

Indice

Capitolo 1 - Introduzione	3
1.1 Peptidi Antimicrobici	3
1.1.1 Storia.....	3
1.1.2 Classificazione.....	4
1.1.3 Meccanismo d’Azione.....	7
1.1.4 Gli AMPs come Agenti Terapeutici.....	9
1.2 Cecropine	11
1.2.1 Struttura e Meccanismo d’azione	11
1.2.2 Altre attività terapeutiche.....	15
1.2.3 Attività Antifungina	15
1.2.4 Attività Antitumorale.....	16
1.2.5 Attività Immunomodulante.....	16
1.3 Sepsi e Shock Settico	18
1.3.1 Epidemiologia	18
1.3.2 Fattori di rischio.....	19
1.3.3 Quadro Clinico	19
1.3.4 Diagnosi	20
1.3.5 Trattamento	21
Capitolo 2 - Scopo della tesi	23
Capitolo 3 - Materiali e Metodi	24
Capitolo 4 - Risultati	28
Capitolo 5 - Discussione e Conclusioni	32
Capitolo 6 – Bibliografia	34

Capitolo 1 - Introduzione

1.1 Peptidi Antimicrobici

I peptidi antimicrobici, noti anche come AMPs (host defense peptides), sono brevi catene di amminoacidi, composte da 10 a 50 residui, caratterizzate da una struttura anfipatica e una carica positiva. Questi peptidi sono presenti in tutte le forme di vita, dai microrganismi agli esseri umani [1]. Gli AMPs rappresentano un elemento cruciale dell'immunità innata, un sistema di difesa non specifico e geneticamente programmato, che non richiede una precedente esposizione ad agenti patogeni per attivarsi e proteggere l'organismo da infezioni [2]. Gli AMPs svolgono un ruolo fondamentale nella protezione dell'ospite contro gli agenti patogeni, grazie sia alla loro attività antimicrobica diretta che alle loro proprietà immunomodulatrici [1,2,3].

Gli AMPs si trovano nelle secrezioni delle cellule epiteliali di pelle e mucose, così come nei granuli dei neutrofili [2]. In molti casi, questi peptidi vengono sintetizzati come precursori inattivi, richiedendo un taglio proteolitico per essere attivati [1]. Alcuni AMPs sono espressi in modo costitutivo, immagazzinati come precursori inattivi nei granuli, e successivamente rilasciati nei siti di infiammazione e infezione. Altri, invece, vengono prodotti in risposta a segnali come le citochine o i pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs) [4,5]. I peptidi antimicrobici possiedono un ampio spettro d'azione, efficace contro batteri gram-positivi e gram-negativi, funghi, virus e parassiti [3,6].

1.1.1 Storia

La scoperta della prima proteina antimicrobica umana risale al 1922, quando Fleming identificò il lisozima. Tuttavia, questa scoperta fu presto messa in ombra dall'avvento della penicillina. Con l'introduzione degli antibiotici nella pratica clinica, l'interesse per altri agenti antimicrobici diminuì drasticamente, fino a quando, negli anni '60, iniziarono a emergere le prime resistenze agli antibiotici. I pionieri tra gli AMPs furono le tionine, scoperte nelle piante. A questa scoperta fece seguito, nello stesso decennio, l'isolamento della bromocrina nelle rane e della lattoferrina nel latte.

Nel 1981, Bosman e il suo team dimostrarono che l'iniezione di batteri in *Hyalophora cecropia* induceva la produzione di un potente AMP, composto da 37 amminoacidi, poi battezzato 'cecropina' [7]. Questi peptidi dimostrarono una significativa attività antibatterica contro numerosi batteri Gram-negativi, tra cui *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nel 1987, Zasloff e i suoi collaboratori identificarono e caratterizzarono un altro importante gruppo di AMPs, le 'magainine', isolandole dalle rane *Xenopus laevis*.

Negli anni '90, il gruppo di ricerca guidato da Hoffmann rivelò che la rimozione dei geni codificanti per gli AMPs nel moscerino della frutta portava a gravi infezioni fungine, fornendo la prima prova concreta dell'importanza di questi peptidi nei meccanismi di difesa degli insetti. Nel 1994, furono isolati AMPs dalla pelle dei mammiferi e esperimenti condotti su topi knock-out per i geni degli AMPs confermarono il loro ruolo cruciale nella risposta immunitaria. Oggi, sono stati isolati oltre 3500 AMPs, catalogati nell'Antimicrobial Peptides Database (<https://aps.unmc.edu/>) [8].

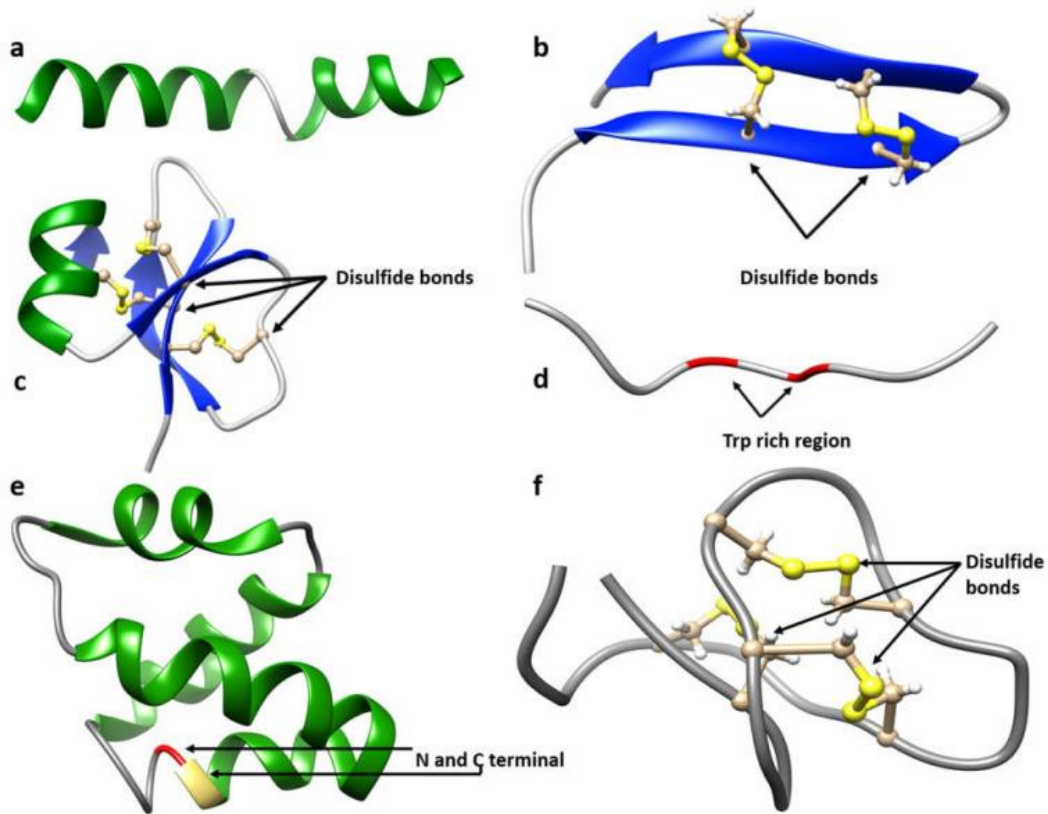
1.1.2 Classificazione

La classificazione basata sulla struttura suddivide gli AMPs in quattro gruppi distinti in base ai tipi di strutture secondarie presenti, ovvero (i) α -elica, (ii) foglietti β (almeno due), (iii) $\alpha\beta$, e (iv) non- $\alpha\beta$. (8)

- Peptidi ad α elica: Queste sono le strutture più studiate [9], con cecropina, pleurocidina, melittina (Figura 1a), magainina e moricina che sono le più descritte. Gli AMPs ad α -elica sono i più abbondanti in natura e sono stati isolati da numerose specie, inclusi piante, insetti, anfibi, pesci e mammiferi. Diversi studi hanno rivelato che la struttura ad α -elica di questi AMPs dipende fortemente dall'interazione con le membrane bersaglio [9]. Questo cambiamento conformazionale durante l'interazione separa i residui idrofilici da quelli idrofobici, con il peptide che assume una struttura anfipatica essenziale per l'attività di targeting della membrana. Le α -eliche sono spesso ricche di Leu, Ala, Gly e Lys.
- Peptidi a foglietto β : Gli AMPs a foglietto β sono costituiti da almeno due β -filamenti, con molte strutture lineari che adottano una conformazione simile ad una β -forcina. La maggior parte dei membri di questa famiglia contiene residui di cisteina conservati che formano ponti disolfuro, cruciali per la loro conformazione e funzione. Ad

esempio, i legami disolfuro nelle defensine forniscono stabilità strutturale e riducono la degradazione mediata dalle proteasi [10]. Le defensine costituiscono il gruppo principale di AMPs a foglietto β e possono essere ulteriormente classificate in sottofamiglie in base alla posizione dei ponti disolfuro. Questo gruppo di peptidi è spesso ricco di Leu, Ala, Gly e Lys.

- Peptidi con struttura $\alpha\beta$: Questa classe di AMPs contiene sia α -eliche che β -foglietti e ha una forte affinità per le membrane [11]. I membri più prominenti sono le defensine vegetali e quelle derivanti da insetto, che hanno attività antifungina grazie alle interazioni con i sfingolipidi della membrana fungina o le membrane microsomiali. Esempi di AMPs $\alpha\beta$ negli esseri umani sono le beta-defensine hBD1, hBD2 (Figura 1c) e hBD3, che contengono una struttura $\alpha\beta\beta\beta$ [10].
- Peptidi con struttura non- $\alpha\beta$: Gli AMPs non- $\alpha\beta$, noti anche come peptidi estesi o a loop, non possiedono né strutture α -elica né foglietti β e vengono classificati come peptidi ricchi di triptofano, proline e glicina. Molti peptidi ricchi di triptofano presentano una conformazione anfipatica. L'indolicidina (Figura 1d) ha una struttura anfipatica che consiste in una regione centrale ricca di triptofano (Trp), essenziale per l'ancoraggio del peptide.
- Peptidi con struttura ciclica e insolita o complessa: questi peptidi possono essere raggruppati come una quinta classe di AMPs [12]. Inoltre, questo gruppo può essere suddiviso ulteriormente in base alla topologia ciclica (sia testa a coda che testa a catena laterale) e ai legami trasversali (ad es., legami tioetere o disolfuro) [12]



In figura (1) sono rappresentate le 5 classi di AMP sulla base della loro struttura [8]

(a) AMPs ad α -elica: Melittina, sequenza amminoacidica GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ, codice PDB: 2MLT.

(b) AMPs a foglietto β : Protegrina-1, sequenza amminoacidica RGGRLCYCRRRFCVCVGR, codice PDB: 1PG1.

(c) AMPs $\alpha\beta$: hBD2, sequenza amminoacidica GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP, codice PDB: 1FD4.

(d) AMPs non- $\alpha\beta$: Indolicidina, sequenza amminoacidica ILPWKWPWWPWRR, codice PDB: 1G89; le regioni ricche in Trp sono indicate in rosso.

(e) AMPs ciclici senza legami tioetere o disolfuro: Carnociclina A, sequenza amminoacidica LVAYGIAQGTAEKVVSLINAGLTVGSIISILGGVTVGLSGVFTAVKAAIAKQGIKKAIDL, codice PDB: 2KJF. Il legame tra i terminali N e C è rappresentato in rosso e beige, rispettivamente.

(f) AMPs ciclici con legami tioetere o disolfuro: Kalata B1, sequenza amminoacidica NGLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTR, codice PDB: 1K48. I legami disolfuro sono

rappresentati con il modello a sfere e bastoncini, con zolfo, carbonio e idrogeno indicati rispettivamente in giallo, beige e bianco.

1.1.3 Meccanismo d'Azione

L'attività antimicrobica diretta degli AMPs si manifesta attraverso interazioni mediate da forze elettrostatiche tra le membrane batteriche, cariche negativamente, e i peptidi antimicrobici, carichi positivamente [13]. Le membrane citoplasmatiche dei batteri, siano esse Gram-positivi o Gram-negativi, contengono fosfatidilglicerolo, cardiolipina e fosfatidilserina, i cui gruppi carichi negativamente attraggono fortemente gli AMPs [13]. Nei batteri Gram-positivi, questa membrana è ulteriormente rinforzata da uno spesso strato di peptidoglicano, mentre nei Gram-negativi il peptidoglicano è più sottile e vi è una membrana esterna. La presenza di acidi teicoici nella parete dei Gram-positivi e di lipopolisaccaridi nella membrana esterna dei Gram-negativi aumenta la carica negativa della superficie, favorendo così il legame degli AMPs [13]. Quando i peptidi antimicrobici entrano in contatto con la membrana citoplasmatica, i loro domini carichi interagiscono con i gruppi idrofilici dei fosfolipidi, mentre i domini idrofobici interagiscono con la porzione idrofobica del doppio strato lipidico.

Questo legame può provocare la rottura della membrana microbica. Tre sono i modelli principali di interazione proposti:

1. Modello "Barrel-Stave": I peptidi si inseriscono perpendicolarmente nella membrana e, interagendo tra loro, formano un poro transmembrana. Le teste idrofiliche dei peptidi si orientano verso il centro del canale, mentre i residui idrofobici sono a contatto con il core lipidico della membrana.
2. Modello "Toroidal-Pore": L'interazione dei peptidi con la membrana causa un ripiegamento dei fosfolipidi, formando un poro in cui gli AMPs e i gruppi di testa dei fosfolipidi contribuiscono alla sua struttura.
3. Modello "Carpet-Like": Gli AMPs si accumulano sulla membrana, causando tensione nel doppio foglietto lipidico, che alla fine porta alla rottura della membrana e alla formazione di micelle.

La compromissione dell'integrità fisica della membrana provoca perdita di ioni e metaboliti, depolarizzazione del potenziale transmembrana, alterazione delle funzioni cellulari e, infine, rottura e lisi delle cellule microbiche [13].

Oltre alla capacità di danneggiare la membrana, gli AMPs possono effettuare un "self-promoted uptake", ossia traslocare all'interno della cellula e agire su target intracitoplasmatici. Tuttavia, gli AMPs non agiscono sulle membrane cellulari dell'ospite, che sono neutre e ricche di fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e sfingomieline, anziché cariche negativamente [13]. Le interazioni idrofobiche tra gli AMPs e le cellule dell'ospite sono quindi molto più deboli rispetto a quelle elettrostatiche tra i peptidi e le cellule batteriche. Inoltre, l'alto contenuto di colesterolo nelle membrane cellulari dei mammiferi riduce l'attività degli AMPs, stabilizzando la membrana. Il potenziale transmembrana, meno negativo rispetto a quello batterico, contribuisce alla selettività degli AMPs. Gli AMPs possiedono anche proprietà immunomodulatorie. Contribuiscono alla clearance batterica stimolando la chemiotassi, modulando la differenziazione delle cellule del sistema immunitario e avviando la risposta immunitaria adattativa [1]. Inoltre, gli AMPs giocano un ruolo nella prevenzione di una risposta infiammatoria eccessiva e dannosa, sopprimendo l'espressione dei toll-like receptors, la produzione di citochine proinfiammatorie indotta da LPS [1,2], e lo shock settico in modelli animali.

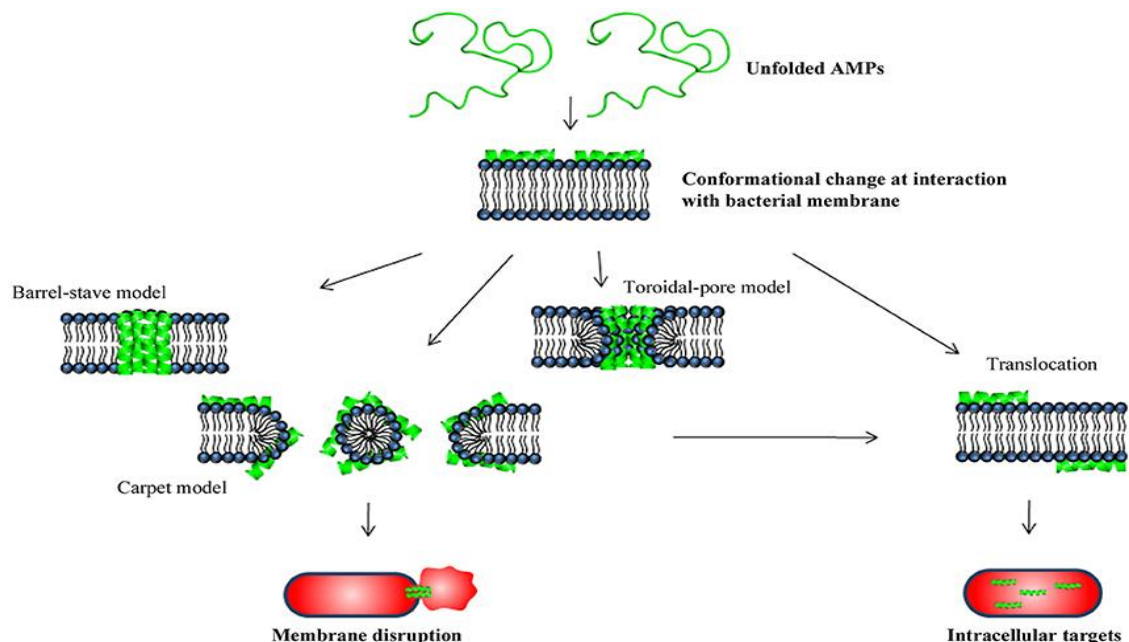


Figura (2). *Illustrazione schematica dei meccanismi di uccisione batterica degli AMP*

1.1.4 Gli AMPs come Agenti Terapeutici

Con l'aumento rapido delle resistenze agli antibiotici tradizionali, gli AMPs hanno attirato l'attenzione come potenziali nuovi agenti antibiotici ad ampio spettro. A differenza degli antibiotici convenzionali, che mirano a target specifici con alta affinità, gli AMPs agiscono alterando diverse funzioni biologiche. Questa capacità di colpire molteplici meccanismi e riconoscere vari target a bassa affinità riduce il rischio di sviluppo di resistenze batteriche.

Oggi, numerosi AMPs sono oggetto di ricerca e diversi peptidi hanno raggiunto la fase clinica di sperimentazione. Tra questi, Pexiganan, Omiganan e LTX-109 sono i più avanzati nello sviluppo clinico.

Pexiganan è un peptide di 22 aminoacidi, simile alla magainina isolata da *Xenopus*. Viene utilizzato come crema topica per il trattamento delle infezioni batteriche delle ulcere del piede diabetico e ha completato la fase III in due studi clinici [14,15].

Omiganan è un derivato dell'indolicina, originariamente isolata dai neutrofili bovini. È studiato come gel topico per le infezioni associate a cateteri e per la rosacea. Anche Omiganan ha raggiunto le fasi II/III di sperimentazione clinica [16,17].

LTX-109 è un peptidomimetico sintetico valutato come agente antimicrobico topico per il trattamento di infezioni cutanee causate da batteri Gram-positivi non complicati, impetigine e colonizzazione nasale da *Staphylococcus aureus* [18].

Inoltre, sono in fase di studio AMPs per uso sistemico. Ad esempio, hLF1-11, un peptide derivato dalla lattoferrina umana, è in fase di sviluppo per il trattamento di infezioni batteriche e fungine in pazienti immunocompromessi in attesa di trapianto di cellule staminali [19,20].

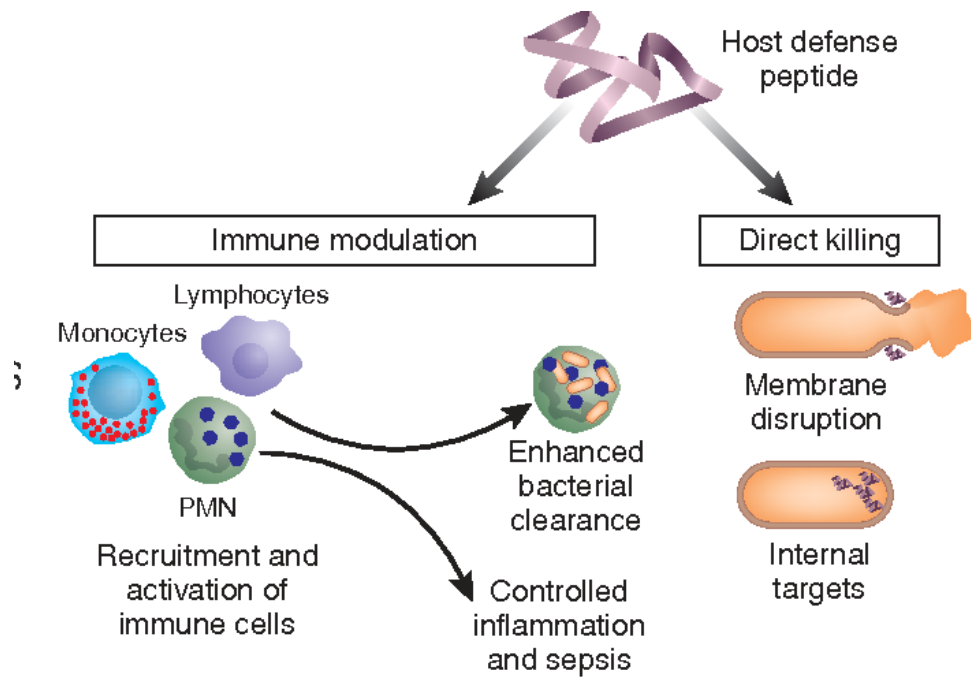


Figura (3) Illustrazione schematica dei ruoli biologici degli AMPs.[21]

Attualmente diversi AMPs sono in sperimentazione come agenti antimicrobici. Il peptide antimicrobico oggetto del mio studio prende il nome di Cecropina B.

1.2 Cecropine

Le cecropine sono una classe di peptidi antimicrobici (AMPs) scoperti inizialmente negli insetti, con particolare riferimento alla falena *Hyalophora cecropia*, da cui prendono il nome [7]. Scoperte per la prima volta negli anni '80, le cecropine rappresentano uno dei primi esempi di difese innate evolute negli invertebrati per combattere le infezioni microbiche. Da allora, sono state identificate in una varietà di organismi, inclusi altri insetti, alcuni anfibi e persino in mammiferi, evidenziando la loro conservazione evolutiva e l'importanza biologica.

1.2.1 Struttura e Meccanismo d'azione

Dal punto di vista strutturale, le cecropine sono peptidi lineari costituiti da circa 31-37 aminoacidi, con una struttura secondaria distintiva che include un' α -elica anfipatica. Questa conformazione è cruciale per la loro funzione, poiché permette l'interazione efficace con le membrane cellulari dei patogeni. Le cecropine sono caratterizzate da una netta polarità, con una regione cationica all'estremità N-terminale e una porzione idrofobica all'estremità C-terminale, una configurazione che facilita il loro inserimento nelle membrane batteriche e la conseguente distruzione delle cellule patogene (Figura 5).

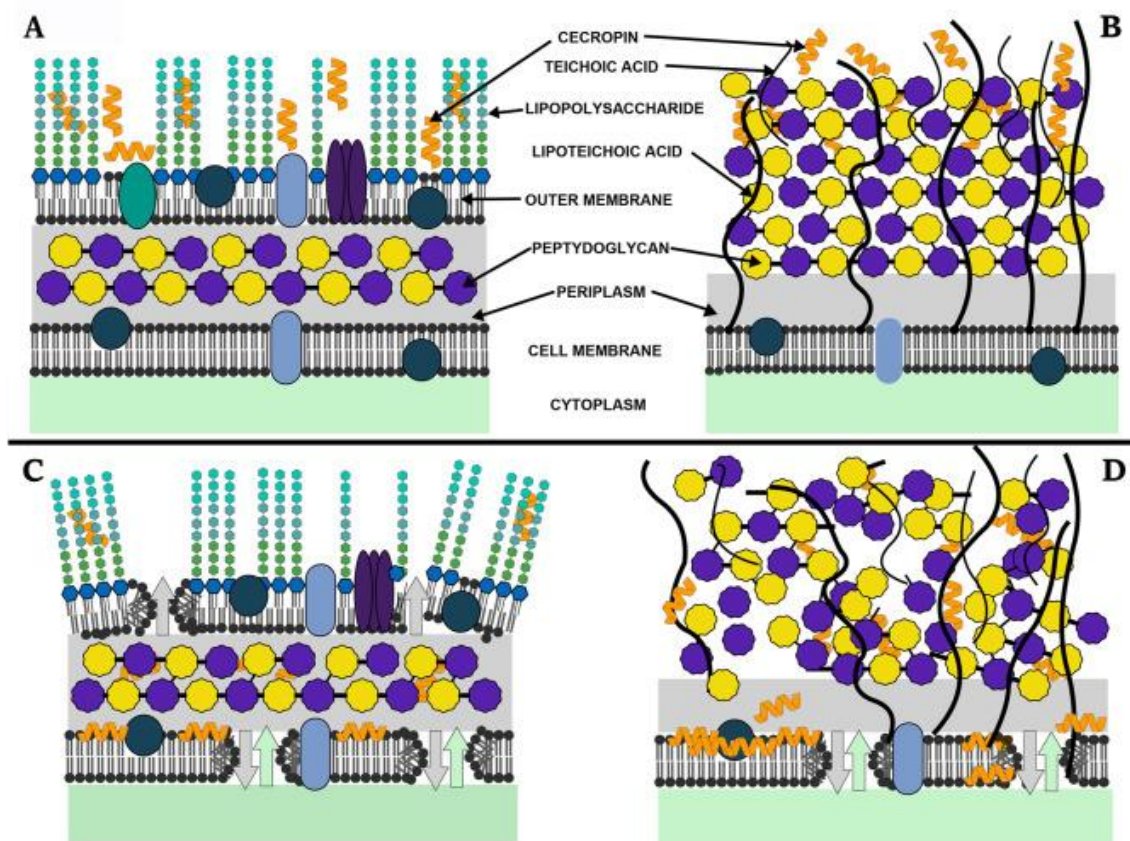


Figura (4) La figura mostra l'effetto schematico delle cecropine contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi. (A). presenta il meccanismo d'azione nei batteri Gram-negativi. (B). presenta il meccanismo d'azione nei batteri Gram-positivi. (C). e (D). presentano la lisi finale delle cellule batteriche. I componenti mostrati nelle figure C e D sono identici a quelli delle figure A e B. [22]

Le cecropine sono note per la loro ampia attività antimicrobica, che include l'uccisione di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, funghi e alcuni virus. Il loro meccanismo d'azione principale implica l'interazione elettrostatica iniziale con la membrana esterna dei microrganismi, seguita dall'inserimento e dall'interruzione del doppio strato lipidico, che porta alla lisi cellulare. A differenza di molti antibiotici convenzionali, le cecropine non agiscono su un singolo target molecolare specifico, ma piuttosto causano un danno fisico diretto alla membrana cellulare. Questo aspetto riduce significativamente la possibilità di sviluppo di resistenze batteriche, un problema che affligge molte terapie antibiotiche moderne.

È stato quindi evidenziato che queste molecole possono indurre alterazioni nelle membrane cellulari. Tuttavia, i meccanismi d'azione specifici dei singoli AMPs possono variare significativamente, e per molti di essi le informazioni disponibili sono ancora limitate. Alcuni studi suggeriscono che il rapporto tra i residui idrofobici e la sequenza peptidica idrofila potrebbe rappresentare un indicatore delle funzioni degli AMPs, ma l'amfipaticità da sola non è sufficiente a stabilire con certezza la correlazione tra la struttura chimica del peptide e il suo effetto sulle cellule batteriche o tumorali [23]. I peptidi della famiglia delle cecropine sono tutti classificati come AMPs cationici, e per questo motivo condividono in gran parte un meccanismo d'azione simile. Il modo in cui queste molecole interagiscono con le cellule bersaglio può essere suddiviso in tre categorie principali, le stesse che abbiamo visionato precedentemente nel Meccanismo d'azione delle AMPs e che riporto di seguito per chiarezza:

1. Modello "Barrel-Stave": I peptidi si inseriscono perpendicolarmente nella membrana e, interagendo tra loro, formano un poro transmembrana. Le teste idrofiliche dei peptidi si orientano verso il centro del canale, mentre i residui idrofobici sono a contatto con il core lipidico della membrana.
2. Modello "Toroidal-Pore": L'interazione dei peptidi con la membrana causa un ripiegamento dei fosfolipidi, formando un poro in cui gli AMPs e i gruppi di testa dei fosfolipidi contribuiscono alla sua struttura.
3. Modello "Carpet-Like": Gli AMPs si accumulano sulla membrana, causando tensione nel doppio foglietto lipidico, che alla fine porta alla rottura della membrana e alla formazione di micelle.

La compromissione dell'integrità fisica della membrana provoca perdita di ioni e metaboliti, depolarizzazione del potenziale transmembrana, alterazione delle funzioni cellulari e, infine, rottura e lisi delle cellule microbiche [13] (Figura 5).

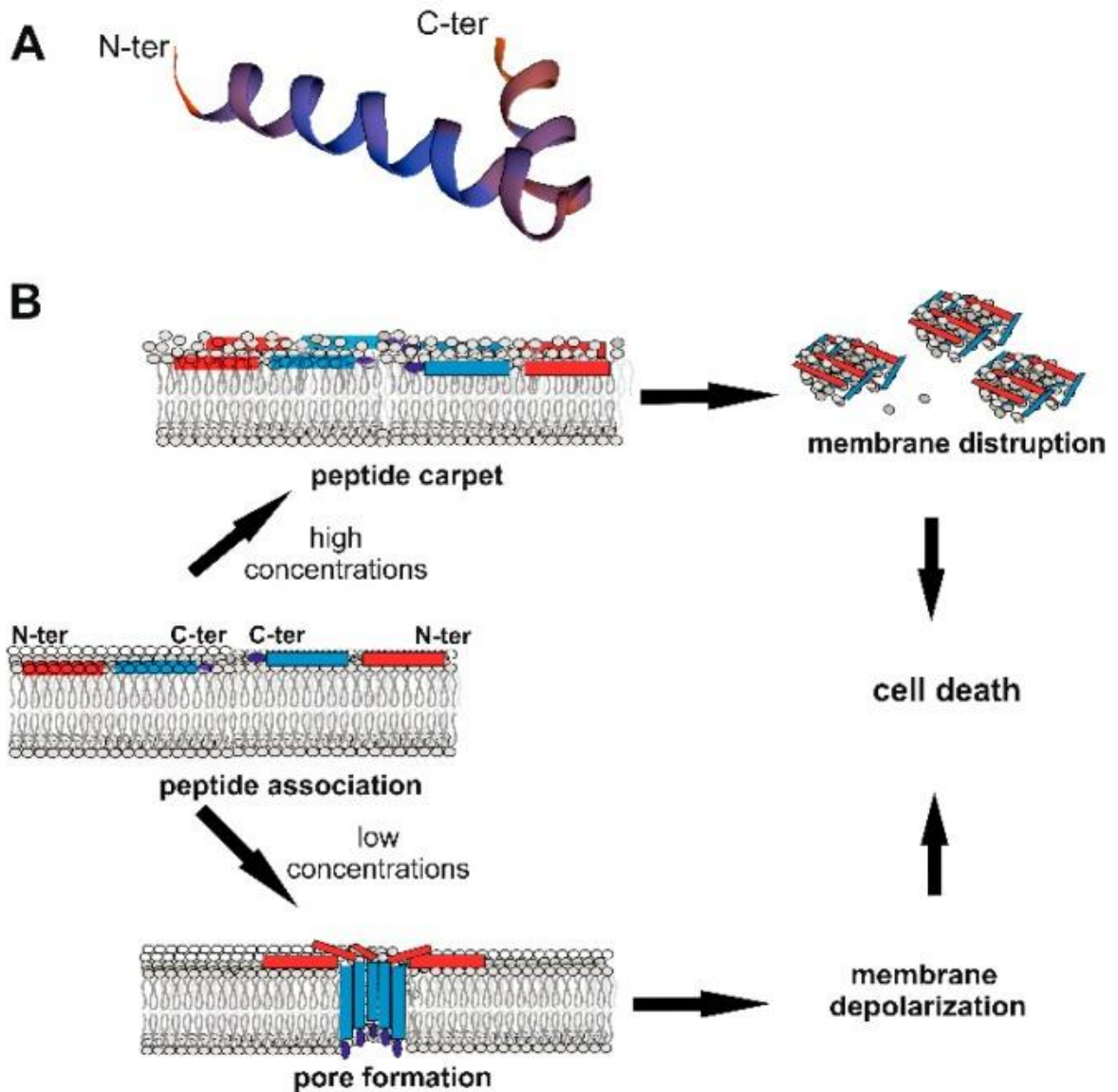


Figura (5) (A) Struttura della variante naturale della Cecropina B da *Bombyx mori* (Q53) di 35aa, ottenuta utilizzando SWISS-MODEL (Disponibile online: <https://swissmodel.expasy.org/>), che mostra α -eliche N-terminale e C-terminale collegate tramite una regione flessibile di giunzione. (B) Modello di azione contro i batteri. Le Cecropine si associano con la membrana batterica, con gli assi lunghi dei domini α -elicoidali paralleli alla superficie del doppio strato lipidico. I residui polari interagiscono con i fosfati lipidici; i residui non polari si interrano nel nucleo idrofobico della membrana. Ad alte concentrazioni (parte superiore), le Cecropine formano una struttura simile a un tappeto con proprietà simili a un detergente, disturbando le membrane. A concentrazioni più basse (parte inferiore), le Cecropine formano pori, che influenzano l'equilibrio elettrolitico cellulare, causando la morte batterica. Il poro è formato da diverse molecole

di Cecropina organizzate come oligomeri, con i domini idrofobici C-terminali immersi nelle catene idrofobiche dei fosfolipidi. Il rettangolo rosso rappresenta l'elica N-terminale, quello blu l'elica C-terminale; l'ellisse blu scuro indica il residuo ammidico C-terminale. [24]

1.2.2 Altre attività terapeutiche

Oltre alla meglio nota attività antibatterica, la famiglia delle Cecropine possiede anche proprietà antifungine, antitumorali e immunomodulanti.

1.2.3 Attività Antifungina

Considerando il crescente problema della resistenza nelle terapie tradizionali, nonché l'elevata attività dei peptidi antimicrobici e le loro proprietà che ostacolano lo sviluppo di resistenze, l'utilizzo di cecropine può rappresentare una terapia alternativa molto interessante.

La cecropina ha mostrato una forte attività antifungina contro *Candida albicans*, riuscendo simultaneamente a distruggere la parete cellulare e la membrana cellulare e causando disfunzioni mitocondriali [25].

Gli effetti delle cecropine di *Drosophila* e *Hyalophora* sono stati testati contro diversi funghi, sia patogeni degli insetti che funghi provenienti dall'ambiente normale di *Drosophila*. I funghi sono stati generalmente trovati suscettibili alle cecropine quanto la maggior parte dei batteri, l'unica eccezione è rappresentata dal patogeno degli insetti *Beauveria bassiana*, che risulta completamente resistente. Questo è anche l'unico fungo testato che è virulento per *Drosophila*, causando il 100% di letalità entro 5 giorni dopo l'iniezione. Le concentrazioni letali di cecropine contro gli altri funghi testati variavano tra 0,4 e 4 μM . L'andropina è meno fungicida delle cecropine, e la cecropina A di *Drosophila* è leggermente più potente della cecropina B. Anche colture dense di *Saccharomyces cerevisiae* possono essere eliminate da concentrazioni micromolari di cecropina, mentre *Geotrichum candidum* non è influenzato dalla cecropina quando testato in coltura densa. [26]

1.2.4 Attività Antitumorale

Dal punto di vista medico, la cecropina potrebbe emergere come un promettente farmaco antitumorale nel prossimo futuro, o come uno degli elementi di terapie combinate per il cancro. Le ricerche condotte, in particolare su linee cellulari tumorali, evidenziano chiaramente il suo potenziale antitumorale. Tuttavia, poiché questi studi sono principalmente in vitro, è necessaria ulteriore ricerca per valutare l'efficacia della cecropina come farmaco clinico. [22]

Inoltre, sono interessanti i coniugati di cecropina con molecole specifiche, che amplificano l'effetto terapeutico e riducono i danni ai tessuti sani durante le terapie antitumorali. Tuttavia, una limitazione di questo approccio è che la cecropina agisce localmente, il che solleva interrogativi sulla sua capacità di raggiungere efficacemente i target terapeutici [22].

Le cecropine A e B hanno dimostrato un'efficacia citotossica e antiproliferativa selettiva significativa nelle cellule del carcinoma vescicale, preservando al contempo i fibroblasti benigni di origine murina o umana [27]. Il loro meccanismo d'azione distintivo sembra dipendere, almeno in parte, dalla compromissione delle membrane cellulari target, che porta a una citolisi irreversibile e alla distruzione delle cellule. Sembra quindi che sia la cecropina A che la cecropina B rappresentino candidati promettenti per ulteriori studi preclinici come opzioni terapeutiche intravesicali nel trattamento del cancro della vescica non invasivo alla muscolare [27].

1.2.5 Attività Immunomodulante

Sono noti gli effetti immunomodulanti degli AMPs: promuovono indirettamente l'eliminazione dei patogeni stimolando la chemotassi e la differenziazione delle cellule immunitarie, mentre prevengono anche l'infiammazione dannosa e la sepsi inibendo il rilascio di citochine proinfiammatorie e neutralizzando direttamente endotossine batteriche come il LPS [1].

Più nello specifico, all'interno della famiglia delle Cecropine, recenti studi hanno evidenziato gli effetti della CecA sulla risposta infiammatoria e sull'omeostasi ossidativa in

una co-coltura di epatociti primari e cellule non parenchimali di pollo. [28] I risultati ottenuti indicano che la CecA non sembra avere effetti dannosi sulla vitalità delle cellule epatiche quando applicata a basse concentrazioni; tuttavia, l'uso di concentrazioni più elevate potrebbe comportare danni alla membrana cellulare. Inoltre, è possibile affermare che la CecA esercita un impatto sulla risposta immunitaria delle cellule ospiti, influenzando i livelli di IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1. Sebbene, sulla base dei risultati ottenuti, la CecA non possa essere considerata puramente antinfiammatoria, si suggerisce che essa possa contribuire a mantenere l'omeostasi infiammatoria epatica. Inoltre, l'esame degli effetti della CecA sullo stato ossidativo cellulare ha mostrato che i parametri ossidativi non sono stati alterati nella maggior parte dei casi di esposizione alla CecA; tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere meglio il suo meccanismo d'azione [28].

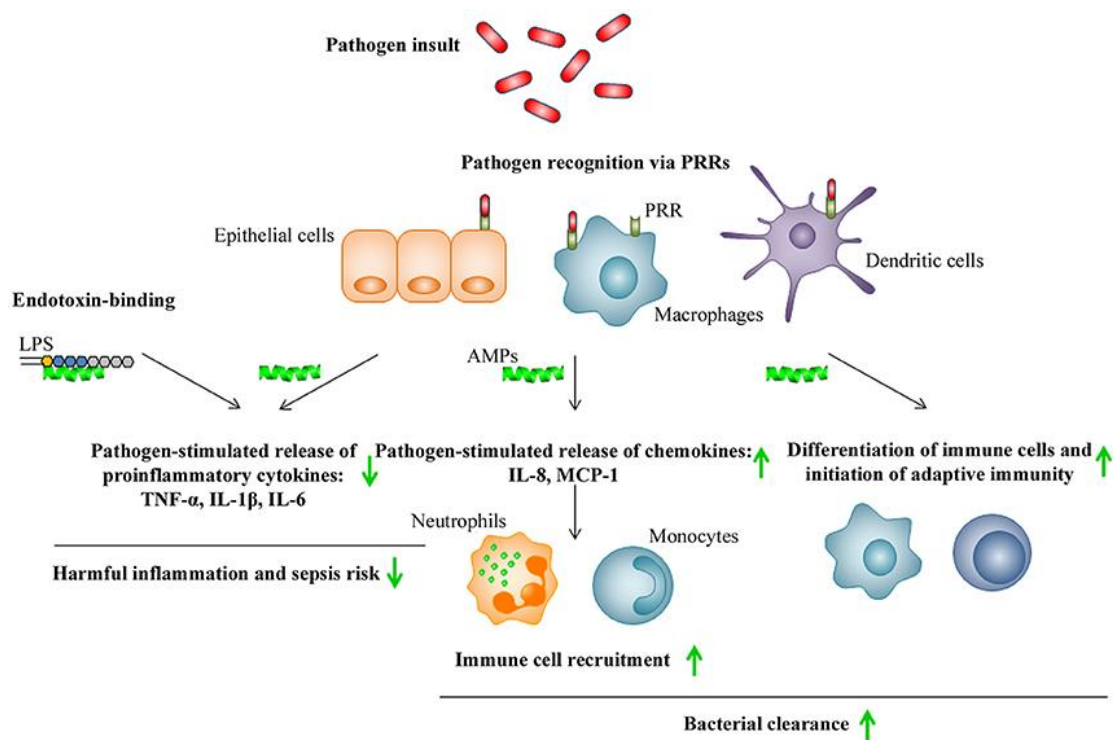


Figura (6) Illustrazione schematica dell'attività immunomodulante degli AMPs [1].

1.3 Sepsi e Shock Settico

La sepsi è definita come una disfunzione d'organo potenzialmente letale causata da una risposta disordinata dell'ospite a un'infezione. [29] La disfunzione d'organo può essere identificata come un cambiamento acuto nel punteggio SOFA totale ≥ 2 punti a seguito di un'infezione. Il punteggio SOFA di base può essere considerato pari a zero nei pazienti per i quali non è nota una disfunzione d'organo preesistente. Un punteggio SOFA ≥ 2 riflette un rischio di mortalità complessivo di circa il 10% in una popolazione ospedaliera generale con sospetta infezione. Anche i pazienti che presentano una disfunzione modesta possono peggiorare ulteriormente, sottolineando la gravità di questa condizione e la necessità di un intervento tempestivo e appropriato, se non già in atto. [29]

Lo shock settico è definito come una sottocategoria della sepsi in cui le anomalie circolatorie e metaboliche cellulari sono così gravi da aumentare significativamente la mortalità. I pazienti con shock settico possono essere identificati attraverso un quadro clinico di sepsi con ipotensione persistente che richiede l'uso di vasopressori per mantenere una pressione arteriosa media (MAP) ≥ 65 mmHg e un livello di lattato sierico > 2 mmol/L (18 mg/dL) nonostante una adeguata rianimazione con fluidi. Con questi criteri, la mortalità ospedaliera supera il 40%. [29]

1.3.1 Epidemiologia

Negli Stati Uniti, la sepsi grave è registrata nel 2% dei pazienti ricoverati in ospedale. Di questi pazienti, la metà viene trattata nell'unità di terapia intensiva (ICU), rappresentando il 10% di tutti i ricoveri in terapia intensiva. Il numero di casi negli Stati Uniti supera i 750.000 all'anno ed è stato recentemente riportato in aumento. [30]

Studi provenienti da altri paesi ad alto reddito mostrano tassi di sepsi simili nelle ICU. L'incidenza della sepsi grave al di fuori delle moderne unità di terapia intensiva, soprattutto nelle parti del mondo in cui le cure intensive sono scarse, è largamente sconosciuta. Estrapolando dai tassi di incidenza trattati negli Stati Uniti, sono stati stimati fino a 19 milioni di casi in tutto il mondo ogni anno. [31] L'incidenza reale è presumibilmente molto più alta. [30]

1.3.2 Fattori di rischio

I fattori di rischio per la sepsi grave sono collegati sia alla predisposizione del paziente alle infezioni sia alla probabilità che si sviluppi una disfunzione d'organo acuta in presenza di un'infezione. Numerosi fattori di rischio noti possono contribuire alle infezioni che spesso scatenano la sepsi grave e lo shock settico, come le malattie croniche (ad esempio, la sindrome da immunodeficienza acquisita, la broncopneumopatia cronica ostruttiva e diversi tipi di cancro) e l'impiego di farmaci immunosoppressori. Tuttavia, i fattori di rischio per lo sviluppo di disfunzioni d'organo nei pazienti con queste infezioni sono meno studiati, ma probabilmente comprendono l'agente patogeno coinvolto, la genetica del paziente, il suo stato di salute generale, la funzione d'organo preesistente e la tempestività delle cure ricevute. [30]

L'incidenza della sepsi grave è inoltre influenzata da fattori come età, sesso e appartenenza etnica: essa risulta più alta nei neonati e negli anziani rispetto ad altre fasce di età, più elevata negli uomini rispetto alle donne, e più frequente nei neri rispetto ai bianchi. [30]

1.3.3 Quadro Clinico

Le manifestazioni cliniche della sepsi sono estremamente variabili e dipendono dal sito iniziale dell'infezione, dall'organismo patogeno coinvolto, dal tipo di disfunzione d'organo acuta, dallo stato di salute generale del paziente e dal tempo trascorso prima dell'inizio del trattamento. I segni sia dell'infezione che della disfunzione d'organo possono essere sottili, motivo per cui le linee guida internazionali più recenti offrono un elenco dettagliato di segni d'allarme che indicano una possibile sepsi in fase iniziale.

La disfunzione d'organo acuta colpisce più comunemente i sistemi respiratorio e cardiovascolare. Il compromesso respiratorio si manifesta tipicamente come sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), definita dalla presenza di ipossiemia e infiltrati bilaterali di origine non cardiaca. Il compromesso cardiovascolare, invece, si presenta principalmente con ipotensione o livelli elevati di lattato sierico. Anche dopo un'espansione adeguata del volume, l'ipotensione può persistere, rendendo necessario l'uso di vasopressori, e può verificarsi disfunzione miocardica. [30]

Il cervello e i reni sono frequentemente coinvolti nella sepsi. La disfunzione del sistema nervoso centrale di solito si manifesta con obnubilamento o delirio. Gli studi di imaging non mostrano generalmente lesioni focali, e le anomalie rilevate mediante elettroencefalografia spesso indicano encefalopatia non focale. È comune anche la polineuropatia e la miopatia da malattia critica, specialmente nei pazienti che rimangono a lungo in terapia intensiva. [30]

L'insufficienza renale acuta si manifesta con una riduzione della produzione di urina e un incremento dei livelli di creatinina sierica, e spesso richiede la terapia di sostituzione renale. Altri problemi frequenti includono l'ileo paralitico, l'innalzamento dei livelli di aminotransferasi, alterazioni nella regolazione glicemica, trombocitopenia e coagulazione intravascolare disseminata. La disfunzione surrenalica e la sindrome da eutiroido malato sono anch'esse comuni nei pazienti con sepsi grave. [30]

1.3.4 Diagnosi

I criteri per la diagnosi di shock settico sono: ipotensione che richiede terapia con vasopressori per mantenere una pressione arteriosa media >65 mmHg e livelli sierici di lattato superiori a 2 mmol/L dopo una gestione appropriata dell'ipovolemia. Questa combinazione è associata a un tasso di mortalità ospedaliera superiore al 40%. Per evitare ritardi nell'inizio del trattamento per i pazienti ricoverati fuori dal reparto di terapia intensiva, è stata progettata una nuova versione semplificata del SOFA score: un sistema di punteggio rapido chiamato quick SOFA (qSOFA). È raccomandata per la diagnosi rapida nei pazienti ambulatoriali e nelle ammissioni ospedaliere di emergenza per i pazienti con sospetta infezione e sepsi. Il qSOFA valuta lo stato mentale, cardiovascolare e respiratorio del paziente. I criteri per l'ipotensione sono la pressione sistolica <100 mmHg, per la tachipnea la frequenza respiratoria >22 respiri al minuto e per lo stato mentale il Glasgow Coma Scale (GCS) <15 . È importante sottolineare che il qSOFA non definisce la sepsi ma consente l'identificazione rapida di tutti i pazienti a rischio potenziale di sepsi, poiché è un indicatore di un aumentato rischio di deterioramento clinico. I principali vantaggi del qSOFA sono che è facile da misurare e non richiede esami di laboratorio, potendo essere eseguita rapidamente e ripetutamente. [32]

1.3.5 Trattamento

Le linee guida aggiornate per la quarta campagna SSC (Surviving Sepsis Campaign) sono state pubblicate nel 2021. Queste linee guida comprendono raccomandazioni per il riconoscimento e la gestione precoce della sepsi, la diagnosi e il trattamento della fonte dell'infezione, la gestione emodinamica, la ventilazione, e ulteriori indicazioni per le strategie terapeutiche. [33]

Per i pazienti con ipoperfusione indotta da sepsi o shock settico, si suggerisce di somministrare almeno 30 mL/kg di fluido cristalloide per via endovenosa entro le prime tre ore di rianimazione. [32,33]

Si raccomanda inoltre di ridurre i livelli di lattato sierico (raccomandazione debole), mentre una nuova raccomandazione (anch'essa debole) suggerisce di monitorare il riempimento capillare per valutare la perfusione tissutale. [32,33]

In caso di sospetto di shock settico, si raccomanda di somministrare farmaci antimicrobici immediatamente o entro un'ora dalla diagnosi (raccomandazione debole). Se si sospetta sepsi senza shock, si consiglia di considerare anche cause non infettive, ma di iniziare la somministrazione di antimicrobici entro tre ore dalla diagnosi di sepsi (raccomandazione debole). È opportuno eseguire campioni microbiologici prima di avviare la terapia. Per i pazienti con sospetta sepsi o shock settico senza conferma di infezione, è consigliabile una continua rivalutazione e la ricerca di diagnosi alternative, oltre all'interruzione della terapia antibiotica empirica se emerge una causa non infettiva, poiché un terzo dei pazienti con sospetta sepsi alla fine risulta avere una condizione non infettiva. [32,33]

Per la rianimazione emodinamica, si raccomanda l'uso di cristalloidi bilanciati al posto della soluzione salina. L'uso di albumina è raccomandato nei pazienti che hanno ricevuto un volume elevato (livello moderato). [32,33]

Per lo shock settico in trattamento con vasopressori, si raccomanda un obiettivo iniziale di pressione arteriosa media (MAP) di 65 mm Hg, piuttosto che obiettivi di MAP più elevati (raccomandazione forte). La noradrenalina rimane il vasopressore di prima scelta (evidenza di alto livello). In assenza dell'effetto terapeutico atteso dalla noradrenalina (obiettivo di pressione arteriosa media di 65 mmHg o superiore), può essere aggiunta la

vasopressina per ridurre la dose di noradrenalina (evidenza di livello moderato). Come alternativa di terza linea, può essere considerata l'aggiunta di adrenalina (raccomandazione debole). Per lo shock con disfunzione cardiaca e ipoperfusione persistente nonostante uno stato volumetrico adeguato, è raccomandato l'uso di dobutamina in aggiunta alla noradrenalina (raccomandazione debole). [32,33]

Le nuove linee guida per l'insufficienza respiratoria indotta da sepsi raccomandano l'uso dell'ossigenoterapia ad alto flusso (HFNO) rispetto alla ventilazione non invasiva (NIV) (raccomandazione debole). Un'altra nuova raccomandazione è che, in caso di sindrome da distress respiratorio acuto grave causata da sepsi, le linee guida suggeriscono l'uso della ossigenazione extracorporea venosa quando la ventilazione meccanica convenzionale fallisce, in centri esperti dotati delle infrastrutture necessarie per il suo utilizzo. [32,33]

Si raccomanda di somministrare corticosteroidi ai pazienti con shock settico che richiedono terapia con vasopressori (raccomandazione debole) nella dose di 200 mg al giorno di idrocortisone, 50 mg ogni sei ore o come infusione continua. [32,33]

Capitolo 2 - Scopo della tesi

La sepsi rappresenta ancora una grande sfida clinica nonostante i notevoli sforzi per migliorare i tassi di sopravvivenza. Rimane una delle principali cause di morbidità e mortalità nei pazienti ricoverati e tra le persone immunocompromesse.

I principi fondamentali del trattamento sono rimasti invariati per decenni. Questi includono la somministrazione tempestiva di antimicrobici specifici per il patogeno responsabile, il controllo della fonte tramite la rimozione dell'infezione quando possibile e il supporto per la disfunzione degli organi. Tuttavia, diversi studi hanno suggerito che l'esposizione di batteri Gram-negativi agli agenti antibatterici può causare anche il rilascio di endotossine.

I peptidi antimicrobici si legano ai residui negativamente carichi del LPS nella membrana esterna attraverso interazioni elettrostatiche con i gruppi fosforilici e interazioni idrofobiche con le catene aciliche del lipide A. Questo legame rappresenta un passaggio cruciale nel meccanismo che porta all'eliminazione degli organismi Gram-negativi e all'inattivazione dell'endotossina. Tra questi composti, la cecropina B, un peptide caricato positivamente originariamente isolato dall'emolinfa del lepidottero gigante da seta, si distingue per la sua doppia attività: ampio spettro antimicrobico e capacità di neutralizzare l'endotossina.

Il presente studio sperimentale è stato condotto per valutare il potenziale terapeutico della cecropina B, sia da sola che in combinazione con antibiotici betalattamici, non solo nel trattamento delle infezioni da Gram-negativi, ma anche nella neutralizzazione dell'effetto biologico dell'endotossina.

Capitolo 3 - Materiali e Metodi

Animali

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti Wistar maschi adulti, con un peso compreso tra 250 e 300 g. Gli animali sono stati alloggiati singolarmente in gabbie standard e hanno avuto accesso a cibo e acqua ad libitum per tutta la durata dello studio. L'ambiente è stato mantenuto in condizioni controllate di temperatura e umidità, con un ciclo di luce diurna e notturna impostato dalle 6:30 del mattino alle 6:30 della sera. Lo studio ha ricevuto l'approvazione dal comitato etico per la ricerca sugli animali dell'I.N.R.C.A.-I.R.R.C.S. di Ancona.

Organismi e Reagenti

È stato utilizzato il ceppo di controllo di qualità commercialmente disponibile di *Escherichia coli* ATCC 25922. L'endotossina (*E. coli* serotipo 0111:B4; Sigma-Aldrich S.r.l., Milano, Italia) è stata preparata in soluzione salina sterile, aliquotata e conservata a -80°C per brevi periodi.

Agenti

La cecropina B è stata ottenuta dalla Sigma-Aldrich. È stata disciolta in H₂O distillata a una concentrazione 20 volte superiore alla massima richiesta. Successivamente, per gli studi in vitro, sono state preparate diluizioni seriali del peptide in acido acetico al 0,01% contenente albumina sierica bovina allo 0,2% in tubi di polipropilene; per gli esperimenti in vivo, è stata diluita in soluzione salina fisiologica. Le polveri di piperacillina (Wieth Lederle, Aprilia, Italia) e imipenem (Merck, Sharp & Dohme, Milano, Italia) sono state diluite in conformità alle raccomandazioni dei produttori. Le soluzioni sono state preparate fresche il giorno della sperimentazione.

Test di Suscettibilità

Il test di suscettibilità è stato condotto utilizzando il metodo di diluizione in microbrodo, seguendo le linee guida del National Committee for Clinical Laboratory Standards. Tuttavia, poiché i peptidi cationici tendono a legarsi al polistirene, sono state impiegate piastre da 96 pozzetti in polipropilene (Sigma-Aldrich) al posto di quelle in polistirene. La Concentrazione Minima Inibente (CMI) è stata definita come la concentrazione più bassa di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Progettazione Sperimentale

Sono state studiate due condizioni sperimentali: (A) somministrazione intraperitoneale di LPS e (B) peritonite indotta da E. coli.

Sei gruppi, ciascuno contenente 20 animali, sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intramuscolare di ketamina (30 mg/kg di peso corporeo) e iniettati intraperitonealmente con 1,0 mg di LPS di E. coli sierotipo O111:B4 in un volume totale di 500 µL di soluzione salina sterile. Immediatamente dopo l'iniezione, gli animali hanno ricevuto per via intraperitoneale soluzione di cloruro di sodio isotonica (gruppo di controllo C0), 1 mg/kg di cecropina B, 20 mg/kg di imipenem o 120 mg/kg di piperacillina da soli e in combinazione con 1 mg/kg di cecropina B, rispettivamente.

E. coli ATCC 25922 è stato coltivato in brodo di infusione di cervello-cuore (BHI). Quando i batteri si trovavano nella fase logaritmica di crescita, la sospensione è stata centrifugata a 1000 g per 15 minuti, il sovrnatante è stato scartato e i batteri sono stati risospesi e diluiti in soluzione salina sterile. Tutti gli animali (sei gruppi, ciascuno contenente 20 animali) sono stati anestetizzati come sopra descritto. L'addome di ciascun animale è stato rasato e preparato con iodio. I ratti hanno ricevuto un inoculo intraperitoneale di 1 mL di soluzione salina contenente 2×10^{10} CFU di E. coli ATCC 25922. Immediatamente dopo l'inoculo batterico, gli animali hanno ricevuto per via intraperitoneale soluzione di cloruro di sodio isotonica (gruppo di controllo C1), 1 mg/kg di cecropina B, 20 mg/kg di imipenem o 120 mg/kg di piperacillina da soli e in combinazione con 1 mg/kg di cecropina B, rispettivamente.

Valutazione del Trattamento

Dopo il trattamento, gli animali sono stati rimessi in gabbie individuali e sottoposti a esami giornalieri approfonditi. In base al tipo di esperimento, alla fine dello studio sono stati valutati il tasso di positività delle colture di sangue, la quantificazione dei batteri nel liquido intra-addominale, il tasso di mortalità, la tossicità, le concentrazioni plasmatiche di endotossine e TNF- α . Gli animali sono stati monitorati per le successive 72 ore.

La tossicità è stata valutata in base alla presenza di eventuali effetti avversi correlati al farmaco, come segni locali di infiammazione, anoressia, perdita di peso, vomito, diarrea, febbre e alterazioni comportamentali.

Gli animali sopravvissuti (modello 2) sono stati soppressi con cloroformio e sono stati ottenuti campioni di sangue per coltura mediante una puntura cardiaca transtoracica percutanea asettica. Inoltre, per effettuare valutazioni quantitative dei batteri nel liquido intra-addominale, sono stati iniettati intraperitonealmente 10 mL di soluzione salina sterile, i campioni del liquido di lavaggio peritoneale sono stati diluiti serialmente e un volume di 0,1 mL di ciascuna diluizione è stato spalmato su piastre di agar sangue. Il limite di rilevamento era di 1 log₁₀ CFU/ml. Le piastre sono state incubate sia in aria che in condizioni anaerobiche a 35°C per 48 ore.

Per la determinazione delle concentrazioni di endotossine e TNF- α nel plasma, sono stati prelevati campioni di sangue da 0,2 mL dalla vena giugulare dopo 0, 2, 6 e 12 ore dall'iniezione. Durante questo periodo, è stato posizionato un catetere nella vena e suturato sulla schiena del ratto.

Le concentrazioni di endotossine sono state misurate mediante il test Limulus amebocyte lysate disponibile commercialmente (E-TOXATE, Sigma-Aldrich). I campioni di plasma sono stati diluiti serialmente 2 volte con acqua sterile priva di endotossine e sono stati trattati termicamente per 5 minuti in un bagno d'acqua a 75°C per distruggere gli inibitori che possono interferire con l'attivazione. Il contenuto di endotossine è stato determinato come descritto dal produttore. I controlli standard dei livelli di endotossina sono stati effettuati in ogni esecuzione e le concentrazioni di endotossine nei campioni (in unità di endotossine [EU/ml]) sono state calcolate mediante confronto con la curva standard.

Le concentrazioni di TNF- α sono state misurate mediante un test di immunoadsorbimento enzimatico a sandwich in fase solida disponibile commercialmente (Nuclear Laser

Medicine, S.r.l., Settala, Italia) secondo il protocollo fornito dal produttore. Gli standard e i campioni sono stati incubati con una piastra microtitolata con rivestimento anticorpo anti-TNF- α . Le cavità sono state lavate con buffer e successivamente incubate con anticorpo anti-TNF- α biotinilato coniugato a streptavidina-perossidasi. Questo è stato lavato via e il colore è stato sviluppato in presenza di substrato cromogeno (tetrametilbenzidina). L'intensità del colore è stata misurata in un lettore di microplacche (MR 700 Dynatech Laboratories, Guernsey, UK) leggendo l'assorbanza a 450 nm. I risultati per i campioni sono stati confrontati con la curva standard per determinare la quantità di TNF- α presente. Tutti i campioni sono stati eseguiti in duplicato. Il limite inferiore di sensibilità per il TNF- α con questo test era di 0,05 ng/ml. I coefficienti di variazione intra-assay e interassay erano rispettivamente del 6,3% e dell'8,1%.

Analisi Statistica

I valori di CMI sono presentati come valori medi ottenuti in triplicato su 3 misurazioni indipendenti. I dati di sopravvivenza sono stati confrontati utilizzando il test del log-rank. I risultati qualitativi delle colture di sangue e del liquido intra-addominale sono stati analizzati utilizzando il χ^2 , la correzione di Yates e il test esatto di Fisher, a seconda delle dimensioni del campione. La valutazione quantitativa dei batteri nelle colture di liquido intra-addominale è stata presentata come media \pm deviazione standard della media; le comparazioni statistiche tra i gruppi sono state effettuate utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). Le comparazioni post hoc sono state effettuate mediante il test di Bonferroni. I livelli plasmatici di endotossine e TNF- α sono stati analizzati utilizzando il test di Kruskal-Wallis; le comparazioni multiple tra i gruppi sono state effettuate utilizzando la procedura standard appropriata. Ciascun gruppo di confronto conteneva 20 ratti. La significatività è stata accettata quando il valore di P era $\leq 0,05$.

Capitolo 4 - Risultati

Studi di Suscettibilità In Vitro

Secondo il metodo di diluizione in brodo-microdiluizione, E. coli ATCC 25922 ha mostrato diverse suscettibilità ai composti testati: le CMI di cecropina B, imipenem e piperacillina sono state rispettivamente di 2,00 mg/L, 0,11 mg/L e 0,24 mg/L.

Somministrazione Intraperitoneale di LPS

I trattamenti intraperitoneali con peptidi somministrati immediatamente dopo la somministrazione di 1,0 mg di LPS di E. coli serotipo O111:B4 sono stati migliori rispetto a nessun trattamento e all'imipenem e alla piperacillina intraperitoneali. Infatti, sono state osservate differenze significative ($P \leq 0,05$) nei livelli plasmatici di endotossine e TNF- α tra il gruppo trattato con cecropina B e il gruppo di controllo C0 e i gruppi trattati con imipenem o piperacillina. In effetti, i trattamenti con cecropina B da sola o in combinazione con i betalattamici hanno mostrato un'attività anti-endotossina che ha portato ai livelli più bassi di endotossine plasmatiche e TNF- α (Tabella 1).

Tabella (1). Livelli plasmatici di Endotossina e TNF- α in un modello di topo dopo la somministrazione intraperitoneale di 1.0 mg di E. Coli Sierotipo O111:B4 LPS

Trattamento*	Endotossina (EU/ml) [†]				TNF- α (ng/ml) [†]			
	0 ore	2 ore	6 ore	12 ore	0 ore	2 ore	6 ore	12 ore
Gruppo di controllo C ₁	24,7 \pm 9,5	1.021 \pm 243,7	1.875,1 \pm 553,6	1.644,3 \pm 471,4	\leq 0,05	0,23 \pm 0,06	0,54 \pm 0,12	0,51 \pm 0,12
C-B (1)	32,5 \pm 11,7	75,8 \pm 18,0‡	154,3 \pm 23,2‡	139,8 \pm 22,1‡	\leq 0,05	0,06 \pm 0,01‡	0,14 \pm 0,02‡	0,12 \pm 0,03‡
PIP (120)	34,1 \pm 12,6	1.183,6 \pm 202,7	1.977,1 \pm 211,8	1.596,5 \pm 209,9	\leq 0,05	0,27 \pm 0,10	0,59 \pm 0,18	0,59 \pm 0,19
IMP (20)	20,3 \pm 8,7	1.298,5 \pm 260,1	2.054,0 \pm 658,7	1.717,8 \pm 508,4	\leq 0,05	0,32 \pm 0,11	0,61 \pm 0,15	0,57 \pm 0,14
PIP (120) più C-B (1)	29,1 \pm 10,3	71,2 \pm 13,9‡	149,7 \pm 30,0‡	116,5 \pm 24,8‡	\leq 0,05	0,06 \pm 0,01‡	0,11 \pm 0,03‡	0,10 \pm 0,02‡
IMP (20) più C-B (1)	27,9 \pm 10,1	69,8 \pm 14,0‡	150,4 \pm 24,9‡	122,7 \pm 20,5‡	\leq 0,05	0,07 \pm 0,01‡	0,13 \pm 0,04‡	0,10 \pm 0,02‡

*C-B, Cecropina B; PIP, Piperacillina; IMP, Imipenem

† Media \pm DS

‡ $P \leq 0,05$ rispetto al gruppo di controllo C0 e ai gruppi trattati con Piperacillina e Imipenem

Peritonite Indotta da E. coli

Il tasso di letalità nel gruppo di controllo C1 è stato del 100%. Per i gruppi trattati con un singolo farmaco, tutti i trattamenti intraperitoneali somministrati immediatamente dopo l'inoculo batterico sono stati migliori rispetto a nessun trattamento ($P \leq 0,05$). In particolare, i tassi di sopravvivenza sono stati del 75,0%, 80,0% e 85,0% nei gruppi trattati rispettivamente con cecropina B, imipenem e piperacillina (Tabella 2).

Tabella (2). Efficacia di iniezione intraperitoneale di Betalattamici da soli o in combinazione con Cecropina B in un modello di Peritonite indotta da E. Coli su topo

Dose di E. coli (CFU)*	Trattamento †	Letalità ‡		Cultura Ematica Qualitativa (N. positivo/totale)	Conteggio Batterico (CFU/ml) §
		No. Morti/Totale	% di Sopravvivenza		
2 x 10 ¹⁰	Gruppo di controllo C1	20/20	0.0	20/20	3.9 x 10 ⁸ ± 0.9 x 10 ⁸
2 x 10 ¹⁰	C-B (1)	5/20**	75.0	6/20**	6.7 x 10 ⁴ ± 2.0 x 10 ⁴ **
2 x 10 ¹⁰	PIP (120)	3/20**	85.0	3/20**	7.3 x 10 ² ± 2.7 x 10 ² **††
2 x 10 ¹⁰	IMP (20)	4/20**	80.0	4/20**	3.2 x 10 ² ± 1.3 x 10 ² **‡‡
2 x 10 ¹⁰	PIP (120) più C-B (1)	1/20**††	95.0	1/20**††	3.8 x 10 ¹ ± 1.1 x 10 ¹ **††††
2 x 10 ¹⁰	IMP (20) più C-B (1)	2/20**††	90.0	2/20**††	4.5 x 10 ¹ ± 1.9 x 10 ¹ **††††

* Ai topi è stato iniettato intraperitonealmente E. Coli insieme ad 1 mL di soluzione salina sterile

† C-B, Cecropina B; PIP, Piperacillina; IMP, Imipenem

‡ La letalità è stata monitorata per 72 ore dopo l'iniezione

§ Media ± DS

** $P < 0.05$ rispetto al gruppo di controllo C1

†† $P < 0.05$ rispetto ai gruppi trattati con Betalattamici

‡‡ $P < 0.05$ rispetto il gruppo di controllo e il gruppo trattato con Cecropina B

La valutazione batteriologica ha mostrato colture di sangue e liquido intra-addominale positive al 100% nel gruppo di controllo C1; la conta batterica media nel liquido

peritoneale di animali morti o sopravvissuti a 72 ore è stata di $3,9 \times 10^8 \pm 0,9 \times 10^8$ CFU/ml. Piperacillina e imipenem hanno mostrato le più alte attività antimicrobiche ed efficacia terapeutica. Infatti, sono state osservate differenze significative nei risultati delle colture batteriche quantitative quando i dati ottenuti dai gruppi trattati con betalattamici sono stati confrontati con quelli ottenuti per il gruppo trattato con il peptide ($P \leq 0,05$). Le concentrazioni di endotossine e TNF- α sono aumentate costantemente nel gruppo di controllo C1, con livelli di picco medi raggiunti a 6 ore dall'iniezione (Tabella 3). Allo stesso modo del modello sperimentale 1, i gruppi trattati con cecropina B hanno mostrato una significativa riduzione dei livelli plasmatici di endotossine e TNF- α rispetto al gruppo di controllo e ai gruppi trattati con betalattamici. L'imipenem ha mostrato i più alti livelli plasmatici di endotossine e TNF- α , tuttavia non è stata osservata alcuna differenza significativa nelle concentrazioni plasmatiche di endotossine e TNF- α tra il gruppo trattato con imipenem, il gruppo trattato con piperacillina e il gruppo di controllo C1. I trattamenti combinati hanno dimostrato che le combinazioni tra cecropina B e betalattamici hanno prodotto i tassi di sopravvivenza più elevati (oltre il 90%). Contemporaneamente, queste combinazioni hanno mostrato le più alte attività antimicrobiche e la più forte riduzione dei livelli plasmatici di endotossine e TNF- α . Infine, tutti gli agenti non hanno mostrato alcuna tossicità; infatti, nessuno degli animali ha presentato evidenze cliniche di effetti avversi correlati al farmaco, come segni locali di infiammazione, anoressia, perdita di peso, vomito, diarrea, febbre e alterazioni comportamentali.

Tabella (3). Effetto di iniezione intraperitoneale di Betalattamici da soli o in combinazione con Cecropina B sui livelli plasmatici di Endotossina e TNF- α in un modello di peritonite indotta da E. Coli su topo

Dose di E. coli	Trattamento [†]	Endotossina (EU/ml) [‡]				TNF- α (ng/ml) [‡]			
		0 ore	2 ore	6 ore	12 ore	0 ore	2 ore	6 ore	12 ore
2×10^{10}	Gruppo di controllo C1	16,7 \pm 4,5	159,8 \pm 28,5	313,9 \pm 49,7	298,7 \pm 40,1	\leq 0,05	0,12 \pm 0,03	0,26 \pm 0,05	0,24 \pm 0,05
2×10^{10}	C-B (1)	18,1 \pm 4,4	33,8 \pm 9,5§	67,8 \pm 13,5§	58,5 \pm 11,9§	\leq 0,05	0,07 \pm 0,02§	0,12 \pm 0,03§	0,11 \pm 0,03§
2×10^{10}	PIP (120)	23,2 \pm 5,8	168,6 \pm 30,9	397,1 \pm 52,8	379,1 \pm 44,8	\leq 0,05	0,15 \pm 0,05	0,29 \pm 0,06	0,26 \pm 0,06
2×10^{10}	IMP (20)	20,3 \pm 4,9	198,9 \pm 41,8	407,0 \pm 64,1	394,2 \pm 49,2	\leq 0,05	0,19 \pm 0,07	0,37 \pm 0,10	0,33 \pm 0,11
2×10^{10}	PIP (120) più C-B (1)	18,2 \pm 4,7	29,7 \pm 7,7§	59,3 \pm 11,6§	50,7 \pm 10,4§	\leq 0,05	0,06 \pm 0,02§	0,09 \pm 0,02§	0,09 \pm 0,03§
2×10^{10}	IMP (20) più C-B (1)	22,4 \pm 5,0	28,6 \pm 7,3§	61,4 \pm 14,3§	53,4 \pm 12,1§	\leq 0,05	0,06 \pm 0,02§	0,10 \pm 0,02§	0,08 \pm 0,02§

* Ai topi è stato iniettato intraperitonealmente E. Coli insieme ad 1 mL di soluzione salina sterile

† C-B, Cecropina B; PIP, Piperacillina; IMP, Imipenem

‡ Media \pm DS

§ P < 0.05 rispetto al gruppo di controllo C1 e ai gruppi trattati con Betalattamici

Capitolo 5 - Discussione e Conclusioni

I trattamenti attuali per lo shock settico da Gram-negativi si basano sull'uso di antibiotici per controllare l'infezione e sul supporto in terapia intensiva per correggere il disfunzionamento dei principali sistemi organici. Tuttavia, dopo il rilascio di LPS da parte degli antibiotici, il lipide A diventa disponibile per interagire in modo avverso con le cellule dell'ospite. Sulla base della sua struttura molecolare altamente conservata tra i batteri Gram-negativi, il lipide A potrebbe essere un obiettivo logico per agenti progettati per legarsi all'LPS. La natura anionica e anfipatica del lipide A gli consente di legarsi sia a composti positivamente carichi che a molecole che possiedono un carattere anfipatico. Per questi motivi, vengono investigate nuove strategie per trattare non solo l'infezione ma anche per neutralizzare l'effetto biologico dell'endotossina mediante l'uso di agenti che sequestrano l'LPS, prevenendone così il riconoscimento da parte delle cellule effettrici dell'ospite.

Nel presente studio vengono descritti gli effetti della somministrazione intraperitoneale di due antibiotici betalattamici, piperacillina e imipenem, da soli e in combinazione con il peptide positivamente carico cecropina B, sull'esito della sopravvivenza, sulla coltura del sangue, sul contenuto batterico del liquido intra-addominale e sui livelli plasmatici di endotossine e TNF- α in due modelli di shock settico da Gram-negativi in ratti. Nel complesso, i risultati di questo studio hanno dimostrato che tutti i composti hanno ridotto la mortalità e il numero di E. coli nel liquido intra-addominale rispetto al trattamento con soluzione fisiologica. D'altra parte, i betalattamici hanno determinato un aumento delle concentrazioni plasmatiche di endotossine e TNF- α . In modo interessante, la cecropina B ha prodotto una significativa riduzione dei livelli plasmatici di endotossine rispetto a qualsiasi altro gruppo, confermando la sua duplice attività antimicrobica e anti-endotossina. Infine, la combinazione tra cecropina B e betalattamici si è dimostrata il trattamento più efficace nella riduzione di tutte le variabili misurate. In effetti, i risultati più consistenti riguardanti l'inibizione della crescita batterica, la mortalità e l'endotossinemia sono stati ottenuti quando piperacillina e imipenem sono stati somministrati in combinazione con cecropina B.

Sono stati condotti numerosi studi su modelli animali di shock settico. Una singola dose di endotossina o un'inoculazione singola di una specie Gram-negativa sono stati i modelli più utilizzati per lo screening di farmaci anti-endotossine e antimicrobici. L'analisi dei dati dei nostri modelli non ha mostrato un impatto essenzialmente diverso sulla valutazione dei parametri ed è emerso che l'efficacia dei composti non è stata influenzata dai modelli animali utilizzati e che questi sono stati conservati indipendentemente dal sistema utilizzato. Tuttavia, l'estrapolazione dei risultati dai modelli animali alla patologia umana dovrebbe essere considerata con cautela. In realtà, questi modelli non sono rappresentativi definitivamente di ciò che accade nelle infezioni cliniche, poiché gli esseri umani sono solitamente esposti non solo a una specie di batteri Gram-negativi ma anche a organismi Gram-positivi e in modi diversi.

Attualmente, i trattamenti per lo shock settico da Gram-negativi si basano sugli antibiotici per controllare l'infezione. D'altra parte, è noto che molti antibiotici clinicamente utilizzati possono essere dannosi quando vengono somministrati per trattare infezioni gravi da Gram-negativi, poiché possono stimolare il rilascio di endotossine e quindi aumentare la comparsa di sintomi e complicazioni potenzialmente letali. I nostri risultati mostrano collettivamente la fattibilità di sequestrare l'LPS mediante l'uso di composti cationici e anfipatici e suggeriscono l'utilità terapeutica potenziale di peptidi policationici come la cecropina B quando associati ad altri composti antimicrobici.

Capitolo 6 – Bibliografia

- 1 Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194.
- 2 Hancock, R. E., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), 1317–1323.
- 3 Wakabayashi, H., Hiratani, T., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (1996). Antifungal Spectrum and Fungicidal Mechanism of an N-Terminal Peptide of Bovine Lactoferrin. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 1(3), 185–189.
- 4 Hancock, R. E., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8(9), 402–410.
- 5 Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), 131–141.
- 6 Valenti, G. E., Alfei, S., Caviglia, D., Domenicotti, C., & Marengo, B. (2022). Antimicrobial Peptides and Cationic Nanoparticles: A Broad-Spectrum Weapon to Fight Multi-Drug Resistance Not Only in Bacteria. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6108.
- 7 Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D., & Yu, X. Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(13), 5807–5822.
- 8 Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., & Zhu, Y. (2021). Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11691.
- 9 Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell*, 1(2), 143–152.
- 10 Dhople, V., Krukemeyer, A., & Ramamoorthy, A. (2006). The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(9), 1499–1512.

- 11 Wang G. (2015). Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1268, 43–66.
- 12 Koehbach, J., & Craik, D. J. (2019). The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends in pharmacological sciences*, 40(7), 517–528.
- 13 Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11401.
- 14 Lamb, H. M., and Wiseman, L. R. (1998). Pexiganan acetate. *Drugs* 56: 1047–1052.
- 15 Lipsky, B. A., Holroyd, K. J., and Zasloff, M. (2008). Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin. Infect. Dis.* 47: 1537–1545.
- 16 Fritsche, T. R., Rhomberg, P. R., Sader, H. S., & Jones, R. N. (2008). Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride against contemporary fungal pathogens responsible for catheter-associated infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(3), 1187–1189.
- 17 Zapotoczna, M., Forde, É., Hogan, S., Humphreys, H., O'Gara, J. P., Fitzgerald-Hughes, D., Devocelle, M., & O'Neill, E. (2017). Eradication of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infections Using Synthetic Antimicrobial Peptides. *The Journal of infectious diseases*, 215(6), 975–983.
- 18 Nilsson, A. C., Janson, H., Wold, H., Fugelli, A., Andersson, K., Hakångård, C., et al. (2015). LTX-109 is a novel agent for nasal decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 145–151.
- 19 Velden, W. J., van Iersel, T. M., Blijlevens, N. M., & Donnelly, J. P. (2009). Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). *BMC medicine*, 7, 44.
- 20 Fais, R., Rizzato, C., Franconi, I., Tavanti, A., & Lupetti, A. (2022). Synergistic Activity of the Human Lactoferricin-Derived Peptide hLF1-11 in Combination with Caspofungin against *Candida* Species. *Microbiology spectrum*, 10(4), e0124022.

- 21 Hancock, R., Sahl, HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24, 1551–1557 (2006).
- 22 Maksymilian Ziaja, Ada Dziedzic, Kacper Szafraniec, Agnieszka Piastowska-Ciesielska, Cecropins in cancer therapies-where we have been?, *European Journal of Pharmacology*, Volume 882, 2020, 173317, ISSN 0014-2999,
- 23 Nambirajan Rangarajan, Somenath Bakshi, and James C. Weisshaar, Localized Permeabilization of E. coli Membranes by the Antimicrobial Peptide Cecropin A, *Biochemistry* 2013 52 (38), 6584-6594
- 24 Brady, D., Grapputo, A., Romoli, O., & Sandrelli, F. (2019). Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5862.
- 25 Peng C, Liu Y, Shui L, Zhao Z, Mao X, Liu Z. Mechanisms of Action of the Antimicrobial Peptide Cecropin in the Killing of *Candida albicans*. *Life*. 2022; 12(10):1581.
- 26 Sophia Ekengren, Dan Hultmark, Drosophila cecropin as an antifungal agent, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 29, Issue 11, 1999, Pages 965-972, ISSN 0965-1748.
- 27 Suttmann, H., Retz, M., Paulsen, F., Harder, J., Zwergel, U., Kamradt, J., Wullich, B., Unteregger, G., Stöckle, M., & Lehmann, J. (2008). Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC urology*, 8, 5.
- 28 Márton, R. A., Sebők, C., Mackei, M., Tráj, P., Vörösházi, J., Kemény, Á., Neogrady, Z., & Mátis, G. (2024). Cecropin A: investigation of a host defense peptide with multifaceted immunomodulatory activity in a chicken hepatic cell culture. *Frontiers in veterinary science*, 11, 1337677.
- 29 Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801–810.

30 Angus, D. C., & van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*, 369(9), 840–851.

31 Adhikari, N. K., Fowler, R. A., Bhagwanjee, S., & Rubenfeld, G. D. (2010). Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet (London, England)*, 376(9749), 1339–1346.

32 Srzić, I., Neseck Adam, V., & Tunjić Pejak, D. (2022). SEPSIS DEFINITION: WHAT'S NEW IN THE TREATMENT GUIDELINES. *Acta clinica Croatica*, 61(Suppl 1), 67–72.

33 Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C. M., French, C., Machado, F. R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H. C., Schorr, C., Simpson, S., Wiersinga, W. J., Alshamsi, F., Angus, D. C., Arabi, Y., Azevedo, L., Beale, R., Beilman, G., Belley-Cote, E., ... Levy, M. (2021). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive care medicine*, 47(11), 1181–1247.