America centrale e meridionale;
- la Famiglia dei Sarcophagidae e in particolare la *Sarcophaga carnaria*;
- *Cordylobia anthropophaga*, nota anche come *Tumby fly*, è diffusa in Africa centrale e orientale;

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

- *Dermatobia hominis*, unica specie nota di oestridae parassita dell'uomo;
- *Clogmia (Telmatoscopus) albipunctatus*, presente in Italia e America;
- *Chrysomya bezziana*, diffusa in Africa tropicale e subtropicale, Medio Oriente, subcontinente indiano e penisola malese, a est fino alla Nuova Guinea.

Ditteri

L'Ordine Diptera è uno degli Ordini più numerosi della Classe Insecta e comprende oltre 120.000 specie. La notevole varietà di ambienti colonizzati e la frequente relazione con l'uomo, con implicazioni di carattere economico, medico ed igienico-sanitario, fanno di questo ordine uno dei raggruppamenti di insetti di maggiore importanza: in tale ordine sono comprese specie che rientrano fra le più importanti parassitosi di interesse della zootecnico, specie responsabili della trasmissione di gravi e tristemente famose patologie a carico dell'uomo talora diffuse su più continenti, come la malaria, e specie ubiquitarie e commensali dell'uomo, come la comunissima mosca domestica.

Stadi

Le varie fasi di sviluppo delle specie appartenenti a questa famiglia si compongono di 4 stadi: le uova, che nel giro di pochissimo tempo si trasformano in larve (stadio che può durare anche molti mesi nella famiglia *Oestridae* e che avviene come parassita nei tessuti dell'ospite), che a loro volta si trasformano in pupa e poi in insetto adulto. Quest'ultimo stadio, a differenza di quello larvale, è particolarmente breve. Questa diversa durata dei vari stadi permette all'insetto di trascorrere il periodo invernale al riparo

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

dal clima rigido come parassita e, una volta adulto, di svilupparsi durante la stagione estiva, con temperature favorevoli^[10].

Larva

La larva dei Ditteri è apode, ovvero non presenta zampe, ha un aspetto vermiforme cilindro-conico a forma di “sigaro” di circa 10-20 mm con più bracci dotati di scheletro, più larga nel tratto addominale, con scarsa differenziazione delle regioni del corpo (capo, torace, addome). Presenta un apparato boccale semplificato costituito da due mandibole conformate ad uncino e da



Figura 1: larva di Diptera, stadio L1

una serie di scleriti cefalici interni a formare l'apparato cefalo-faringeo. A differenza delle mandibole dell'apparato buccale masticatore, gli uncini dell'apparato cefalo-faringeo sono dotati di movimenti secondo un piano verticale (fig. 1).

Le larve possono essere saprofaghe, fitofaghe, micetofaghe o zoofaghe. In quest'ultimo caso (tipico della *Diptera cyclorrhapha*, principale responsabile della miasi) ricorre sia la predazione sia il parassitismo, a spese degli invertebrati, sia il parassitismo a spese di vertebrati^[10].

Pupa

Le *pupae* (fig. 2) dei Ditteri possono essere obtecte o exarate. Le prime hanno gli abbozzi delle ali e delle zampe visibili ma appressati al



Figura 2: pupa di Diptera

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

resto del corpo, in quanto il tutto è avvolto da un'unica cuticola; le seconde hanno le appendici avvolte da una cuticola propria e sono perciò staccabili dal resto. Nell'ultima fase della loro vita le pupe dei Ditteri diventano mobili [10].

Mosca Adulto o Imago

Allo stadio finale, si presenta come un insetto di piccole o medie dimensioni, dotato di esoscheletro poco consistente, caratterizzato dalla presenza di annessi tegumentali. La peculiarità fondamentale dei Ditteri è la notevole specializzazione evolutiva raggiunta nella conformazione delle ali e nell'adattamento morfo-anatomico del torace: sono infatti provvisti di un solo paio di ali mesotoraciche funzionali seguite da un paio di ali metatoraciche utilizzate come bilancier^[11]

Le mosche sono presenti nelle più svariate condizioni climatiche in gran numero: approssimativamente 150000 specie, 10000 generi e 150 famiglie e molte di loro sono vettori di patologie che riguardano essere umano.

Riproduzione

I Ditteri si riproducono generalmente per anfigonia e sono ovipari e larvipari; rari sono i casi di riproduzione per partenogenesi o pedogenesi. Caratteristica è la brevità del ciclo di sviluppo, aspetto di particolare problematicità nel caso di Ditteri dannosi o nocivi, in quanto ne rende difficile il controllo in caso di avvicendamento di numerose generazioni^[12].

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Importanza

Le parassitosi causate dai ditteri sono responsabili di gravi problemi nel settore zootecnico sia dal punto di vista sanitario, a causa del diverso potenziale patogeno in relazione alla sede e alla biologia del parassita^[11], sia dal punto di vista dello sviluppo economico, a causa dei danni arrecati all'agricoltura alla zootecnia e nonché all'industria della concia delle pelli a causa degli notevoli scarti di cui si rendono responsabili^[12].

Ambito medico e igienico-sanitario

- irritazioni cutanee, allergie e altre patologie dirette provocate dall'attività di alimentazione degli adulti ematofagi;
- miasi provocate dall'attività trofica di larve parassita o sarcofaghe;
- trasmissione di agenti infettivi patogeni causata da adulti ematofagi quali la malaria e la plasmodiosi, trasmessa dalle *Anopheles*, e la tripanosomiasi africana (malattia del sonno), trasmessa da diverse specie di *Glossina*.

L'interesse igienico-sanitario risiede nell'etologia di diversi muscoidi commensali dell'uomo, fra cui ha un ruolo di primo piano la mosca domestica. Questo insetto si alterna infatti tra ambienti e substrati malsani (rifiuti, escrementi, ecc.) e ambienti domestici, posandosi sugli alimenti, sulle stoviglie e sulle persone. Il semplice contatto, o più probabilmente il riversamento di rigurgiti ed escrementi, è causa di accidentali trasmissioni di microrganismi patogeni agenti di febbri, affezioni gastrointestinali e/o patologie a carico delle mucose interne o esterne, diventando così anche possibile vettore del tifo e del colera^[12].

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Ambito agrario

- Formazione di mine all'interno dei frutti, a cui segue spesso l'insediamento di microrganismi patogeni;
- formazione di mine all'interno della foglia, pregiudicando la funzionalità dell'apparato assimilante o causando dal semplice danno di tipo estetico (negli ortaggi e nelle piante ornamentali), fino a danni di grande entità sulle produzioni frutticole, arrivando anche alla perdita dell'intero raccolto^[12].

Ambito alimentare ecologico

Sotto l'aspetto ecologico i ditteri saprofiti sono organismi utili, in quanto intervengono nelle fasi iniziali dei processi di decomposizione della sostanza organica. Possono invece essere considerati dannosi quando la loro attività trofica si indirizza sugli alimenti^[12].

Classificazione delle miasi

Le miasi possono essere classificate con differenti metodologie a seconda della caratteristica di interesse: possiamo infatti avere una classificazione in rapporto ai rispettivi agenti miasigeni, utile nel campo veterinario, o una classificazione secondo la specificità

| Anatomical classification of myiasis | | |
|--------------------------------------|--|--|
| Classification by Zumpt | Classification by Bishopp | Classification by James |
| Sanguinivorous | Bloodsucking | Bloodsucking |
| Dermal/subdermal | Tissue-destroying Subdermal migratory | Furuncular Creeping ic/wound Anal/vaginal |
| Nasopharyngeal | Infestation of the head passages | Nose, mouth, sinuses Aural Ocular |
| Intestinal | Intestinal/urogenital | Enteric Anal/vaginal |
| Urogenital | Intestinal/urogenital | Bladder, urinary passages Anal/vaginal |

Tabella 1: classificazione anatomica delle miasi

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

espressa dall'agente causale per gli organi o i tessuti bersaglio.

Sicuramente la classificazione più funzionale per questo trattato risulta essere quella di natura anatomica, come quella proposta da Bishopp e successivamente modificata da James e Zumpt, utile a scopo diagnostico per classificare l'infestazione in relazione alla sua localizzazione nell'ospite (Tab. 1) [3, 11, 13].

Un'altra classificazione, riportata per esteso nella Tab. 2, riconosce 5 macro categorie: miasi cutanee, foruncolose, intestinali, cavitare (tra cui rientra la miasi oculare) e la miasi con migrazioni interne, distinte in base al trofismo tissutale delle larve.

Classificazione secondo il tropismo tissutale delle larve

| | |
|--------------------|---|
| Miasi cutanee: | se interessano il mantello dermo-epidermico dell'ospite, talvolta il sottocutaneo, con possibilità per qualche specie di addentrarsi nei tessuti profondi. Sono provocate da larve appartenenti ai generi <i>Calliphora</i> , <i>Sarcophaga</i> , <i>Lucilia</i> , <i>Cochliomya</i> , <i>Wohlfarthia</i> e <i>Crysomia</i> che infestano le ferite superficiali o profonde di origine traumatica (lacerazioni da filo spinato o cornate), o da interventi operatori (castrazione, sterilizzazione). Sono di preferenza interessate le ferite secernenti o suppuranti. Le specie di mosche dei tropici, a parassitismo obbligato, sono particolarmente temibili perché capaci di penetrare anche la cute integra o attraverso soluzioni effimere come le minuscole ferite da morso di zecca o i punti d'inoculazione farmacologica; inoltre, tali parassiti possono spingersi più in profondità fino ai tessuti più interni o finanche, alle cavità naturali. Altre localizzazioni preferenziali delle larve di mosca, sono le zone cutanee inumidite da secrezioni come: l'area ombelicale nei neonati o la vulva nelle femmine in puerperio |
| miasi foruncolose: | caratterizzate dallo sviluppo, nello spessore del derma o nel sottocutaneo, di un granuloma reattivo. Agenti causali ne sono le larve del genere <i>Dermatobia</i> e <i>Cordylobia</i> |
| miasi intestinali: | in questo caso le larve, appartenenti al genere <i>Gasterophilus</i> , sono introdotte per via orale e sviluppano gran parte del loro ciclo in ambito gastroenterico |
| miasi cavitare | dal profilo patogenetico peculiare, dato dall'invasione delle cavità corporee naturali quali le fosse nasali (rinomiasi), i seni frontali (estrosi nasofrontale), i fornici congiuntivali (oftalmomiasi), l'orecchio esterno (otomiasi). I generi <i>Oestrus</i> e <i>Sarcophaga</i> sono i più importanti nel determinismo di queste parassitosi. È nota in Africa una forma di miasi oculare che conduce a cecità con esito letale |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

miasi con
migrazioni
interne

caratterizzate, infine, da complesse migrazioni delle larve, all'interno del corpo dell'ospite, prima di emergere a livello cutaneo. Sono indotte da larve del genere *Hypoderma*

Tabella 2: classificazioni delle miasi secondo il trofismo tissutale.

La diagnosi della miasi, sia essa clinica o anatomopatologica, è però sempre tardiva poiché l'infestazione è evidente quando l'evoluzione delle larve si è completata. Recentemente, anche in Italia, sono stati messi a punto interventi diagnostici che, tramite rilevamento di anticorpi nel siero, nel sangue e nel latte degli animali parassitati, hanno permesso di rilevare la presenza e diffusione di queste infestazioni^[1].

Manifestazioni cliniche nell'uomo

La miasi costituisce ormai un importante argomento di parassitologia umana, specie a seguito dell'aumentata mobilità turistica e lavorativa in zone tropicali, tanto da rappresentare la quinta causa dermatologica più comune, con una percentuale variabile dal 7,3% al 11% ^[14, 15].

Per la classificazione delle miasi ad interessamento umano si predilige la classificazione anatomica distinguendo così:

- miasi cutanee (foruncolose, sottocutanee e delle piaghe) da *Dermatobia hominis*, ecc.;
- miasi intestinali da *Eristalis*;
- miasi delle vie urinarie da *Fannia canicularis*;
- miasi cavitare che includono:
 - la rinomiasi, cagionata in particolare da *Wohlfahrtia magnifica*, *Cochliomya hominivorax* e *Oestrus ovis* (quest'ultima descritta da S. Pampiglione et al. nel 1997 nei pastori dell'Etna)

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

confermandone la sua diffusione tra queste categorie professionali);

- l'oftalmomiasi, causata principalmente da *Oestrus ovis* e *Rhinoestrus purpureus*.

Fattori di rischio della miasi acquisita, oltre all'esposizione a particolari condizioni climatiche che ne favoriscono lo sviluppo ^[11], sono sicuramente la scarsa igiene e le basse condizioni socioeconomiche^[16, 17], ma anche usanze tipiche di alcune popolazioni quali sedersi o stendersi per terra durante riti religiosi, o l'esposizione di lesioni suppurative che attraggono e stimolano la femmina di mosca a depositare le sue uova.

Ad oggi il reale impatto della miasi sull'uomo è in parte sconosciuto.

Dal punto di vista entomologico è molto complesso riuscire a identificare quale specie ne sia responsabile, specie in quelle regioni dove le miasi sono più diffuse.

Dal punto di vista epidemiologico i dati appaiono scarni in quanto, molto spesso, i casi che si presentano non vengono segnalati. Questa inadeguatezza nella registrazione dell'incidenza della patologia comporta una inadeguata capacità diagnostica da parte dei professionisti sanitari. Rilevata infatti la larva, questa viene estratta senza però i doverosi ulteriori approfondimenti in merito. Bisogna inoltre tenere conto che in alcune parti del mondo le miasi vengono trattate nell'ambiente domestico da familiari del paziente con rimedi "casalinghi", che contribuiscono ulteriormente alla riduzione della casistica presente nella Letteratura scientifica.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Miasi da *Oestrus ovis*

Le larve di *Oestrus ovis*, dell'ordine dei Ditteri, rappresentano la causa più comune di miasi oculare.

Tipica delle regioni dal clima sub-tropicale e temperato [18], è in particolare modo nota nel centro, nel sud Italia e nelle isole dove è particolarmente rappresentata la pastorizia^[19, 20] (fig. 3).

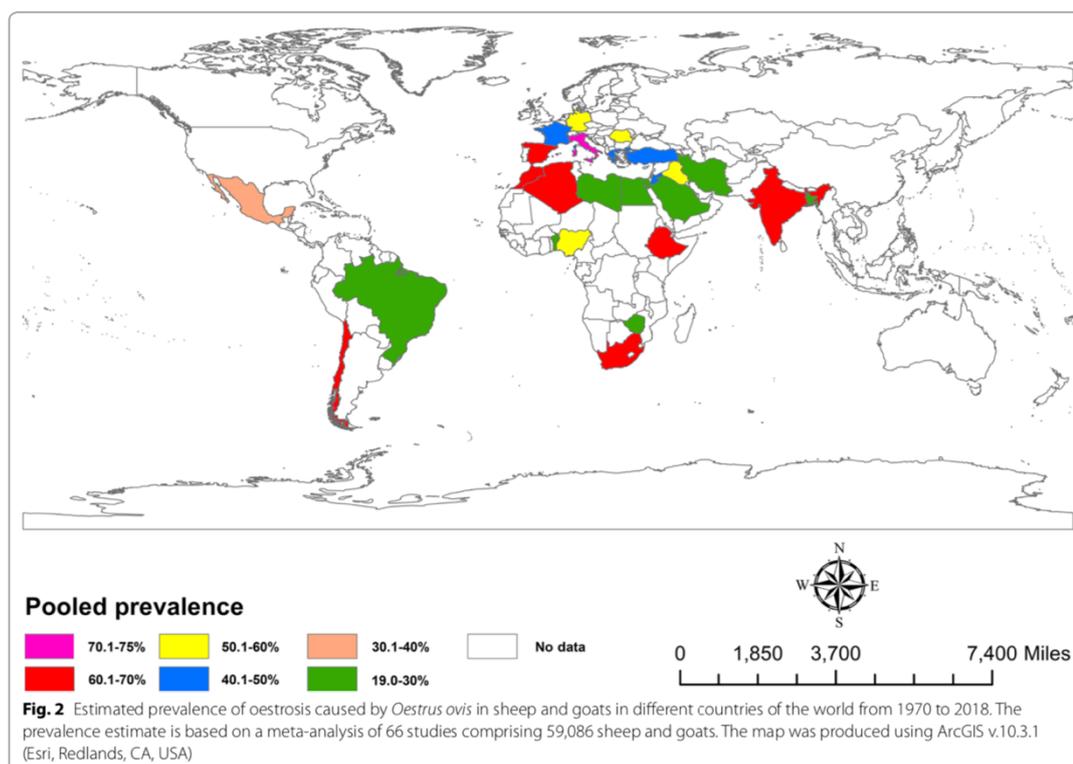


Figura 3: prevalenza mondiale delle miasi da *Oestrus ovis*

Nello specifico, la femmina fecondata di *Oestrus ovis*, durante le ore più calde del periodo primaverile-estivo, spruzza durante il volo nelle narici, o in generale sul muso durante il volo degli ovini e dei caprini, un getto di liquido contenente fino a 25 larve L₁. Da qui le larve, grazie ai loro uncini, e cibandosi del muco prodotto in risposta al processo infiammatorio, migrano fino a raggiungere le cavità nasali e quindi i seni frontali ed etmoidali, dove permangono per i mesi invernali (fase 1). Quando le condizioni tornano ad

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

essere favorevoli, in genere durante il periodo primaverile o estivo, le larve iniziano la loro metamorfosi (fase 2). A maturità avvenuta (fase 3), vengono espulse all'esterno e cadono sul terreno diventando pupe in 24 ore e, dopo 1 mese circa, insetto adulto, la cui sopravvivenza è limitata a non più di 14 giorni (fig. 4).

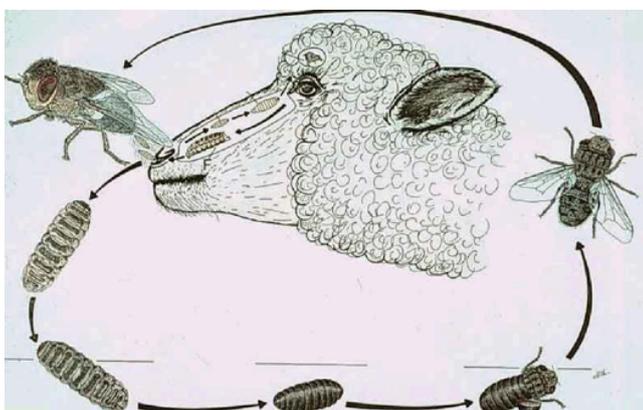


Figura 4: ciclo vitale di *Oestrus ovis*

Qualora l'insetto non trovi l'ospite specifico, espelle e schizza le larve mature sul volto del primo mammifero che si trova nei paraggi, solitamente cane, o, più spesso, l'uomo [21-23]. È per questo che tale patologia

risulta maggiormente diffusa fra gli allevatori, veterinari o chi lavori o frequenti ambienti rurali.

Sono stati descritti nei decenni passati numerosi casi in umani, raccolti soprattutto da Pampiglione, che interessano la congiuntiva (fig. 5), le narici, la gola, ovvero labbra e cavità orale, faringe, laringe e più raramente l'orecchio esterno [5, 11, 18, 22].



Figura 5: caso di oftalmomiasi esterna. È possibile osservare le larve a livello corneale (freccia blu a sinistra), o sulla congiuntiva tarsale (immagine destra)

Sebbene si ritenga che in campo medico la maggior parte delle miasi da *Oestrus ovis* siano di tipo congiuntivale, in realtà ciò appare

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

inesatto ed è da ascrivere al fatto che è evenienza più consueta consultare un medico per disturbi persistenti all'occhio che non per un fastidio alla gola o al naso [3, 11, 13, 18, 23].

Oftalmomiasi

L'oftalmomiasi, è caratterizzata dalla penetrazione delle larve nei tessuti oculari con una sintomatologia dallo spettro molto ampio che va dell'iperlacrimazione, la fotofobia, alla sensazione di corpo estraneo.

Classificazione

Possiamo classificare le oftalmomiasi in:

- oftalmomiasi primaria, allorché le mosche, principalmente del genere *Oestrus ovis* e *Rhinoestrus purpureus*, depongono le larve ai margini, o sulla superficie dell'occhio;
- oftalmomiasi secondaria, intesa come complicanza della rinomiasi, per il passaggio delle larve, attraverso le fessure sfenoidali, dalla cavità nasale, nell'orbita.

In entrambi i casi, con movimenti attivi, le larve aggrediscono la mucosa congiuntivale, quella palpebrale o il canale lacrimale, provocando intenso dolore che induce una reazione flogistica severa, con ripercussioni più o meno gravi a carico dell'organo a seconda della sede e della gravità.

Altra classificazione può essere quella topografica a seconda della localizzazione della larva, in oftalmomiasi esterna, interna o profonda.

Oftalmomiasi esterna

L'oftalmomiasi esterna (o superficiale) è caratterizzata dalla presenza di larve all'attaccatura ciliare e/o sulla congiuntiva, promuovendo così infiammazione congiuntivale. Questa tipologia di miasi, viene riportata in letteratura come una forma lieve, autolimitante e dal decorso benigno ^[11]. Le larve, con la loro particolare conformazione ad uncino, causano però, con il loro movimento durante il passaggio sulla superficie oculare, gravi lesioni corneali percepite dal paziente come dolore e sensazione di corpo estraneo.

Sono inoltre in grado di sopravvivere molteplici giorni sulla superficie oculare aumentando, in questo lasso di tempo, la sintomatologia del paziente, non solo a causa dei processi immuno-mediati (IGE) ma anche per il concomitarsi di congiuntiviti batteriche ^[24]

Nello specifico, la patologia è improvvisa ed è caratterizzata da occhi rossi, fotofobia, edema palpebrale, iperemia congiuntivale, emorragia congiuntivale puntata, formazione di pseudomembrane, cheratite superficiale puntata ed il riscontro delle tipiche larve sulla superficie oculare, patognomiche di questa patologia.

Qualora la miasi si localizzi a livello della ghiandola lacrimale, la lesione può complicarsi con una infestazione congiuntivale ^[25] ed è inoltre possibile una migrazione dal canale lacrimale alla cavità nasale ^[26].

Il dolore e l'infiammazione permangono per circa 10 giorni ^[11].

Oftalmomiasi interna

Con il termine oftalmomiasi interna si intende un'infestazione che coinvolge sia il segmento anteriore che posteriore dell'occhio^[27]. La larva può infatti

essere visibile sia a livello del segmento anteriore che del vitreo e finanche nello spazio subretinico.

Spesso questa patologia è una complicanza dell'oftalmomiasi esterna^[28].

Il sito di ingresso delle larva non è sempre visibile ma è probabile che penetrino dalla sclera e migrino all'interno del bulbo. Di solito, vi è la presenza di una singola larva endobulbare ma, sono riportati in letteratura, casi con riscontro di due o più larve nello stesso occhio e interessamento bilaterale^[29].

Oftalmomiasi interna anteriore

L'oftalmomiasi interna anteriore è meno comune e si presenta clinicamente con le caratteristiche di un'uveite, a cui può associarsi un'inflammazione del segmento anteriore anche di natura severa^[30].

Oftalmomiasi interna posteriore

Rappresenta la presentazione più classica di oftalmomiasi interna e si caratterizza per la presenza di pigmentazione e atrofia a livello dell'epitelio pigmentato retinico (RPE), con tunnel sottoretinici in uno schema incrociato accompagnato da emorragie, proliferazione fibrovascolare, distacchi retinici essudativi e presenza di cicatrici fibrovascolari^[31-33].

L'emorragia può presentarsi nel momento in cui la larva abrada e attraversa il tessuto vascolare; può poi seguire neovascolarizzazione coroideale con distacco essudativo emorragico ed eventuale cicatrice fibrosa.

Grave complicanza dell'oftalmomiasi in sede sottoretinica è il distacco di retina essudativo e fibrovascolare, che può estendersi fino al distacco totale con conseguente cecità, oltre che alle emorragie focali ed alle cicatrici fibrose

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

multifocali^[34, 35]. Tuttavia, la sua manifestazione tipica consiste nella presenza di tunnel sottoretinici con aspetto serpiginoso ed incroci, localizzati a livello dell'RPE con tracce di atrofia pigmentaria^[36], che rappresenta un segno patognomonico della patologia^[37-39].

Dal punto di vista sintomatologico ritroviamo anche in questo caso occhi rossi e dolore, a cui spesso si associano calo visivo, miodesopsie e scotomi. In particolare, il calo visivo severo è stato più comunemente associato con la presenza di infestazione da *Hypoderma tarandi*.

L'oftalmomiasi interna dovrebbe essere presa in considerazione nella diagnosi differenziale del distacco di retina, panuveite^[40], cellulite orbitaria^[41], trombosi del seno cavernoso^[42], corioretinite^[43] ed endoftalmite^[44]. Di conseguenza, la diagnosi di miasi subretinica si basa sulle caratteristiche alterazioni dello strato retinico sub-RPE ed alle tipiche modificazioni cliniche morfologiche correlate all'oftalmomiasi interna.

I dati epidemiologici dell'oftalmomiasi interna non sono dirimenti, in quanto in molti casi la larva viene distrutta tramite fotocoagulazione laser. Sembra però che la mosca della specie *Hypoderma tarandi*, tipica della renna del Nord America, nota anche come caribù, rappresenti la causa più diffusa nel Nord Europa, specie in Norvegia^[45, 46].

Oftalmomiasi profonda

Nota anche come oftalmomiasi orbitale, si caratterizza per la contemporanea presenza dell'infestazione sia a livello palpebrale e perioculare, che intraoculare.

Il quadro che si viene a configurare è più severo rispetto alle altre forme ed è caratterizzato da un'invasione intraoculare delle larve poste sulle ciglia, favorita dalla presenza di una ferita a livello della rima palpebrale.

La presenza di tumori palpebrali rappresenta un fattore predisponente comune per questa forma di oftalmomiasi^[47-51], sebbene possa comunque presentarsi anche su individui scevri da patologie neoplastiche, con meccanismi comuni a tutte le altre forme.

Trattamento

La terapia delle miasi cavitare mira principalmente all'asportazione meccanica delle larve, con l'ausilio d'istillazione di novocaina per le oftalmomiasi, o irrigazioni di etere o cloroformio per le rinomiasi ed otomiasi, al fine di anestetizzare le larve e le mucose interessate.

Nell'ambito veterinario, come anche mostrato in letteratura, la somministrazione orale o sottocutanea di Ivermectina, è risultata un trattamento utile e privo di rischi negli animali ^[52, 53].

Nell'uomo, la gestione delle oftalmomiasi, e più in particolare delle oftalmomiasi interne, è molto variabile a seconda delle sedi e della gravità del quadro clinico.

Le larve devono assolutamente essere rimosse per evitare ulteriori danni alle strutture orbitarie ed oculari. Ad esempio, nelle oftalmomiasi orbitarie l'asportazione delle larve vive è necessaria per evitare, attraverso la distruzione e la successiva penetrazione dei tessuti, l'estensione intracranica ^[51]. Lo stato infiammatorio necessita di trattamento topico a base di steroidi e midriatici con frequenti controlli, se però, nonostante la terapia, residuano larve ancora in vita, questo richiede un trattamento di natura chirurgica, o

mediante coagulazione laser come nel caso di larve in sede subretinica^[41], con urgenza pari alla localizzazione della larva.

Ad oggi quindi non esistono farmaci per il trattamento vero e proprio dell'oftalmomiasi nell'uomo. L'unguento a base di ossido giallo di mercurio in concentrazione all'1% (unico rimedio efficace conosciuto) non è più in commercio e non sono stati scoperti nuovi farmaci in grado di uccidere le larve di *Oestrus ovis* in maniera sicura ed efficace^[54]. La terapia con Ivermectina potrebbe essere una valida opzione terapeutica, utile a prevenire l'estensione del processo necrotizzante nelle strutture più interne e, di conseguenza, ridurre il rischio di danni permanenti gravi che necessitano come unica strada l'enucleazione^[55], ma ad oggi non sono stati eseguiti studi circa l'efficacia e la sicurezza dell'Ivermectina topica nell'oftalmomiasi umana.

L'unico trattamento efficace rimane perciò la rimozione meccanica della larva che però, data la sua rapidità di movimento, può facilmente passare inosservata, in particolare se la sintomatologia non peggiora; ne consegue pertanto la necessità di eseguire un gran numero di esami clinici, con conseguente aggravio a carico, non solo della compliance e del benessere psico-fisico del paziente, ma anche del Sistema Sanitario Nazionale, e con costi sociali conseguenti all'infermità temporanea e/o permanente derivante dall'*exitus* dell'infestazione.

Sicuramente l'utilizzo di lidocaina o cocaina come anestetico ha come beneficio ulteriore la capacità di immobilizzare le larve, per facilitarne le rimozione; inoltre, l'occlusione con un unguento, spesso può aiutare nella rimozione della larva incoraggiandone l'uscita specie dal sacco congiuntivale, se coinvolto ^[11].

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Alcuni Autori hanno riportato alcuni rari casi di oftalmomiasi orbitaria umana trattata con una combinazione di unguento di petrolio e ivermectina o ivermectina in soluzione ad uso topico cutaneo, al solo fine di coadiuvare la rimozione meccanica delle larve. Tali pubblicazioni si limitano però a casi di oftalmomiasi orbitaria/cutanea causata da altre specie di Ditteri (*Cochliomyia Hominivorax* e *Dermatobia hominis*) [53, 56-58] e la soluzione utilizzata non è mai stata somministrata ad uso topico oculare (collirio).

Da questa considerazione, vista ad oggi il frequente riscontro di tale patologia in Sardegna, le limitazioni presenti nella asportazione meccanica delle larve, ed il rischio di penetrazione endoculare delle larve eventualmente lasciate in vita sulla superficie oculare, nasce la necessità di trovare un farmaco topico per il trattamento delle oftalmomiasi nell'uomo.

Disegno dello studio

Per raggiungere lo scopo del trattato, abbiamo deciso di condurre uno studio *in vitro* seguito poi da uno studio *in vivo*.

Il lavoro può essere fondamentalmente diviso in tre fasi sostanziali:

- Fase 1: identificazione delle molecole potenzialmente efficaci nel trattamento delle larve e creazione del composto ad uso topico oculare, seguito poi dal prelevamento delle larve di *Oestrus ovis* e test di efficacia *in vitro*;
- fase 2: Valutazione della citotossicità e tollerabilità del preparato galenico, *in vitro*, su cellule corneali e congiuntivali umane e verifica della sopravvivenza delle cellule a differenti dosaggi e timepoint;
- fase 3: Valutazione della tossicità e tollerabilità del preparato galenico, *in vivo*, su modello animale.

Fase I

Si è proceduto all'identificazione delle molecole potenzialmente efficaci nel trattamento delle larve da *Oestrus ovis*, e nella creazione di un composto che potesse soddisfare non solo il profilo dell'efficacia clinica, ma anche quello della tollerabilità e sicurezza nell'uso topico oculare.

A tale proposito sono stati indagati diversi farmaci, al fine di trovare i composti che maggiormente potessero rispondere ai requisiti di efficacia e scarsa tossicità ricercati.

Farmaci

I principali farmaci esaminati sono stati lo Iodopovidone e l'Ivermectina. La scelta di questi due farmaci nasce dalla considerazione che l'Ivermectina è un

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

farmaco di uso veterinario notoriamente efficace nel trattamento di parassitosi, comprese quelle da *Oestrus ovis*, negli ovini. Il rationale dell'utilizzo dello Iodim® è nato dalla sua dimostrata efficacia nei confronti dell'acaro *Demodex* nelle blefariti umane nonché dalla sua nota azione antisettica e disinfettante, che avrebbe potuto potenzialmente contemporaneamente contrastare l'imponente reazione infiammatoria presente nell'oftalmomiasi esterna.

PVP:

Lo Iodo-Povidone (PVP-I) è un disinfettante e antisettico usato per la preparazione preoperatoria della pelle e delle mucose, nonché per il trattamento delle ferite contaminate. Visto il suo ampio spettro di attività antimicrobica, il PVP-I è ampiamente usato in oftalmologia. Già nel 2013 le linee guida dell'ESCRS indicavano lo Iodopovidone topico, come forma di profilassi per l'intervento di cataratta, come parte delle cure standard somministrate. Una misura obbligata per ridurre il numero di batteri nell'area della ferita consiste infatti nell'applicare Iodopovidone al 5% sulla cornea, sul sacco congiuntivale e sulla cute perioculare per almeno 3 minuti prima dell'intervento. In caso di controindicazioni per lo Iodopovidone (l'allergia è molto rara e l'ipertiroidismo è solo una controindicazione relativa per questo specifico uso) è possibile ricorrere ad una soluzione acquosa di clorexidina allo 0,05%. I primi dati dimostravano che l'uso dello Iodopovidone poteva ridurre del 90% la flora della superficie oculare e, al giorno d'oggi, la letteratura continua a sostenerne l'uso come principale misura preoperatoria per ridurre i tassi di endoftalmite postoperatoria ^[59].

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Recentemente è stato commercializzato un nuovo collirio a base di Iodo-Povidone allo 0.6% (composto da PVP-I allo 0.6% e acido ialuronico, IODIM™, Medivis). Le concentrazioni di PVP-I diluite hanno una più alta capacità di fornire iodio molecolare libero nei siti di infezione, con una migliore tollerabilità oculare. Questo aumenta lo iodio molecolare libero, noto per essere la specie iodata dotata di maggiore attività antimicrobica [60]. È stato anche dimostrato un effetto anti-infiammatorio del PVP-I, poiché lo iodio è in grado di agire come agente riducente dello ione superossido, generato nella reazione infiammatoria dell'ospite[61]. È interessante notare che, recentemente, lo Iodo-Povidone allo 0.6% si è dimostrato efficace anche contro gli acari del genere *Demodex* [62].

Ivermectina

L'ivermectina è un agente antielmintico semisintetico indicato per somministrazione orale nel trattamento di ascaridiasi, filariasi, gnatostomiasi e nelle infezioni da *Ancylostomatidae*. [63]

L'ivermectina è un lattone macrociclico il cui meccanismo d'azione si basa sulla promozione della secrezione di acido gamma-amminobutirico (GABA) da parte delle terminazioni nervose e sull'aumento della sua affinità, portando alla paralisi ed alla morte del parassita. Inoltre, l'ivermectina non penetrando facilmente nel sistema nervoso centrale dei mammiferi, e non interagendo con i neurotrasmettitori periferici dell'uomo, è sicuro per l'uso umano[64].

Studi *in vitro* hanno anche mostrato un effetto anti-infiammatorio legato alla diminuzione della risposta umorale e cellulo-mediata e alla modulazione della fagocitosi da parte dei neutrofili.

Come dimostrato dalla letteratura, la somministrazione orale di Ivermectina è sicura ed efficace nel trattamento delle miasi negli animali [52, 53] e numerosi studi hanno evidenziato che il trattamento topico con ivermectina può essere efficace nei disturbi cutanei come blefariti e rosacea, patologie nelle quali acari del genere *Demodex* possono avere un ruolo [65].

Alcuni autori hanno episodicamente descritto casi di oftalmomiasi umana trattata con una combinazione di unguento di vasellina e Ivermectina o esclusivamente con soluzioni di Ivermectina, come coadiuvante della rimozione meccanica delle larve. Inoltre, tutti questi articoli erano relativi a casi di oftalmomiasi legati a ditteri, quali *Cochliomyia hominivorax* e *Dermatobia hominis* [53, 56-58].

Soluzioni

Essendo l'Ivermectina in polvere, abbiamo valutato sia la sua efficacia in sospensione, sia mediante l'uso di svariate soluzioni per individuare quale di esse si adattasse maggiormente alle nostre esigenze.

Come solventi sono stati presi in considerazione due agenti normalmente utilizzati in oculistica (la Soluzione Salina Bilanciata [BSS] e l'olio di ricino), ed un solvente frequentemente utilizzato in ambito medico e classificato come "sicuro" dall'FDA, il Glicole Propilenico.

Soluzione Salina Bilanciata (BSS)

La soluzione salina bilanciata è una soluzione isotonica fisiologica sterile, in cui ogni ml contiene: cloruro di sodio (NaCl) 0.64%, cloruro di potassio (KCl) 0.075, calcio cloruro diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.048%, magnesio cloruro esaidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.03%, sodio acetato triidrato ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

0.39%, sodio citrato diidrato ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 0.17%, sodio idrossido e/o acido idroclorico (per tamponare il pH) e acqua per soluzioni iniettabili. Il pH è approssimativamente 7.0, l'osmolarità circa 200 mOsm/kg.

Il suo utilizzo è principalmente quello di irrigazione dei tessuti oculari durante la chirurgia oculare.^[66, 67]

Olio di ricino

L'olio di ricino è un trigliceride degli acidi grassi, commercialmente disponibile, economico e con una dimostrata scarsa tossicità oculare.

La composizione degli acidi grassi è approssimativamente dell'87% di acido ricinoleico, 7% acido linoleico, 3% acido palmitico, 1% acido stearico e tracce di acido idrossistearico.

L'olio di ricino ha proprietà emollienti ed è usato come olio, solvente o veicolo, nella cosmetica, nell'industria alimentare e nelle preparazioni farmaceutiche. Nell'industria farmaceutica è più comunemente utilizzato in formulazioni di tipo topico in creme a concentrazione del 5%-12.5%. Inoltre è utilizzato nelle formulazioni orali (comprese, pillole), nei preparati ad uso topico oculari (colliri, pomate) e come solvente nelle soluzioni intramuscolari. L'olio di ricino appare come un olio viscoso, leggermente paglierino, dall'odore ed il sapore che appare inizialmente delicato, ma che successivamente si dimostra acre^[68]. Il suo utilizzo nell'ambito dell'oculistica è di comune riscontro nei preparati galenici di ciclosporina o come componente delle lacrime artificiali per il trattamento delle meibomiti^[69].

Glicole propilenico

Il glicole propilenico è un liquido trasparente, viscoso, quasi inodore, con un sapore che si avvicina molto a quello della glicerina. È molto usato come solvente e come conservante in una grande quantità di preparazioni farmaceutiche per l'utilizzo parenterale e non parenterale. È un solvente migliore della glicerina e dissolve una grande quantità di sostanze come i corticosteroidi, i fenoli, i farmaci sulfamidici, i barbiturici, le vitamine (A e D) ed in una discreta quantità di anestetici locali. Possiede un'azione antisettica simile all'etanolo. Contro i funghi si comporta similmente alla glicerina ed è appena meno efficace dell'etanolo. È utilizzato anche nella cosmetica e nell'industria alimentare e come veicolo per i sapori in presenza di etanolo. Conservante con azione antimicrobica, disinfettante, umettante, solvente, possiede caratteristiche di co-solvente miscibile in acqua con ridotta azione tossica. Il Glicole propilenico è rapidamente assorbito dal tratto intestinale, mentre non esistono evidenze che possa essere assorbito attraverso la pelle, anche in caso di ferite cutanee. Prevalentemente metabolizzato dal fegato è degradato in acido lattico e piruvico, ma viene anche parzialmente escreto intatto nelle urine. Sebbene appaia leggermente più irritante della glicerina, le formulazioni topiche a base di Glicole Propilenico appaiono minimamente irritanti. Gli effetti tossici descritti in letteratura sono perlopiù dovuti all'assunzione di dosi molto elevate del prodotto ^[68].

Modello in vitro

Visto il particolare campo di interesse e il necessario supporto di un parassitologo, questa fase è stata svolta con l'attiva collaborazione e partecipazione del prof. Giovanni Garippa, Professore Ordinario di

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Parassitologia e Malattie Parassitarie degli Animali, Direttore della Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni zootecniche. Il prof. Garippa ha ricoperto l'incarico di Presidente della Società Italiana di Patologia e Allevamento degli Ovini e Caprini ed ha condotto numerosi studi e progetti di ricerca, nazionali ed internazionali, relative alle problematiche della parassitologia e malattie parassitarie degli animali, con oltre 300 pubblicazioni su riviste italiane e straniere.

Le larve, prelevate durante il periodo invernale, ovvero durante la fase di maggiore replicazione, da teste di pecore prelevate presso i mattatoi del Nord Sardegna, sono state utilizzate per ricreare in vitro un modello della patologia per poter testare i composti precedentemente descritti.

Fase II

L'obiettivo di questa fase dello studio è stato di verificare la citotossicità dei composti già testati nella fase I e rivelatesi promettenti in termini di rapidità di azione ed efficacia. Al fine di poter valutare la reale tollerabilità e tossicità dei preparati galenici sviluppati, il protocollo di studio prevedeva di testare questi composti, *in vitro*, su cellule corneali e congiuntivali umane e verificare la sopravvivenza delle cellule a differenti dosaggio e diversi timepoint.

Per tale scopo si è deciso di partecipare al bando Erasmus/Ulisse pubblicato dall'Università degli Studi di Sassari al fine di poter eseguire questa fase di studio nel laboratorio del professor Arto Urtti, dell'Università della Finlandia dell' Est.

Il prof. Urtti ha ottenuto il Ph.D. in Farmacia nel 1986 presso l'Università di Kuopio, Finlandia, ed è professore associato di Tecniche farmaceutiche e biofarmaceutiche. Autore di oltre 300 pubblicazioni peer-reviewed e oltre 22

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

brevetti, ha ricevuto numerosi premi per la ricerca e attualmente dirige il laboratorio di Biofarmacia dell'Università di Kuopio, dove vengono svolte primariamente ricerche sul tema dell'"Ocular Drug Delivery".

Modelli cellulari

Gli studi di tossicità *in vitro* dei farmaci sperimentali sono di fondamentale importanza per testare la sicurezza e la tollerabilità dei farmaci. Può infatti accadere che un farmaco, efficace contro il suo target, sia poi altamente tossico o mal tollerato, rendendone di fatto impossibile l'utilizzo.

I test di tossicità *in vivo*, in particolare per i trattamenti topici oculari, possono essere problematici, in quanto invasivi e potenzialmente estremamente tossici per i modelli animali coinvolti.

I modelli *ex vivo*, sebbene potenzialmente utili, sono soggetti a limitazioni, soprattutto temporali, a causa della mortalità dei tessuti, perciò, sebbene utilizzati in precedenza, i risultati ottenuti da questi modelli possono talvolta non rappresentare correttamente le condizioni reali dell'occhio umano [70].

A seguito di quanto esposto, sono stati sviluppati modelli cellulari per predire, *in vitro*, l'eventuale tossicità *in vivo*. Questi modelli spaziano dalle semplici linee cellulari a singolo strato, fino ai complessi modelli tridimensionali.

Per valutare la tossicità sulle cellule corneali, il modello più semplice ed efficace rappresentato da una cultura monostrato di colture cellulari primarie o immortalizzate su piastra. Non è infatti la prima volta che linee cellule epiteliali primarie umane [71, 72] e linee cellule corneali immortalizzate [71, 73-75] vengono usate per valutare la tossicità di lacrime artificiali, farmaci topici ed eccipienti. Ciò è possibile poiché, come dimostrato dallo studio di Savolainen et al. [75], una semplice cultura di cellule corneali non differenziate è

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

sovrapponibile, in termini di reazione tossica, a quella della cornea umana *in vivo*.

Culture di cellule epiteliali corneali (HCE) e congiuntivali (HCjE) umane

Questo tipo di cellule sono state utilizzate in numerose ricerche in ambito oftalmologico, sia per lo studio della tossicità, apoptosi e adesività cellulare, sia per testare gli effetti dei fattori di crescita.

Le culture cellulari primarie non vengono modificate, così da rappresentare completamente le cellule umane. Se questo da un lato permette un risultato ottimale e del tutto sovrapponibile alla “realtà”, dall’altro rappresenta uno svantaggio per gli studi *in vitro*. Queste cellule infatti presentano un ciclo vitale molto breve, intorno alle 10 replicazioni, rendendo complesso e economicamente svantaggioso il loro utilizzo ^[76].

Per ovviare a tali limitazioni sono state create delle linee cellulari modificate attraverso la tecnica di immortalizzazione virale. Sebbene sia possibile anche *in vivo* che alcune cellule corneali subiscano un processo di immortalizzazione, queste cellule possono mostrare una crescita alterata, eccessiva, ed una alterata espressione di cellule di superficie, nonché anomalie cromosomiche. Ciò nonostante, queste linee cellulari sono di più facile manipolazione, permettendo una maggiore riproducibilità degli esperimenti grazie ad un’illimitata capacità di replicazione.

In passato sono state utilizzate anche cellule SIRC (The Statens Seruminstitut rabbit corneal) per condurre studi di tossicità *in vitro*. Tali cellule però mostrano un fenotipo di tipo fibroblastico e pertanto, alla luce della nuova

disponibilità delle cellule HCE, non hanno più un razionale per il loro utilizzo^[77].

Test di tossicità

I test di citotossicità e di vitalità cellulare *in vitro* sono nati con lo scopo di ridurre i costi e i tempi necessari anche grazie all'uso di automazioni. Inoltre, grazie all'utilizzo di cellule umane, è possibile avere risultati più rilevanti rispetto ai test sugli animali *in vivo*. Ad oggi, sebbene i test sugli animali *in vivo* non siano stati del tutto sostituiti da questi test, in quanto non tecnicamente sufficientemente avanzati ^[78], hanno comunque permesso di ridurre il numero e evitare effetti estremamente tossici e dannosi per gli animali coinvolti.

Tossicità oculare

Dal punto di vista prettamente oculare, l'esposizione ad agenti chimici può di fatto causare un'irritazione oculare con conseguente dolore, data dall'azione diretta dei recettori del dolore ^[79] e tradursi in un danno a livello dei tessuti corneali ^[80], la cui estensione è strettamente dipendente dalla tossicità del prodotto chimico con cui è entrato in contatto.

I tipici agenti irritanti sono tensioattivi cationici, anionici e non ionici, aldeidi, acidi, alcoli e sostanze alcaline. Questi possono danneggiare l'epitelio corneale in maniera lieve o moderata fino a danni gravi, che si possono estendere a tutta la superficie corneale, che possono arrivare a coinvolgere anche lo stroma corneale. La risposta tipica dell'irritazione corneale comprende l'infiammazione con attivazione e migrazione dei cheratociti, la

fibrosi e la neovascolarizzazione congiuntivale ^[81] che si traduce, per via del suo effetto tossico, in rossore, chemosi congiuntivale e secrezione^[82].

Il principio dei test di tossicità *in vitro* è quello di esporre le cellule a varie concentrazioni di farmaci per un certo periodo di tempo; le cellule vengono poi monitorate dopo l'incubazione e confrontate allo stato normale.

Gli agenti fisici e chimici possono influenzare la salute e il metabolismo delle cellule causandone tossicità attraverso vari eventi cellulari (quali distruzione delle membrane, modifiche circa la differenziazione, proliferazione, morfologia, e funzione cellulare ^[83, 84], la prevenzione della sintesi proteica, l'inibizione dell'allungamento dei polidossinucleotidi e le reazioni enzimatiche^[85]. È per questo che, al fine di determinare la vitalità e la morte cellulare causata da questi meccanismi, sono necessari test di citotossicità che siano però a basso impatto economico ma al contempo affidabili e riproducibili^[86].

I test più usati, valutano l'integrità della membrana cellulari o l'attività metabolica delle cellule attraverso analisi colorimetriche, fluorometriche o basate sulla luminescenza ^[87, 88].

Approfondimenti sui meccanismi biochimici possono essere ottenuti attraverso approcci sistemici (proteomica, trascrittomica, metabolomica) che sono strumenti emergenti nella tossicità predittiva ^[89, 90].

La vitalità cellulare rappresenta, di per sé, lo step più semplice nei test di tossicità. I prodotti chimici possono infatti causare lesioni cellulari che inducono citotossicità attraverso vie apoptotiche e/o necrotiche, per questa ragione i test di vitalità si basano sull'integrità della membrana cellulare o sull'attività metabolica delle cellule mediante l'analisi di biomarcatori (come

nel caso del Cytotox 96) o, ad esempio, attraverso indicatori metabolici che riportano l'attività dei sistemi di riduzione dell'ossidazione cellulare (ad esempio l'MTT) [87, 88].

Analisi colorimetrica

Il principio dei test colorimetrici è la misurazione di un marcatore biochimico per valutare l'attività metabolica delle cellule. I reagenti utilizzati nei test colorimetrici sviluppano un colore in risposta alla vitalità delle cellule, consentendo la misurazione colorimetrica della vitalità cellulare tramite spettrofotometro. I test colorimetrici sono applicabili a linee cellulari aderenti o sospese, facili da eseguire e relativamente economiche [91, 92]. Sono disponibili in commercio molteplici kit di test colorimetrici da diverse società con al loro interno le procedure sperimentali.

Cytotox 96

Il dosaggio di citotossicità LDH (lattato deidrogenasi) è un metodo colorimetrico per il dosaggio della citotossicità cellulare.

Il razionale alla base di questo test risiede nel fatto che la lattato deidrogenasi fuoriesce dalle cellule solo se la membrana plasmatica è stata danneggiata^[70]: questa sua caratteristica rende l'LDH il biomarcatore più comunemente usato per l'integrità della membrana cellulare.

Il kit di dosaggio della citotossicità LDH può essere utilizzato con diversi tipi di cellule, non solo per l'analisi della citotossicità mediata dalle cellule, ma anche per la valutazione della citotossicità mediata da sostanze chimiche, tossiche ed altri composti. Il dosaggio misura quantitativamente l'enzima stabile, citosolico, lattato deidrogenasi (LDH) che viene rilasciato dalla cellula

danneggiata. L'LDH è un enzima che si trova normalmente nel citoplasma cellulare. Quando la vitalità cellulare si riduce, aumenta la perdita della membrana plasmatica e quindi l'enzima LDH viene rilasciato nel mezzo di coltura cellulare. L' LDH rilasciato viene misurato con una reazione enzimatica accoppiata che provoca la conversione di un sale di tetrazolio (iodonitrotetrazolium (INT)) in un formazan di colore rosso mediante diaforasi. Nella prima fase, LDH catalizza la conversione del lattato in piruvato e quindi il NAD viene ridotto a NADH / H +. In una seconda fase, il catalizzatore (diaforasi) trasferisce H / H + da NADH / H + al sale di tetrazolio 2- (4-iodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5-feniltetrazo- lium cloruro (INT), che viene ridotto a formazan rosso ^[93, 94].

L'attività LDH è determinata come ossidazione NADH o riduzione INT per un periodo di tempo definito. Il formazan rosso risultante si assorbe al massimo a 492 nm e può essere misurato quantitativamente a 490 nm.

Il detergente Triton X-100 è comunemente usato come controllo positivo nel test LDH per determinare il rilascio massimo di LDH dalle cellule. Inoltre, ben note particelle membranolitiche come la silice cristallina possono essere utilizzate come controllo positivo nel dosaggio LDH ^[95].

Vantaggi: affidabilità, velocità e semplice valutazione sono alcune delle caratteristiche di questo test. La perdita di LDH intracellulare, e il suo rilascio nel mezzo di coltura, sono un indicatore di morte cellulare irreversibile a causa di danni alla membrana cellulare ^[93, 96].

Svantaggi: la principale limitazione di questo test è che il siero e alcuni altri composti hanno un'attività intrinseca di LDH. Ad esempio, il Siero Fetale Bovino, frequente componente dei mezzi di coltura, è in grado di alterare le letture dell' LDH a causa di un alto valore di background. Pertanto, questo

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

test è limitato a culture prive di mezzo a base di siero o di livelli di siero basso. Al fine di evitare l'elevato background i test devono essere adeguati modificando i tempi di esposizione in modo da permettere alle cellule una adeguata sopravvivenza con un mezzo di cultura modificato (siero-free o comunque con concentrazioni molto ridotte), evitando bias derivanti da una morte cellulare indotta da un mezzo di cultura inadeguato, piuttosto che da una reale tossicità del mezzo da testare. A tal proposito è consigliato eseguire sempre una prima lettura con una quota del mezzo di coltura che si è scelto di utilizzare, e confrontarla con una lettura su un mezzo di coltura non ancora addizionato dei vari supplementi (ad esempio DMEM puro) [86].

Mtt

Il kit MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) è uno dei kit colorimetrici più comunemente usati per valutare la citotossicità o la vitalità cellulare [97]. Il rationale alla base di questo test risiede nel fatto che, a differenza delle cellule morte, le cellule vitali riducono i coloranti a prodotti colorati [98]. Da ciò deriva un rapporto direttamente proporzionale tra la quantità di prodotti colorati e il numero di cellule vitali.

Questo test determina principalmente la vitalità cellulare attraverso la determinazione della funzione mitocondriale delle cellule misurando l'attività degli enzimi mitocondriali come la succinato deidrogenasi [99]. In questo test, MTT è ridotto a cristalli viola di formazan dall' NADH. Questo prodotto può essere quantificato dall'assorbimento della luce a una lunghezza d'onda specifica.

Vantaggi: Questo metodo è di gran lunga superiore ai metodi di esclusione dei coloranti precedentemente menzionati perché è facile da usare, sicuro,

ha un'alta riproducibilità ed è ampiamente usato per determinare sia i test di vitalità cellulare che di citotossicità [86, 99, 100].

Svantaggi: I cristalli di Formazan sono insolubili in acqua e formano cristalli viola a forma di ago nelle cellule. Pertanto, prima di misurare l'assorbanza, è necessario un solvente organico come dimetilsolfossido (DMSO) o isopropanolo per solubilizzare i cristalli. Inoltre, la citotossicità del formazan MTT rende difficile la rimozione dei terreni di coltura cellulare dai pozzetti della piastra a causa delle cellule galleggianti con aghi di formazan, comportando il rischio di una significativa differenza tra i singoli pozzetti [99, 101].

Ulteriori esperimenti di controllo dovrebbero essere condotti per ridurre i risultati falsi positivi o falsi negativi causati da interferenze di fondo dovute all'inclusione di particelle. Questa interferenza potrebbe portare a una sopravvalutazione della vitalità cellulare. Questo può essere spesso controllato mediante sottrazione dell'assorbanza di fondo delle cellule in presenza delle particelle, ma senza i reagenti del dosaggio [86].

Fase III

Alla luce dei risultati ottenuti dalla fase II dello studio si è deciso di procedere ad un test su modello animale al fine di verificare, *in vivo*, la tossicità del farmaco in studio. I dati di tossicità ottenuti dagli studi di fase II dimostravano infatti un grado di tossicità sostenibile per uno studio su modello animale, sebbene fosse stato deciso che, qualsiasi manifestazione oculare apparentemente insostenibile per la cavia, sarebbe stata sufficiente per interrompere lo studio e sopprimere l'animale.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Modelli animali

Per eseguire questo studio si è deciso di utilizzare, diversamente dal tipico test di Draize, un modello murino.

Test di Draize

Il test di Draize è un test di tossicità acuto sviluppato nel 1944 dai tossicologi della FDA John H. Draize e Jacob M. Spines, approvato globalmente dai governi e accettato dall'Organization for Economic Cooperation and Countries Development (OECD, test guidance [TG] 405). Il modello più frequentemente utilizzato è il coniglio albino, per un numero medio di circa 3-6 esemplari. I conigli albini presentano il vantaggio di occhi sufficientemente grandi, con una anatomia e fisiologia ben conosciuta, sono facili da maneggiare, facilmente disponibili e relativamente poco costosi. Con questo test si esaminano i cambiamenti che avvengono a livello della congiuntiva, della cornea e dell'iride. In questo test vengono normalmente instillati 0.1 ml di della sostanza in studio nei fornici inferiori in uno dei due occhi (occhio in studio), previa instillazione di un anestetico collirio ove necessario, mentre il controlaterale viene utilizzato come controllo. I timepoint solitamente utilizzati sono: 1, 4, 24, 48 e 72 ore dopo l'esposizione. I parametri comunemente analizzati sono: i cambiamenti direttamente visualizzabili nella camera anteriore, densità ed estensione delle opacità corneali, severità dell'infiammazione iridea, severità della reazione congiuntivale ed eventuale edema. Qualora i test dimostrino una tossicità elevata tale da provocare una sofferenza eccessiva per la cavia, queste vengono rapidamente ed umanamente sopresse.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Attualmente, la scala di valutazione universalmente riconosciuta è la Globally Harmonized System (GHS) sebbene ogni paese, ed ogni laboratorio, possa decidere di personalizzare la scala di valutazione del test. Secondo la classificazione della GHS i farmaci possono essere classificati come:

- categoria 1 (irritazione irreversibile entro 21 giorni);
- categoria 2 (irritazione reversibile entro i 21 giorni). Quest'ultima categoria è a sua volta divisa in due sottoclassi:
 - ◇ 2A: irritanti oculari con reversione della sintomatologia entro 21 giorni;
 - ◇ 2B: lievi irritanti oculari, con reversione della sintomatologia entro 7 giorni.
- “No Classification”: sostanze non irritanti

L'utilizzo di tale test è stato ampiamente criticato in passato non solo per la sua “crudeltà”, ma anche per l'alta variabilità inter-laboratoristica, dovuta alla soggettività dei risultati analizzati. Ciononostante, tale metodologia di esame, rimane a tutt'ora un test universalmente riconosciuto ed accettato per predire i potenziali effetti irritanti dei farmaci nell'occhio ^[102, 103].

Test su modello murino

Recentemente, i modelli murini sono stati frequentemente utilizzati per lo studio delle patologie correlate al *dry-eye* ^[104]. Dal momento che le più temibili complicanze correlate all'istillazione di questo farmaco potevano interessare proprio la superficie corneale, con un effetto simile a quello delle patologie correlate al *dry-eye* severo, è stato deciso di riadattare il test di Draize su un modello murino.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Costi dello studio

Lo studio è stato condotto con l'ausilio dei fondi del dottorato di ricerca.

Il costo per l'acquisto della polvere di Ivermectina è stato di 130€ per 1000 mg, per un costo totale di circa 400€. L'acquisto della polvere di Ivermectina e di PVP necessarie alla fase II dello studio è stato sostenuto dal Laboratorio del Prof. Urtti, così come i costi necessari all'acquisto delle culture cellulari, dei mezzi di cultura e dei test di citotossicità necessari.

Il farmaco IODIM è stato procurato dai campioni gratuiti destinati ai medici del servizio di oftalmologia dell'AOU di Sassari.

Le larve di *Oestrus ovis* sono state ottenute dalle teste di ovini prelevate presso alcuni mattatoi del Nord Sardegna, con l'ausilio dei mezzi e del personale del laboratorio di parassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari, senza alcun costo, e con la collaborazione dei Medici Veterinari del Servizio Igiene degli alimenti di origine animale, Area Socio Sanitaria Locale di Sassari (ASSL) dell'Azienda tutela della salute (AST) di Sassari.

Nessuna spesa è stata sostenuta per la preparazione dei farmaci galenici utilizzati nella fase I della sperimentazione, che sono stati preparati dal servizio di Farmacologia dell'A.O.U. di Sassari.

Tempi di esecuzione

La fase I è stata condotta dal mese di Dicembre 2017 ed è stata conclusa in circa 50 giorni

Le fasi II e III sono state condotte nel corso degli anni 2018-2019, con la collaborazione del laboratorio di farmacologia della Università della Finlandia dell'EST.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Obiettivi e Vantaggi

Gli obiettivi attesi da questo progetto di ricerca sono stati di individuare un nuovo, sicuro ed efficace trattamento topico popolare per la gestione dell'oftalmomiasi esterna umana.

Sebbene l'oftalmomiasi non sia una patologia di comune riscontro, ma presente solo delle aree ad alta incidenza della parassitosi come la Sardegna, le sue manifestazioni, fra cui congiuntivite, emorragia sotto congiuntivale, abrasione corneale ed uveiti nella forma esterna ed emorragie vitreali, distacco retinico trazionale, endoftalmite e lesioni sottoretiniche arcuate o lineari nella forma interna, possono esitare in un deficit funzionale severo, ed i rischi e le complicanze correlate a questa patologia non devono essere sottovalutate. Inoltre, la rimozione meccanica delle larve, attualmente l'unica terapia esistente, è non di facile esecuzione, a causa dell'alto numero e la vivace motilità delle larve, nonché alla severa chemosi congiuntivale che caratterizza questa infestazione. Una nuova strategia terapeutica per curare questa patologia, porterebbe ad una gestione più semplice, economica e con una sicuramente miglior compliance dei pazienti. Infine, qualora l'Ivermectina dovesse risultare ben tollerata ed efficace, il progetto di studio potrebbe in un futuro essere ampliato per trattare altre patologie come la blefarite da *Demodex*, contro il quale è già stata dimostrata una efficacia dell'ivermectina topica in campo dermatologico ^[65], o come le cheratiti da *acanthamoeba*.

Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico

Fase I

Scopo di questa fase di studio è stato verificare *in vitro* l'eventuale efficacia dei farmaci presi in considerazione nei confronti di larve di primo stadio (L₁) di *Oestrus ovis*.

Materiali e metodi

Preparazioni farmaceutiche

Il Protocollo preparato per questa fase di studio prevedeva di testare sulle larve l'efficacia dei seguenti composti:

- 1) Soluzione Salina Bilanciata (BSS) (placebo)
- 2) 0.6% di Iodopovidone (IODIM).
- 3) Formulazione galenica di Ivermectina all'1% (10 mg/ml)
- 4) Formulazione galenica di Ivermectina all'1% (10 mg/ml) + Iodopovidone allo 0.6%

Tutte le formulazioni sono state pesate su una bilancia analitica (sensibilità 0,1 mg, Mettler Toledo ab-204) ed il pH è stato misurato con un pH-metro modello 700 XS.

Secondo la Farmacopea, "le gocce oftalmiche sono soluzioni sterili acquose o oleose, sospensioni o emulsioni, destinate ad essere somministrate nel sacco congiuntivale..." (The International Pharmacopoeia. World Health Organization; 2006).

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Allo scopo di testare farmaci alternativi, abbiamo preparato due formulazioni differenti di ivermectina.

La prima formulazione era 10 ml di ivermectina all'1% in sospensione. Per ottenerla sono stati pesati in bilancia analitica (sensibilità 0.1 mg) 100mg di ivermectina in polvere posti in agitazione magnetica con 10 ml di BSS. Il pH della sospensione era circa 5.3.

Per quanto riguarda la seconda formulazione, è stata presa in considerazione la solubilità di dell'ivermectina riportata in letteratura e testata in laboratorio, e sono stati selezionati due possibili solventi compatibili con l'epitelio corneale, vale a dire glicole propilenico e olio di ricino.

Tuttavia, il fatto che l'olio di ricino non sia miscelabile col film lacrimale, dove le larve di *Oestrus ovis* svolgono il loro ciclo vitale, ha portato a concentrarci sul glicole propilenico, avente teoricamente una buona tollerabilità sulla superficie dell'occhio. Per ottenere 10 ml di soluzione di ivermectina all'1%, sono stati pesati 100 mg di ivermectina in polvere e posti in agitazione magnetica con 5 ml di glicole propilenico. Successivamente alla completa solubilizzazione dell'ivermectina la soluzione è stata portata ad un volume di 10 ml con un matraccio da 10 ml. Allo stesso tempo l'ancoretta magnetica è stata lavata per recuperare i residui. Il pH finale della soluzione era circa 5.4.

É stata inoltre testata un'associazione tra una preparazione oftalmica di PVP-I (Oftasteril™ 5%, Alfa Intes, Casoria, Italia) diluita allo 0.6% e ivermectina. Considerando la solubilità sia dell'ivermectina che del polivinilpirrolidone-iodio riportata in letteratura e testata in laboratorio, abbiamo scelto una miscela di glicole propilenico e acqua. Per ottenere 10 mL di soluzione, 100 mg di ivermectina sono stati solubilizzati in 5 mL di glicole propilenico all'interno di un matraccio da 10mL sotto agitazione magnetica sino a

completa solubilizzazione. 1.2mL di Oftasteril™ (pH 4.5) sono stati aggiunti e la soluzione è stata portata ad un volume di 10 mL con glicole propilenico. Il pH finale della soluzione era circa 4.2.

Per evitare distorsioni dovute ad una possibile azione del solvente, è stato testato anche il glicole propilenico da solo. È stato inoltre testato un farmaco veterinario a base di Ivermectina 1% (Tolomec®) per confronto. Abbiamo inoltre testato l'attività di una nuova formulazione in gocce oculari composta da PVP-I allo 0.6% ed acido ialuronico (IODIM™, Medivis). La soluzione fisiologica sterile è stata impiegata come controllo.

Rivelamento della larva

Tra il 4 dicembre 2017 e il 23 gennaio 2018, per un totale di 50 giorni, sono state campionate teste di pecore regolarmente macellate nei mattatoi del Nord Sardegna, per un massimo giornaliero di 15. Queste sono state trasferite mediante specifici contenitori, nella sala autoptica del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari. Qui le teste sono state sezionate lungo l'asse sagittale ed i seni nasali sono stati rimossi e raccolti.

La raccolta e il processamento dei campioni sono avvenuti nella stessa giornata; quando ciò non è stato possibile, le teste in eccesso sono state mantenute intatte in contenitori specifici a una temperatura media di 30 °C e processate, al più tardi, il giorno successivo.

Tutti i seni nasali raccolti sono stati esaminati mediante stereo-microscopio.

Sulla base delle caratteristiche osservate allo stereo-microscopio, le larve rinvenute sono state selezionate in modo da ottenere gruppi omogenei di L₁ di *Oestrus ovis*, eliminando tutte quelle larve in stadi successivi (L₂ e L₃). Quotidianamente, tutte le larve L₁ di *Oestrus ovis* repertate, sono state

raccolte e trasferite su un pezzo di tessuto nasale, in una singola piastra di Petri per essere analizzate. In tale modo è stato possibile effettuare i test farmacologici su campioni omogenei di larve.

In totale sono state prelevate 1015 larve L1 di *Oestrus ovis*.

Esperimenti in vitro

I test *in vitro* sono stati condotti nel laboratorio della Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Medicine Veterinaria dell'Università di Sassari. I campioni di larve sono stati raccolti e processati secondo le metodologie espresse paragrafo *rilevamento delle Larve*.

Tutti gli esperimenti sono stati riportati, come da protocollo, su un foglio elettronico.

Un massimo di tre piastre Petri, con un numero limitato di 25 larve L₁, sono state preparate contemporaneamente da tre diversi esaminatori e quindi ciascuna è stata esposta ad un differente farmaco. Almeno una piastra è sempre stata allestita con soluzione salina come controllo. I campioni sono stati messi a contatto con 1 mL di ciascuno dei farmaci in studio ed esaminati allo stereomicroscopio per valutare la loro vitalità. Al fine di verificare quale potesse essere un range temporale di efficacia dei farmaci testati, sono stati inizialmente testati 3 differenti time-point per ogni farmaco: 2 ore, 8 ore e 12 ore (Tabella 3).

Tabella 3: farmaci e time-point inizialmente utilizzati nel protocollo di studio

| 2 ore | 8 ore | 12 ore |
|---|---|---|
| Controllo T-2 (Larve con BSS*) | Controllo T-8 (Larve con BSS*) | Controllo T-12 (Larve con BSS*) |
| Test 1-PVP (Larve con PVP-I 0.6%) | Test 2-PVP (Larve con PVP-I 0.6%) | Test 1-PVP (Larve con PVP-I 0.6%) |
| Test 1-IV-1 (Larve con Ivermectina 1%) | Test 2-IV-1 (Larve con Ivermectina 1%) | Test 3-IV-1 (Larve con Ivermectina 1%) |
| *BSS= Soluzione Salina Bilanciata | | |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Successivamente, sulla base dei dati ottenuti dai primi test, è stato deciso di osservare direttamente le larve allo stereo-microscopio dal momento dell'aggiunta del farmaco in studio, e di registrare il tempo intercorso sino al momento della totale cessazione di qualsiasi attività vitale delle larve. È stato definito come *tempo di morte* il periodo intercorso tra il primo contatto delle larve con il farmaco e l'ottenimento della totale immobilità. Quando possibile è stata eseguita una registrazione time-lapse delle immagini di microscopia ottica al fine di meglio caratterizzare la sensibilità delle larve ai differenti composti. Quando una larva raggiungeva il *tempo di morte*, per confermare la reale efficacia del farmaco testato, il protocollo prevedeva la riconversione delle larve in soluzione fisiologica per verificare la presenza di una eventuale ripresa della vitalità. Se l'assenza di vitalità era confermata, il *tempo di morte* era accettato. Per ciascun campione di larve isolato in un giorno, è stato eseguito in parallelo un test di controllo sospendendo le larve in soluzione salina.

Tra il 04 Dicembre 2017 ed il 23 gennaio 2018 sono state testate testato un totale di 1015 larve di primo stadio (L_1) di *Oestrus ovis*.

Analisi statistica

Per ogni esperimento è stato riportato il tempo (espresso in secondi) richiesto da ciascun farmaco per ottenere la totale assenza di vitalità (morte) delle larve. È stato anche preso in considerazione il tempo che intercorre tra la raccolta delle larve nella testa o nel seno nasale e l'esecuzione degli esperimenti.

I dati sono stati testati per verificare la distribuzione normale (Shapiro Wilk e Kolmogorov-Smirnov) e l'omogeneità della varianza (test Levine). Inoltre, è

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

stata eseguita una trasformazione logaritmica (base 10) dei dati, per ridurre l'asimmetria e rendere i risultati più vicini a una distribuzione normale.

A causa della distribuzione non parametrica e dell'eterogeneità della varianza, il test Kruskal Wallis H con test Dunnett con aggiustamento secondo Sidák per confronti multipli è stato eseguito su dati trasformati. Un'analisi della sopravvivenza utilizzando il Log-Rank test è stata eseguita tra diversi trattamenti farmacologici. Per tutte le analisi, un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche dei risultati dello studio di fase I sono state eseguite utilizzando il software Stata (Stata/MP 14.1 for Mac, StataCorp, College Station, TX).

Risultati

Un totale di 893 larve L_1 sono state testate in 50 giorni. Sono state escluse dall'analisi 122 larve che, al momento della raccolta, presentavano chiari segni di alterata vitalità. La dimensione del campione, l'intervallo interquartile mediano (IQR) e il valore minimo e massimo della variabile analizzata per ciascun farmaco sono riportati nella tabella 4.

Il tempo mediano per ottenere la completa morte delle larve è stato rispettivamente di circa 94, 46, 44, 8, 11, 6, e 10 minuti per la soluzione fisiologica, Iodim, ivermectina 1% sospensione, Tolomec, glicole propilenico, ivermectina 1% soluzione e per l'associazione di ivermectina 1% + PVP-I 0.6%. L'analisi della sopravvivenza (Figura 6) eseguendo un'analisi Log-Rank tra i gruppi ha mostrato un valore di p altamente significativo ($p < 0,000$).

Sia i dati originali che quelli trasformati in $\text{Log}(10)$ non hanno mostrato una distribuzione normale (Skewness/Kurtosis, test di Shapiro-Francia W' ed il

test di Shapiro-Wilk W per la verifica della distribuzione normale, $p < 0.001$ per variabili e test).

L'analisi statistica è stata comunque eseguita su dati trasformati in $\text{Log}(10)$. Il test di Kruskal-Wallis H ha mostrato una differenza statisticamente significativa nel tempo di morte tra i diversi trattamenti farmacologici ($\chi^2(2) = 731.676$, con 6 d.f.; $p = 0.0001$). Il test Dunnett con aggiustamento secondo Sidák per confronti multipli ha mostrato che tutti i farmaci testati erano più efficaci della soluzione fisiologica in modo significativo ($p < 0.001$). L'ivermectina sospensione all'1% e lo Iodim hanno mostrato una efficacia significativamente superiore alla soluzione fisiologica, ma non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due farmaci. ($p=0.9937$). È interessante notare anche che il glicole propilenico (il solvente scelto per l'ivermectina) ha mostrato un'efficacia statisticamente significativa superiore alla sospensione di ivermectina all'1% ed allo Iodim ($p < 0.0000$). Tuttavia, la soluzione di ivermectina all'1% e l'associazione di ivermectina 1% + PVP-I 0,6% sono risultate significativamente più efficaci del solo glicole propilenico in termini di tempo necessario per uccidere le larve ($p = 0.0000$ e $p=0.0360$ rispettivamente). Inoltre, la sospensione di ivermectina 1% è risultata meno efficace dell'associazione di ivermectina 1% + PVP-I 0,6% ($p=0.0000$). È anche notevole il fatto che la soluzione ivermectina all'1% abbia l'effetto più veloce ($p=0.0000$; tab. 5), e sia equiparabile in termini statistici, solo al farmaco veterinario Tolomec® ($p=0.8794$). Infine, il confronto tra l'associazione di Ivermectina1% + PVP 0.6% e l'ivermectina soluzione 1%, non ha dimostrato differenze statisticamente significative, sebbene il tempo mediano necessario all'associazione per raggiungere l'outcome (morte della larva) era leggermente superiore.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Tabella 4: Statistica descrittiva della variabile tempo relativa ai farmaci studiati

| Farmaco | Variabile (sec) | N° Larve | Media (Minuti) | SD | Varianza | Mediana | IQR | Min. (Minuti) | Max (Minuti) |
|--|-----------------|----------|-----------------|----------------|----------|----------------|---------------|---------------|----------------|
| Fisiologica | Tempo | 146 | 6571.1 (109) | 4025 (67) | 16200000 | 5674.5 (94) | 7955 (132) | 360 (6) | 15233 (253) |
| | Log10 | | 3.7 | 0.3 | 0.1 | 3.8 | 0.5 | 2.6 | 4.2 |
| Iodim | Tempo | 165 | 2756.8 (45) | 1567.6 (26) | 2457400 | 2792 (46) | 1640 (27) | 143 (2) | 8370 (139) |
| | Log10 | | 3.4 | 0.3 | 0.1 | 3.4 | 0.3 | 2.2 | 3.9 |
| Ivermectina 1% Sospensione | Tempo | 106 | 2309.7 (38) | 873.6 (14) | 763172.2 | 2661 (44) | 1056 (17) | 386 (6) | 3868 (64) |
| | Log10 | | 3.3 | 0.2 | 0.1 | 3.4 | 0.2 | 2.6 | 1.6 |
| Tolomec | Tempo | 85 | 430.4 (7) | 144.9 (2) | 20998.5 | 482 (8) | 200 (3) | 96 (1) | 671 (11) |
| | Log10 | | 2.6 | 0.2 | 0 | 2.7 | 0.2 | 2 | 2.8 |
| Glicole Propilenico | Tempo | 94 | 805.6 (13) | 289.8 (4) | 84001.4 | 679.5 (11) | 383 (6) | 250 (4) | 1723 (28) |
| | Log10 | | 2.9 | 0.1 | 0 | 2.8 | 0.2 | 2.4 | 3.2 |
| Ivermectina 1% Soluzione | Tempo | 200 | 375.6 (6) | 161.7 (2) | 26150.4 | 379.5 (6) | 239.5 (3) | 79 (1) | 779 (12) |
| | Log10 | | 2.5 | 0.2 | 0.1 | 2.6 | 0.3 | 1.9 | 2.9 |
| Ivermectina 1% Soluzione + PVP 0.6% | Tempo | 182 | 601.4 (10) | 185.4 (3) | 34371.5 | 613 (10) | 261 (4) | 128 (2) | 987 (16) |
| | Log10 | | 2.8 | 0.2 | 0 | 2.8 | 0.2 | 2.1 | 3 |
| Totale | Tempo | 978 | 2000 (33) | 2721.4 (45) | 7406215 | 719.5 (11) | 2285 (38) | 79 (1) | 15233 (253) |
| | Log10 | | 3 | 0.5 | 0.2 | 2.9 | 0.8 | 0 | 0 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Tabella 5: Comparazione a coppie di Dunn del Tempo di morte in Log (10) (in secondi) per Farmaco (Sidák)

| | Fisiologica | Iodim | Ivermectina 1% Sospensione | Tolomec® | Glicole propilenico | Ivermectina 1% Soluzione |
|----------------------------|-------------|-----------|----------------------------|-----------|---------------------|--------------------------|
| Iodim | 4.531902 | | | | | |
| | p=0.0001 | | | | | |
| Ivermectina 1% Sospensione | 4.80702 | 0.791159 | | | | |
| | p=0.0000 | p=0.9937 | | | | |
| Tolomec® | 16.181918 | 12.679271 | 10.950363 | | | |
| | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.0000 | | | |
| Glicole propilenico | 10.171622 | 6.424335 | 5.164568 | -5.763425 | | |
| | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.0000 | | |
| Ivermectina 1% Soluzione | 21.834861 | 17.703827 | 14.677867 | 1.3058 | 8.250261 | |
| | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.8794 | p=0.0000 | |
| Associazione | 15.446604 | 11.17485 | 9.02551 | -3.74191 | 2.921367 | -6.449108 |
| | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.0000 | p=0.0360 | p=0.0000 |

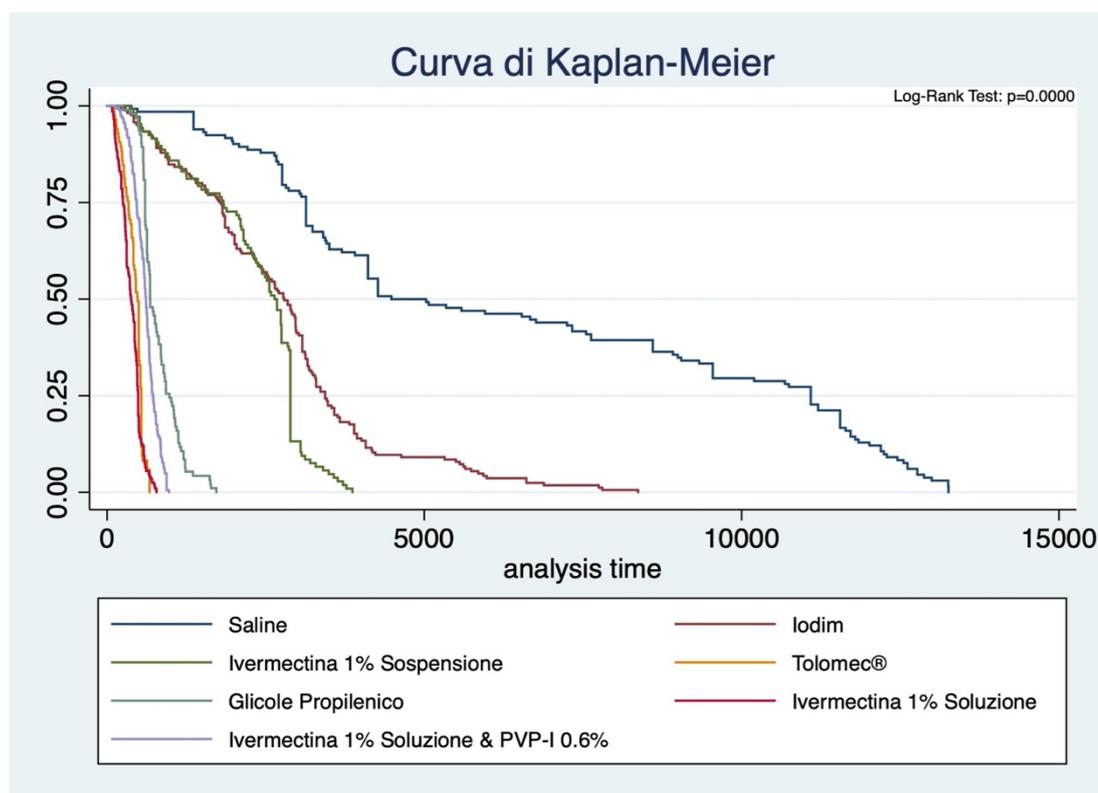


Figura 6: Curva di sopravvivenza di Kaplan Meier

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari



Figura 7: immagine a microscopio ottico di Larva L1 in soluzione con Ivermectina 1% in olio di ricino

Discussione

Le caratteristiche chimico fisiche dell' Ivermectina, parzialmente insolubile in acqua, ma liberamente solubile in cloruro di metilene o in alcool, hanno indirizzato le nostre ricerche verso un solvente con caratteristiche

adeguate, che non fosse notoriamente tossico per i tessuti oculari. Esclusa quindi la possibilità di utilizzare la soluzione salina bilanciata (BSS), è stata primariamente tentata una diluizione in Olio di ricino. Questo solvente è infatti spesso utilizzato in oculistica per la preparazione galenica di formulazioni a base di ciclosporina per uso topico (collirio). L'olio di ricino, si è dimostrato un discreto solvente per l'ivermectina, permettendo una facile diluizione del farmaco ad una concentrazione totale dell'1%.

I primi risultati degli esperimenti eseguiti però hanno però dimostrato immediatamente l'impossibilità di utilizzare tale solvente.

Come è possibile infatti vedere dalla figura 7 le larve che venivano trattate con la soluzione di olio di ricino venivano avvolte in una "bolla" in grado di proteggere le larve stesse, riducendo, per non dire annullando completamente, l'efficacia del composto creato.

Pertanto, è stato selezionato il glicole propilenico come possibile diluente per l'Ivermectina.

Il glicole propilenico è utilizzato in come solvente in diverse preparati farmaceutici, sia ad uso orale che topico o iniettabile. Il contatto prolungato

del Glicole propilenico con gli occhi è stato messo in relazione solo con una lieve irritazione oculare, associata ad una iperemia dose dipendente^[105].

Per questa sua bassa tossicità orale cronica, il glicole propilenico è stato classificato dalla Food and Drug Administration "generalmente riconosciuto come sicuro" (GRAS sigla in inglese) ed ha autorizzato l'utilizzo come additivo alimentare. Sebbene sia stato possibile, con alcuni accorgimenti, ottenere una formulazione all'1% di Ivermectina in glicole propilenico, tale formulazione appare essere la massima raggiungibile, in quanto, soluzioni più concentrate, precipitano, per mancata diluizione dell'ivermectina.

La soluzione ottenuta, alla luce dei risultati di questa fase dello studio, dimostra come l'ivermectina possa rivelarsi un trattamento efficace nell'utilizzo topico contro l'oftalmomiasi esterna.

La formulazione da noi testata ha inoltre dimostrato una efficacia sovrapponibile e non significativamente differente dalla preparazione farmaceutica ad uso veterinario Tolomec®.

Tale preparato, che presenta una concentrazione di equiparabile a quella da noi testata di 10mg/ml, è però diluito con Glycerol formal, ad uso veterinario, che lo rende di pericoloso utilizzo in ambito umano.

I risultati ottenuti ci hanno inoltre permesso di dimostrare come IODIM, disponibile in commercio, possieda una discreta efficacia nel devitalizzare larve al primo stadio (L₁) di *Oestrus ovis*.

Inoltre, l'aggiunta di PVP-I allo 0,6% a una soluzione all'1% di ivermectina nel glicole propilenico non riduce l'efficacia della formulazione rispetto al gruppo di controllo, anche se è necessario un tempo più lungo, sebbene statisticamente non significativo, per uccidere le larve rispetto all'uso della sola soluzione di ivermectina. Tuttavia, in un modello umano, il vantaggio

dell'aggiunta di PVP-I potrebbe essere correlato alle sue proprietà disinfettanti e antisettiche.

A corollario di questa fase è stato avviato un secondo studio, attualmente in corso, in quanto, durante il reperimento delle larve sono stati scoperti, in numerose teste di un singolo allevamento, alcuni nematodi sconosciuti. Il riscontro di nematodi nei seni paranasali degli ovini, è infatti inusuale ed estraneo alle caratteristiche degli armenti della regione Sardegna, e potrebbe trattarsi di un riscontro casuale, ma in ogni caso unico.

Fase II

Scopo di questa fase dello studio è stato verificare e quantificare l'eventuale tossicità corneale e congiuntivale dei farmaci precedentemente testati.

Materiali e metodi

Preparati (comune a tutti gli esperimenti)

La polvere di Ivermectina (Primarily Ivermectin B1a) e di PVP1 (Poly(vinylpyrrolidone)–Iodine complex) è stata comprata dalla Sigma-Aldrich. Il glicole propilenico (Propylenglycolum PH.EUR. 8TH ED) è stato acquistato dal fornitore Oriola.

Il test MTT (M2128) è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich.

Sono state testate prima differenti diluizioni di Glicole Propilenico dal 50% allo 0.1% e successivamente sono state studiate le combinazioni di Ivermectina con: DMSO 0.5%, Glicole 10% e Glicole 10%+ PVP 0.6% (Associazione) alle concentrazioni di 250,125,50,25 e 0,25 µg. È stata inoltre preparata una soluzione madre di Ivermectina 1% + 0.6% i PVP in glicole

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

propilenico e testata alle diluizioni di 40,60 e 80X. Le caratteristiche di Osmolarità, PH e le relative concentrazioni dei farmaci oggetto di studio sono riassunte nella tabella 6.

Tabella 6: Osmolarità, pH e composizione dei farmaci testati.

| Farmaco | Osmolarità: | pH: | Composizione | Volume |
|----------------------------|----------------|------|---------------------------------|--------|
| Preparazione Galenica | N/A (not frez) | N/A | 1% Ivermectin (100 mg) | 10 ml |
| | | | 0,6% PVP (60mg) | |
| | | | 100% Glycol | |
| 40x Diluizione | 766 mOsm | 7.65 | 125µl Principal 4875µl 1xPBS | 5ml |
| Glycol + PVP + IV + 1XPBS | 1609 mOsm | 7.42 | 0,025% Ivermectin (1500 mg) | 6ml |
| | | | 0,6% PVP (1,44ml from 2,5%sol) | |
| | | | 10% Glycol (600µl) | |
| | | | 5398,6 ml PBS | |
| Glycol + IV + 1XPBS | 1855 Osm | 7.72 | 0,025% Ivermectin (1500 mg) | 6ml |
| | | | 10% Glycol (600µl) | |
| | | | 5400 ml PBS | |
| Glycol + PVP + IV + HCE CM | 2389 mOsm | 8.04 | 0,025% Ivermectin (1500 mg) | 6ml |
| | | | 0,6% PVP (1,44ml from 2,5%sol) | |
| | | | 10% Glycol (600µl) | |
| | | | 5398,6 ml HCE CM | |
| Glycol + IV + HCE CM | 2184 mOsm | 8.15 | 0,025% Ivermectin (1500 mg) | 5ml |
| | | | 10% Glycol (600µl) | |
| | | | 5400 ml HCE CM | |
| DMSO + Glycol + IV | 483 mOsm | 8.02 | 0,025% Ivermectin (1500 mg) | 5 ml |
| | | | 0,5% DMSO | |
| | | | 10% Glycol | |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Al fine di testare la tossicità delle soluzioni in fase di studio su campioni cellulari di cellule corneali e congiuntivali si è deciso di procedere a diluizioni seriali dei farmaci.

Sebbene si stimi che il reale tempo di contatto di una lacrima artificiale con la superficie corneale sia relativamente breve (nell'ordine dei minuti), vista la particolare viscosità del mezzo usato per diluire il farmaco, si è deciso di procedere con test a timepoint particolarmente lunghi (1, 2,4,6 e 24h).

Le diluizioni dei farmaci sono riportate nella tabella 7

Tabella 7: Elenco completo delle diluizioni utilizzate per i vari composti analizzati.

| Glicole propilenico | Glicole propilenico + Ivermectina | Glicole propilenico + Ivermectina + PVP | DMSO + Ivermectina | Glicole propilenico + Ivermectina + PVP (farmaco in studio) |
|---------------------|-----------------------------------|---|---------------------------------|---|
| 50.0% | Glycol 10% + Ivermectina 250 µg | Glycol 10% + Ivermectina 250 µg + PVP 0.6% | DMSO 0.5% + Ivermectina 250 µg | Diluizione 40X |
| 25.0% | Glycol 10% + Ivermectina 125 µg | Glycol 10% + Ivermectina 125 µg + PVP 0.6% | DMSO 0.5% + Ivermectina 125 µg | Diluizione 60% |
| 12.5% | Glycol 10% + Ivermectina 100 µg | Glycol 10% + Ivermectina 100 µg + PVP 0.6% | DMSO 0.5% + Ivermectina 100 µg | Diluizione 80X |
| 6.3% | Glycol 10% + Ivermectina 50 µg | Glycol 10% + Ivermectina 50 µg + PVP 0.6% | DMSO 0.5% + Ivermectina 50 µg | |
| 3.1% | Glycol 10% + Ivermectina 25 µg | Glycol 10% + Ivermectina 25 µg + PVP 0.6% | DMSO 0.5% + Ivermectina 25 µg | |
| 1.6% | Glycol 10% + Ivermectina 10 µg | Glycol 10% + Ivermectina 10 µg + PVP 0.6% | DMSO 0.5% + Ivermectina 10 µg | |
| 0.8% | Glycol 10% + Ivermectina 0,25 µg | Glycol 10% + Ivermectina 0,25 µg + PVP 0.6% | DMSO 0.5% + Ivermectina 0,25 µg | |
| 0.4% | | | | |
| 0.2% | | | | |
| 0.1% | | | | |

Preparazione delle culture e delle piastre

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Ogni singolo esperimento è stato ripetuto un minimo di 3 volte per ogni timepoint, ed ogni concentrazione del farmaco è stata replicata almeno 3 volte per ogni esperimento (Fig. 8).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---|---|---|
| A | G 10% IV 250 µg | G 10% IV 250 µg | G 10% IV 250 µg | G 1% IV 250 µg | G 1% IV 250 µg | G 1% IV 250 µg | DMSO 0,5% IV 250 µg | DMSO 0,5% IV 250 µg | DMSO 0,5% IV 250 µg | Glycol 50% + Culture medium | Glycol 50% + Culture medium | Glycol 50% + Culture medium |
| B | G 10% IV 125 µg | G 10% IV 125 µg | G 10% IV 125 µg | G 1% IV 125 µg | G 1% IV 125 µg | G 1% IV 125 µg | DMSO 0,5% IV 125 µg | DMSO 0,5% IV 125 µg | DMSO 0,5% IV 125 µg | Glycol 25% + Culture medium | Glycol 25% + Culture medium | Glycol 25% + Culture medium |
| C | G 10% IV 50 µg | G 10% IV 50 µg | G 10% IV 50 µg | G 1% IV 50 µg | G 1% IV 50 µg | G 1% IV 50 µg | DMSO 0,5% IV 50 µg | DMSO 0,5% IV 50 µg | DMSO 0,5% IV 50 µg | Glycol 12,50% + Culture medium | Glycol 12,50% + Culture medium | Glycol 12,50% + Culture medium |
| D | G 10% IV 25 µg | G 10% IV 25 µg | G 10% IV 25 µg | G 1% IV 25 µg | G 1% IV 25 µg | G 1% IV 25 µg | DMSO 0,5% IV 25 µg | DMSO 0,5% IV 25 µg | DMSO 0,5% IV 25 µg | Glycol 10% + Culture medium | Glycol 10% + Culture medium | Glycol 10% + Culture medium |
| E | G 10% IV 0,25 µg | G 10% IV 0,25 µg | G 10% IV 0,25 µg | G 1% IV 0,25 µg | G 1% IV 0,25 µg | G 1% IV 0,25 µg | DMSO 0,5% IV 0,25 µg | DMSO 0,5% IV 0,25 µg | DMSO 0,5% IV 0,25 µg | Glycol 6,25%+ Culture medium | Glycol 6,25%+ Culture medium | Glycol 6,25%+ Culture medium |
| F | X | X | X | X | X | X | No-CC | No-CC | No-CC | Glycol 3,125% + Culture medium | Glycol 3,125% + Culture medium | Glycol 3,125% + Culture medium |
| G | X | X | X | X | X | X | Only cells control | Only cells control | Only cells control | Glycol 1,5% + Culture medium | Glycol 1,5% + Culture medium | Glycol 1,5% + Culture medium |
| H | X | X | X | X | X | X | Max Release Control | Max Release Control | Max Release Control | Glycol 0,7% + Culture medium | Glycol 0,7% + Culture medium | Glycol 0,7% + Culture medium |

Figura 8: Esempio di piastra da 96 pozzetti, con 30000 cell/0.20 ml. Esperimento timepoint 1h, 3 farmaci in studio

Per ogni piastra sono state preparate inoltre: 3 pozzetti vuoti (No cell control), 3 pozzetti contenenti cellule non trattate con farmaci (Only cells control), 3 pozzetti con cellule da lisare per valutare la massima tossicità (*Maximum Release Control*).

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Tutte le piastre sono state preparate con una densità di 30000 cellule per pozzetto per tutti gli esperimenti, sia con le cellule congiuntivali che corneali. Le cellule corneali (HCE) sono state scongelate e messe in cultura in terreno di cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionate con 15% di FBS (Siero Fetale Bovino), 1000U/ml di penicillina, 0,1 mg/ml Streptomicina, 0,3 mg/ml L-Glutamina, 10 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 5µg/ml Insulina, 0,5% DMSO (dimetilsolfossido), 0,1µg/ml di tossina colerica, 15nM HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico).

Le cellule congiuntivali (HCjE) sono state messe in cultura in mezzo di coltura per cheratinociti senza siero con l'aggiunta di estratto di ipofisi bovina (concentrazione finale. 25 µg/ml), EGF (concentrazione finale. 0.2 ng/ml), CaCl₂ (cloruro di Calcio) 0.4 mM e penicillina/streptomicina (0.5%).

Entrambe le culture cellulari sono state incubate a 37°, con concentrazioni controllate di CO₂. Il mezzo di cultura è stato sostituito ogni 2 giorni per le cellule corneali e ogni 3 giorni per le cellule congiuntivali per permettere una crescita costante e continua della cultura. Quando la replicazione cellulare aveva raggiunto un livello sufficiente, le culture venivano disgregate mediante uso di tripsina per permettere la formazione di nuove culture cellulari. Quando il numero di cellule aveva raggiunto un valore sufficiente per permettere l'esecuzione degli esperimenti programmati le culture sono state messe in sospensione e sottoposte a conta cellulare. La conta delle cellule è stata eseguita con il metodo della camera di Burker.

Nella camera di Burker, la griglia delimita con 3 linee ravvicinate un grande quadrato diviso in 9 quadrati più piccoli (ciascuno delimitato da 2 linee ravvicinate), ciascuno dei quali è diviso ulteriormente in una serie di quadrati maggiori, dei quadrati piccolissimi e dei rettangoli, tutti delimitati da una

singola linea. A ciascun poligono corrisponde una certa area. Trascurando le figure più piccole (i quadratini e i rettangoli) è importante sapere che i quadrati "a un solo bordo" corrispondono ad un'area di 0.04 mm^2 e quindi, dato che lo spessore è di 0.1 mm , delimitano un volume di 0.004 mm^3 , cioè di $1/250 \text{ }\mu\text{l}$. I quadrati "a due bordi" invece racchiudono un'area totale (compresi i quadratini più piccoli e i rettangoli) di 1 mm^2 e quindi delimitano un volume di $0.1 \text{ }\mu\text{l}$.

La sospensione cellulare è stata mescolata mediante pipetta Pasteur e sono stati prelevati $100 \mu\text{l}$ di sospensione cellulare e versati in un tubo di Eppendorf da 1.5 ml . Sono stati aggiunti $100 \mu\text{l}$ di eritrocina 0.1% e si è proceduto ad agitare la soluzione delicatamente prima di riempire la camera di Burker per capillarità.

Con l'obiettivo da $10\times$ sono state contate le cellule vitali contenute in almeno 4 aree da 1 mm^2 . Le cellule a contatto con il margine superiore ed il margine sinistro del riquadro sono state incluse, mentre sono state escluse quelle sul fondo o sul margine destro, per evitare di contare due volte le stesse cellule (Fig. 9).

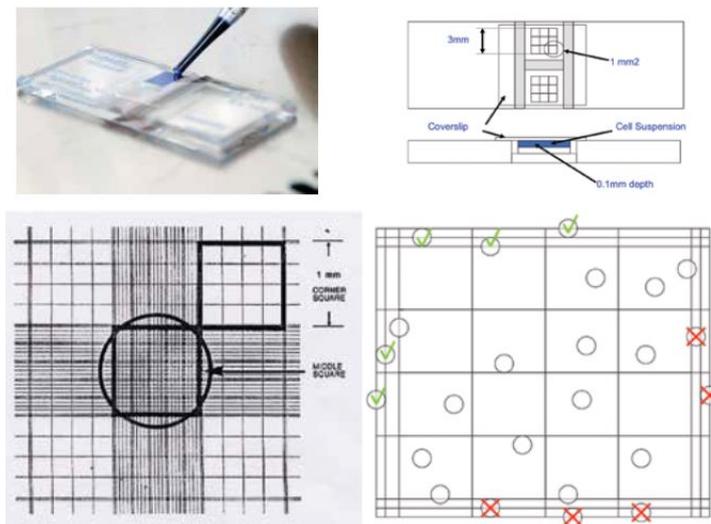


Figura 9: Camera di Burker e dettaglio dei criteri utilizzati per la conta cellulare

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Le cellule non vitali sono state contate separatamente per valutare l'eventuale tasso di mortalità della cultura cellulare. Il valore medio (**N**) delle misurazioni è stato utilizzato per ottenere il valore della densità cellulare (in milioni di cell/ml) con la formula:

$$\text{Numero di cell/ml} = \frac{N \times 2 \times 10000}{1000000}$$

Per poter riempire i pozzetti necessari con la densità cellulare desiderata, la soluzione cellulare ottenuta dalla cultura appena contata è stata diluita con una quantità di mezzo di cultura calcolato con la formula:

$$[0,20 \text{ ml} \times (\text{numero totale di pozzetti necessari})] - \frac{\text{Densità desiderata (30000 cell)}}{\text{Numero di cell/ml}}$$

In tale modo, ogni 0,20 ml di soluzione presentava una densità pari a 30000 cellule.

Tale densità è stata decisa dopo aver eseguito diverse prove di ottimizzazione relative alla ripetibilità ed affidabilità dei test MTT.

Test di citotossicità con Cytotox 96

In un primo momento è stato deciso di utilizzare il test Cytotox 96® per valutare la lisi cellulare. Nonostante numerose prove di ottimizzazione, e l'esclusione dei dati a timepoint superiori alle 9 ore (emivita massima dell'LDH), i risultati ottenuti (fig. 10) mostravano un valore di assorbanza

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

estremamente elevata del background o, comunque, del mezzo di cultura, tali da alterare completamente i risultati. Sono stati eseguite varie prove di ottimizzazione, con mezzi di cultura FBS-free (che è una delle principali cause di elevata assorbanza del background) senza ottenere un miglioramento dei risultati.

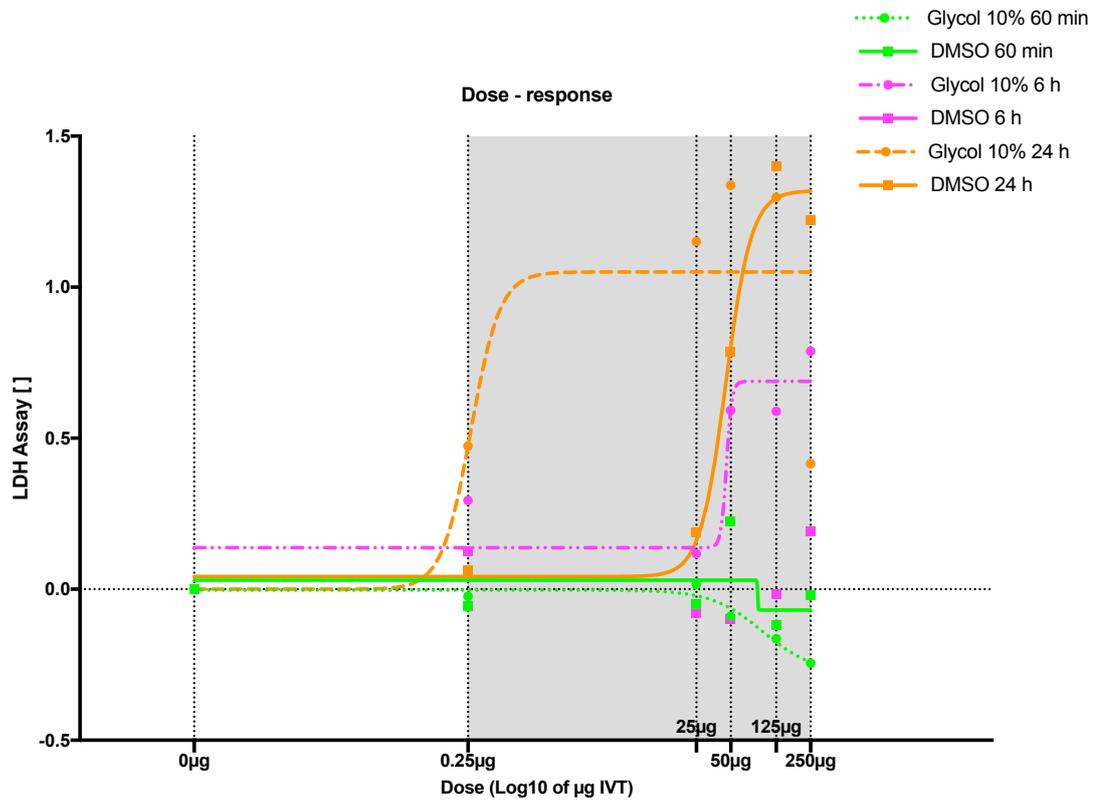


Figura 10: Risultati a 6 e 24h del test eseguito con Cytotox96.

Sono stati quindi condotti numerosi studi di ottimizzazione con il solo Glicole, supponendo una interazione tra quest'ultimo e il buffer utilizzato per il test Cytotox96. I risultati hanno evidenziato tale interazione, rendendo di fatto, inutilizzabile tale tipologia di test per gli esperimenti di tossicità prefissati (Figura 11).

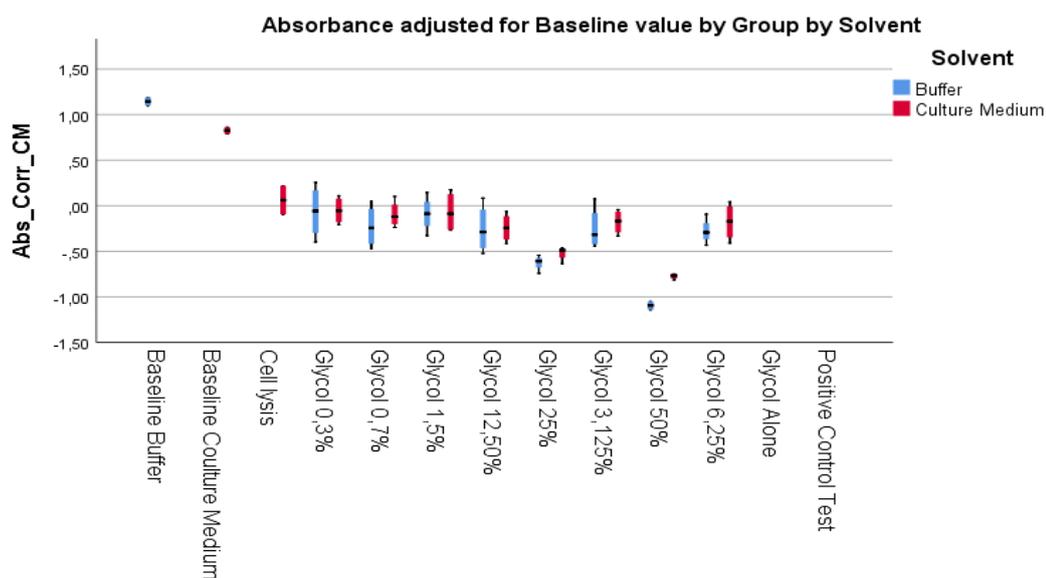


Figura 11: Box plot delle medie dei risultati spettrometrici su Buffer e mezzo di cultura con FBS

Alla luce di questi risultati si è quindi deciso di testare l'eventuale effetto citotossico dei farmaci oggetto di studio con il test MTT.

Test di citotossicità con MTT

Come dai risultati ottenuti durante gli esperimenti di ottimizzazione, è stato preparato una soluzione MTT in mezzo di cultura libero da FBS nelle quantità di 2,5mg/ml per le cellule corneali (HCE) e di 5mg/ml per le cellule congiuntivali. La citotossicità delle differenti formulazioni è stata quindi testata con il metodo MTT (Fig. 12). Sono stati approntati tre replicati per ogni differente concentrazione di farmaci da testare, e testati a 3 differenti intervalli temporali (1, 4 e 24 ore). Alla fine di ogni timepoint i farmaci in studio sono stati rimossi mediante aspirazione con pipetta Pasteur, ponendo la massima attenzione a non danneggiare il tessuto cellulare, e 0.1 ml di soluzione MTT è stata aggiunta in ogni pozzetto per 2 ore. Al termine delle due ore è stato aggiunto un volume equivalente di soluzione di lisi DSD-DMF. Le piastre sono state quindi lasciate in incubatrice a 37°C a CO₂ costante (5%)

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

e poi è stata misurata l'assorbanza a 570nm mediante spettrofotometro Envision o Victor 2.

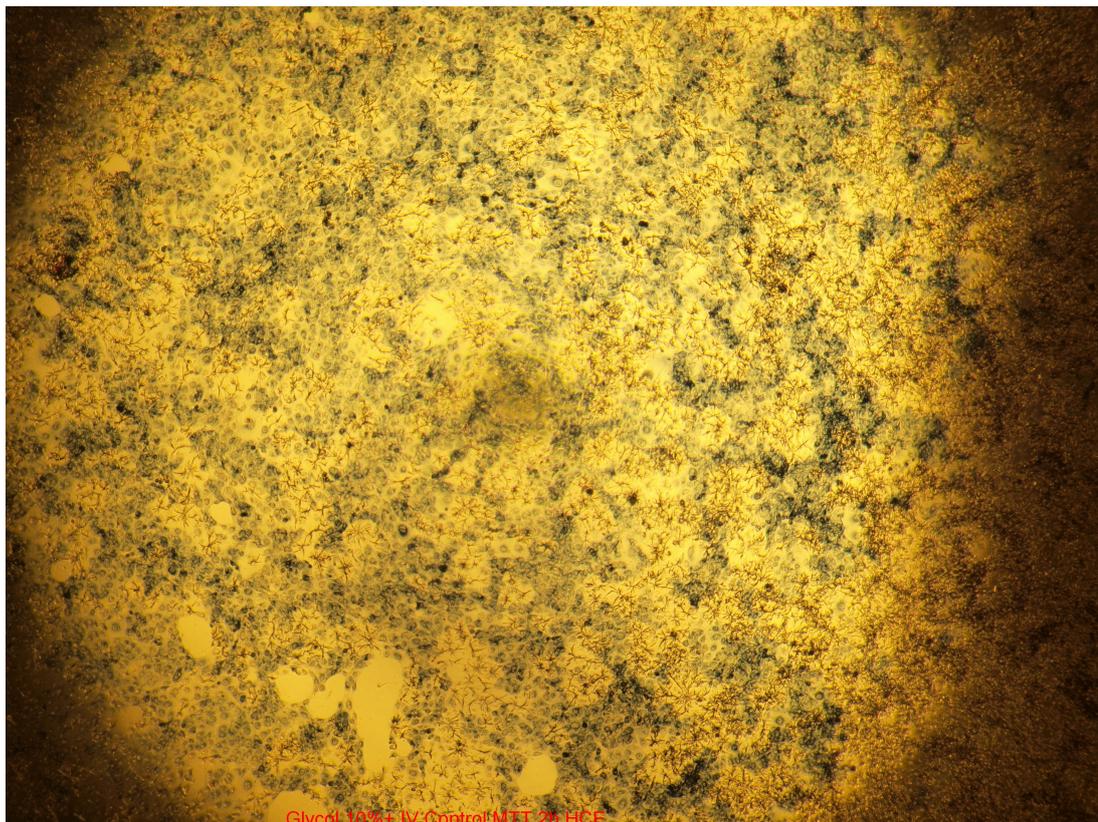


Figura 12: Fotografia di microscopia ottica di pozzetto con cultura cellulare HCE dopo test MTT

I test di citotossicità svolti hanno riguardato i seguenti preparati:

- Glicole propilenico a concentrazioni variabili dal 50% allo 0.1%;
- Glicole propilenico 10% + PVP 0.6%;
- Glicole propilenico 10% + Ivermectina (0.25, 25,50, 125 e 250µg);
- DMSO 0.5% + Ivermectina (0.25, 25,50, 125 e 250µg);
- Glicole propilenico 10% + PVP 0.6% + Ivermectina (0.25, 25,50, 125 e 250µg).

I test di confronto svolti sono stati mirati a confrontare:

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

- la differente tossicità cellulare del Glicole propilenico a differenti concentrazioni, al fine di trovare il giusto compromesso per poter proseguire gli esperimenti su culture cellulari. Tutti gli esperimenti infatti, per poter essere eseguiti su lunghi intervalli, devono prevedere una quota sufficiente di mezzo di cultura con cui diluire il farmaco oggetto di studio, per permettere alle cellule di “sopravvivere” durante l’esecuzione degli esperimenti;
- la tossicità del Glicole propilenico 10% + PVP 0.6%;

Ottimizzata quindi la metodologia di cultura cellulare, sono quindi stati testati e confrontati i risultati della tossicità di:

- Glicole propilenico 10% + Ivermectina (0.25, 25,50, 125 e 250µg) versus DMSO 0.5% + Ivermectina (0.25, 25,50, 125 e 250µg) versus Glicole propilenico 10% + PVP 0.6% + Ivermectina (0.25, 25,50, 125 e 250µg);
- la tossicità di diluizioni di 40,60 e 80 volte della soluzione di farmaco madre.

Gli esperimenti condotti con il solo Glicole propilenico a differenti diluizioni sono stati replicati da un minimo di 30 ad un massimo di 96 volte, con una media di 56 replicati.

Gli esperimenti di tossicità del Glicole 10% + PVP 0.6% sono stati condotti con un minimo di 6 ad un massimo di 18 replicati.

Gli esperimenti che hanno coinvolto il composto di ivermectina associato a PVP e Glicole sono stati replicati, per ogni singolo dosaggio un numero minimo di 6 volte fino ad un massimo di 12 volte (Tabella 8).

Gli outliers dovuti a chiare alterazioni dei pozzetti utilizzati per gli esperimenti (ridotta densità cellulare per difetti di cultura, eventuali alterazioni delle

cellule durante la fase di rimozione della cultura cellulare, etc.), così come alcune ripetizioni alterate per difetti di incubazione, sono state preventivamente escluse dall'analisi per evitare bias.

Le statistiche descrittive relative ai vari timepoint, per ognuna delle 3 composizioni utilizzate, per ogni differente dosaggio di Ivermectina, sono riportate, per semplicità di lettura, nella tabella 9.

Tabella 8: riepilogo dei replicati eseguiti divisi per farmaco, timepoint e concentrazioni di Ivermectina

| Ivermectina + PVP + Glicole | Timepoint | | | |
|---------------------------------------|-----------|-------|--------|--------|
| | 1 ora | 4 ore | 24 ore | Totale |
| DMSO | | | | |
| Numero replicati per dosaggio 250 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 125 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 50 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 25 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 0,25 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Glycol | | | | |
| Numero replicati per dosaggio 250 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 125 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 50 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 25 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| Numero replicati per dosaggio 0,25 µg | 6 | 12 | 9 | 27 |
| PVP | | | | |
| Numero replicati per dosaggio 250 µg | 6 | 9 | 6 | 21 |
| Numero replicati per dosaggio 125 µg | 6 | 9 | 6 | 21 |
| Numero replicati per dosaggio 50 µg | 6 | 9 | 6 | 21 |
| Numero replicati per dosaggio 25 µg | 6 | 9 | 6 | 21 |
| Numero replicati per dosaggio 0,25 µg | 6 | 9 | 6 | 21 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Tabella 9: statistiche descrittive dei test con dosaggi decrescenti di Ivermectina in differenti solventi su cell. HCE

| Farmaco | | Media | 95% di intervallo di confidenza per la media | | Media ritagliata al 5% | Mediana | Varianza | Deviazione std. | Minimo | Massimo | Intervallo interquartile | | |
|---------|------------|---------|--|------------------|------------------------|---------|----------|-----------------|--------|---------|--------------------------|-------|------|
| | | | Limite inferiore | Limite superiore | | | | | | | | | |
| DMSO | Control | 1 → 4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | | |
| | 0,25µg | 1 | 92.2 | 83.4 | 101.0 | 91.8 | 88.8 | 70.1 | 8.4 | 85.3 | 106.2 | 14.4 | |
| | | 4 | 92.9 | 87.6 | 98.3 | 92.5 | 91.5 | 55.6 | 7.5 | 84.2 | 109.5 | 9.7 | |
| | | 24 | 118.9 | 113.0 | 124.7 | 118.8 | 121.2 | 40.7 | 6.4 | 111.4 | 127.2 | 11.3 | |
| | 25µg | 1 | 102.6 | 76.7 | 128.4 | 102.0 | 93.5 | 608.1 | 24.7 | 79.0 | 135.9 | 49.5 | |
| | | 4 | 61.0 | 46.2 | 75.8 | 61.2 | 67.2 | 370.3 | 19.2 | 32.3 | 87.4 | 34.8 | |
| | | 24 | 42.4 | 21.1 | 63.7 | 41.3 | 29.8 | 767.4 | 27.7 | 14.7 | 90.3 | 48.1 | |
| | 50µg | 1 | 89.1 | 64.1 | 114.0 | 88.6 | 85.0 | 404.1 | 20.1 | 68.6 | 118.3 | 37.4 | |
| | | 4 | 18.2 | 13.2 | 23.2 | 17.9 | 19.1 | 55.1 | 7.4 | 8.8 | 32.6 | 13.4 | |
| | | 24 | 1.6 | 0.4 | 2.7 | 1.5 | 1.3 | 1.2 | 1.1 | 0.5 | 3.0 | 2.1 | |
| | 125µg | 1 | 102.7 | 71.0 | 134.5 | 103.8 | 114.4 | 915.3 | 30.3 | 57.9 | 129.3 | 59.1 | |
| | | 4 | 14.0 | 10.8 | 17.3 | 14.1 | 14.3 | 23.4 | 4.8 | 6.2 | 20.0 | 9.2 | |
| | | 24 | 1.1 | 0.7 | 1.6 | 1.1 | 1.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 1.7 | 0.7 | |
| | 250µg | 1 | 82.3 | 54.0 | 110.7 | 82.8 | 91.4 | 732.2 | 27.1 | 48.4 | 108.1 | 55.5 | |
| | | 4 | 15.8 | 10.4 | 21.3 | 15.6 | 16.6 | 73.4 | 8.6 | 3.6 | 32.6 | 13.9 | |
| | | 24 | 2.3 | 1.9 | 2.7 | 2.3 | 2.3 | 0.1 | 0.3 | 2.0 | 2.6 | 0.5 | |
| | Glycol 10% | Control | 1 → 4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | |
| | | 0,25µg | 1 | 90.3 | 81.7 | 98.8 | 90.0 | 88.6 | 66.2 | 8.1 | 82.1 | 103.4 | 14.6 |
| | | | 4 | 86.4 | 78.4 | 94.5 | 86.3 | 88.0 | 143.2 | 12.0 | 68.0 | 107.4 | 15.4 |
| | | | 24 | 11.8 | 5.7 | 17.9 | 11.7 | 11.2 | 33.8 | 5.8 | 5.8 | 21.3 | 10.4 |
| | | 25µg | 1 | 95.0 | 80.4 | 109.5 | 94.6 | 95.1 | 192.6 | 13.9 | 77.3 | 118.2 | 20.1 |
| | | | 4 | 85.2 | 74.8 | 95.7 | 85.0 | 88.1 | 241.2 | 15.5 | 62.7 | 111.2 | 26.8 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

| | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------------------|---------|-------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|-----|
| | 50µg | 24 | 9.0 | 3.2 | 14.9 | 8.9 | 8.2 | 31.3 | 5.6 | 2.7 | 17.1 | 11.0 | |
| | | 1 | 90.7 | 82.5 | 98.8 | 90.7 | 92.7 | 43.3 | 6.6 | 82.8 | 97.3 | 12.9 | |
| | | 4 | 72.9 | 59.0 | 86.8 | 73.4 | 73.1 | 481.5 | 21.9 | 32.9 | 103.4 | 29.8 | |
| | 125µg | 24 | 24.6 | 3.0 | 46.3 | 23.5 | 14.0 | 795.2 | 28.2 | -0.2 | 70.1 | 56.1 | |
| | | 1 | 88.6 | 76.7 | 100.6 | 88.5 | 88.7 | 130.4 | 11.4 | 74.4 | 104.8 | 20.5 | |
| | | 4 | 48.8 | 30.6 | 67.0 | 48.7 | 43.9 | 559.2 | 23.6 | 16.1 | 83.4 | 43.7 | |
| | 250µg | 24 | 18.2 | -3.0 | 39.4 | 16.2 | 2.6 | 761.5 | 27.6 | -0.4 | 73.7 | 42.0 | |
| | | 1 | 49.4 | 41.0 | 57.8 | 49.3 | 49.9 | 64.0 | 8.0 | 39.3 | 60.5 | 15.0 | |
| | | 4 | 9.1 | 4.4 | 13.7 | 8.9 | 8.0 | 53.0 | 7.3 | 0.0 | 21.7 | 12.9 | |
| | | | 24 | 1.2 | 0.3 | 2.1 | 1.2 | 1.1 | 0.8 | 0.9 | 0.2 | 2.5 | 1.6 |
| | Glycol 10% + PVP 0.6% | Control | 1 → 4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 |
| | | 0,25µg | 1 | 60.1 | 56.3 | 63.9 | 60.1 | 60.5 | 9.3 | 3.1 | 56.4 | 64.2 | 5.7 |
| 4 | | | 11.2 | 5.3 | 17.0 | 11.2 | 11.4 | 31.2 | 5.6 | 4.5 | 17.8 | 11.5 | |
| 24 | | | 3.3 | 1.8 | 4.8 | 3.2 | 3.0 | 2.0 | 1.4 | 2.0 | 5.7 | 2.2 | |
| 25µg | | 1 | 61.9 | 58.1 | 65.7 | 61.9 | 63.4 | 9.3 | 3.0 | 58.0 | 64.4 | 5.8 | |
| | | 4 | 7.1 | 3.7 | 10.5 | 7.0 | 6.7 | 10.4 | 3.2 | 3.9 | 12.2 | 6.2 | |
| | | 24 | 2.9 | 0.7 | 5.1 | 2.9 | 2.7 | 4.4 | 2.1 | 0.8 | 5.7 | 3.9 | |
| 50µg | | 1 | 62.0 | 48.6 | 75.4 | 62.4 | 66.2 | 162.6 | 12.7 | 42.7 | 73.6 | 25.1 | |
| | | 4 | 18.5 | 4.0 | 33.1 | 17.5 | 9.0 | 359.9 | 19.0 | 3.4 | 52.6 | 33.4 | |
| | | 24 | 2.4 | 0.3 | 4.6 | 2.4 | 2.2 | 4.3 | 2.1 | 0.5 | 4.7 | 3.9 | |
| 125µg | | 1 | 60.0 | 52.5 | 67.4 | 60.1 | 62.4 | 36.0 | 6.0 | 52.5 | 65.5 | 11.6 | |
| | | 4 | 17.4 | 4.2 | 30.5 | 16.5 | 8.5 | 292.4 | 17.1 | 3.2 | 46.7 | 31.3 | |
| | | 24 | 2.6 | 1.7 | 3.4 | 2.5 | 2.4 | 0.7 | 0.8 | 1.8 | 4.0 | 1.2 | |
| 250µg | | 1 | 39.7 | 35.8 | 43.5 | | 39.3 | 2.4 | 1.5 | 38.3 | 41.4 | | |
| | | 4 | 6.5 | 5.3 | 7.8 | 6.5 | 7.0 | 1.7 | 1.3 | 4.9 | 8.2 | 2.7 | |
| | | 24 | 2.9 | 1.1 | 4.6 | 2.9 | 2.6 | 2.7 | 1.7 | 1.2 | 4.7 | 3.3 | |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Gli esperimenti su diluizioni di 40,60 e 80 volte, del farmaco principale sono stati ripetuti da un minimo di 6 volte ad un massimo di 36 volte (tabella 10)

Tabella 10: riepilogo dei replicati eseguiti divisi per diluizione e timepoint

| Diluizioni | Timepoint | | | | |
|--------------------|-----------|-----|----|----|--------------------|
| | 1 | 3 | 4 | 24 | Totale complessivo |
| 40X | 12 | 36 | 18 | 6 | 72 |
| 60X | 12 | 34 | 22 | 10 | 78 |
| 80X | 12 | 30 | 18 | 10 | 70 |
| Totale complessivo | 36 | 100 | 58 | 26 | 220 |

Analisi Statistica

I dati sono stati raccolti al termine di ogni esperimento su foglio elettronico Excel e categorizzati per esperimento, data di esecuzione, tipologia di cultura cellulare, densità cellulare e farmaco esaminato.

I dati sono stati testati per verificare la distribuzione normale (Shapiro Wilk e Kolmogorov-Smirnov). A causa della distribuzione non parametrica dei dati, nonché dell'alta variabilità presente in alcune ripetizioni, si è deciso di utilizzare il test di Kruskal Wallis H con test di Dunnet con aggiustamento secondo formula di Bonferroni per test multipli, il test di Mann-Whitney U per 2 campioni indipendenti, oppure un Modello Lineare generalizzato a seconda dei casi. Per tutte le analisi, un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Risultati

Studi su cellule corneali HCE

L'analisi statistica (modello lineare generalizzato) sui test di citotossicità eseguiti su modello cellulare HCE con il glicole propilenico in soluzione nel mezzo di cultura a diverse concentrazioni, ha dimostrato che le diverse concentrazioni di glicole propilenico ad 1 ora (F 20,166, p= 0.000), 2 ore (F=20.723 p=0.000), 4 ore (F= 95.835 p=0.000) e 24 (F=80,987 p=0.000) hanno un effetto statisticamente significativo sulla vitalità della coltura cellulare.

In particolare, l'analisi post-hoc ha dimostrato una significativa differenza di vitalità tra tutte le diluizioni ed il controllo, con la sola eccezione della diluizione a 0.70% (p=0.176). Le altre differenze, nei vari timepoint sono riportate nella tabella 11.

Tabella 11: Analisi post-hoc glicole propilenico in soluzione nel mezzo di cultura a diverse concentrazioni

| Timepoint | (J) Concentration | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|---------|-------|-------|-------|------|
| | Control | 0.10 % | 0.30 % | 0.70 % | 3.10 % | 6.30 % | 10 % | 12.50 % | 15 % | 20 % | 25 % | 50 % |
| 1 | Control | | | 0.176 | | 0.004 | 0.000 | 0.001 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | |
| | 0.70% | 0.176 | | | | 0.046 | 0.003 | 0.008 | 0.037 | 0.000 | 0.000 | |
| | 6.30% | 0.004 | | 0.046 | | | 0.255 | 0.471 | 0.924 | 0.000 | 0.000 | |
| | 10% | 0.000 | | 0.003 | | 0.255 | | 0.670 | 0.296 | 0.004 | 0.000 | |
| | 12.50% | 0.001 | | 0.008 | | 0.471 | 0.670 | | 0.532 | 0.001 | 0.000 | |
| | 15% | 0.003 | | 0.037 | | 0.924 | 0.296 | 0.532 | | 0.000 | 0.000 | |
| | 20% | 0.000 | | 0.000 | | 0.000 | 0.004 | 0.001 | 0.000 | | 0.006 | |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 25% | 0.000 | | | 0.000 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.006 | | |
| 2 | Control | | 0.377 | 0.788 | 0.313 | 0.885 | 0.621 | 0.744 | 0.543 | | | 0.000 | 0.000 |
| | 0.10% | 0.377 | | 0.253 | 0.067 | 0.306 | 0.175 | 0.231 | 0.143 | | | 0.000 | 0.000 |
| | 0.30% | 0.788 | 0.253 | | 0.454 | 0.901 | 0.820 | 0.954 | 0.732 | | | 0.000 | 0.000 |
| | 0.70% | 0.313 | 0.067 | 0.454 | | 0.385 | 0.600 | 0.489 | 0.681 | | | 0.000 | 0.000 |
| | 3.10% | 0.885 | 0.306 | 0.901 | 0.385 | | 0.726 | 0.856 | 0.642 | | | 0.000 | 0.000 |
| | 6.30% | 0.621 | 0.175 | 0.820 | 0.600 | 0.726 | | 0.865 | 0.908 | | | 0.000 | 0.000 |
| | 10% | 0.744 | 0.231 | 0.954 | 0.489 | 0.856 | 0.865 | | 0.776 | | | 0.000 | 0.000 |
| | 12.50% | 0.543 | 0.143 | 0.732 | 0.681 | 0.642 | 0.908 | 0.776 | | | | 0.000 | 0.000 |
| | 25% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | | | 0.983 |
| | 50% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | | 0.983 | |
| 4 | Control | | 0.376 | 0.022 | 0.093 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 0.10% | 0.376 | | 0.217 | 0.736 | 0.054 | 0.006 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 0.30% | 0.022 | 0.217 | | 0.220 | 0.481 | 0.219 | 0.109 | 0.004 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 0.70% | 0.093 | 0.736 | 0.220 | | 0.036 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 3.10% | 0.002 | 0.054 | 0.481 | 0.036 | | 0.732 | 0.472 | 0.045 | 0.009 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 6.30% | 0.000 | 0.006 | 0.219 | 0.000 | 0.732 | | 0.550 | 0.009 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 10% | 0.000 | 0.002 | 0.109 | 0.000 | 0.472 | 0.550 | | 0.041 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 12.50% | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.045 | 0.009 | 0.041 | | 0.280 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 15% | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.009 | 0.001 | 0.003 | 0.280 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 20% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | 0.007 | 0.083 |
| 25% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.007 | | 0.951 | |
| 50% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.083 | 0.951 | | |
| 24 | Control | | | | 0.789 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | |
| | 0.70% | 0.789 | | | | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

| | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| 6.30% | 0.000 | | | 0.000 | | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | |
| 10% | 0.000 | | | 0.000 | 0.000 | | 0.936 | 0.422 | 0.295 | 0.341 | | |
| 12.50% | 0.000 | | | 0.000 | 0.000 | 0.936 | | 0.469 | 0.332 | 0.382 | | |
| 15% | 0.000 | | | 0.000 | 0.000 | 0.422 | 0.469 | | 0.803 | 0.879 | | |
| 20% | 0.000 | | | 0.000 | 0.000 | 0.295 | 0.332 | 0.803 | | 0.922 | | |
| 25% | 0.000 | | | 0.000 | 0.000 | 0.341 | 0.382 | 0.879 | 0.922 | | | |

Based on estimated marginal means

Sig: Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Alla luce dei risultati ottenuti si è deciso di proseguire i successivi esperimenti utilizzando una diluizione del 10% di glicole propilenico, che ha dimostrato una buona tollerabilità a 2 ore ($p=0.744$).

La tossicità del composto di Glicole Propilenico al 10% + PVP 0.6% è stata analizzata con test di Mann-Whitney U. I risultati hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa a 1 ora ($p=0.001$), 4 ore ($p=0.001$) e 24 ore ($p=0.001$, Fig. 13).

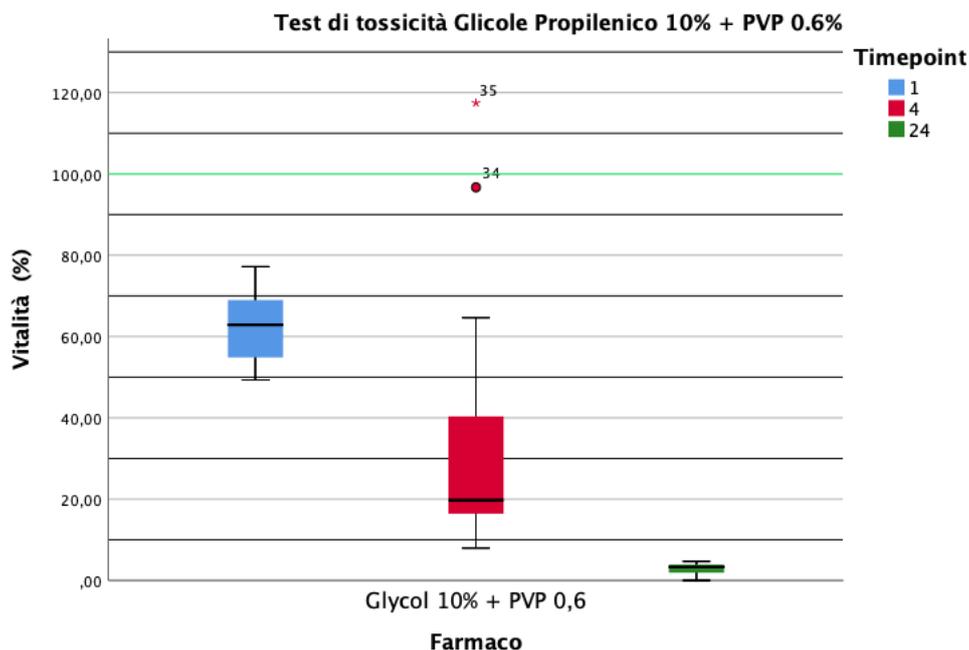


Figura 13: boxplot a 1, 4 e 24 ore della vitalità % di Glicole 10%+ PVP 0.6 sulle cellule corneali

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

I risultati di questo studio dimostravano una maggiore tossicità del Glicole quando associato a PVP 0.6%. Pertanto si è deciso di procedere ad una analisi di un composto di PVP 0.6% su cellule corneali.

I risultati di questa analisi, che ha coinvolto un totale di 18 replicati (2 esperimenti da 3 pozzetti ognuno per ogni timepoint), ha dimostrato come il PVP 0.6% sia particolarmente tossico per le cellule corneali (tabella 12).

Tabella 12: Statistica descrittiva del Glicole 10% + PVP 0.6% e PVP 0.6%

| Farmaco | | Media | 95% di intervallo di confidenza per la media | | Media ritagliata al 5% | Mediana | Varianza | Deviazione std. | Minimo | Massimo | IQR |
|-----------------------|---------|-------|--|------------------|------------------------|---------|----------|-----------------|--------|---------|------|
| | | | Limite inferiore | Limite superiore | | | | | | | |
| Control | 1--> 24 | 100% | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0.00 |
| Glycol 10% + PVP 0.6% | 1 | 62.3% | 56.8 | 67.8 | 62.2 | 62.9 | 75.4 | 8.7 | 49.3 | 77.2 | 14.9 |
| | 3 | 36.5% | 21.3 | 51.6 | 35.5 | 15.9 | 929.3 | 30.5 | 8.1 | 81.7 | 62.1 |
| | 4 | 35.1% | 16.9 | 53.3 | 32.1 | 19.7 | 1082.1 | 32.9 | 8.0 | 117.5 | 27.2 |
| | 24 | 2.9% | 2.0 | 3.8 | 3.0 | 3.3 | 2.1 | 1.4 | 0.0 | 4.7 | 2.5 |
| PVP 0.6% | 1 | 2.4% | 1.3 | 3.5 | 2.5 | 2.6 | 1.1 | 1.1 | 0.3 | 3.2 | 1.2 |
| | 4 | 3.5% | 1.5 | 5.5 | 3.6 | 3.7 | 3.5 | 1.9 | 0.5 | 5.7 | 3.2 |
| | 24 | 2.4% | 1.6 | 3.1 | 2.4 | 2.3 | 0.5 | 0.7 | 1.6 | 3.2 | 1.5 |

L'analisi statistica eseguita con test di Kruskal-Wallis ha infatti dimostrato una differenza statisticamente significativa al timepoint di 1 ora tra il Glicole 10% e PVP 0.6% e il PVP 0.6%, non solo nei confronti del controllo, ma anche tra il PVP 0.6% Glicole 10% e PVP 0.6% (tabella 13, figura 14).

Tabella 13: Statistica descrittiva del Glicole 10% + PVP 0.6% e PVP 0.6%

| Timepoint | Sample 1-Sample 2 | | |
|-----------|-------------------------|------------------|-----------------------|
| | PVP 0.6%- Associazione* | PVP 0.6%-Control | Associazione*-Control |
| 1 | 0.031 | 0.000 | 0.031 |
| 4 | 0.013 | 0.000 | 0.051 |
| 24 | 1.000 | 0.001 | 0.006 |

*Glycol 10% + PVP 0.6%= Associazione.

Ciascuna riga esegue il test per l'ipotesi nulla che le distribuzioni Campione 1 e Campione 2 siano identiche. Il livello di significatività è ,05. I valori di significatività sono stati adattati in base alla correzione di Bonferroni per più test.

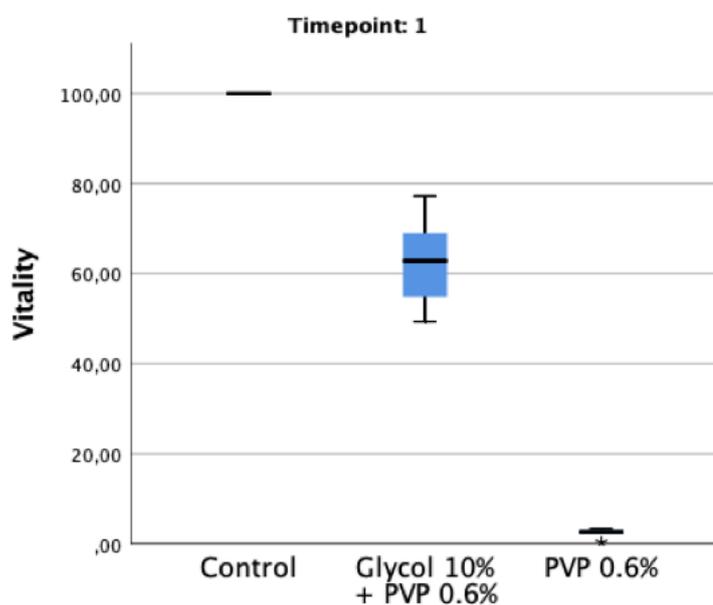


Figura 14: Boxplot della vitalità % a confronto nel timepoint 1 per il controllo, il Glicole 10% + PVP 0.6% e il PVP 0.6%

Analizzando l'andamento della vitalità delle cellule HCE nei vari timepoint solo per il farmaco PVP 0.6% non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ($p=0.262$, Figura 15)

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

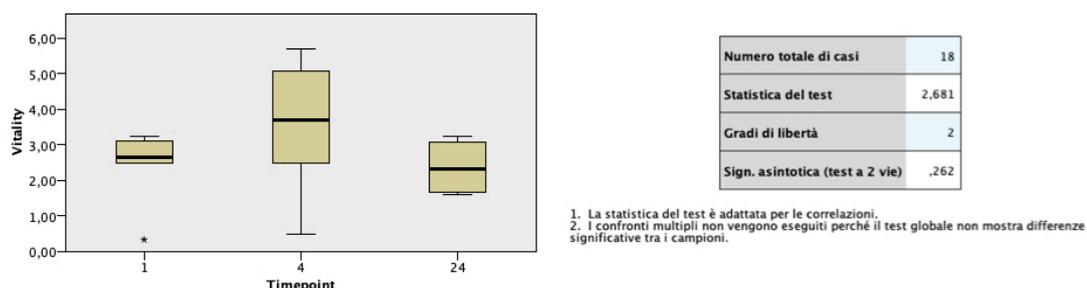


Figura 15: Distribuzione della vitalità % nei timepoint per il PVP 0.6%

Gli esperimenti di tossicità riguardanti l'associazione di differenti dosaggi di Ivermectina associata a DMSO, Glicole Propilenico al 10% e l'associazione di Glicole Propilenico 10% + PVP 0.6% sono stati analizzati con test di Kruskal Wallis H per ogni concentrazione di Ivermectina ad ogni timepoint analizzato. I risultati hanno complessivamente dimostrato una costante differenza statisticamente significativa, con l'esclusione dei dosaggi di 50µg(p=0.220), 125µg(p=0.159) e 250µg (p=0.144) a 24 ore.

I confronti pairwise eseguiti con test di Dunnett e rettificati con formula di Bonferroni sono riportati in tabella (14).

Tabella 14: confronti pairwise eseguiti con test di Dunnett per Ivermectina a differenti dosaggi in DMSO, Glicole 10% e associazione glicole 10% + PVP 0.6%

| Timepoint | | Sample 1-Sample 2 | | | |
|-----------|--------|-------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | | Associazione-Glycol 10% | Associazione-DMSO | Glycol 10%-DMSO | DMSO-Glycol 10% |
| 1,00 | 0,25µg | 0.027 | 0.010 | 1.000 | K-W non sig. |
| | 25µg | 0.027 | 0.010 | 1.000 | K-W non sig. |
| | 50µg | 0.021 | 0.039 | | 1.000 |
| | 125µg | 0.072 | 0.018 | 1.000 | K-W non sig. |
| | 250µg | 0.464 | 0.016 | 0.280 | K-W non sig. |
| 4,00 | 0,25µg | 0.010 | 0.001 | 0.887 | K-W non sig. |
| | 25µg | 0.000 | 0.064 | K-W non sig. | 0.147 |
| | 50µg | 0.000 | 1.000 | K-W non sig. | 0.001 |
| | 125µg | 0.005 | 1.000 | K-W non sig. | 0.011 |
| 24,00 | 0,25µg | 0.194 | 0.000 | 0.114 | K-W non sig. |
| | 25µg | 0.734 | 0.000 | 0.036 | K-W non sig. |

I valori di significatività sono stati adattati in base alla correzione di Bonferroni per più test.
 Il farmaco: Glicole 10% + PVP 0.6% è stato riportato come "Associazione" per comodità di lettura

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Sono stati analizzati inoltre i dati di tossicità delle diverse concentrazioni a confronto nel medesimo timepoint per ogni singola associazione.

Solo La diluizione del farmaco con DMSO al timepoint di 1 ora non ha mostrato una differenza statisticamente significativa ($p=0.598$), mentre tutte le altre preparazioni hanno dimostrato, nei vari timepoint, delle differenze statisticamente significative tra le varie diluizioni di ivermectina utilizzate.

I valori riepilogativi sono riportati nella tabella 15

Tabella 15: tossicità delle diverse concentrazioni a confronto nel medesimo timepoint per ogni singola associazione

| Sample 1-Sample 2 | Farmaco | | | | | | | |
|-------------------|-----------|-------|------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| | DMSO | | Glycol 10% | | | Glycol 10% + PVP 0.6% | | |
| | Timepoint | | Timepoint | | | Timepoint | | |
| | 4 | 24 | 1 | 4 | 24 | 1 | 4 | 24 |
| 125µg-250µg | 0.728 | 0.410 | | | | | | 0.880 |
| 125µg-50µg | 0.452 | 0.771 | 0.936 | 0.121 | 0.382 | 0.581 | | |
| 125µg-25µg | 0.004 | 0.018 | 0.516 | 0.020 | 0.442 | 0.885 | | 0.891 |
| 125µg-0,25µg | 0.000 | 0.000 | 0.910 | 0.013 | 0.284 | | 0.869 | 0.592 |
| 125µg-Control | 0.000 | 0.000 | 0.042 | 0.000 | 0.000 | 0.008 | 0.001 | 0.002 |
| 250µg-50µg | 0.674 | | 0.019 | 0.001 | 0.086 | 0.021 | 0.431 | |
| 250µg-25µg | 0.009 | 0.235 | 0.003 | 0.000 | 0.120 | 0.057 | 0.908 | |
| 250µg-0,25µg | 0.000 | 0.001 | 0.013 | 0.000 | 0.067 | 0.134 | 0.369 | 0.701 |
| 250µg-Control | 0.000 | 0.015 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 |
| 50µg-25µg | 0.031 | 0.041 | 0.590 | 0.387 | | | | 0.631 |
| 50µg-0,25µg | 0.000 | 0.000 | 0.979 | 0.302 | 0.772 | | 0.844 | 0.379 |
| 50µg-Control | 0.000 | 0.001 | 0.063 | 0.005 | 0.002 | 0.027 | 0.001 | 0.001 |
| 25µg-0,25µg | 0.225 | 0.005 | | 0.869 | 0.783 | | 0.450 | 0.690 |
| 25µg-Control | 0.019 | 0.109 | 0.166 | 0.059 | 0.005 | 0.012 | 0.000 | 0.003 |
| 0,25µg-Control | 0.265 | | 0.055 | 0.085 | 0.011 | 0.003 | 0.004 | 0.011 |
| 50µg-250µg | | 0.573 | | | | | | 0.621 |
| Control-0,25µg | | 0.183 | | | | | | |
| 250µg-125µg | | | 0.018 | 0.099 | 0.350 | 0.075 | 0.412 | |
| 0,25µg-25µg | | | 0.592 | | | 0.639 | | |
| 25µg-50µg | | | | | 0.990 | 0.688 | 0.528 | |
| 0,25µg-125µg | | | | | | 0.746 | | |
| 0,25µg-50µg | | | | | | 0.373 | | |
| 25µg-125µg | | | | | | | 0.508 | |
| 50µg-125µg | | | | | | | 0.972 | 0.731 |
| 25µg-250µg | | | | | | | | 0.989 |

Le significatività asintotiche (test a 2 vie) sono visualizzate. Il livello di significatività è ,05.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

I risultati degli esperimenti condotti su diluizione dei farmaci, che sono stati eseguiti a 1,3,4 e 24 ore di intervallo hanno mostrato una costante differenza statisticamente significativa ($p=0.000$) a tutti i timepoint (Test di Kruskal Wallis H). La mediana (IQR) della vitalità ad 1 ora era di 45.14% (8.21) per la diluizione 40X, 88.14%(44.33) e 55.10(16.23) per la diluizione 80X (Figura 16).

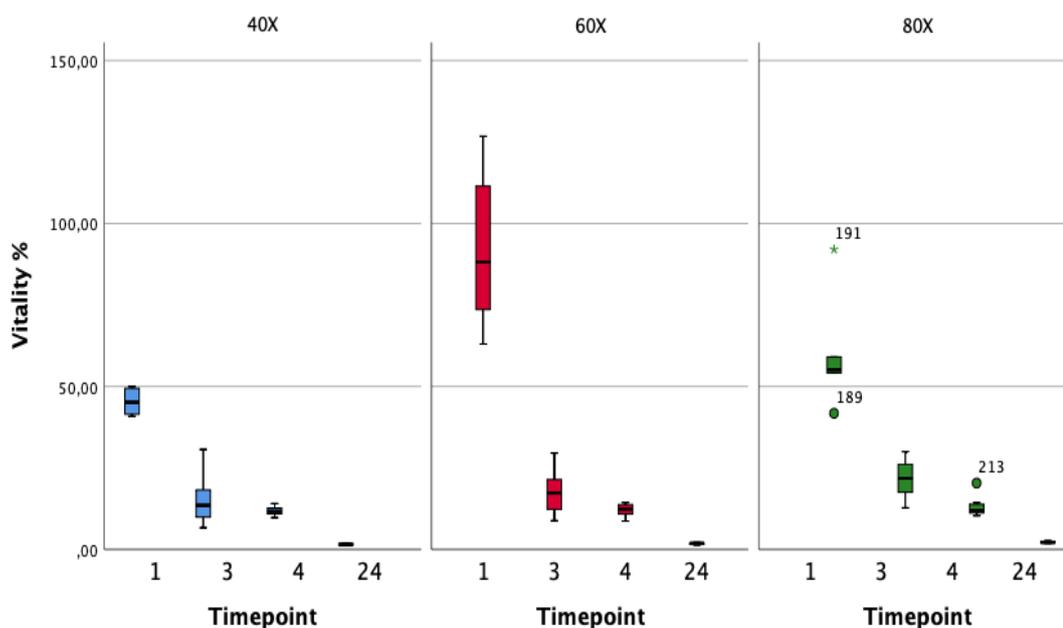


Figura 16: boxplot % vitalità cellulare diviso per diluizione e timepoint

L'analisi post-hoc ha dimostrato come fosse presente una significativa differenza in termini di vitalità percentuale residua tra la diluizione 40X, 80X ed il controllo, così come tra la diluizione 40X e 60X al timepoint di 1 ora. Non si rilevano invece differenze statisticamente significative tra gli altri confronti, ed in particolare tra la diluizione 60X ed il controllo.

In tutti gli altri timepoint invece si è riscontrata una differenza statisticamente significativa tra le diluizioni e il controllo, ma nessuna differenza statisticamente significativa è stata dimostrata tra le varie diluizioni di farmaci.

I valori di significatività dei vari confronti e dei test statistici, così come le statistiche descrittive sono riportate nelle tabelle 16 e 17

Tabella 16 : Confronto pairwise delle diluizioni del farmaco su cultura HCE. Il livello di significatività è ,0,5 valori di significatività sono stati adattati in base alla correzione di Bonferroni per più test.

| Timepoint | Sample 1-Sample 2 | | | | | | |
|-----------|-------------------|---------|-------------|---------|-------------|-------------|---------|
| | 40X-80X | 40X-60X | 40X-Control | 80X-60X | 80X-Control | 60X-Control | 60X-80X |
| 1 | 1.000 | 0.019 | 0.000 | 0.242 | 0.003 | 1.000 | |
| 3 | 0.491 | 1.000 | 0.000 | | 0.000 | 0.000 | 1.000 |
| 4 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | | 0.000 | 0.000 | 1.000 |
| 24 | 1.000 | 1.000 | 0.004 | | 0.047 | 0.001 | 1.000 |

Tabella 17: Statistiche Descrittive diluizioni 40,60,80X per culture HCE

| Diluizione | | Media | 95% di intervallo di confidenza per la media | | Mediana | Varianza | Deviazione Standard | Minimo | Massimo | IQR |
|------------|------|-------|--|------------------|---------|----------|---------------------|--------|---------|------|
| | | | Limite inferiore | Limite superiore | | | | | | |
| Control | 01→4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 |
| 40X | 1 | 45.3 | 41.0 | 49.7 | 45.1 | 17.0 | 4.1 | 40.9 | 50.0 | 8.2 |
| | 3 | 14.5 | 11.3 | 17.7 | 13.5 | 41.0 | 6.4 | 6.7 | 30.7 | 9.1 |
| | 4 | 11.8 | 10.8 | 12.9 | 11.7 | 2.0 | 1.4 | 9.7 | 14.1 | 2.4 |
| | 24 | 1.6 | 0.5 | 2.6 | 1.5 | 0.2 | 0.4 | 1.2 | 2.0 | . |
| 60X | 1 | 91.8 | 66.7 | 117.0 | 88.1 | 574.4 | 24.0 | 63.0 | 126.7 | 44.3 |
| | 3 | 17.5 | 14.2 | 20.7 | 17.3 | 39.8 | 6.3 | 8.8 | 29.6 | 9.5 |
| | 4 | 12.2 | 11.0 | 13.4 | 12.4 | 3.3 | 1.8 | 8.7 | 14.4 | 3.2 |
| | 24 | 1.8 | 1.4 | 2.2 | 1.9 | 0.1 | 0.3 | 1.4 | 2.2 | 0.5 |
| 80X | 1 | 59.5 | 41.7 | 77.4 | 55.1 | 288.1 | 17.0 | 41.8 | 92.0 | 16.2 |
| | 3 | 21.9 | 19.0 | 24.8 | 21.9 | 26.7 | 5.2 | 12.8 | 30.0 | 9.3 |
| | 4 | 13.1 | 10.7 | 15.4 | 11.9 | 9.4 | 3.1 | 10.4 | 20.4 | 3.1 |
| | 24 | 2.2 | 1.9 | 2.6 | 2.2 | 0.1 | 0.3 | 1.9 | 2.6 | 0.6 |

Studi su cellule congiuntivali HCjE

Gli esperimenti su cellule congiuntivali, relativi alla tossicità del Glicole Propilenico a differenti concentrazioni, sono stati eseguiti su 3 replicati per

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

concentrazione per timepoint. A causa di problemi legati al lungo tempo necessario per la replicazione cellulare e il breve ciclo vitale delle culture non è stato possibile tuttavia eseguire gli esperimenti per alcune concentrazioni ad alcuni timepoint (tabella 18).

| Replicati Timepoint | Timepoint | | | Totale complessivo |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| | 1 | 2 | 4 | |
| Control | 3 | 3 | 6 | 12 |
| 0.10% | 0 | 3 | 3 | 6 |
| 0.30% | 0 | 3 | 3 | 6 |
| 0.70% | 3 | 3 | 6 | 12 |
| 1.5% | 0 | 3 | | 3 |
| 3.10% | 0 | 3 | 3 | 6 |
| 6.30% | 3 | 3 | 6 | 12 |
| 10% | 3 | 0 | 6 | 9 |
| 12.50% | 0 | 3 | 3 | 6 |
| 15% | 3 | 0 | 3 | 6 |
| 20% | 3 | 0 | 3 | 6 |
| 25% | 3 | 3 | 6 | 12 |
| 50% | 0 | 3 | 3 | 6 |
| Totale complessivo | 21 | 30 | 51 | 102 |

Tabella 18: riepilogo dei replicati eseguiti divisi per diluizione % del Glicol e timepoint

L'analisi statistica (modello lineare misto), eseguito per i timepoint 1 e 4 ore, ha dimostrato che la concentrazione di Glicole Propilenico ad 1 ora ($f=17.309,166$, $p= 0.0009$) e 4 ore ($F=67.380,987$ $p=0.000$) hanno un effetto statisticamente significativo sulla vitalità della coltura cellulare.

In particolare, l'analisi post-hoc ha dimostrato, ad 1 ora, una significativa differenza di vitalità tra le diluizioni 20% e 25% ed il controllo, mentre non sono state riportate differenze statisticamente significative tra le diluizioni \leq a 15% ($p= 0.205$) di Glicole Propilenico. Inoltre, concentrazioni di 0.70% e 6.30% hanno dimostrato un lieve, seppur non significativo, aumento della vitalità cellulare, come si può evincere dalla figura 17.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

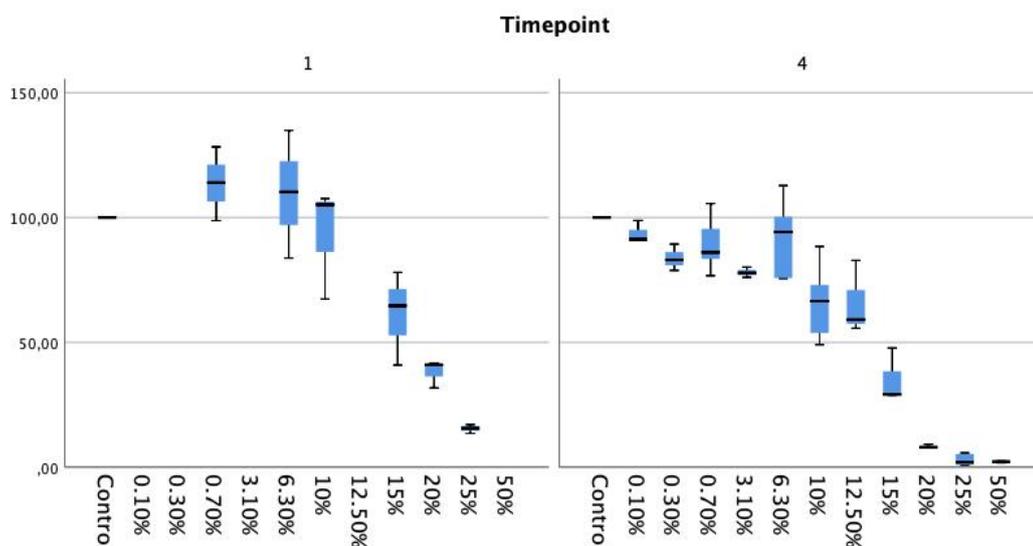


Figura 17: boxplot vitalità cellulare % a differenti concentrazioni di Glicole Propileno in culture HCJE

A 4 ore, le concentrazioni inferiori al 10% si sono dimostrate non significativamente differenti dai valori di vitalità del controllo, mentre tutte le altre hanno manifestato effetti significativamente rilevanti di riduzione della vitalità cellulare rispetto al controllo.

I risultati delle significatività sono riportati nel dettaglio nella tabella 19

| Timepoint | (J) Concentration | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | Control | 0.70% | 6.30% | 10% | 15% | 20% | 25% | 0.10% | 0.30% | 3.10% | 12.50% | 50% | |
| 1 | Control | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.205 | 0.006 | 0.000 | | | | | | |
| | 0.70% | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.025 | 0.001 | 0.000 | | | | | | |
| | 6.30% | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.047 | 0.002 | 0.000 | | | | | | |
| | 10% | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.559 | 0.017 | 0.001 | | | | | | |
| | 15% | 0.205 | 0.025 | 0.047 | 0.559 | | 1.000 | 0.070 | | | | | |
| | 20% | 0.006 | 0.001 | 0.002 | 0.017 | 1.000 | | 1.000 | | | | | |
| | 25% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.070 | 1.000 | | | | | | |
| 4 | Control | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 1.000 | 0.153 | 0.001 | 0.000 | |
| | 0.70% | 1.000 | 1.000 | 0.013 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.101 | 0.000 | |
| | 6.30% | 1.000 | 1.000 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.025 | 0.000 | |
| | 10% | 0.000 | 0.013 | 0.002 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.014 | 0.880 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | |
| | 15% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.003 | 0.000 | 0.087 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.022 | 0.009 |
| | 20% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.087 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 |
| | 25% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 |
| | 0.10% | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.014 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | 1.000 | 1.000 | 0.062 | 0.000 |
| | 0.30% | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.880 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | | 1.000 | 1.000 | 0.000 |
| | 3.10% | 0.153 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 1.000 | | 1.000 | 0.000 |
| | 12.50% | 0.001 | 0.101 | 0.025 | 1.000 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.062 | 1.000 | 1.000 | | 0.000 |
| | 50% | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.009 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | |

Basato sulle medie marginali stimate

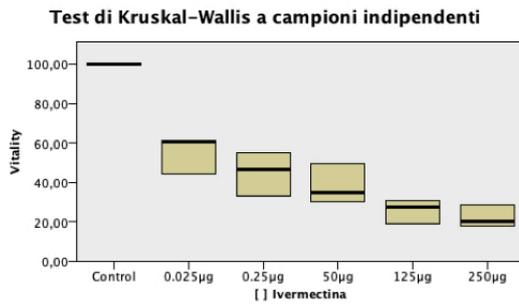
a. Variabile dipendente: Vitality (%)

c. Adattamento per confronti multipli: Bonferroni.

Tabella 19: confronti pairwise delle diverse concentrazioni di Glycol a confronto in culture HCJE

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Gli esperimenti di tossicità riguardanti l'associazione di differenti dosaggi di Ivermectina associata a DMSO, e Glicole Propilenico 10% sono stati analizzati con test di Mann Whitney U. L'analisi statistica, a causa della scarsità di replicati che si è potuto ottenere, a causa delle difficoltà incontrate con le culture cellulari HCJE, e l'alta variabilità dei pochi dati ottenuti, sono state eseguite solo al timepoint 1. I risultati hanno dimostrato una differenza sempre statisticamente significativa tra i due farmaci in termini di vitalità della cultura cellulare ad ogni concentrazione di Ivermectina nel confronto tra i due solventi utilizzati (DMSO-Glicole 10%). È stato inoltre eseguita una analisi dei dati con test di Kruskal-Wallis H per verificare, al timepoint 1, eventuali differenze, in termini di vitalità, tra le diverse concentrazioni di ivermectina nei due diversi vettori utilizzati (Fig. 18). Il test non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra il controllo e tutte le differenti concentrazioni di Ivermectina quando il solvente oggetto dell'analisi era il DMSO. La stessa analisi, eseguita sul preparato con Ivermectina e Glicole propilenico al 10%, ha invece mostrato una differenza statisticamente significativa ($p=0.000$). L'analisi pairwise con test di Dunnett corretto con il metodo di Bonferroni per analisi ripetute, ha mostrato differenze statisticamente significative tra i valori di vitalità al controllo e i dosaggi 125 μ g e 250 μ g ($p=0.000$), così come tra i dosaggi 250 μ g e 0.025 μ g ($p=0.015$).

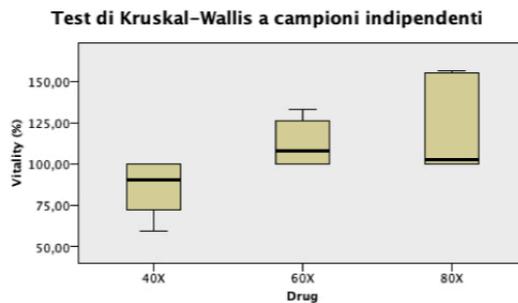


| | |
|---------------------------------|--------|
| Numero totale di casi | 36 |
| Statistica del test | 30,261 |
| Gradi di libertà | 5 |
| Sign. asintotica (test a 2 vie) | ,000 |

1. La statistica del test è adattata per le correlazioni.

Figura 18: Test di Kruskal-Wallis per le differenti concentrazioni di Ivermectina in DMSO

I risultati degli esperimenti condotti su diluizione dei farmaci, che sono stati eseguiti al solo timepoint 1 hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa in termini di vitalità della cultura di cellule congiuntivali (test di Kruskal Wallis H, $p=0.026$, figura 19). Le statistiche descrittive sono riassunte in tabella 20.



Drug

| | |
|---------------------------------|-------|
| Numero totale di casi | 18 |
| Statistica del test | 7,329 |
| Gradi di libertà | 2 |
| Sign. asintotica (test a 2 vie) | ,026 |

1. La statistica del test è adattata per le correlazioni.

Figura 19: Test di Kruskal-Wallis per le differenti diluizioni del farmaco

L'analisi pairwise con test di Dunnet corretto con il metodo di Bonferroni per analisi ripetute, ha mostrato differenze statisticamente significative tra i valori di vitalità delle concentrazioni 40X ed 80X ($p=0.046$).

| Drug | Timepoint | Media | 95% di intervallo di confidenza per la media | | Mediana | Varianza | Deviazione std. | Minimo | Massimo | IQR |
|------|-----------|-------|--|------------------|---------|----------|-----------------|--------|---------|------|
| | | | Limite inferiore | Limite superiore | | | | | | |
| 40X | 1 | 85.4 | 67.2 | 103.7 | 90.5 | 302.0 | 17.4 | 59.3 | 100.0 | 30.9 |
| 60X | 1 | 112.5 | 97.0 | 127.9 | 107.8 | 217.2 | 14.7 | 100.0 | 132.8 | 28.1 |
| 80X | 1 | 119.7 | 90.0 | 149.3 | 102.9 | 799.8 | 28.3 | 100.0 | 156.8 | 55.7 |

Tabella 20: Statistiche Descrittive diluizioni 40,60,80X per culture HCJE

Discussione

Sebbene lo scopo di un test di citotossicità *in vitro* sia quello di verificare l'eventuale tossicità di un farmaco sulle cellule target, è pur vero che, al fine di mantenere la vitalità del tessuto cellulare *in vitro*, il farmaco debba essere diluito nel mezzo di cultura, unica fonte di sostentamento delle cellule *in vitro*. Alla luce di ciò si è resa necessaria una diluizione dei farmaci oggetto di studio. Al fine di utilizzare delle diluizioni di Ivermectina che potessero essere comunque rappresentative della soluzione madre all' 1%, sono state scelte delle concentrazioni già utilizzate in altri studi. Molinari et al. Infatti avevano testato concentrazioni simili di Ivermectina per verificare gli effetti citotossici della formulazione veterinaria Ivomec®^[106]. Dirimente inoltre il fatto che il farmaco Ivomec® presenti una concentrazione equivalente a quella del galenico da noi presentato (1%). La scelta di diluire il glicole propilenico al 10% invece è stata dettata da diversi fattori. In primis i risultati dei primi test di citotossicità che hanno dimostrato, sia su cellule corneali che congiuntivali, come una concentrazione del 10% risultasse non significativamente differente dal controllo (ottenuto con il solo mezzo di cultura) in termini di vitalità del tessuto cellulare *in vitro*. Inoltre, tale concentrazione, era la minor concentrazione alla quale era possibile ottenere una diluizione dell'ivermectina, completamente assente da precipitati. I risultati dei primi

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

studi hanno inoltre manifestato alcuni risultati apparentemente contraddicenti. A concentrazioni inferiori all'1% il Glicole sembrerebbe infatti associato ad una aumentata vitalità cellulare, piuttosto che ad una tossicità. Tale dato però non ha sorpreso i biologi del laboratorio dell'UEF, in quanto spesso può capitare che piccole concentrazioni di sostanze, teoricamente tossiche, possano invece, in un modello cellulare *in vitro*, favorirne la crescita e la replicazione. Gli studi eseguiti con il glicole propilenico al 10%, addizionato al PVP, hanno invece mostrato risultati di tossicità superiori a quanto previsto. Il PVP allo 0.6% è infatti normalmente commercializzato per uso topico oculare come collirio (IODIM®). L'aggiunta del PVP in tutti i test eseguiti, è però sempre risultata in un aumento significativo della tossicità, con una significativa riduzione della vitalità media cellulare. L'analisi degli studi eseguiti su PVP 0.6% in colture cellulari ha dimostrato una marcata tossicità del PVP sulle cellule corneali. L'analisi statistica volta ad esaminare eventuali differenze nella distribuzione della vitalità nei vari timepoint per il solo farmaco è risultata non significativa. Questo è attribuibile al fatto che già dal timepoint di 1 ora la vitalità media delle culture esposte al PVP 0.6% era solo del 2.5%. Recenti studi hanno dimostrato come lo iodopovidone, utilizzato a concentrazioni molto inferiori a quelle della pratica clinica, sia in grado di inibire la crescita cellulare. In particolare in uno studio su cellule epiteliali umane (HeLa) è stato dimostrato come già a concentrazioni di 3×10^{-3} il PVP inducesse una statisticamente significativa riduzione della crescita cellulare ad un giorno. [107]

Appare quindi evidente come l'aggiunta del PVP a concentrazioni dello 0.6% possa essere la causa dell'aumentata tossicità riscontrata nell'associazione Glicole 10%+ PVP 0.6%.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Interessante invece notare come i test su diluizioni seriali (40,60,80X) del farmaco originario, abbiano mostrato come il farmaco, diluito solo 40X non mostri una tossicità elevata.

Andando infatti ad analizzare le mediane di vitalità ad 1 ora si può infatti notare come su culture cellulari HCE questa sia di circa 45.1%, mentre raggiunga valori di 90.5% su cellule HCjE.

Alla luce di tali incoraggianti risultati, con il parere favorevole dei colleghi dell'Università della Finlandia dell'Est, si è deciso di procedere ad una fase III dello studio, per verificare, su modello animale, la tossicità del composto.

Fase III

Sono stati selezionati 15 Ratti albin, tra i 4 e i 7 mesi di vita. L'esperimento è stato dapprima condotto con il farmaco oggetto di tesi (Glicole propilenico, Ivermectina 0.1ml, PVP 0.6%) su un singolo ratto con 2 somministrazioni a 4 ore di intervallo e si è proceduto all'osservazione delle condizioni oculari e sistemiche per 24h. Non essendo state riscontrate alterazioni tali da definire un criterio per l'interruzione dello studio si è provveduto a ripetere il test su 6 occhi di 6 ratti, ripetendo la somministrazione 4 volte per 12 ore (ogni 4 ore). I ratti sono stati monitorizzati per le 48 ore successive senza riscontrare segni di tossicità sistemica e/o oculare tali da rendere necessario interrompere lo studio. Pertanto, si è potuto procedere con lo studio programmato. I parametri esaminati sono stati: la frequenza di ammiccamento, il tempo intercorso tra l'instillazione del farmaco e la totale riapertura dell'occhio, il numero di "scuotimenti della testa", il numero di tentativi di riapertura dell'occhio prima della totale riapertura, la ricerca di eventuali segni di dolore, secondo lo schema dell' University of Michigan ULAM (Figura 20), rossore

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

congiuntivale, difetti corneali (mediante applicazione di fluoresceina ed esame con lampada a fessura) ed eventuali manifestazioni sistemiche. I ratti sono poi stati sottoposti al termine dell'follow-up ad esame OCT e retinografia, oltre che esame del fundus alla lampada a fessura, per escludere eventuali segni di tossicità retinica.

University of Michigan
ULAM

Pain Assessment in Rats

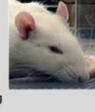
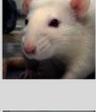
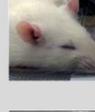
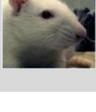
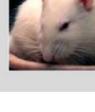
What if you see ...?

6/22/2015

Analgesics must be administered as outlined in the UCUCU-approved protocol. When "as needed" analgesics are specified, animals must be monitored for signs of pain, and treated accordingly.

Listed below are easily identifiable indicators of pain in rats. This is neither a comprehensive nor specific list, and as such, other observations should be taken into account when assessing pain status in rats. Please contact ULAM veterinary staff for additional assistance with identification and/or treatment of pain.

Appearance (A) Interpretation of facial expression can be used to qualify pain. Below are images of rats who show varying levels of pain.

| | Not present "0" | Present "1" | Pronounced "2" |
|--|---|---|---|
| <p>Orbital Tightening Rats in pain display a narrowing of the orbital area, manifesting as either (partial or complete) eye closure or eye "squeezing"¹</p> |  |  |  |
| <p>Nose/Cheek Flattening Rats in pain display successively less bulging of the nose and cheek, with eventual absence of the crease between the cheek and whisker pads²</p> |  |  |  |
| <p>Ear changes The ears of rats in pain tend to fold, curl and angle forwards or outwards, resulting in a pointed shape. The space between the ears may appear wider³</p> |  |  |  |
| <p>Whisker change The whiskers of rats in pain move forward (away from the face) from the baseline position, and tend to bunch, giving the appearance of whiskers standing on end⁴</p> |  |  |  |

Behavior (C) When rats are experiencing abdominal pain, they may demonstrate the following abnormal behaviors:

Cat-like Back Arching
The animal arches its back upwards; this looks like normal cat stretching, but is abnormal in rodents.



Withing
Lateral contortion of the flank abdominal muscles². It may look like the animal is "sucking in" its stomach.



Twitching
A short-lived involuntary muscular contraction of any body part⁵.

No image available

References

- The Rat Grimace Scale images and accompanying descriptions are borrowed verbatim from: Sotocoll SG, Sorge RE, Zalozni A, et al. 2011. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory rat via Facial Expressions. *Molecular Pain* 7: 5.
- Behavioral indicators from: Roughan JV, and Flecknell PA. 2001. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90 (1): 65-74. Roughan JV, and Flecknell PA. 2005. Training in behavior-based post-operative pain scoring in rats – An evaluation based on improved recognition of analgesic requirements. *Applied Animal Behaviour Science* 96 (3-4): 327-342.
- Porphyrin staining image from: Humane Endpoints in laboratory animal experimentation: Eye crusting ("Red tears") (rat). www.humane-endpoints.info
- The behavior images are borrowed directly from videos on: Newcastle University. 2014. Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals. "An Introduction: Recognising Post-Operative Pain in Animals." <http://www.ahwa.org.uk/site/hotnews/09/0902-Title.html>

Figura 20: Scala di valutazione del dolore nei ratti secondo l'University of Michigan

È stato condotto un esperimento su 6 ratti, con una somministrazione ogni 4 ore, per un totale di 4 somministrazioni giornaliere, ripetute per 3 giorni. I ratti sono stati controllati al baseline, dopo 1 ora dalla somministrazione, dopo ulteriori 3 ore, prima della nuova somministrazione. Gli stessi ratti nei giorni successivi sono stati controllati ogni 4 ore per escludere effetti tossici tardivi.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Materiali e metodi

Sono stati testati 12 occhi di 6 ratti albini. Gli occhi destri sono stati tutti trattati con il farmaco galenico (Ivermectina 1% + PVP 0.6% + Glicole Propilenico), mentre gli occhi sinistri sono stati utilizzati come controllo. Per poter procedere con gli esami specialistici (biomicroscopia con lampada a fessura, colorazione con fluoresceina e luce di Wood), senza dover ricorrere ad eventuali sedazioni e/o anestesie, che avrebbero potuto inficiare i risultati del test, i ratti, al momento di ogni esperimento, sono stati delicatamente maneggiati e fasciati, solo da personale altamente qualificato dell' UEF, lasciando libera la testa, così da poter procedere con la somministrazione del farmaco e la valutazione successiva, senza inficiare la normale reazione dell'animale al collirio. Al termine di ogni valutazione gli animali sono stati liberati e lasciati nelle loro gabbie. Al baseline tutti i ratti sono stati esaminati alla lampada a fessura e valutati con test della fluoresceina e luce di Wood per verificare eventuali presenze di alterazioni e/o anomalie corneali e della camera anteriore. Tutti i risultati sono stati trascritti su foglio elettronico.

Il farmaco è stato somministrato 4 volte al giorno per 3 giorni nel solo occhio destro di ogni animale, ad intervalli di 4 ore. Gli animali sono stati esaminati ogni volta immediatamente prima e dopo la somministrazione del farmaco, nonché dopo 60 minuti e dopo 4 ore dalla somministrazione. I timepoint di controllo immediatamente dopo la somministrazione del collirio sono stati indicati come HH.1, per distinguerli dai timepoint di osservazione immediatamente precedenti alla somministrazione.

Sia la fluoresceina, preparata giornalmente in cappa sterile alla concentrazione del 2% (medesima formulazione umana), sia il farmaco sono stati somministrato mediante pipetta Pasteur, per un totale di 5µl/dose.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Durante l'esperimento due diversi osservatori hanno osservato ognuno un occhio della animale, osservando e registrando:

- Presenza di dolore (come dalle scale di valutazione del University of Michigan ULAM)
- Numero di tentativi dell'animale di apertura delle palpebre dopo instillazione del farmaco
- Tempo necessario affinché l'animale aprisse completamente l'occhio.
- Numero di ammiccamenti
- Numero di movimenti di scuotimento della testa
- Tempo necessario affinché l'animale tornasse ad un comportamento equiparabile a prima dell'instillazione del collirio.
- Valutazione con esame biomicroscopico alla ricerca di:
 - Lesioni corneali fluo +
 - Alterazioni della camera anteriore.

In particolare, eventuale presenza di dolore persistente e/o di intensità elevata sarebbe stata immediatamente causa di sospensione dello studio ed eventuale soppressione dell'animale, al fine di evitare inutili sofferenze alla cavia.

Alla lampada a fessura si sono invece ricercati:

- Eventuali segni di uveite: (Iperemia congiuntivale, neovascolarizzazione corneale, fenomeno di Tyndall, sinechie irido-lenticolari)
- Eventuali lesioni corneali, classificate secondo il seguente schema:
 - 0: Nessuna alterazione fluo+
 - 0.5: Lesioni aspecifiche

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

- 1: Cheratite Puntata
- 1.5: Cheratite Puntata >50% superficie
- 2: Disepitelizzazione <50% dell'area, non confluyente
- 3: Ulcera corneale

Analisi Statistica

I dati sono stati raccolti al termine di ogni esperimento su foglio elettronico Excel e categorizzati per esperimento, data di esecuzione, caratteristiche degli animali utilizzati, età, peso e farmaco esaminato.

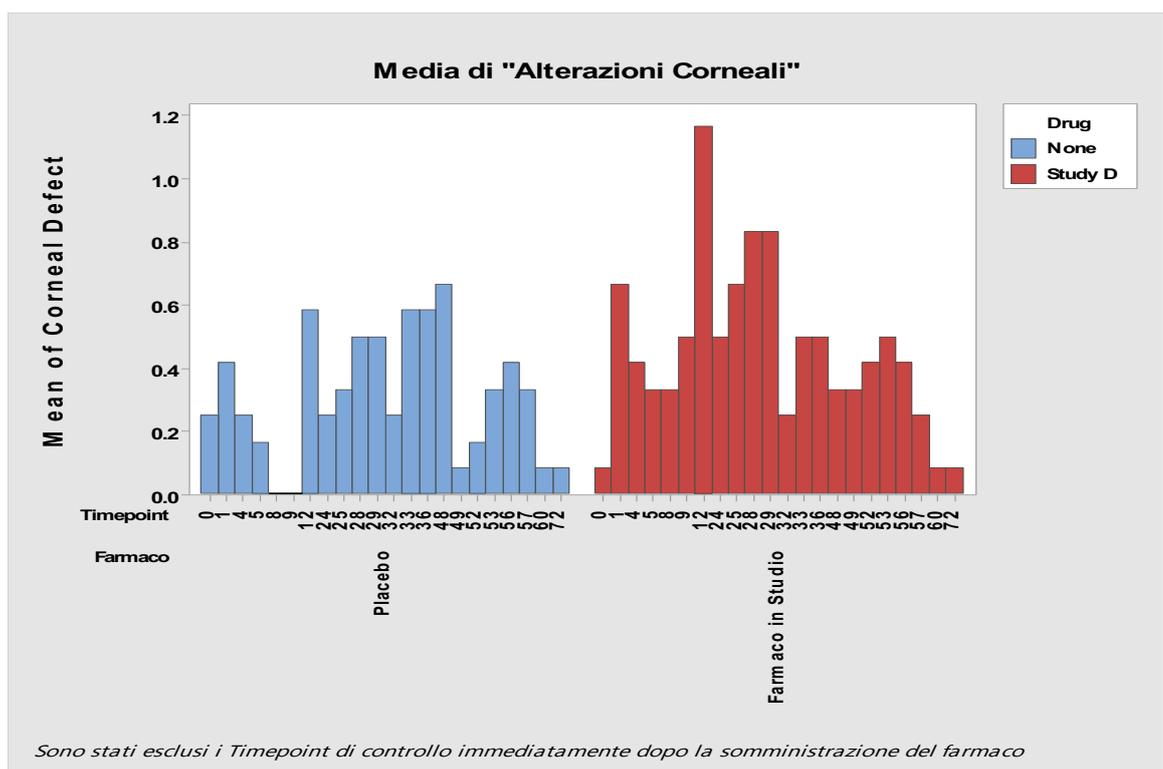
I dati sono stati analizzati con un Modello Lineare Misto, con fattori casuali (soggetto/occhio). Per tutte le analisi, un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R studio per Mac (RStudio Team (2018). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL [http://www.rstudio.com/.](http://www.rstudio.com/)) e Minitab per Windows (Minitab 17 Statistical Software 2010. [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. - www.minitab.com).

Risultati

Sono stati analizzati 12 occhi di 6 ratti (6 occhi destri, 6 occhi sinistri), l'età media dei ratti utilizzati per l'esperimento era 51.5 ± 3.01 giorni, con un minimo di 47 ed un massimo di 56 giorni. Nessuno degli animali ha manifestato reazioni dolorose tali da richiedere la soppressione prematura dell'animale e/o l'interruzione dello studio. I timepoint valutati sono stati, per ogni animale per ogni occhio 34. Nessun timepoint è stato saltato.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

L'analisi statistica ha dimostrato un effetto statisticamente significativo tra il tempo e la presenza di eventuali lesioni corneali ($p=0.000$). Non sono state dimostrate differenze significative però tra gli occhi trattati e quelli non trattati ($p=0.323$, figura 21) o interazioni tra il trattamento e i timepoint ($p=0.148$). L'analisi post-hoc della variabile Timepoint con il metodo di Turkey ha dimostrato una differenza statisticamente significativa, associata ad una media di lesioni corneali inferiori, per i timepoint 0.0, 0.1, 4.0, 4.1, 5.0, 8.0, 8.1, 9.0, 12.1, 24.0, 24.1, 28.1, 32.0, 32.1, 36.1, 48.1, 49.0, 52.0, 52.1, 56.1, 57.0, 60.0, 60.1, 72.0 rispetto al timepoint a 12 ore; ed una media statisticamente inferiore dei timepoint 0.0, 0.1, 4.1, 8.0, 8.1, 12.1, 24.1, 28.1, 32.1, 36.1, 48.1, 52.1, 56.1, 60.0, 60.1, 72.0 rispetto ai timepoint 28 e 29.



Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

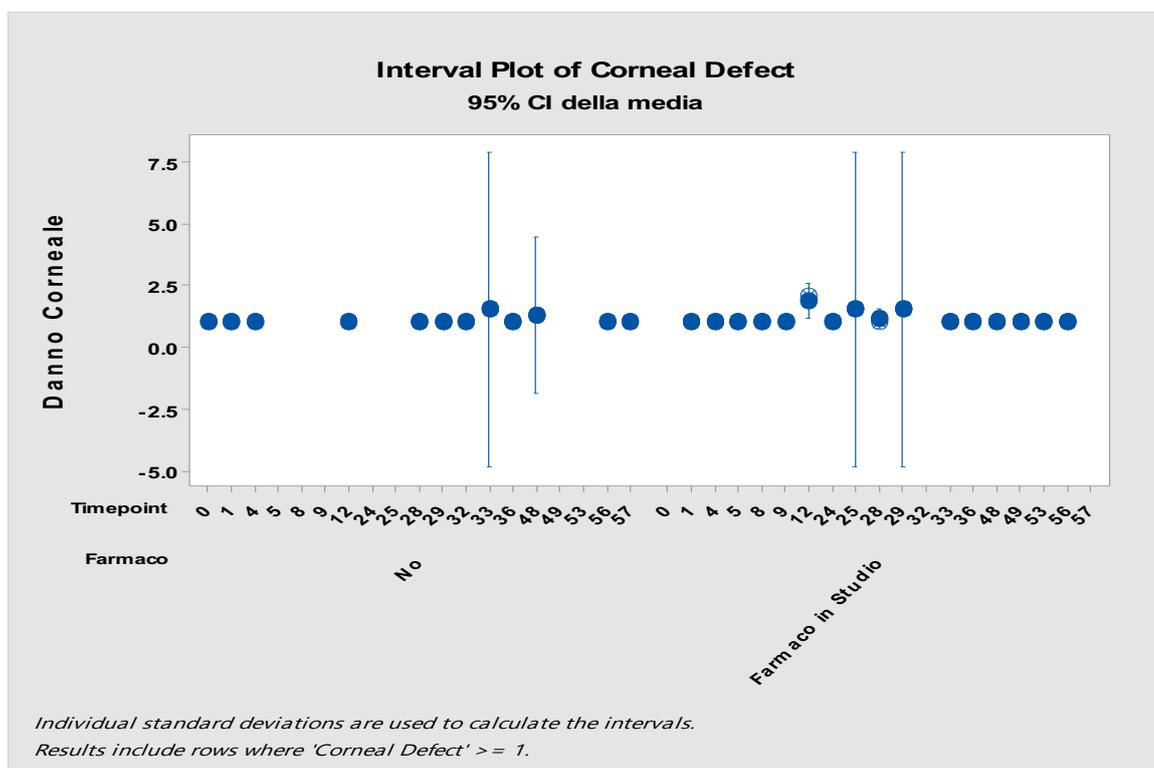


Figura 21: : nella pagina precedente, il confronto della media di alterazioni corneali riscontrate negli occhi non trattati (placebo) e in quelli trattati. In basso L'interval Plot delle medie delle alterazioni corneali nei due gruppi

L'analisi statistica ha inoltre rilevato una differenza statisticamente significativa nel numero degli ammiccamenti, nel numero dei tentativi di riapertura degli occhi e nel tempo necessario per la riapertura degli occhi dopo instillazione del farmaco negli occhi trattati ($p=0.001$).

I valori medi, e le statistiche descrittive sono riportate nella tabella 21, per i comportamenti sistemici, e nella tabella 22 per le variabili di interesse oculare.

Tabella 21: statistiche descrittive delle variabili comportamentali sistemiche post-somministrazione

| | Timepoint | N | | Media | Mediana | Deviazione Standard | Varianza | Minimo | Massimo |
|--------|-----------|--------|----------|-------|---------|---------------------|----------|--------|---------|
| | | Valido | Mancante | | | | | | |
| Dolore | ,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 4,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 8,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 12,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|------|----|---|-------|-------|--------|---------|-----|-----|
| | 24,1 | 12 | 0 | 1.542 | 1.750 | 1.5294 | 2.339 | 0.0 | 3.0 |
| | 28,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 32,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 36,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 48,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 52,1 | 12 | 0 | 1.500 | 1.500 | 1.5667 | 2.455 | 0.0 | 3.0 |
| | 56,1 | 12 | 0 | 1.750 | 3.000 | 1.5448 | 2.386 | 0.0 | 3.0 |
| | 60,1 | 12 | 0 | 1.000 | 0.000 | 1.4771 | 2.182 | 0.0 | 3.0 |
| Scuotimento della testa | ,1 | 12 | 0 | 2.50 | 2.00 | 1.567 | 2.455 | 1 | 5 |
| | 4,1 | 12 | 0 | 4.33 | 5.00 | 1.670 | 2.788 | 1 | 6 |
| | 8,1 | 12 | 0 | 3.42 | 2.00 | 1.832 | 3.356 | 2 | 7 |
| | 12,1 | 12 | 0 | 8.00 | 4.00 | 12.143 | 147.455 | 2 | 46 |
| | 24,1 | 12 | 0 | 3.33 | 3.00 | 1.435 | 2.061 | 2 | 5 |
| | 28,1 | 12 | 0 | 5.00 | 5.00 | 0.853 | 0.727 | 4 | 6 |
| | 32,1 | 12 | 0 | 5.50 | 5.50 | 1.446 | 2.091 | 3 | 7 |
| | 36,1 | 12 | 0 | 4.50 | 4.50 | 1.446 | 2.091 | 2 | 6 |
| | 48,1 | 12 | 0 | 3.67 | 3.00 | 1.435 | 2.061 | 2 | 6 |
| | 52,1 | 12 | 0 | 5.17 | 5.50 | 0.937 | 0.879 | 4 | 6 |
| | 56,1 | 12 | 0 | 4.00 | 4.50 | 2.000 | 4.000 | 0 | 6 |
| | 60,1 | 12 | 0 | 4.00 | 3.00 | 1.907 | 3.636 | 2 | 7 |

Non sono state riscontrate manifestazioni sistemiche.

Tabella 22: statistiche descrittive delle variabili comportamentali oculari post-somministrazione

| | Timepoint | Media | 95% di intervallo di confidenza per la media | | Media ritagliata al 5% | Mediana | Varianza | Deviazione std. | Minimo | Massimo | IQR | |
|--------------------------------|-----------|---------|--|------------------|------------------------|---------|----------|-----------------|--------|---------|-----|---|
| | | | Limite inferiore | Limite superiore | | | | | | | | |
| Tentativi di apertura palpebra | ,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 | |
| | | Study D | 2.50 | -0.93 | 5.93 | 2.28 | 1.50 | 10.700 | 3.271 | 0 | 9 | 3 |
| | 4,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 6.67 | 3.72 | 9.61 | 6.63 | 6.00 | 7.867 | 2.805 | 4 | 10 | 6 |
| | 8,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 3.17 | 2.13 | 4.20 | 3.19 | 3.50 | 0.967 | 0.983 | 2 | 4 | 2 |
| | 12,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 5.83 | 1.94 | 9.73 | 5.70 | 5.00 | 13.767 | 3.710 | 2 | 12 | 6 |
| | 24,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 4.50 | 0.53 | 8.47 | 4.44 | 4.00 | 14.300 | 3.782 | 0 | 10 | 6 |
| | 28,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 3.67 | 0.51 | 6.83 | 3.57 | 2.00 | 9.067 | 3.011 | 1 | 8 | 6 |
| | 32,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 3.67 | 0.18 | 7.16 | 3.52 | 2.50 | 11.067 | 3.327 | 1 | 9 | 6 |
| | 36,1 | None | 3.33 | -2.25 | 8.91 | 3.04 | 0.00 | 28.267 | 5.317 | 0 | 12 | 9 |
| | | Study D | 6.17 | 2.11 | 10.23 | 6.13 | 6.50 | 14.967 | 3.869 | 1 | 12 | 7 |
| | 48,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 7.00 | 3.49 | 10.51 | 6.89 | 6.00 | 11.200 | 3.347 | 4 | 12 | 7 |
| | 52,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 9.00 | 2.74 | 15.26 | 8.72 | 8.00 | 35.600 | 5.967 | 3 | 20 | 8 |
| | 56,1 | None | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| | | Study D | 8.67 | 5.30 | 12.03 | 8.57 | 8.50 | 10.267 | 3.204 | 5 | 14 | 5 |
| | 60,1 | None | 0.67 | -1.05 | 2.38 | 0.52 | 0.00 | 2.667 | 1.633 | 0 | 4 | 1 |
| | | Study D | 5.17 | 2.56 | 7.77 | 5.13 | 4.50 | 6.167 | 2.483 | 2 | 9 | 4 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|--------|----|----|----|
| Ammiccamenti | ,1 | None | 4.67 | 1.65 | 7.68 | 4.52 | 4.00 | 8.267 | 2.875 | 2 | 10 | 4 |
| | | Study D | 19.17 | 8.27 | 30.06 | 18.80 | 17.50 | 107.767 | 10.381 | 7 | 38 | 12 |
| | 4,1 | None | 6.50 | 0.57 | 12.43 | 6.33 | 4.00 | 31.900 | 5.648 | 1 | 15 | 10 |
| | | Study D | 32.67 | 24.33 | 41.00 | 32.35 | 32.00 | 63.067 | 7.941 | 25 | 46 | 14 |
| | 8,1 | None | 2.50 | 0.91 | 4.09 | 2.56 | 2.50 | 2.300 | 1.517 | 0 | 4 | 3 |
| | | Study D | 10.67 | 6.38 | 14.95 | 10.69 | 11.00 | 16.667 | 4.082 | 6 | 15 | 9 |
| | 12,1 | None | 2.83 | 0.69 | 4.98 | 2.87 | 3.00 | 4.167 | 2.041 | 0 | 5 | 4 |
| | | Study D | 23.83 | 5.97 | 41.70 | 23.37 | 17.50 | 289.767 | 17.023 | 8 | 48 | 34 |
| | 24,1 | None | 3.67 | 0.11 | 7.22 | 3.46 | 3.00 | 11.467 | 3.386 | 1 | 10 | 5 |
| | | Study D | 13.83 | 4.53 | 23.14 | 13.87 | 14.00 | 78.567 | 8.864 | 1 | 26 | 15 |
| | 28,1 | None | 3.50 | 1.22 | 5.78 | 3.50 | 3.00 | 4.700 | 2.168 | 1 | 6 | 4 |
| | | Study D | 13.33 | 6.32 | 20.35 | 12.93 | 11.00 | 44.667 | 6.683 | 8 | 26 | 9 |
| | 32,1 | None | 2.50 | -0.13 | 5.13 | 2.44 | 2.50 | 6.300 | 2.510 | 0 | 6 | 5 |
| | | Study D | 15.00 | 11.07 | 18.93 | 15.00 | 15.00 | 14.000 | 3.742 | 10 | 20 | 7 |
| | 36,1 | None | 2.67 | 0.95 | 4.38 | 2.63 | 2.50 | 2.667 | 1.633 | 1 | 5 | 3 |
| | | Study D | 15.33 | 10.25 | 20.42 | 15.31 | 14.00 | 23.467 | 4.844 | 9 | 22 | 9 |
| | 48,1 | None | 4.00 | 0.75 | 7.25 | 3.78 | 3.00 | 9.600 | 3.098 | 2 | 10 | 4 |
| | | Study D | 10.17 | 5.60 | 14.74 | 10.24 | 11.00 | 18.967 | 4.355 | 4 | 15 | 9 |
| | 52,1 | None | 4.67 | 2.21 | 7.12 | 4.63 | 4.00 | 5.467 | 2.338 | 2 | 8 | 5 |
| | | Study D | 18.33 | 9.97 | 26.69 | 17.87 | 16.50 | 63.467 | 7.967 | 12 | 33 | 11 |
| 56,1 | None | 5.83 | -0.12 | 11.79 | 5.70 | 5.00 | 32.167 | 5.672 | 0 | 14 | 10 | |
| | Study D | 14.67 | 10.70 | 18.63 | 14.63 | 14.00 | 14.267 | 3.777 | 10 | 20 | 7 | |
| 60,1 | None | 7.50 | -0.40 | 15.40 | 7.33 | 5.00 | 56.700 | 7.530 | 0 | 18 | 14 | |
| | Study D | 14.00 | 5.00 | 23.00 | 14.11 | 15.00 | 73.600 | 8.579 | 2 | 24 | 15 | |

Discussione

Lo studio condotto su modello murino ha permesso di verificare che il farmaco oggetto di studio non presenti caratteri di tossicità tali da pregiudicare un eventuale futuro sviluppo di un preparato galenico da utilizzare sull'uomo.

Il modello murino, sebbene possa apparire difforme dal modello umano, è stato recentemente utilizzato per approfondire i meccanismi di azione e le terapie del dry-eye^[108]. Alla luce di ciò appare evidente come i risultati di questo studio, andando a testare su un modello riconosciuto valido per le alterazioni del segmento anteriore, confermino una scarsa tossicità del farmaco oggetto di tesi, aprendo le porte a sviluppi futuri della molecola.

Sebbene il timepoint 12 abbia dimostrato una media significativa maggiore di alterazioni corneali, questa è risultata non significativa tra i due gruppi. Una delle possibili spiegazioni può risiedere nel comportamento dei ratti. È stato

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

possibile notare infatti che i ratti, dopo la somministrazione del collirio, tendevano a “grattarsi” gli occhi con entrambe le zampe, anche e soprattutto per rimuovere il collirio che, fuoriuscendo in parte dall’occhio, tendeva ad impregnare, anche per la sua natura viscosa, il pelo periorbitario. Analizzando i grafici in fig. 21 è possibile notare che un lieve aumento della media di alterazioni corneali è presente anche al timepoint 48, ma non si riscontrano differenze significative tra i due occhi. Una delle possibili spiegazioni potrebbe risiedere nel fatto che i ratti, dopo 3 somministrazioni del farmaco, possano essersi provocati delle lesioni da grattamento nel tentativo di pulire il pelo.

Lo studio condotto inoltre ha previsto una frequenza di somministrazione ed una durata del trattamento sovrapponibile a quella che si presuppone necessaria nell’ uomo. L’assenza di differenze statisticamente significative tra gli occhi trattati e quelli in cui non è stato instillata alcuna soluzione lascia intravedere ampi margini di utilizzo del farmaco anche a dosaggi di 4 volte al giorno per almeno 4 giorni.

Purtroppo, a causa della scarsità di fondi e tempo, non è stato possibile integrare questo studio con l’analisi della persistenza del farmaco sulla superficie oculare. Sebbene infatti il glicole propilenico possieda una discreta viscosità, che si presuppone possa permettere una certa persistenza del farmaco a livello corneale e congiuntivale, non si può escludere che i meccanismi naturali di difesa dell’occhio umano (film lacrimale, ammiccamento, etc.) possano ridurre la reale efficacia del farmaco, rendendo necessarie modifiche chimico-fisiche alla molecola a tutt’ora testata.

Appare inoltre particolarmente interessante il fatto che nessuno degli animali, esaminato al termine dello studio, abbia manifestato alterazioni vitreali,

retiniche e/o del disco ottico. Sebbene questi dati siano sicuramente parziali e meritevoli di ulteriori approfondimenti elettro-funzionali per escludere eventuali danni assonali e/o dei fotorecettori retinici, aggiungono un ulteriore fattore di sicurezza al preparato oggetto di studio.

Conclusioni

Per quanto di nostra conoscenza, questo è il primo studio volto non solo a scoprire un possibile trattamento mirato contro l'oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*, ma anche il primo studio di tossicità di un preparato galenico di Ivermectina per uso oculare.

In letteratura, come ampiamente descritto all'inizio di questo elaborato, sono stati riportati alcuni case report relativi a preparati galenici di Ivermectina per uso topico, ma sempre limitati al campo dermatologico. Ad oggi nessuno studio riporta dati di tossicità e/o preparati galenici di ivermectina destinati specificatamente all'uso oculare in umano.

I limiti di questo studio sono sicuramente correlati alla scarsa disponibilità di dati della fase II, in particolare su culture congiuntivali. Nonostante gli sforzi compiuti infatti, la replicazione delle culture HCjE è stata particolarmente lunga e complessa, costringendoci a ridurre non solo i timepoint da analizzare, ma anche e soprattutto il numero di esperimenti eseguibili nel tempo a disposizione. Inoltre, altro limite, è la variabilità nella risposta ai test di vitalità con MTT, che ci ha costretto, in diverse situazioni, a dover interrompere gli esperimenti per ottimizzare i risultati o, a replicare gli esperimenti più volte al fine di ridurre la variabilità riscontrata. Inoltre una delle limitazioni presenti è sicuramente legata alla scelta di valutare la citotossicità del farmaco su un modello convenzionale di tessuto monostratificato. L'eventuale utilizzo di un

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

sistema oculare più avanzato, come un modello tridimensionale (3D), avrebbe potuto aggiungere ulteriori utili informazioni. Altro limite di questo studio può essere considerato la mancanza di un test su modello animale, non solo della tossicità, ma anche dell'efficacia del farmaco, attraverso un modello di malattia su specie animale. Tale limite è da imputare in primis al fatto che l'oftalmomiasi esterna è principalmente una patologia umana, difficilmente replicabile su un modello animale, ma anche alle particolari condizioni climatiche della Finlandia, dove hanno avuto luogo gli esperimenti della fase II e III, che rendono particolarmente difficile reperire larve di *Oestrus ovis*.

Cionondimeno i dati ottenuti da questo studio dimostrano come un preparato galenico a base di Glicole propilenico, Ivermectina all'1% (+/- PVP 0.6%) possa essere efficace contro larve L₁ di *Oestrus ovis*, con una tossicità oculare, almeno del segmento anteriore, accettabile. Tali risultati appaiono non solo di fondamentale importanza per la gestione, la cura e il trattamento della miasi oculare esterna, ma anche e soprattutto per eventuali implicazioni future del farmaco. Come precedentemente descritto infatti l'ivermectina, in ambito dermatologico, è stata dimostrata particolarmente efficace nel trattamento delle blefariti da *Demodex*. L'eventuale sviluppo e commercializzazione del nostro preparato potrebbe aggiungere una nuova arma nel trattamento di questa patologia cronica, ben nota a tutti gli oculisti. Inoltre, Recentemente, sono stati condotti alcuni studi volti a dimostrare l'eventuale efficacia dell' Ivermectina su *Chlamydia trachomatis*^[109], *Acanthamoeba*^[110] e *Sarcoptes scabiei*^[111], che hanno dimostrato una discreta efficacia della molecola. Questi agenti patogeni, oltre che in patologie sistemiche, sono coinvolti rispettivamente in patologie oculari quali le

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

congiuntivite da corpi inclusi ed il tracoma, le cheratiti e le infestazioni palpebrali. Per tutte queste patologie, al momento, la scelta terapeutica appare limitata per scarsità di soluzioni terapeutiche. Per questo è stato deciso, nel prossimo futuro, di testare questa molecola in vitro anche su *Acanthamoeba* e *Phthirus pubis*, sperando di poterne allargare le indicazioni d'uso e offrire nuovi strumenti terapeutici per la cura di queste patologie.

In conclusione, sebbene a tutt'oggi la molecola da noi messa a punto, non sia ancora utilizzabile clinicamente, è stata avviata una domanda di riconoscimento di brevetto per indicazione d'uso che ci si augura possa essere accettata a breve, così da poter proseguire con rinnovato entusiasmo, e nuovi fondi, gli studi.

Ringraziamenti

Lo svolgimento di questa tesi non sarebbe potuto avvenire senza la fondamentale collaborazione del mio tutor, il Prof. Antonio Pinna e del Co-tutor, il Prof. Giovanni Garippa. Entrambi, che non solo mi hanno sostenuto, ma anche spinto ed aiutato nella difficile realizzazione delle varie fasi di questo studio. In particolare il prof. Garippa ha sacrificato assieme a me, interi pomeriggi e week-end nella sala settoria e nel laboratorio. Ci tengo inoltre a ringraziare Stefano Cortese, del laboratorio di Farmacia dell' AOU, ed i Medici Veterinari del Servizio Igiene degli alimenti di origine animale, dott. Maria Luisa Delogu, Raffaele Marrosu, Giuseppe Fois, Angelo Ruda e Antonio Soggiu, che hanno volontariamente offerto il loro supporto durante la fase di reperimento delle larve.

Anche il Prof. Arto Urtti, che oltre ad offrirmi i loro laboratori ed i fondi, assieme a tutta la sua magnifica equipe hanno non solo collaborato attivamente, ma anche indirizzato le mie ricerche in un campo a me quasi sconosciuto come quello delle culture cellulari. In particolare Mika Reinisalo, che mi ha seguito passo passo nello sviluppo e nei test delle culture cellulari, Marika Ruponen, che ci ha aiutato con la sua esperienza a risolvere le criticità incontrate, ed Elisa Toropainen che con un entusiasmo travolgente, ha passato assieme a me intere giornate (rese ancora più lunghe dal fantastico sole di mezzanotte), ad esaminare gli occhi dei ratti usati per la fase III. Assieme a loro ringrazio Amir, Anika, Lea, Laura e tutti gli altri che non solo mi hanno supportato durante il mio periodo in Finlandia, ma mi hanno accolto come in una famiglia, facendomi sentire a mio agio e "a casa".

Ringrazio inoltre Rosaria, Patrizia e Claudia, che mi hanno aiutato a distanza con le mille difficoltà incorse nella preparazione dei protocolli e delle diluizioni dei farmaci.

Un grazie particolare però va a mia madre, che nonostante le mille difficoltà legate alla distanza mi ha sempre supportato e aiutato con entusiasmo, ma soprattutto alla mia compagna Elena, che ha spontaneamente deciso di collaborare alla mia tesi, sacrificando intere settimane ad impazzire al mio fianco, tra pubblicazioni di parassitologia, statistica ed impaginazione della tesi. Senza di Lei, senza il suo supporto e amore, e la sua pazienza questo elaborato non avrebbe potuto probabilmente vedere la luce.

Indice delle figure

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: LARVA DI DIPTERA, STADIO L1 | 7 |
| FIGURA 2: PUPA DI DIPTERA | 7 |
| FIGURA 3: PREVALENZA MONDIALE DELLE MIASI DA OESTRUS OVIS | 14 |
| FIGURA 4: CICLO VITALE DI OESTRUS OVIS | 15 |
| FIGURA 5: CASO DI OFTALMOMIASI ESTERNA. E' POSSIBILE OSSERVARE LE LARVE A LIVELLO CORNEALE (FRECCIA BLU A SINISTRA), O SULLA CONGIUNTIVA TARSALE (IMMAGINE DESTRA) | 15 |
| FIGURA 6: CURVA DI SOPRAVVIVENZA DI KAPLAN MEIER | 50 |
| FIGURA 7: IMMAGINE A MICROSCOPIO OTTICO DI LARVA L1 IN SOLUZIONE CON IVERMECTINA 1% IN OLIO DI RICINO | 51 |
| FIGURA 8: ESEMPIO DI PIASTRA DA 96 POZZETTI, CON 30000 CELL/0.20 ML. ESPERIMENTO TIMEPOINT 1H, 3 FARMACI IN STUDIO | 56 |
| FIGURA 9: CAMERA DI BURKER E DETTAGLIO DEI CRITERI UTILIZZATI PER LA CONTA CELLULARE | 58 |
| FIGURA 10: RISULTATI A 6 E 24H DEL TEST ESEGUITO CON CYTOTOX96. | 60 |
| FIGURA 11: BOX PLOT DELLE MEDIE DEI RISULTATI SPETTROMETRICI SU BUFFER E MEZZO DI CULTURA CON FBS | 61 |
| FIGURA 12: FOTOGRAFIA DI MICROSCOPIA OTTICA DI POZZETTO CON CULTURA CELLULARE HCE DOPO TEST MTT | 62 |
| FIGURA 13: BOXPLOT A 1, 4 E 24 ORE DELLA VITALITÀ % DI GLICOLE 10%+ PVP 0.6 SULLE CELLULE CORNEALI | 70 |
| FIGURA 14: BOXPLOT DELLA VITALITÀ % A CONFRONTO NEL TIMEPOINT 1 PER IL CONTROLLO, IL GLICOLE 10% + PVP 0.6% E IL PVP 0.6% | 72 |
| FIGURA 15: DISTRIBUZIONE DELLA VITALITÀ % NEI TIMEPOINT PER IL PVP 0.6% | 73 |
| FIGURA 16: BOXPLOT % VITALITÀ CELLULARE DIVISO PER DILUIZIONE E TIMEPOINT | 75 |
| FIGURA 17: BOXPLOT VITALITÀ CELLULARE % A DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI GLICOLE PROPILENICO IN CULTURE HCJE | 78 |
| FIGURA 18: TEST DI KRUSKAL-WALLIS PER LE DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI IVERMECTINA IN DMSO | 80 |
| FIGURA 19: TEST DI KRUSKAL-WALLIS PER LE DIFFERENTI DILUIZIONI DEL FARMACO | 80 |
| FIGURA 20: SCALA DI VALUTAZIONE DEL DOLORE NEI RATTI SECONDO L'UNIVERSITY OF MICHIGAN | 84 |
| FIGURA 21: : IN ALTO IL CONFRONTO DELLA MEDIA DI ALTERAZIONI CORNEALI RICONTRATE NEGLI OCCHI NON TRATTATI (PLACEBO) E IN QUELLI TRATTATI. IN BASSO L'INTERVAL PLOT DELLE MEDIE DELLE ALTERAZIONI CORNEALI NEI DUE GRUPPI | 89 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Indice delle tabelle

| | |
|---|----|
| TABELLA 1: CLASSIFICAZIONE ANATOMICA DELLE MIASI | 10 |
| TABELLA 2: CLASSIFICAZIONI DELLE MIASI SECONDO IL TROFISMO TISSUTALE. | 12 |
| TABELLA 3: FARMACI E TIME-POINT INIZIALMENTE UTILIZZATI NEL PROTOCOLLO DI STUDIO | 45 |
| TABELLA 4: STATISTICA DESCRITTIVA DELLA VARIABILE TEMPO RELATIVA AI FARMACI STUDIATI | 49 |
| TABELLA 5: COMPARAZIONE A COPPIE DI DUNN DEL TEMPO DI MORTE IN LOG (10) (IN SECONDI) PER FARMACO (SIDÁK) | 50 |
| TABELLA 6: OSMOLARITÀ, PH E COMPOSIZIONE DEI FARMACI TESTATI. | 54 |
| TABELLA 7: ELENCO COMPLETO DELLE DILUIZIONI UTILIZZATE PER I VARI COMPOSTI ANALIZZATI. | 55 |
| TABELLA 8: RIEPILOGO DEI REPLICATI ESEGUITI DIVISI PER FARMACO, TIMEPOINT E CONCENTRAZIONI DI IVERMECTINA | 64 |
| TABELLA 9: STATISTICHE DESCRITTIVE DEI TEST CON DOSAGGI DECRESCENTI DI IVERMECTINA IN DIFFERENTI SOLVENTI SU CELL. HCE | 65 |
| TABELLA 10: RIEPILOGO DEI REPLICATI ESEGUITI DIVISI PER DILUIZIONE E TIMEPOINT | 67 |
| TABELLA 11: ANALISI POST-HOC GLICOLE PROPILENICO IN SOLUZIONE NEL MEZZO DI CULTURA A DIVERSE CONCENTRAZIONI | 68 |
| TABELLA 12: STATISTICA DESCRITTIVA DEL GLICOLE 10% + PVP 0.6% E PVP 0.6% | 71 |
| TABELLA 13: STATISTICA DESCRITTIVA DEL GLICOLE 10% + PVP 0.6% E PVP 0.6% | 72 |
| TABELLA 14: CONFRONTI PAIRWISE ESEGUITI CON TEST DI DUNNETT PER IVERMECTINA A DIFFERENTI DOSAGGI IN DMSO, GLICOLE 10% E ASSOCIAZIONE GLICOLE 10% + PVP 0.6% | 73 |
| TABELLA 15: TOSSICITÀ DELLE DIVERSE CONCENTRAZIONI A CONFRONTO NEL MEDESIMO TIMEPOINT PER OGNI SINGOLA ASSOCIAZIONE | 74 |
| TABELLA 16 : CONFRONTO PAIRWISE DELLE DILUIZIONI DEL FARMACO SU CULTURA HCE. IL LIVELLO DI SIGNIFICATIVITÀ È ,0.5 VALORI DI SIGNIFICATIVITÀ SONO STATI ADATTATI IN BASE ALLA CORREZIONE DI BONFERRONI PER PIÙ TEST. | 76 |
| TABELLA 17: STATISTICHE DESCRITTIVE DILUIZIONI 40,60,80X PER CULTURE HCE | 76 |
| TABELLA 18: RIEPILOGO DEI REPLICATI ESEGUITI DIVISI PER DILUIZIONE % DEL GLICOL E TIMEPOINT | 77 |
| TABELLA 19: CONFRONTI PAIRWISE DELLE DIVERSE CONCENTRAZIONI DI GLYCOL A CONFRONTO IN CULTURE HCJE | 78 |
| TABELLA 20: STATISTICHE DESCRITTIVE DILUIZIONI 40,60,80X PER CULTURE HCJE | 81 |
| TABELLA 21: STATISTICHE DESCRITTIVE DELLE VARIABILI COMPORTAMENTALI SISTEMICHE POST-SOMMINISTRAZIONE | 89 |
| TABELLA 22: STATISTICHE DESCRITTIVE DELLE VARIABILI COMPORTAMENTALI OCULARI POST-SOMMINISTRAZIONE | 90 |

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

Bibliografia

1. Sarno, C.D., Le Miasi. *Large Animals Review*, 2002. 8(5).
2. Hope, F.W., On insects and their larvae occasionally found in the human body. *Trans. R. Entomol. Soc. London*, 1840. 2: p. 256-271.
3. F. Zumpt *Myiasis in man and animals in the Old World*. Butterworths, London, United Kingdom, 1965.
4. D'Annibale, M.L. and D. Crotti, Miasi congiuntivale da *Oestrus ovis*: descrizione di un nuovo caso e problematiche in tema di miasi in ambito umano. *Clinical Reports/Casi clinici*, 2007. 22(1).
5. Prevention, C.f.D.C.a. Myiasis. 2013 January 10; Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/myiasis/>.
6. Garcia, L.S., *Diagnostic medical parasitology*. 6th edition. ed. 2016, Washington, DC: ASM Press. xxii, 1388 pages.
7. Iori A, et al., A case of human myiasis of the scalp due to *Wohlfahrtia magnifica* recorded near Rome. *Parassitologia*, 1998. 40(82).
8. Pampiglione S and C.T. G., *Guida allo studio della parassitologia*, ed. S.E. Esculapio. 1999, Bologna.
9. Sacchi L., Miasi, in *Parassiti e parassitosi umane*, Scaglia M, Gatti S., and R.E. G., Editors. 2005, *Selecta Medica*: Pavia. p. 627-630.
10. Resh Vincent H and C.R. T., *Encyclopedia of Insects*, ed. A. Press. 2009.
11. Francesconi, F. and O. Lupi, Myiasis. *Clin Microbiol Rev*, 2012. 25(1): p. 79-105.
12. Antonio Servadei, Sergio Zangheri, and L. Masutti, *Entomologia generale ed applicata*, ed. CEDAM. 1972, Padova.
13. MT., J., The flies that cause myiasis in man. *Department of Agriculture miscellaneous publication no. 631*. USDA, Washington, DC, 1947: p. p 1–175.
14. Romano, C., G. Albanese, and C. Gianni, Emerging imported parasitoses in Italy. *Eur J Dermatol*, 2004. 14(1): p. 58-60.
15. Lukin, L.G., Human cutaneous myiasis in Brisbane: a prospective study. *Med J Aust*, 1989. 150(5): p. 237-40.

Giuseppe D'Amico Ricci, *Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico*, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

16. Fernandes, L.F., F.C. Pimenta, and F.F. Fernandes, First report of human myiasis in GoiaS state, Brazil: frequency of different types of myiasis, their various etiological agents, and associated factors. *J Parasitol*, 2009. 95(1): p. 32-8.
17. Fujisaki, R., et al., Exotic myiasis caused by 19 larvae of *Cordylobia anthropophaga* in Namibia and identified using molecular methods in Japan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2008. 102(6): p. 599-601.
18. Bali, J., et al., Ophthalmomyiasis: a rare cause of short duration pre-septal cellulitis in a healthy non-compromised adult. *Singapore Med J*, 2007. 48(10): p. 969-71.
19. Crotti, D., M.L. D'Annibale, and A. Ricci, [A case of ophthalmomyiasis: description and diagnosis]. *Infez Med*, 2005. 13(2): p. 120-2.
20. Ahaduzzaman, M., The global and regional prevalence of oestrosis in sheep and goats: a systematic review of articles and meta-analysis. *Parasit Vectors*, 2019. 12(1): p. 346.
21. Faust E. C., R.P.F., Jung R. C, The Warble Flies, In Craig and Faust' *Clinical Parasitology VIII Edition* ed. 1970, Philadelphia.
22. Cianchetti A., R.A.L., Antei R., Piergili D, Su un caso di oftalmomiasi occorso nella regione umbra. *Ann. Oftalm. Clin. Ocul.* , 1987. CXIII(2): p. 157-163.
23. Crotti, D., M.L. D'Annibale, and A. Ricci, Miasi congiuntivale da *Oestrus ovis*: descrizione di un caso, considerazioni generali e indicazioni diagnostico-epidemiologiche A case of ophthalmomyiasis: description and diagnosis, . *Le Infezioni in Medicina*, 2005. 2: p. 120-122.
24. Giuseppe D'Amico Ricci, et al., External Ophthalmomyiasis, Case Report in Campania. *JOJOphthal*, 2016. 1((3): 555563).
25. Saraiva, F.P., et al., [Ophthalmomyiasis as a cause of canalicular lesion]. *J Pediatr (Rio J)*, 2005. 81(1): p. 85-7.
26. Eyigor, H., et al., A case of naso-ophthalmic myiasis. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*, 2008. 18(6): p. 371-3.
27. Jakobs, E.M., et al., Ophthalmomyiasis interna posterior. Report of a case with optic atrophy. *Retina*, 1997. 17(4): p. 310-4.
28. Wolfelschneider, P. and P. Wiedemann, [External ophthalmic myiasis cause by *Oestrus ovis* (sheep and goat botfly)]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 1996. 209(4): p. 256-8.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

29. Mason, G.I., Bilateral ophthalmomyiasis interna. *Am J Ophthalmol*, 1981. 91(1): p. 65-70.
30. Saraiva Vda, S., et al., A case of anterior internal ophthalmomyiasis: case report. *Arq Bras Oftalmol*, 2006. 69(5): p. 741-3.
31. Gass, J.D. and R.A. Lewis, Subretinal tracks in ophthalmomyiasis. *Arch Ophthalmol*, 1976. 94(9): p. 1500-5.
32. Gass, J.D. and R.A. Lewis, Subretinal tracts in ophthalmomyiasis. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 1976. 81(3 Pt 1): p. 483-90.
33. Slusher, M.M., et al., Ophthalmomyiasis interna posterior. Subretinal tracks and intraocular larvae. *Arch Ophthalmol*, 1979. 97(5): p. 885-7.
34. Syrdalen, P., T. Nitter, and R. Mehl, Ophthalmomyiasis interna posterior: report of case caused by the reindeer warble fly larva and review of previous reported cases. *Br J Ophthalmol*, 1982. 66(9): p. 589-93.
35. Custis, P.H., et al., Posterior internal ophthalmomyiasis. Identification of a surgically removed *Cuterebra* larva by scanning electron microscopy. *Ophthalmology*, 1983. 90(12): p. 1583-90.
36. Lima, L.H., et al., Ophthalmomyiasis with a singular subretinal track. *Am J Ophthalmol*, 2010. 150(5): p. 731-736.e1.
37. Biswas, J., et al., Intraocular *Gnathostoma spinigerum*. Clinicopathologic study of two cases with review of literature. *Retina*, 1994. 14(5): p. 438-44.
38. McDonald, H.R., et al., Two cases of intraocular infection with *Alaria mesocercaria* (Trematoda). *Am J Ophthalmol*, 1994. 117(4): p. 447-55.
39. Martidis, A., et al., Multifocal electroretinography response after laser photocoagulation of a subretinal nematode. *Am J Ophthalmol*, 2002. 133(3): p. 417-9.
40. Khoumiri, R., et al., [Ophthalmomyiasis interna: two case studies]. *J Fr Ophtalmol*, 2008. 31(3): p. 299-302.
41. Georgalas, I., et al., Intraocular safari: ophthalmomyiasis interna. *Clin Exp Ophthalmol*, 2011. 39(1): p. 84-5.
42. Alves, C.A., et al., Cavernous sinus thrombosis in a patient with facial myiasis. *Quintessence Int*, 2010. 41(4): p. e72-4.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

43. Olumide, Y.M., Cutaneous myiasis: a simple and effective technique for extraction of *Dermatobia hominis* larvae. *Int J Dermatol*, 1994. 33(2): p. 148-9.
44. Gozum, N., N. Kir, and T. Ovali, Internal ophthalmomyiasis presenting as endophthalmitis associated with an intraocular foreign body. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2003. 34(6): p. 472-4.
45. Kearney, M.S., et al., Ophthalmomyiasis caused by the reindeer warble fly larva. *J Clin Pathol*, 1991. 44(4): p. 276-84.
46. Buettner, H., Ophthalmomyiasis interna. *Arch Ophthalmol*, 2002. 120(11): p. 1598-9.
47. Baliga, M.J., et al., Orbital myiasis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2001. 30(1): p. 83-4.
48. Caca, I., et al., Orbital myiasis: case report. *Jpn J Ophthalmol*, 2003. 47(4): p. 412-4.
49. Jain, A., R.U. Desai, and J. Ehrlich, Fulminant orbital myiasis in the developed world. *Br J Ophthalmol*, 2007. 91(11): p. 1565-6.
50. Cavusoglu, T., et al., Massive oculofacial myiasis infestation with *Lucilia sericata*. *J Am Acad Dermatol*, 2009. 61(1): p. 169-70.
51. Yeung, J.C., C.F. Chung, and J.S. Lai, Orbital myiasis complicating squamous cell carcinoma of eyelid. *Hong Kong Med J*, 2010. 16(1): p. 63-5.
52. Pandey, T.R., et al., A Case of Orbital Myiasis in Recurrent Eyelid Basal Cell Carcinoma Invasive into the Orbit. *Case Rep Ophthalmol Med*, 2016. 2016: p. 2904346.
53. de Arruda, J.A.A., et al., Head and neck myiasis: a case series and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2017. 124(5): p. e249-e256.
54. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, Serie Generale n.66 del 20-03-2009 Suppl. Ordinario n 35.
55. Osorio, J., et al., Role of ivermectin in the treatment of severe orbital myiasis due to *Cochliomyia hominivorax*. *Clin Infect Dis*, 2006. 43(6): p. e57-9.
56. De Tarso, P., et al., Use of ivermectin in the treatment of orbital myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax*. *Scand J Infect Dis*, 2004. 36(6-7): p. 503-5.
57. Denion, E., et al., External ophthalmomyiasis caused by *Dermatobia hominis*. A retrospective study of nine cases and a review of the literature. *Acta Ophthalmol Scand*, 2004. 82(5): p. 576-84.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

58. Wakamatsu, T.H. and P.T. Pierre-Filho, Ophthalmomyiasis externa caused by *Dermatobia hominis*: a successful treatment with oral ivermectin. *Eye (Lond)*, 2006. 20(9): p. 1088-90.
59. Barry, P., L. Cordovés, and S. Gardner, ESCRS Guidelines for Prevention and Treatment of Endophthalmitis Following Cataract Surgery: Data, Dilemmas and Conclusions. 2013. European Society of Cataract and Refractive Surgeons, Temple House, Temple Road, Blackrock, Co Dublin, Ireland [WWW.ESCRS.ORG](http://www.escrs.org).
60. Grzybowski, A., P. Kanclerz, and W.G. Myers, The use of povidone-iodine in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*, 2017.
61. Beukelman, C.J., et al., Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel) for wound healing in vitro. *Burns*, 2008. 34(6): p. 845-55.
62. Pelletier, J.S., et al., Demodex Blepharitis Treated with a Novel Dilute Povidone-Iodine and DMSO System: A Case Report. *Ophthalmol Ther*, 2017. 6(2): p. 361-366.
63. Merck & Co, I., Stromectol (ivermectin) tablets prescribing information. 2010 May, Whitehouse Station, NJ; .
64. Victoria, J., R. Trujillo, and M. Barreto, Myiasis: a successful treatment with topical ivermectin. *Int J Dermatol*, 1999. 38(2): p. 142-4.
65. Zargari, O., N. Aghazadeh, and F. Moeineddin, Clinical applications of topical ivermectin in dermatology. *Dermatol Online J*, 2016. 22(9).
66. Alcon, BSS PLUS® STERILE INTRAOCULAR IRRIGATING SOLUTION (balanced salt solution enriched with bicarbonate, dextrose, and glutathione).
67. Alcon, BSS® Sterile Irrigating Solution.
68. Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, and M.E. Quinn., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 2009: Pharmaceutical Press.
69. Goto, E., et al., Low-concentration homogenized castor oil eye drops for noninflamed obstructive meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology*, 2002. 109(11): p. 2030-5.
70. Ronkko, S., et al., Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. *Drug Deliv Transl Res*, 2016. 6(6): p. 660-675.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

71. Cheong, H.I., et al., In vitro cytotoxicity of eight beta-blockers in human corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell lines: comparison with epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Toxicol In Vitro*, 2008. 22(4): p. 1070-6.
72. Geerling, G., et al., Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42(5): p. 948-56.
73. Pozarowska, D., P. Pozarowski, and Z. Darzynkiewicz, Cytometric assessment of cytostatic and cytotoxic effects of topical glaucoma medications on human epithelial corneal line cells. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. 78(2): p. 130-7.
74. Kahook, M.Y. and D.A. Ammar, In vitro toxicity of topical ocular prostaglandin analogs and preservatives on corneal epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2010. 26(3): p. 259-63.
75. Saarinen-Savolainen, P., et al., Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharm Res*, 1998. 15(8): p. 1275-80.
76. Kahn, C.R., et al., Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. 34(12): p. 3429-41.
77. Niederkorn, J.Y., et al., Ultrastructural and immunohistological characterization of the SIRC corneal cell line. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990. 26(9): p. 923-30.
78. Chrzanowska, C., et al., The use of cytotoxicity assays for the assessment of toxicity. In: EHT 9329, Final Report to the Department of the Environment. 1990.
79. Belmonte, C., M.C. Acosta, and J. Gallar, Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res*, 2004. 78(3): p. 513-25.
80. Maurer, J.K., R.D. Parker, and J.V. Jester, Extent of initial corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2002. 36(1): p. 106-17.
81. Jester, J.V., et al., Area and depth of surfactant-induced corneal injury predicts extent of subsequent ocular responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998. 39(13): p. 2610-25.
82. Wilhelmus, K.R., The Draize eye test. *Surv Ophthalmol*, 2001. 45(6): p. 493-515.
83. Deavall, D.G., et al., Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*, 2012. 2012: p. 645460.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

84. Mecklenburg, L. and U. Schraermeyer, An overview on the toxic morphological changes in the retinal pigment epithelium after systemic compound administration. *Toxicol Pathol*, 2007. 35(2): p. 252-67.
85. Ishiyama, M., et al., Combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1996. 19(11): p. 1518-1520.
86. Aslantürk, Ö.S., M.L. Larramendy, and S. Soloneski, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*,. December 20th 2017, IntechOpen.
87. Astashkina, A., B. Mann, and D.W. Grainger, A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacol Ther*, 2012. 134(1): p. 82-106.
88. Niles, A.L., R.A. Moravec, and T.L. Riss, In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Curr Chem Genomics*, 2009. 3: p. 33-41.
89. Bai, J.P. and D.R. Abernethy, Systems pharmacology to predict drug toxicity: integration across levels of biological organization. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013. 53: p. 451-73.
90. Hartung, T., et al., Systems toxicology. *Altex*, 2012. 29(2): p. 119-28.
91. Präbst, K., et al., Basic colorimetric proliferation assay. Vol, 2017. 1601.
92. Präbst, K., et al., Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST and Resazurin. *Cell Viability Assays, Methods and Protocols*. 2017. p. 1-17.
93. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 1988. 160: p. 81-88.
94. Lappalanien, K., et al., Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two catronic liposomes. *Pharmaceutical Research*, 1994. 11: p. 1127-1131.
95. Schins, R.P., et al., Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chemical Research in Toxicology*, 2002. 15: p. 1166-1173.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

96. Fotakis, G. and J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 2006. 160: p. 171-177.
97. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
98. Fritzsche, M. and C.F. Mandenius, Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing. *Anal Bioanal Chem*, 2010. 398(1): p. 181-91.
99. Stone, V., H. Johnston, and R.P.F. Schins, Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology*, 2009. 39(7): p. 613-626.
100. Aslantürk, Ö.S., et al., Active phytochemical detecting, antioxidant, cytotoxic, apoptotic activities of ethyl acetate and methanol extracts of *Galium aparine* L. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 2017. 15(6): p. 1-16.
101. Bopp, S.K. and T. Lettieri, Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology*, 2008. 8: p. 1-11.
102. Shamim, B., Alternatives to the Draize Eye Test. *Pharmatutor*. 2(10).
103. Wilson, S.L., M. Ahearne, and A. Hopkinson, An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*, 2015. 327: p. 32-46.
104. Schrader, S., A.K. Mircheff, and G. Geerling, Animal models of dry eye. *Dev Ophthalmol*, 2008. 41: p. 298-312.
105. Janusz Szajewski, M., International Programme on Chemical Safety Poisons Information Monograph 443 - Chemical, 1991.
106. Molinari, G., et al., In vitro genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivermectin on Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Hazard Mater*, 2009. 165(1-3): p. 1074-82.
107. Sato, S., et al., Povidone-iodine-induced cell death in cultured human epithelial HeLa cells and rat oral mucosal tissue. *Drug Chem Toxicol*, 2014. 37(3): p. 268-75.

Giuseppe D'Amico Ricci, Trattamento topico della oftalmomiasi esterna da *Oestrus ovis*: progettazione e sviluppo di un nuovo preparato galenico, Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, Curriculum Neuroscienze, Università degli Studi di Sassari

108. Xiao, F., H. Cui, and X. Zhong, Beneficial effect of daidzin in dry eye rat model through the suppression of inflammation and oxidative stress in the cornea. *Saudi J Biol Sci*, 2018. 25(4): p. 832-837.
109. Pettengill, M.A., et al., Ivermectin inhibits growth of *Chlamydia trachomatis* in epithelial cells. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e48456.
110. Rain, A.N., et al., In vitro drug susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to chloroquine, ivermectin and fungizone. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1996. 27(2): p. 319-24.
111. Chiu, S. and C. Argaez, in *Ivermectin for Parasitic Skin Infections of Scabies: A Review of Comparative Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines*. 2019: Ottawa (ON).