

## Sommario

1. Introduzione
2. Pseudomonas
  - 2.1 Morfologia e crescita
  - 2.2 Infezioni da Pseudomonas
  - 2.3 Antibiotico resistenza di pseudomonas aeruginosa
  - 2.4 Principali meccanismi di resistenza
    - 2.4.1 Produzione di enzimi inattivanti
    - 2.4.2 Alterazioni delle porine
    - 2.4.3 Pompe di efflusso
    - 2.4.4 Modifiche del sito bersaglio
    - 2.4.5 Formazione di biofilm
3. Biofilm
  - 3.1 Biofilm di Pseudomonas aeruginosa
4. Peptidi antimicrobici
  - 4.1 Scoperta e caratteristiche molecolari
  - 4.2 Meccanismi d'azione
  - 4.3 Classificazione molecolare
    - 4.3.1 AMP ad  $\alpha$ -elica
    - 4.3.2 AMP  $\beta$ -foglietto
    - 4.3.3 AMP  $\alpha\beta$
    - 4.3.4 AMP non  $\alpha\beta$
  - 4.4 Evoluzione molecolare sintetica dei peptidi antimicrobici
  - 4.5 Studi clinici sui peptidi antimicrobici
    - 4.5.1 Infezioni oculari
    - 4.5.2 Infezioni del sangue
    - 4.5.3 Infezioni localizzate
    - 4.5.4 Infezioni virali
5. Pexiganan
  - 5.1 Studi clinici del pexiganan ad oggi
6. Materiali e metodi
  - 6.1 Agenti antimicrobici e studi in vitro

- 6.2 Preparazione del substrato
- 6.3 Preparazione delle cellule
- 6.4 Valutazione dell'aderenza
- 7. Studio in vitro
  - 7.1 Valutazione del biofilm
  - 7.2 Valutazione dell'antibiotico resistenza
- 8. Studio in vivo
- 9. Risultati degli esperimenti
  - 9.1 analisi statistica
  - 9.2 Risultati degli studi in vitro
  - 9.3 Risultati degli studi in vivo
- 10. Conclusioni

## 1. INTRODUZIONE

L'aumento della resistenza agli antibiotici è stato riconosciuto come una minaccia emergente per la salute pubblica. È stato riconosciuto come uno dei fattori più importanti nell'aumento dei tassi di morbilità e mortalità, con conseguente crescita dei costi sanitari. [1-2]

Questo fenomeno è in crescita ed è principalmente causato dall'aumento dell'utilizzo improprio di antibiotici sia in medicina umana sia in veterinaria, con la conseguente pressione selettiva di ceppi resistenti, con la diffusione di essi non solo in ambito comunitario, ma anche e soprattutto, in ambito nosocomiale.

Lo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) stima che, nella sola Unione Europea, la resistenza agli antibiotici causa ogni anno 33.000 decessi e circa 880.000 casi di disabilità. [3]

Altri studi in ambito europeo hanno evidenziato i dati relativi alle mappe di distribuzione dei batteri resistenti. Analizzando questi dati emerge che l'Italia detiene insieme alla Grecia e ai Paesi dell'Est Europa il primato per diffusione dei germi resistenti, con particolare riferimento ai cosiddetti "batteri ESKAPE". [4]

I patogeni ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp. - sono stati identificati come batteri multiresistenti critici per i quali sono rapidamente necessarie terapie efficaci. [1]

Pertanto, la ricerca negli ultimi anni si sta focalizzando su nuovi strumenti per combattere al meglio questi microrganismi. Il nostro studio, nel dettaglio, è indirizzato alla valutazione dell'efficacia di un nuovo gruppo di antibiotici, i peptidi antimicrobici, nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa*.

I peptidi antimicrobici sono stati isolati a partire da numerosi organismi viventi. Infatti, si è scoperto che fanno parte delle normali difese immunitarie naturali di questi organismi, tra cui mammiferi, anfibi, uccelli, ma anche vegetali e funghi. Il primo peptide ad essere stato isolato in maniera documentata è stata la gramicidina, isolata dal *Bacillus brevis* isolato dal suolo nel 1939 dal biologo francese René Dubos.

Da quando sono stati individuati, sono stati molto studiati e, ad oggi, si conoscono molto meglio i loro meccanismi d'azione e le loro strutture molecolari. Si è notata, non solo un'azione antibatterica, ma anche antivirale e antifungina, motivo per cui sono stati proposti anche nel trattamento di queste infezioni.

Grazie alle crescenti conoscenze su queste molecole, sono state ottimizzate tramite modifiche di ingegneria chimica. Questi composti ingegnerizzati hanno permesso un netto aumento dell'efficacia terapeutica e una riduzione degli effetti collaterali. Grazie a questa "evoluzione molecolare sintetica" molti di questi peptidi antimicrobici sono stati inseriti in studi clinici di cui alcuni sono arrivati a fasi avanzate.

Alcuni di questi sono stati inseriti dal food and drug administration (FDA) nella lista degli antibiotici disponibili per uso terapeutico. Alcuni di questi sono utilizzati non solo a scopo antibatterico, ma anche antifungino e antivirale.

Oggi si conoscono molto meglio anche la maggior parte dei meccanismi di resistenza di ciascun batterio. Il biofilm, tra questi, è senza dubbio uno dei meccanismi di resistenza più interessanti e studiati. È causa di molte infezioni croniche, in particolare, quelle associate a dispositivi medici, tra cui: cateteri, venosi o urinari, stent e protesi articolari.

Alcuni dei peptidi antimicrobici sono stati studiati proprio per la loro capacità di non essere riconosciuti dai normali meccanismi di resistenza antibiotica. Inoltre, alcuni di essi hanno dimostrato avere la capacità di inibire la produzione di biofilm.

Per questo motivo, il nostro studio è mirato alla valutazione dell'efficacia del pexiganan, un peptide antimicrobico ingegnerizzato, nella riduzione della formazione del biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* in vitro ed in vivo.

Abbiamo utilizzato delle sub-MIC (concentrazioni minime inibitorie) di pexiganan e imipenem come strumento per valutare l'inibizione dell'adesione del batterio come metodo per prevenire la successiva formazione di biofilm.

In primo luogo, abbiamo studiato i cambiamenti nell'adesione e nella formazione del biofilm di un isolato clinico di *P. aeruginosa* produttore di biofilm in grado di crescere in presenza di sub-MIC dei suddetti antibiotici.

In seguito, abbiamo utilizzato lo stesso ceppo, precedentemente trattato con due antibiotici, in un modello animale. Il modello di infezione scelto è stato quello dello stent ureterale, per verificare il tipo di impatto che questo trattamento aveva anche in vivo sulla capacità del ceppo batterico di produrre biofilm.

## 2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

*Pseudomonas aeruginosa* è un batterio Gram negativo, aerobio, non fermentante, che fa parte dei batteri ESKAPE. Questo gruppo di batteri è stato identificato come il più pericoloso in termini di evasione dall'azione antibiotica.

Ha numerosi meccanismi di virulenza che includono: la capsula, che è di tipo polisaccaridico mucoide, i suoi annessi, come i pili di tipo IV e le tossine di cui, la neuraminidasi, la fosfolipasi C, l'elastasi e la fosfatasi alcalina.

Questo batterio è in grado di colonizzare una vasta gamma di habitat naturali e artificiali, grazie alla sua versatilità metabolica e alla sua straordinaria capacità di adattamento a condizioni ambientali avverse. È comunemente isolato in suolo, acque, piante e superfici umide, e ha una particolare predilezione per gli ambienti acquatici. La sua presenza nelle strutture sanitarie è facilitata dalla capacità di sopravvivere su superfici inanimate e in soluzioni antisettiche, il che lo rende un importante agente patogeno nosocomiale. [5]

La capsula di questo batterio svolge un ruolo fondamentale nell'adattamento ad ambienti ostili, adesione a dispositivi medici, nell'antibiotico resistenza e alla produzione di biofilm. Conosciamo dei ceppi di *Pseudomonas Aeruginosa* produttori di alginato, chiamati ceppi mucoidi, e non produttori di alginato. I primi, sono quelli maggiormente responsabili della produzione di infezioni polmonari in pazienti con fibrosi cistica o di infezioni croniche associate a dispositivi medici. I ceppi non produttori di alginato sono quelli che si trovano in fasi iniziali di infezione oppure sono ceppi isolati da ambienti non patologici.

L'alginato è un polisaccaride extracellulare che protegge i batteri dagli antibiotici e dagli agenti ossidativi e migliora l'adesione delle cellule alle superfici solide nel processo di formazione del biofilm. Lo studio di Pezzoni et al. (2022) ha analizzato il ruolo dell'alginato nella risposta adattativa di *P. aeruginosa*. Hanno studiato il ruolo dell'alginato nel contesto delle risposte adattative generate quando *P. aeruginosa* è esposto a dosi subletali e letali di radiazioni ultraviolette-A (UVA).

I risultati di questo studio di sopravvivenza hanno dimostrato che l'alginato ha un ruolo chiave nella resistenza di *P. aeruginosa* allo stress ossidativo, sia nelle cellule planctoniche sia nei biofilm. Inoltre, hanno valutato come la presenza di alginato sia essenziale

nell'induzione della formazione di biofilm come risposta adattativa. Questa molecola ha rivelato avere anche un ruolo nella protezione incrociata contro agenti ossidanti quali il perossido di idrogeno e l'ipoclorito di sodio, entrambi generati dall'esposizione a basse dosi di UVA.

Infine, hanno dimostrato che l'aumento della formazione del biofilm è direttamente proporzionale alla concentrazione di alginato nella matrice del biofilm. Probabilmente questo aspetto è correlato all'induzione di geni legati alla regolazione (algR e algU) e alla biosintesi (operone algD) di alginato. [6]

## **2.1 Morfologia e crescita**

*Pseudomonas aeruginosa* è un bacillo, quindi ha una forma di bastoncino diritto o leggermente ricurvo, con dimensioni variabili tra 0,5-0,8 micrometri di diametro e 1,5-3,0 micrometri di lunghezza.

È dotato di uno o più flagelli polari che conferiscono motilità, permettendo al batterio di muoversi in ambienti liquidi e di colonizzare rapidamente nuove superfici. La sua parete cellulare è caratterizzata dalla presenza di lipopolisaccaridi (LPS), che conferiscono resistenza agli agenti antimicrobici e contribuiscono alla patogenicità attraverso l'induzione di risposte infiammatorie nell'ospite.

Un'altra caratteristica distintiva di *P. aeruginosa* è la produzione di pigmenti idrosolubili. Tra questi, i più rilevanti sono: la Piocianina e la Pioverdina. Il primo è un pigmento blu-verde che ha proprietà pro-ossidanti e può danneggiare le cellule ospiti generando specie reattive dell'ossigeno (ROS). La Pioverdina è un pigmento verde-giallo fluorescente che agisce sequestrando il ferro dall'ambiente (agente sideroforo), essenziale per la crescita del batterio, soprattutto in condizioni di limitata disponibilità di questo elemento.

*P. aeruginosa* cresce bene su diversi tipi di terreni di coltura comuni, come il terreno nutriente agar e l'agar MacConkey. Le colonie di *P. aeruginosa* tipicamente appaiono lisce, mucoidi o rugose, con bordi irregolari. Questo batterio è capace di crescere in un ampio intervallo di temperature, da 4°C a 42°C, con una temperatura ottimale di crescita intorno ai 37°C. La sua capacità di prosperare a temperature superiori a quelle della maggior parte degli altri batteri patogeni gli conferisce un vantaggio competitivo negli ambienti ospedalieri. (Figura 1)



**Figura 1.** Una colonia di *Pseudomonas Aeruginosa* in terreno agar.

*P. aeruginosa* è un organismo non fermentante; utilizza la respirazione aerobica per produrre energia, ma può crescere in condizioni microaerofile (bassi livelli di ossigeno) grazie alla sua capacità di utilizzare nitrati come accettori finali di elettroni in un processo simile alla respirazione anaerobica. Questa capacità di adattamento metabolico contribuisce alla sua sopravvivenza in una vasta gamma di ambienti. [7, 8]

## 2.2 Infezioni da Pseudomonas

*Pseudomonas aeruginosa* è, quindi, un batterio notevolmente versatile e ha una straordinaria capacità di infettare il polmone nei pazienti con fibrosi cistica (FC). L'infezione da *P. aeruginosa*, in questi pazienti, si manifesta precocemente e, sebbene l'eradicazione possa essere raggiunta dopo una diagnosi precoce, l'infezione cronica si verifica in oltre il 60% degli adulti con FC. L'infezione cronica è associata ad un aumento della mortalità e a un peggioramento della malattia di base. [9]

*P. aeruginosa*, inoltre, è un importante causa di infezione in pazienti immunosoppressi. In particolare, in quelli affetti da cancro causa una vasta gamma di infezioni, che vanno da più superficiali come, infezioni di ferite e ustioni, alle infezioni delle vie urinarie, fino a infezioni profonde e disseminate come batteriemia, endocardite, meningite e osteomielite. In questo tipo di pazienti spesso, oltre alle infezioni più comuni da *P. aeruginosa*, abbiamo la comparsa di alcune nuove manifestazioni di infezione, tra cui l'ulcerazione corneale e la cheratite associata alle lenti da contatto o la follicolite associata alle vasche da bagno o all'idromassaggio.

Queste infezioni sono dovute alla sua capacità di adattarsi perfettamente ad ambienti umidi o acquosi. In passato era associato a vere e proprie epidemie causate dalla contaminazione di preparati farmaceutici, aerosol, soluzioni per saponi, umidificatori e apparecchiature come respiratori, rubinetti e scarichi, serbatoi di idroterapia e lavandini. Il riconoscimento di queste potenziali fonti di contaminazione ha portato alla formulazione di linee guida attente per le procedure di sterilizzazione, che hanno aiutato a ridurre il loro impatto come veicoli principali nella diffusione dell'infezione. [10]

Quindi questo batterio è uno dei principali agenti eziologici di infezioni nosocomiali, che si manifestano principalmente come: polmonite, infezioni del sito chirurgico, infezioni del tratto urinario e batteriemia. Si stima che *P. aeruginosa* abbia una prevalenza del 7,1%-7,3% tra tutte le infezioni associate all'assistenza sanitaria [11, 12].

Il sito più comune di infezione da *P. aeruginosa* è la polmonite ed è l'organismo Gram-negativo più comunemente identificato nella polmonite nosocomiale. La prevalenza è aumentata nell'ultimo decennio [13].

*Pseudomonas aeruginosa* è anche una causa comune di infezioni nosocomiali del tratto urinario (UTI), in particolare di UTI associate a catetere (CAUTI). È responsabile di circa il 10% di tutte le CAUTI e fino al 16% delle UTI nei pazienti in terapia intensiva [14, 15]. Le UTI nosocomiali secondarie a questa infezione sono associate a un'elevata morbilità e mortalità e la batteriemia è una potenziale complicanza [16].

Inoltre, la CAUTI da *P. aeruginosa* è associata ad alti tassi di resistenza antimicrobica, a seconda dei modelli locali di antibioticoresistenza. I dati del rapporto dell'International Nosocomial Infection Control Consortium hanno rilevato tassi di resistenza superiori al 40% per antibiotici quali fluorochinoloni, piperacillina-tazobactam e meropenem nei pazienti delle unità di terapia intensiva, anche se il rapporto rileva che questi tassi di resistenza sono superiori a quelli riportati altrove [14].

## 2.3 Antibiotico resistenza di *Pseudomonas aeruginosa*

I ceppi di *Pseudomonas* possono essere resistenti a una o più classi di antibiotici tra cui: carbapenemi, aminoglicosidi, cefalosporine, penicilline anti-*Pseudomonas* (come la piperacillina) e fluorochinoloni. I ceppi di *Pseudomonas* sono definiti multiresistenti (MDR) quando sono resistenti ad almeno tre classi di antibiotici. Nel 2018, il 32,1% degli isolati di *P. aeruginosa* segnalati nei Paesi europei era resistente ad almeno uno dei gruppi antimicrobici sotto regolare sorveglianza. [4]

Questi ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* sono tenuti sotto controllo tramite sequenziatori del DNA ad alta velocità che hanno migliorato la nostra conoscenza dell'organizzazione genomica complessiva dei ceppi e delle specie di *P. aeruginosa*. Questi progressi scientifici hanno anche portato a una tecnologia efficace per identificare e caratterizzare i cloni ad alto rischio come base per un'efficace sorveglianza ospedaliera. [17]

L'istituto superiore di sanità ha pubblicato la tabella delle resistenze di *P. Aeruginosa* in Italia nel 2022. (Figura 2) Il dato che emerge nella tabella del 2022 è una lieve diminuzione nella percentuale di resistenza dei carbapenemi.

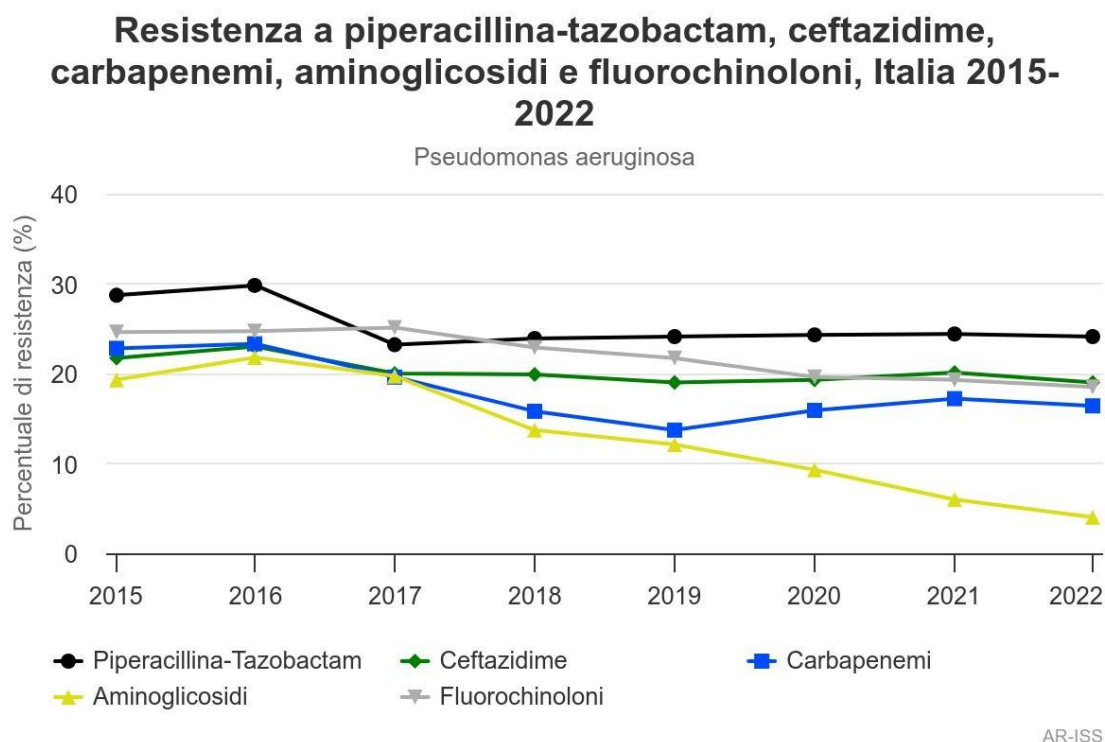
Tabella - Batteri gram-negativi: profilo di antibiotico-resistenza per *Pseudomonas aeruginosa*, Italia 2022

Classe di antibiotici	Antibiotico	Isolati (n)	R (%)	95% IC R (%)
Penicilline	Piperacillina-Tazobactam	5.893	24,1	23,0 - 25,2
Cefalosporine III/IV generazione	Ceftazidime	5.903	19,0	18,0 - 20,0
	Cefepime	5.775	17,5	16,5 - 18,5
	Ceftazidime/Avibactam	3.726	6,0	5,2 - 6,8
	Ceftolozano/Tazobactam	3.322	5,5	4,7 - 6,3
Carbapenemi	Imipenem	5.019	17,7	16,6 - 18,8
	Meropenem	5.816	9,5	8,7 - 10,3
Aminoglicosidi	Amikacina	5.855	2,7	2,3 - 3,1
	Gentamicina	818	12,6	10,4 - 15,1
	Tobramicina	3.248	6,9	6,0 - 7,8
Fluorochinoloni	Ciprofloxacina	5.943	16,2	15,3 - 17,2
	Levofloxacina	1.874	21,1	19,3 - 23,1

R=resistenza; IC=intervallo di confidenza

**Figura 2.** Tabella delle resistenze di *P. Aeruginosa* in Italia nel 2022 dell'istituto superiore di sanità

Valutando, invece, il periodo tra il 2015 e il 2022 si osserva una riduzione delle resistenze per tutti gli antibiotici tranne che per la piperacillina-tazobactam e ceftazidime, che hanno invece registrato un andamento stabile. In particolare, a partire dal 2017 si nota una riduzione costante dell'antibiotico resistenza per gli aminoglicosidi e i fluorochinoloni. [18] (Figura 3)



**Figura 3.** Tabella dell'andamento delle resistenze ad alcuni antibiotici dello *Pseudomonas aeruginosa* dal 2015 al 2022.

Il programma di sorveglianza SENTRY riporta che il 27,7 e il 23,7% di polmoniti o batteriemie di *P. aeruginosa*, rispettivamente, erano MDR. Gli isolati MDR sono stati isolati più frequentemente dall'America Latina, seguita da Europa, Nord America e Asia. Purtroppo, nessun sito africano è incluso nel programma SENTRY. [19]

La riduzione della pressione selettiva verso questi ceppi resistenti viene combattuta non solo con la ricerca di nuove terapie ma anche con l'aumento della consapevolezza dei principali errori legati all'insorgenza di questo fenomeno.

L'uso razionale degli antibiotici, noto anche come “Antibiotic Stewardship” è un concetto chiave per combattere l'antibiotico resistenza. Si riferisce a un approccio mirato a garantire che gli antibiotici vengano utilizzati solo quando necessario e in modo appropriato. Questo concetto include sia il medico che il paziente.

Il medico viene coinvolto con la scelta dell'antibiotico corretto, che deve essere fatta attraverso le linee guida di trattamento. Nella scelta corretta della dose e nella durata di terapia. Un metodo che può tornare molto utile è quello del monitoraggio e feedback: con i quali i medici possono confrontare i loro dati con modelli di prescrizione della best practice.

Molti studi dimostrano che un miglioramento della comunicazione tra medico e paziente e una maggiore consapevolezza del pubblico sui rischi dell'uso improprio di questi farmaci, porta a un'ottimizzazione delle terapie.

I pazienti in questo ambito vengono coinvolti con un aumento dell'educazione sanitaria. Le principali cause di non aderenza dei pazienti alla terapia antibiotica sono: l'interruzione precoce della cura una volta che ci si sente meglio, l'assunzione di dosi sbagliate o la dimenticanza di alcune somministrazioni, la cattiva comprensione delle indicazioni terapeutiche e una scarsa percezione del rischio associato. Il comportamento del paziente è influenzato da fattori come la durata della terapia, la presenza di effetti collaterali e la via di somministrazione del farmaco.

Il questionario di Morinsky-Green è uno degli strumenti utilizzati in questi studi per misurare l'aderenza dei pazienti alle terapie farmacologiche. È un questionario semplice, composto da 4 o 8 domande, che valuta il comportamento del paziente riguardo all'assunzione dei farmaci, individuando se ci sono stati errori o omissioni nella terapia.  
[20, 21]

## **2.4 Principali meccanismi di resistenza**

*Pseudomonas aeruginosa* mostra resistenza a un'ampia varietà di antibiotici, inclusi aminoglicosidi, chinoloni e  $\beta$ -lattamici. I principali meccanismi che *P. aeruginosa* utilizza per contrastare gli antibiotici possono essere classificati in: resistenza intrinseca, acquisita e adattativa.

La resistenza intrinseca, si riferisce alla sua innata capacità di diminuire l'efficacia di uno specifico antibiotico attraverso caratteristiche strutturali o funzionali intrinseche e include la bassa permeabilità della sua membrana esterna, l'espressione di pompe di efflusso e la produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici.

La resistenza acquisita può essere ottenuta mediante trasferimento orizzontale di geni di resistenza o cambiamenti mutazionali.

La resistenza adattativa comporta la formazione di biofilm che funge da barriera alla diffusione per limitare l'accesso degli antibiotici alle cellule batteriche. [22]

Questo battere possiede una notevole resistenza intrinseca a diversi antibiotici e può acquisire resistenza attraverso mutazioni cromosomiche e l'acquisizione di geni che gli conferiscono resistenza antibiotica. Ha uno dei genomi batterici più grandi e possiede un assortimento significativo di geni acquisiti tramite trasferimento genico orizzontale, che sono spesso localizzati all'interno di integroni ed elementi genetici mobili, come: trasposoni, sequenze di inserzione, isole genomiche, fagi, plasmidi ed elementi integrativi e coniugativi.

Questa diversità genomica determina una struttura di popolazione non clonale, dove emergono alcuni cloni specifici associati a morbilità e mortalità significative in tutto il mondo, i cosiddetti cloni ad alto rischio. [23]

I principali meccanismi di antibioticoresistenza sono:

### **2.4.1 Produzione di Enzimi Inattivanti:**

Le  $\beta$ -lattamasi prodotte da *Pseudomonas aeruginosa* sono diverse e includono: le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e le metallo-beta-lattamasi (MBL). Le ESBL possono idrolizzare una vasta gamma di antibiotici beta-lattamici, comprese penicilline e

cefalosporine di terza generazione. Le MBL, come l'enzima VIM-2 (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase), sono in grado di degradare anche i carbapenemi, spesso utilizzati come ultima risorsa contro le infezioni batteriche più gravi.

E le Aminoglicosidasi, enzimi modificanti gli aminoglicosidi (AME) come acetiltransferasi, fosfotransferasi e nucleotidiltransferasi che ne alterano la struttura riducendone la loro capacità di legarsi al ribosoma batterico. [24, 25]

#### **2.4.2 Alterazioni delle Porine**

Le porine sono proteine che formano canali situati nella membrana esterna delle cellule batteriche Gram-negative che consentono il passaggio di nutrienti e antibiotici. In *Pseudomonas aeruginosa*, la riduzione dell'espressione delle porine, come OprD, porina specifica per il trasporto dell'imipenem, ne determina la riduzione dell'ingresso rendendo l'antibiotico inefficace. Questo meccanismo, insieme a quello della produzione della VIM-2, è quindi particolarmente preoccupante poiché va a colpire una delle classi più efficaci di antibiotici di cui disponiamo, i carbapenemi. [26]

#### **2.4.3 Pompe di Efflusso**

*Pseudomonas aeruginosa* possiede numerose pompe di efflusso che contribuiscono alla sua resistenza agli antibiotici. È una delle principali forme di resistenza di questo battere. Le pompe di efflusso sono complessi proteici che espellono attivamente vari antibiotici dalla cellula batterica, diminuendone la concentrazione intracellulare e permettendo al batterio di sopravvivere. Il sistema MexAB-OprM è una delle pompe di efflusso più studiate in *P. aeruginosa*. È costituito da tre componenti: MexA (un accoppiatore di membrana), MexB (una proteina trasportatrice di membrana interna) e OprM (una porina di membrana esterna). Questo sistema è in grado di espellere una vasta gamma di antibiotici, inclusi beta-lattamici, chinoloni, tetracicline e cloramfenicolo, contribuendo alla multi drug resistance (MDR). [27]

#### **2.4.4 Modifiche del Sito Bersaglio**

*Pseudomonas aeruginosa* ha sviluppato resistenze attraverso mutazioni nei geni che codificano per i bersagli degli antibiotici. Per fare un esempio abbiamo la resistenza ai fluorochinoloni, che inibiscono gli enzimi DNA-girasi e topoisomerasi IV, essenziali per

la replicazione del DNA batterico. Mutazioni nei geni *gyrA* e *parC* che codificano rispettivamente per questi due enzimi possono ridurre l'affinità dei fluorochinoloni per i loro bersagli, rendendo questi antibiotici inefficaci. Anche le più conosciute alterazioni nelle proteine leganti la penicillina (PBP) sono un meccanismo di resistenza di questo battere. [28]

### **2.4.5 Formazione di biofilm**

Approfondirò nel prossimo capitolo la questione sul biofilm, visto che nel nostro studio è stata anche analizzata l'efficacia dei peptidi antimicrobici contro lo sviluppo di questa struttura.

### **3. BIOFILM**

Il biofilm è una comunità strutturata di microrganismi irreversibilmente incapsulati all'interno di una matrice polimerica auto sviluppata e aderente a varie superfici biotiche e abiotiche. Una volta instaurato, costituisce una modalità di crescita protetta che promuove la sopravvivenza batterica in un ambiente ostile. Anche i batteri che mancano di resistenza intrinseca o mancano di mutazioni protettive, possono diventare meno sensibili agli antibiotici quando crescono in un biofilm.

È difficile da eradicare anche con terapie antibiotiche molto aggressive a causa della sua elevata resistenza intrinseca agli agenti antimicrobici. Per questo motivo è di primaria importanza concentrarsi sullo sviluppo di nuove strategie per prevenire e trattare la formazione del biofilm. [29, 30, 31]

I meccanismi generali di resistenza mediata dal biofilm che proteggono i batteri dall'attacco degli antibiotici comprendono la prevenzione della penetrazione degli antibiotici, l'alterazione del microambiente che induce una crescita lenta delle cellule del biofilm, l'induzione di una risposta adattativa allo stress e la differenziazione cellulare persistente. [22] (Figura 4)

Il biofilm causa numerose infezioni croniche, in particolare associate a dispositivi medici come: protesi articolari, stent e cateteri urinari o venosi. Le infezioni croniche, oltre alla resistenza innata o acquisita del battere, sono anche dovute ai meccanismi di tolleranza e resistenza intrinseche del biofilm.

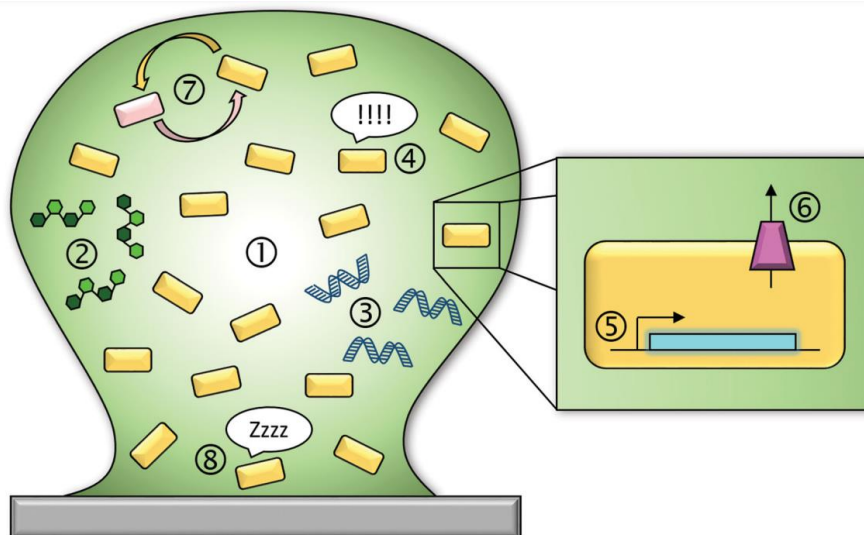
Un altro importante ostacolo per il trattamento di *P. aeruginosa* è la formazione di cellule batteriche persistenti, varianti fenotipiche che non sono geneticamente resistenti agli antibiotici ma ne tollerano alte concentrazioni. Le cellule persistenti comprendono circa l'1% delle cellule del biofilm e sono a crescita lenta, metabolicamente inattive e altamente tolleranti agli agenti antimicrobici.

Sono in grado di rimanere vitali durante la somministrazione della terapia antibiotica a causa dell'esistenza di uno stato quiescente che interrompe la sintesi dei bersagli e una volta finita la terapia possono andare a ripopolare i biofilm.

Queste cellule non proliferano in presenza di antibiotici, tuttavia riprendono la crescita una volta rimossi questi ultimi. Pertanto, si ritiene che le cellule persistenti rimanenti nel biofilm siano i principali responsabili delle infezioni croniche.

Le coppie tossina-antitossina (TA) sono le principali responsabili della formazione di cellule persistenti. I sistemi TA sono costituiti da una tossina proteica che interrompe un processo cellulare essenziale e da un'antitossina, che può essere una proteina o un piccolo RNA non codificante che inibisce la tossicità della tossina.

Inoltre, i sistemi TA sono coinvolti nella regolazione di un'ampia gamma di processi cellulari, tra cui la replicazione del DNA, la traduzione delle proteine, il mantenimento dei plasmidi e la sintesi della parete cellulare in risposta a vari stimoli ambientali. [20]



**Figura 4.** Riassunto schematico di tutti i meccanismi di resistenza e tolleranza utilizzati dai biofilm batterici. Le cellule batteriche del biofilm (rettangoli gialli) sono contenute in una matrice a forma di fungo (in verde). Il biofilm è attaccato ad una superficie (rettangolo grigio) che può rappresentare una superficie biotica o abiotica. I meccanismi di resistenza sono numerati come segue: (1) il gradiente con la quale arrivano i nutrienti è stato rappresentato con una scala di intensità di colore, in cui la porzione con meno nutrienti è il centro del fungo. (2) Matrice esopolisaccaridica, (3) Dna extracellulare, (4) risposta allo stress ossidativo (5) vie di trascrizione genica attivate dal biofilm come meccanismi di riduzione della suscettibilità agli antibiotici (6) pompe di efflusso (7) interazioni intracellulari (quorum sensing, trasferimento orizzontale di geni, etc.) e (8) cellule persistenti.

I batteri integrano, quindi, le informazioni provenienti dall'ambiente, come nutrienti, ossigeno e somministrazione di antibiotici e generano un'appropriata espressione genica adattativa che li protegge. I batteri all'interno di un biofilm sono, quindi, di diversi ordini di grandezza più resistenti agli antibiotici rispetto ai batteri planctonici. Ad oggi, non

esistono farmaci in uso clinico che abbiano come bersaglio specifico i biofilm batterici. Questo probabilmente perché fino a poco tempo fa i dettagli molecolari della formazione dei biofilm erano poco conosciuti.

Ad oggi, però, si conosce l'identità dei principali attori di questi meccanismi come: i secondi messaggeri e gli RNA regolatori. [32]

### 3.1 Biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*

Lo sviluppo del biofilm è suddiviso in cinque fasi distinte: (Figura 5)

**Fase I:** Le cellule batteriche aderiscono a una superficie tramite il supporto di appendici cellulari come flagelli e pili di tipo IV. Il movimento limitato dei flagelli è coinvolto nella biosintesi di esopolisaccaridi necessari per l'associazione del batterio alla superficie. Questa fase dell'adesione è reversibile. [33]

Gli esopolisaccaridi prodotti da *Pseudomonas aeruginosa* includono l'alginato, il Pel e il Psl e questi stabilizzano la struttura del biofilm. I mutanti carenti nella biosintesi di alginato, Pel e/o Psl, si è notato che perdono la capacità di formare questa struttura. [22]

Il Pel è un polisaccaride che ha una struttura prevalentemente glucosidica, che non solo svolge un ruolo fondamentale nella formazione del biofilm, ma è anche strettamente correlato alla produzione di alcuni meccanismi di resistenza. La Polimixina B, ad esempio, è inibita dal legame che il Pel è in grado di formare con il DNA extracellulare (e-DNA). [34]

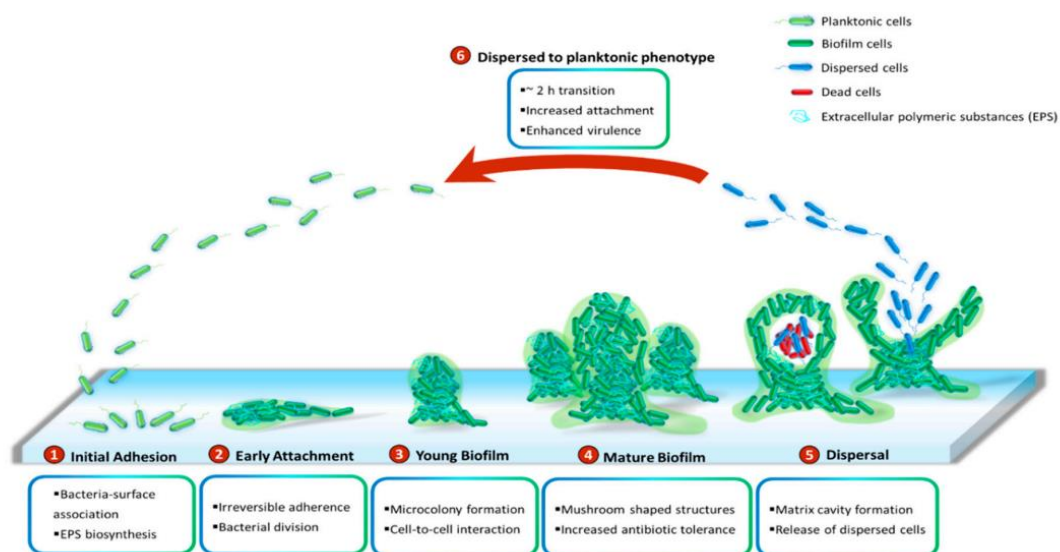
Uno studio proteomico su PAO1 wild-type ha concluso che le risposte batteriche e la formazione di biofilm sono specifiche del materiale.

**Fase II:** Le cellule batteriche passano dall'attacco reversibile a quello irreversibile.

**Fase III:** Progressione dei batteri attaccati verso un'architettura più strutturata, definita microcolonia.

**Stadio IV:** Queste microcolonie si sviluppano ulteriormente in estese strutture tridimensionali simili a funghi, un segno distintivo della maturazione del biofilm.

**Fase V:** al centro della microcolonia, la matrice viene interrotta attraverso l'autolisi cellulare, con conseguente liberazione di cellule disperse. Questo procedimento è seguito dalla transizione da modalità di crescita sessile alla modalità di crescita planctonica, per la disseminazione verso spazi non colonizzati (stadio VI), che consente al ciclo del biofilm di ripetersi. È stato recentemente dimostrato che l'endonucleasi EndA è necessaria per la dispersione del biofilm esistente attraverso la degradazione dell'eDNA. [33]



**Figura 5.** Ciclo di sviluppo di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*.

L'eDNA rilasciato dalle cellule lisate è un altro componente importante della matrice del biofilm, che facilita l'adesione iniziale cellula-cellula e l'aggregazione sulle superfici. Una nuova funzione dell'eDNA di *P. aeruginosa* è stata identificata, poiché è stato dimostrato che acidifica l'ambiente e induce l'espressione di geni regolati attraverso due componenti: PhoPQ e PmrAB, portando ad un notevole aumento della resistenza agli aminoglicosidi. [22]

Lo sviluppo dei biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* richiede un coordinamento delle singole cellule all'interno delle comunità batteriche e per questo utilizza molteplici vie di trasduzione del segnale interconnesse tra loro, note come quorum sensing (QS). Queste vie che consentono ai batteri di comunicare tra le singole cellule e di orchestrare un comportamento collettivo è essenziale per l'adattamento e la sopravvivenza. Il batterio entra in modalità QS in risposta a variazioni della densità cellulare o a stress ambientali.

Il QS comporta la produzione, secrezione e accumulo di molecole di segnalazione chiamate autoinduttori (AI), la cui specificità e concentrazione sono percepite dai regolatori trascrizionali, con conseguente espressione di specifici set di geni su scala di popolazione.

Oltre allo sviluppo del biofilm, il QS è stato collegato alla regolazione di altri processi fisiologici, tra cui la produzione di fattori di virulenza, la tolleranza allo stress, la regolazione metabolica e le interazioni ospite-microbo.

Pertanto, la comprensione e il controllo di questi sistemi di comunicazione chimica potrebbero portare a nuovi obiettivi per trattamenti alternativi o complementari agli antimicrobici e agli antibiotici convenzionali. [33]

*Pseudomonas aeruginosa* subisce numerosi cambiamenti fisiologici e fenotipici durante la formazione del biofilm. Ad esempio, il flagello di *P. aeruginosa* è fondamentale per l'inizio della formazione del biofilm, tuttavia, dopo l'adesione alla superficie, *P. aeruginosa* sottoregola significativamente l'espressione del flagello e può anche perderlo permanentemente a causa di mutazioni genetiche, riducendo così l'attivazione della risposta immunitaria dell'ospite, consentendo al patogeno l'elusione del sistema immunitario e la fagocitosi.

Negli ultimi anni, sono stati fatti numerosi passi avanti nella conoscenza dei geni e dei meccanismi di resistenza attuati dai biofilm batterici. Ad esempio, uno studio di Sadovskaya et al. (2010), ha identificato una famiglia di  $\beta$ -(1, 3) -glucani ciclici glicerofosforilati secreti da *P. aeruginosa* nella matrice del biofilm extracellulare, come responsabili dell'interazione e del sequestro della canamicina.

Mentre un gruppo di ricerca dell'Università di Ottawa ha identificato diversi nuovi geni, tra cui *ndvB*, PA14\_40260-40230 e *tssC1*, nell'isolato clinico PA14 di *P. aeruginosa*, che non solo influenza la formazione del biofilm, ma ha un impatto sulla resistenza agli antibiotici specifica di questa struttura.

Nello specifico, il gene *ndvB* codifica per una glucosiltransferasi importante per la sintesi dei glucani ciclici  $\beta$ -(1, 3) -periplasmatici che interagiscono fisicamente con la tobramicina e la sequestrano nel periplasma prima del raggiungimento del suo sito d'azione.

Il gene PA14\_40260-40230 fa parte di un operone che codifica per una pompa di efflusso e la cancellazione di questo operone in *P. aeruginosa* ha comportato una diminuzione della resistenza del batterio alla gentamicina e alla ciprofloxacina nel biofilm.

IL *tssC1* è un gene coinvolto nella secrezione di tipo VI, ed è altamente espresso nel biofilm. La rimozione di questo gene causa una riduzione della resistenza alla tobramicina, gentamicina e ciprofloxacina, antibiotici comunemente usati nel trattamento di *P. aeruginosa*. [22]

I biofilm prematuri possono essere trattati più efficacemente con gli antibiotici rispetto ai biofilm maturi. Tuttavia, l'inefficienza nel diagnosticare i biofilm prematuri nell'organismo è la ragione principale dell'insorgere di condizioni cliniche, che sono per lo più legate alla forma matura dei biofilm.

I biofilm sono responsabili quindi di un'ampia gamma di malattie croniche e, a causa dell'emergere della resistenza agli antibiotici nei batteri, è diventato davvero difficile trattarli efficacemente. Inoltre, il corretto trattamento di queste infezioni correlate ai biofilm necessita di concentrazioni minime inibitorie (MIC) e concentrazione minima battericida (MBC), maggiori, che possono essere la causa di tossicità in vivo.

Per questo motivo, è di fondamentale importanza progettare o selezionare molecole anti-biofilm, che possono includere composti attivi vegetali, agenti chelanti, antibiotici, composti chimici di sintesi e i peptidi antimicrobici. Negli ultimi anni si stanno studiando quindi in maniera più approfondita le loro strutture chimiche, il meccanismo d'azione e le rispettive MIC, MBC, concentrazioni minime di inibizione del biofilm (MBIC) e valori di concentrazione inibitoria semimassimale (IC<sub>50</sub>).

Le diverse modalità d'azione delle molecole anti-biofilm sono l'inibizione attraverso l'interferenza nelle vie del quorum sensing, il blocco dell'adesione, l'interruzione del DNA extracellulare, delle proteine, dei lipopolisaccaridi, degli esopolisaccaridi e dei messaggeri secondari coinvolti in varie vie di segnalazione. Occorre inoltre garantire che la concentrazione minima efficace di queste molecole sia in grado di eradicare le infezioni da biofilm con la massima potenza senza provocare effetti collaterali negativi sull'ospite. [35]

## 4. PEPTIDI ANTIMICROBICI

### 4.1 Scoperta e caratteristiche molecolari

I peptidi antimicrobici (AMP) sono molecole presenti in tutte le forme di vita e sono una componente indispensabile del sistema immunitario innato. Sono costituiti prevalentemente da peptidi cationici corti con un'ampia varietà di strutture e bersagli. Data la resistenza sempre crescente di vari agenti patogeni alle terapie antimicrobiche esistenti, gli AMP hanno recentemente suscitato un vasto interesse come potenziali agenti terapeutici. [36]

Il primo AMP, la gramicidina, è stato scoperto nel 1939 dal batterio del suolo *Bacillus brevis* e ha mostrato attività antibatterica in vitro e in vivo contro molti batteri Gram-positivi. [37] La maggior parte degli AMP sono oligopeptidi da 5 a 100 aminoacidi con una carica netta positiva (in genere da +2 a +11) e una percentuale significativa (in genere il 50%) di residui idrofobici [38].

Nei mammiferi sono attivi contro un'ampia varietà di microbi, tra cui batteri, funghi, protozoi unicellulari e virus. I meccanismi d'azione sono diversi e generalmente si traducono nell'uccisione diretta dell'agente patogeno, sebbene alcuni possano anche uccidere indirettamente, modulando le risposte immunitarie dell'ospite [39]. Gli AMP sono suscettibili di mutagenesi e ingegneria peptidica, proprietà che hanno già portato alla produzione di numerosi composti con maggiore bioattività e ridotta citotossicità [40].

La lunghezza dell'AMP è fondamentale per garantire l'attività antimicrobica e litica della membrana di queste molecole. Hanno tutte la tendenza a formare strutture secondarie come  $\alpha$ -eliche e foglietti  $\beta$ , che risulta essere essenziale per garantirne l'attività. L'efficacia dei peptidi si riduce in maniera direttamente proporzionale al diminuire della loro lunghezza.

Gli AMP possono essere classificati in base alla loro idrofobicità, cioè alla proporzione contenuta in ciascuna molecola di aminoacidi idrofobici. I peptidi privi di residui idrofobici generalmente non hanno un forte attaccamento alle membrane, mentre quelli con elevata idrofobicità come la gramicidina tendono a risiedere più a lungo nelle membrane. [36]

## 4.2 Meccanismi d'azione

Una caratteristica importante che distingue gli AMP dagli antibiotici convenzionali è il loro attacco a bersagli multipli a bassa affinità, come le membrane batteriche, che si ritiene possa attenuare lo sviluppo della resistenza antimicrobica [41].

La maggior parte degli AMP sono peptidi cationici, quindi carichi positivamente contenenti residui idrofili e idrofobici alle due estremità (cioè, anfipatici). Dato che la superficie delle membrane batteriche è spesso carica negativamente, gli AMP si legano inizialmente alla superficie della membrana tramite interazioni elettrostatiche e una volta legati, le estremità idrofobe si inseriscono nel doppio strato lipidico provocando disorganizzazione della membrana e inducendo la formazione di pori toroidali (wormhole) e, infine, la morte cellulare. [42, 43, 44, 45].

Molti fattori possono influenzare la perturbazione della membrana e la rottura da parte degli AMP, ad esempio la sequenza di aminoacidi, la composizione lipidica della membrana e la concentrazione dei peptidi. Le differenze nella composizione della membrana tra cellule eucariotiche e batteriche consentono agli AMP di distinguere il bersaglio dall'ospite.

Le membrane batteriche, infatti, sono caricate negativamente a causa della presenza di gruppi fosfolipidici anionici, ad esempio fosfatidilglicerolo, fosfatidilserina, mentre le cellule eucariotiche possiedono gruppi con carica neutra, ad esempio fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina.

Inoltre, la presenza di colesterolo nelle membrane cellulari delle cellule eucariotiche è fondamentale per regolare l'attività di questi composti. Infatti, il colesterolo è in grado di interagire con gli AMP neutralizzando o riducendo la loro attività e di stabilizzare maggiormente il doppio strato fosfolipidico.

Nei batteri Gram-positivi, gli AMP devono attraversare prima la parete cellulare composta da peptidoglicano reticolato con acido lipoteicoico prima di raggiungere la membrana, mentre nei Gram negativi devono affrontare uno strato di lipopolisaccaride (LPS) seguito da una membrana esterna fosfolipidica e da uno strato di peptidoglicano legato.

Le interazioni elettrostatiche tra il peptide cationico e i componenti caricati negativamente, ad esempio il lipopolisaccaride nei Gram-negativi e l'acido teicoico nei Gram-positivi, sono i primi legami che si formano tra la membrana batterica e l'antibiotico.

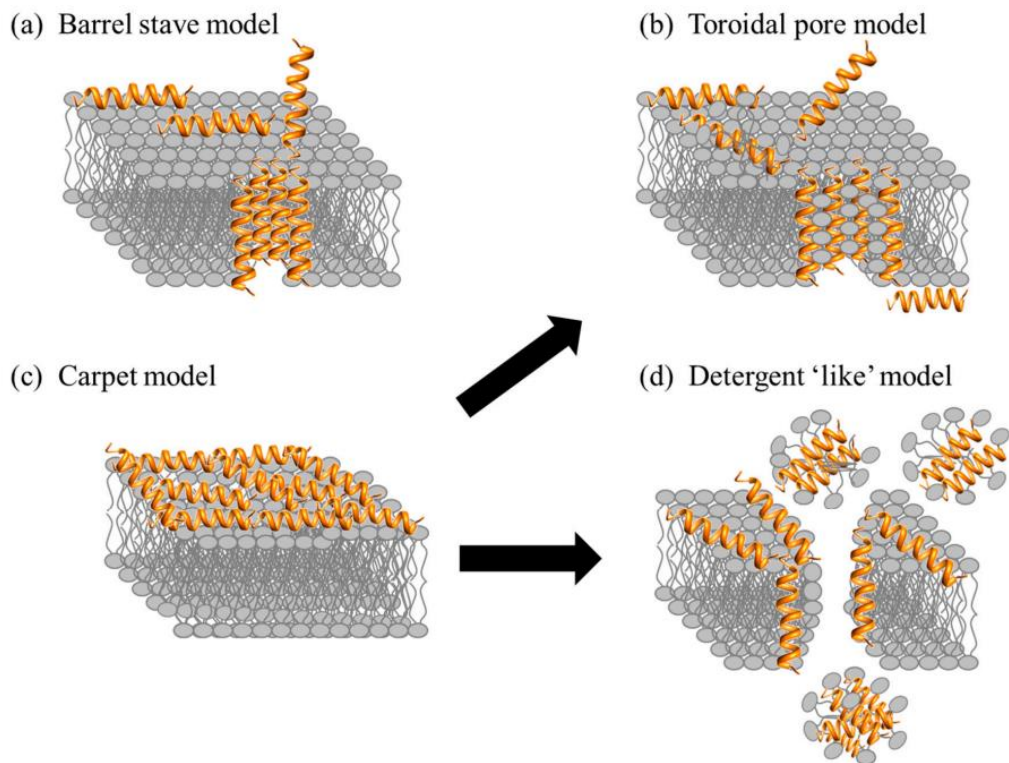
Tuttavia, mentre gli AMP sembrano attraversare facilmente lo strato di peptidoglicano e accedere alla membrana citoplasmatica dei Gram-positivi, nei Gram-negativi devono distruggere o perturbare sia la membrana esterna che quella citoplasmatica.

Per spiegare la perturbazione delle membrane fosfolipidiche degli AMP sono stati proposti tre modelli principali: carpet-like, barrel-stave e poro toroidale. (Figura 6)

Generalmente, quando il rapporto peptidi/lipidi è basso, gli AMP interagiscono con lo strato fosfolipidico della membrana in modo parallelo, definito carpet-like. L'interazione tra i peptidi o la penetrazione nel nucleo idrofobo del doppio strato lipidico, non hanno luogo. L'integrità della membrana viene interrotta e si formano micelle come in un processo simile al contatto con un detergente.

All'aumentare del rapporto peptidi/lipidi gli AMP, si spostano verso un orientamento perpendicolare fino a raggiungere una concentrazione tale da poter attraversare la membrana formando veri e propri pori.

Nel modello barrel-stave, l'interazione tra i peptidi è un prerequisito per l'azione poiché si dispongono imitando la formazione di un poro transmembrana, mentre, nel caso del modello del poro toroidale, i peptidi sono disposti in modo più approssimativo. Questi due ultimi modelli sono molto simili tra loro e spesso si possono manifestare contemporaneamente. La caratteristica distintiva del modello del poro toroidale rispetto al poro barrel-stave è che in quest'ultimo viene mantenuta la disposizione idrofobica e idrofila dei lipidi, mentre nei pori toroidali la disposizione idrofobica e idrofila del doppio strato è interrotta.



**Figura 6.** Modelli di meccanismo di azione dei vari peptidi antimicrobici. (a) modello poro barrel-stave, (b) modello poro toroidale, (c) modello carpet-like, (d) modello detergente simile con micelle.

Alcuni AMP hanno dimostrato la loro efficacia legando alcuni componenti e recettori sul lato extracellulare della membrana e della parete, destabilizzando così la permeabilità e/o attivando vie di segnalazione intracellulare che hanno, come risposta, l'inibizione o l'attivazione di diverse funzioni.

Un esempio interessante è rappresentato dal legame con i recettori Toll-like e dalla conseguente amplificazione della risposta infiammatoria tramite cascata di NF- $\kappa$ B seguita dall'attivazione del sistema immunitario verso patogeni microbiologici.

Altri peptidi antimicrobici riescono ad entrare nel citosol attraverso la penetrazione diretta o l'endocitosi (sia micropinocitosi che mediata dai recettori). Lì possono influenzare diversi enzimi e intermedi coinvolti in processi fondamentali per la vita cellulare.

Altri meccanismi utilizzano l'inibizione degli enzimi coinvolti nella biosintesi del DNA/RNA. Ad esempio, la DNA topoisomerasi I, che impedisce il rilassamento del

DNA, il blocco della RNA polimerasi, con conseguente blocco della trascrizione o la compromissione della girasi nel superavvolgimento del DNA. In seguito ad alcuni di questi meccanismi viene indotta la degradazione del DNA/RNA e di conseguenza anche la morte cellulare.

Esistono numerosi meccanismi descritti relativi all'inibizione della sintesi proteica che alterano la trascrizione e la traduzione ma anche il corretto ripiegamento e la degradazione delle proteine.

Di solito, gli AMP che agiscono sulla sintesi proteica prendono di mira le subunità ribosomiali. Ma altri possono interferire con l'incorporazione di istidina, uridina e timidina, le vie di sintesi degli aminoacidi, i fattori di rilascio sul ribosoma, la regolazione dei fattori sigma, il trasporto dei nucleotidi e dei coenzimi e la degradazione delle proteine associate alla replicazione del DNA.

Alcuni peptidi influenzano il ripiegamento delle proteine, in particolare il DnaK, la maggiore Hsp70 della via chaperonine dell'*Escherichia coli*, che è stato visto essere un bersaglio ottimale.

Un altro approccio è legato all'inibizione delle metalloproteasi della matrice, enzimi essenziali nella crescita e nell'omeostasi delle cellule microbiche, vale a dire la serina proteasi, la proteasi tripsina-like, l'elastasi e le chimotripsine.

Esistono anche inibitori della divisione cellulare che bloccano la replicazione del DNA ovvero i meccanismi essenziali per la riparazione dei danni al DNA, determinando poi il blocco del ciclo cellulare, nella compromissione della separazione cromosomica, nella mancata settazione, nell'alterazione dell'attività mitocondriale e in un cambiamento sostanziale della morfologia cellulare con blebbing ed allungamento ben visibili verso una forma filamentosa.

La sintesi della parete cellulare è un altro obiettivo. Alcuni AMP agiscono sul lipide II sequestrandolo dal sito funzionale. Oppure legano i residui D-Ala-D-Ala impedendone l'aggiunta di N-acetilglucosamina e N-acido-acetilmuramico nella struttura, da cui deriva un blocco nell'allungamento del peptidoglicano.

Altri peptidi hanno mostrato attività antimicrobica attivando enzimi litici associati alla parete cellulare. Ad esempio, alcuni AMP legano gli acidi teicoico e teicuronico che

normalmente sarebbero legati alle amidasi. Il mancato legame con queste molecole determina il rilascio di amidasi che stimolano l'attivazione dell'autolisina portando la cellula a una lisi prematura.

Inoltre, anche il lipopolisaccaride (LPS) è un componente della membrana ma, una volta rilasciato, svolge anche un ruolo di endotossina, in grado di innescare una risposta proinfiammatoria eccessiva.

Gli AMP che legano e neutralizzano l'LPS evitano l'eccessiva stimolazione del sistema immunitario favorendo una corretta ed equilibrata risoluzione dell'infezione. [46]

### **4.3 Classificazione molecolare**

La classificazione basata sulla struttura divide gli AMP in quattro gruppi distinti in base ai tipi di strutture secondarie presenti, vale a dire (1)  $\alpha$ -elicoideale, (2) fogli  $\beta$  (almeno due), (3)  $\alpha\beta$ , e (4) non- $\alpha\beta$ .

#### **4.3.1. AMP ad $\alpha$ -elica:**

Queste sono le molecole più studiate come la cecropina, pleurocidina, melittina, magainina e moricina. Gli AMP ad  $\alpha$ -elica sono i più abbondanti in natura e sono stati isolati in numerose specie, tra cui piante, insetti, anfibi, pesci e mammiferi.

Diversi studi hanno rivelato che la struttura  $\alpha$ -elicoideale di questi AMP dipende fortemente dall'interazione con le membrane bersaglio. La struttura e l'attività delle  $\alpha$ -eliche anfipatiche sono ben caratterizzate dalla formazione di un poro transmembrana. Le  $\alpha$ -eliche formano fasci nella membrana in cui la regione idrofobica interagisce con il nucleo lipidico della membrana e la regione idrofila punta verso l'interno, risultando in un poro. Le  $\alpha$ -eliche sono spesso ricche di Leu, Ala, Gly e Lys. [36]

#### **4.3.2. AMP $\beta$ -foglietto**

Questa classe comprende AMP come le protegrine (della famiglia delle catelicidine), le defensine e le tachiplesine.

Gli AMP  $\beta$ -foglietto sono costituiti da almeno due filamenti  $\beta$  con molte strutture lineari che adottano una conformazione a forcina  $\beta$ . La maggior parte dei membri di questa famiglia contengono residui conservati di cisteina che formano ponti disolfuro

fondamentali per la loro conformazione e funzione. Ad esempio, i legami disolfuro nelle defensine forniscono stabilità strutturale e riducono la degradazione mediata dalle proteasi. L'attività antimicrobica è solitamente attribuita ai residui cationici e alle catene laterali idrofobe esposte sui fogli  $\beta$  antiparalleli. [47, 48]

Le defensine costituiscono il gruppo principale di AMP del foglio  $\beta$  e possono essere ulteriormente classificate in sottofamiglie in base alla posizione dei legami disolfuro. Questo gruppo di peptidi è spesso ricco di Leu, Ala, Gly e Lys. [36]

### **4.3.3. AMP $\alpha\beta$**

Questa classe di AMP contiene sia eliche  $\alpha$  che foglietti  $\beta$  e interagisce fortemente le membrane.

I membri più importanti sono le defensine di piante e insetti che hanno attività antifungina dovuta alle interazioni con gli sfingolipidi delle membrane fungine o con le membrane microsomiali.

I peptidi di questa classe agiscono diversamente in base alla loro struttura terziaria, possono ad esempio influenzare il ciclo cellulare, attivare vie di segnalazione che determinano l'accumulo di sostanze reattive dell'ossigeno, con conseguente morte cellulare o di interagire con bersagli intracellulari, determinando l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno. [36]

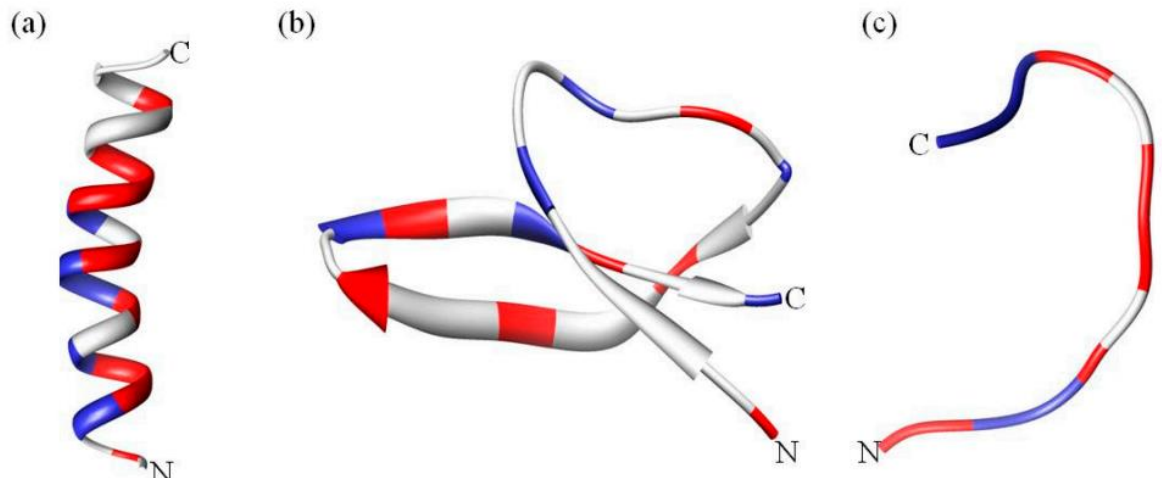
### **4.3.4. AMP non $\alpha\beta$**

Gli AMP non  $\alpha\beta$ , chiamati anche peptidi estesi o ad anello, mancano sia della struttura ad  $\alpha$ -elica che di quella a foglietto  $\beta$  e sono classificati come peptidi ricchi di triptofano, ricchi di prolina e ricchi di glicina.

Molti peptidi ricchi di triptofano hanno una conformazione anfipatica, costituita da una regione centrale ricca di triptofano essenziale per l'ancoraggio dei peptidi.

I peptidi ricchi di prolina sono lunghi 15-39 residui e agiscono su bersagli intracellulari. Studi recenti hanno dimostrato che questi peptidi adottano una struttura non  $\alpha\beta$  che blocca il tunnel ribosomiale, impedendo così l'ingresso dell'aminoacil tRNA nell'A-site.

I peptidi ricchi di glicina si trovano in una varietà di specie di insetti e tipicamente hanno un peso molecolare compreso tra 8 e 30 kDa. [36]



**Figura 7.** Diversità strutturale dei peptidi antimicrobici (AMP). (a) una struttura elicoidale  $\alpha$ , (b) un foglietto  $\beta$ , come la defensina umana 5 e (c) peptide esteso, come l'indociclina. I residui idrofobici sono stati colorati in rosso, mentre i residui blu rappresentano i residui carichi positivamente. Infine, sono indicati i terminali N e C.

#### **4.4 Evoluzione molecolare sintetica dei peptidi antimicrobici**

Più di 3200 AMP sono elencati nel file Database dei peptidi antimicrobici (APD3), ma solo alcuni di essi sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense a causa della loro tossicità, degli effetti fuori bersaglio e della scarsa efficacia in vivo e riproducibilità tra diversi laboratori.

L'applicazione degli AMP approvati dalla FDA è stata in gran parte limitata ai farmaci topici e molti AMP sono ancora in studi preclinici o clinici. D'altro canto, tra il 1999 e il 2019 sono stati approvati dalla FDA 57 composti su 555 nuove molecole, suggerendo che gli AMP costituiscono potenzialmente un ampio serbatoio di antibiotici per il trattamento delle infezioni batteriche resistenti ai farmaci.

La maggior parte degli AMP è stata identificata negli anfibi, nei mammiferi, negli insetti, nei batteri e nei funghi. La loro ubiquità riflette la naturale attività antimicrobica del sistema immunitario innato di questi organismi. Gli esseri umani esprimono anche peptidi di difesa dell'ospite come protezione contro le infezioni microbiche.

Tuttavia, gli AMP estratti da fonti non umane, ad esempio veleno di insetti o secrezioni cutanee di anfibi, possono provocare infiammazioni e risposte immunitarie, oppure possono essere tossici o avere bassa potenza o scarsa stabilità in vivo. Se si vogliono sviluppare peptidi per le loro proprietà terapeutiche e il potenziale uso clinico, queste limitazioni dovranno essere superate. Sono stati necessari, quindi, nuovi strumenti per la scoperta e l'ingegnerizzazione di peptidi antimicrobici più efficaci.

Si definisce con il termine "evoluzione molecolare sintetica" tutti quei procedimenti che includono approcci chimici o biologici volti alla sintesi di antibiotici ingegnerizzati.

I peptidi ottenuti mediante evoluzione molecolare sintetica possono essere classificati per motivo di sequenza, struttura secondaria, idrofobicità, carica netta, distribuzione di carica e lunghezza, nonché per attività. [49]

I meccanismi di azione dei peptidi antimicrobici sintetici sono gli stessi che sono stati descritti precedentemente. [46]

Recentemente è stata segnalata l'attività inibitoria degli AMP sul biofilm.

Il biofilm, essendo costituito da una matrice extracellulare composta principalmente da polisaccaridi, fornisce virulenza, persistenza e resistenza ai farmaci alla comunità microbica. I meccanismi anti-biofilm sono molto simili a quelli mirati alla membrana, sono molto diversi tra loro e dipendenti dalla sequenza molecolare.

Gli AMP potrebbero prevenire la formazione del biofilm influenzando l'adesione cellulare o potrebbero agire sul biofilm preformato interrompendone il quorum sensing, disperdendo le cellule al suo interno, o influenzando l'espressione dei geni correlati.

È stata anche ipotizzata una destabilizzazione dell'architettura della matrice che compromette la secrezione o l'interazione tra i polimeri della matrice.

L'indebolimento del biofilm aumenta la suscettibilità del patogeno agli AMP o agli antibiotici convenzionali; pertanto, anche un'azione sinergica potrebbe essere interessante per scopi clinici. [46]

Un altro obiettivo è la guanosina pentaosfato, che è una delle molecole prodotte dal biofilm in condizioni di stress. [50]

## **4.5 Studi clinici sui peptidi antimicrobici**

Ad oggi già trovano impiego in diversi tipi di infezione, mentre molte altre sono ancora in fase di studio. Alcune di queste molecole sono riuscite ad arrivare anche in fasi molto avanzate.

I principali ambiti di studio che ad oggi stanno avendo più successo sono:

### **4.5.1 Infezioni oculari**

Si sta studiando la defensina  $\alpha$  di coniglio (NP-1), ad esempio, contro molte infezioni oculari, come ad esempio *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* e *Candida albicans*. Altre molecole che risultano avere un'ottima efficacia sono quelle che derivano dalla cecropina come SHIVA-11 ed Hecate.

### **4.5.2 Infezioni del sangue**

rBPI21 e opebacan hanno trovato impiego in ambito pediatrico. Si è vista la loro efficacia nella prevenzione delle infezioni nelle operazioni a cuore aperto. Si è notato anche un effetto benefico nei pazienti grandi ustionati.

Il peptide più avanzato MBI-226 è studiato, ad oggi, per la sua efficacia nel contrastare le infezioni ematiche correlate a catetere e si trova in alcune sperimentazioni cliniche di fase III. Questo peptide sta ottenendo grandi risultati negli studi preclinici, ad esempio si è notata la sua efficacia nel ridurre le infezioni grazie alla riduzione della colonizzazione cutanea da parte dei principali batteri responsabili delle batteriemie correlate a catetere. La sua efficacia non si limita al mondo batterico ma è anche notevole contro i funghi, tra cui *Candida albicans*, nella pelle delle cavie utilizzate.

Poiché la colonizzazione del CVC è una causa comune di gravi infezioni potenzialmente letali nei pazienti ospedalizzati ed immunocompromessi, questa molecola è stata studiata su un campione di 18 volontari sani in doppio cieco. I risultati ottenuti sono stati sorprendentemente validi, infatti si è notato che era in grado di eliminare il 99,9% dei batteri cutanei e la sua azione ha dimostrato essere anche prolungata nel tempo. In questo modo sono state prevenute in tutti i casi le colonizzazioni batteriche a breve termine dei cateteri venosi centrali utilizzati.

Anche alcuni peptidi derivati dall'indolicidina come MX-226 è utilizzato nelle batteriemie catetere-correlate.

### **4.5.3 Infezioni localizzate**

In questo ambito il pexiganan, il peptide utilizzato nel nostro studio, ha trovato un campo di applicazione nella cura delle ulcere da piede diabetico. Oppure un altro composto, derivato dall'indolicidina, l'MX-594AN ha dimostrato la sua efficacia nel trattamento dell'Acne volgare.

Hanno trovato spazio anche nella cura delle stomatiti. Ad esempio, l'IB-367, una molecola derivante della protegrina-1 suina, viene utilizzata nel trattamento delle infezioni miste della bocca, effetto collaterale non poco frequente di alcune terapie antitumorali. Mentre il P113 ha dimostrato avere un'ottima efficacia in vitro su candida albicans e si pensa possa avere un futuro sulla cura delle mucositi fungine nei pazienti affetti da HIV. [49]

### **4.5.4 Infezioni virali**

Era già stata studiata la loro attività contro i virus, ma in seguito alla pandemia da Covid-19 si è iniziato a prenderli seriamente in considerazione come valide alternative terapeutiche in questo campo. I peptidi antimicrobici attivi contro i virus vengono denominati peptidi antivirali (AVP).

Una revisione narrativa del gruppo di ricerca di Urmi et al. (2023) ha raccolto tutti i dati relativi alle molecole e alle applicazioni cliniche degli AVP fino a questo momento. Secondo lo studio fino a quella data erano stati valutati 156 peptidi contro un ventaglio di 21 virus differenti. Più della metà degli studi analizzati era diretto a valutare l'efficacia di queste molecole contro il virus dell'immunodeficienza umana acquisita (HIV), dell'Herpes simplex virus (HSV) e il virus dell'epatite C (HCV). Altri due virus sui quali sono stati trovati degli studi abbastanza rappresentativi sono i coronavirus e il virus dell'influenza. [50]

Alcune tra queste molecole, in realtà, sono già state approvate nella terapia antivirale. Ad esempio, enfuvirtide, è un farmaco antivirale utilizzato nella terapia contro HIV-1. Questo peptide ingegnerizzato svolge una funzione anti-fusogena grazie al legame con le

glicoproteine 41 provocando cambiamenti conformazionali del linfocita T CD4+ che non permette l'ingresso del virus. La brilacidina, invece, tramite lo stesso meccanismo si lega e disgrega il recettore ACE-2, bersaglio del virus SARS-CoV-2, in preparati polmonari contenenti questo recettore, mostrando un'ottima efficacia in vitro.

Altri meccanismi d'azione evidenziati sono quello del P9, molecola derivante dalla  $\beta$ -defensina 4 murina, legandosi ai recettori virali del virus dell'influenza o del SARS-CoV-2 inibisce l'acidificazione endosomiale e quindi l'ingresso del virus nella cellula. [53]

## 5. PEXIGANAN

Tra le centinaia di AMP geneticamente progettati e ingegnerizzati, la magainina-2 e i suoi analoghi sono stati molto utilizzati. La magainina-2 è stata scoperta nel 1987 dopo che gli scienziati hanno scoperto che gli *Xenopus laevis*, delle rane africane, erano in grado di non contrarre infezioni dopo esser state immerse in acque piene di microbi in seguito ad aver praticato alcune incisioni nella loro cute.

Da *Xenopus laevis*, quindi, sono stati isolati due peptidi, la magainina-1 e la magainina-2. Analizzando la magainina-2 è stato scoperto che l'amminoacido 23 ha un'attività antibatterica e antimicotica ad ampio spettro.

Molti analoghi sintetici della magainina-2 sono stati sviluppati per massimizzare l'attività ad ampio spettro del peptide nella speranza di sviluppare un agente terapeutico antimicrobico clinicamente utile. [54]

Zasloff et al. hanno scoperto che la rimozione di residui aminoacidici dall'N-terminale della magainina-2 determina una perdita di attività del peptide. Anche la rimozione di residui aminoacidici dal C-terminale del peptide ha influenzato negativamente l'attività del peptide in modo significativo.

Questi risultati suggeriscono che la lunghezza minima del peptide è importante, potenzialmente a causa del suo meccanismo d'azione. Probabilmente dovuto al fatto che il peptide deve mantenere la sua struttura secondaria per poter agire efficacemente. [55]

Infatti, partendo da questo sospetto, il gruppo di Chen et al. ha valutato la struttura elicoidale del peptide come potenziale obiettivo per migliorare l'attività della magainina. La sostituzione di Glicina con Alanina, effettuata per aumentare la stabilità della struttura  $\alpha$ -elicoidale, ha portato a un miglioramento dell'attività del peptide, mentre i tentativi di interrompere l'elicità del peptide sostituendo gli amminoacidi D (acido aspartico) hanno dimostrato di diminuire l'attività del peptide.

Questi studi hanno, quindi, stabilito l'importanza della struttura secondaria del peptide nell'associazione con la membrana cellulare e per il mantenimento della loro attività antibiotica. [56]

La natura cationica del pexiganan o MSI-78 determina una struttura a spirale casuale in soluzione acquosa a causa della repulsione elettrostatica tra le catene laterali di lisina. Al momento dell'associazione con la superficie della membrana, in particolare con i gruppi di testa dei lipidi anionici, viene raggiunto un equilibrio di carica e il pexiganan assume una struttura  $\alpha$ -elicoidale.

La struttura ad alta risoluzione, lo stato di oligomerizzazione e l'orientamento del Pexiganan associato alla membrana sono stati studiati mediante spettroscopia NMR. L'interfaccia del dimero è una “cerniera di fenilalanina”, in quanto composta da tre catene laterali di fenilalanina per elica. Anche i residui di leucina e isoleucina vicino ai terminali delle eliche si impacchettano insieme all'interfaccia del dimero.

L'importanza dei tre residui di fenilalanina nell'auto-associazione del Pexiganan è confermata dal fatto che l'MSI-594, che manca di questi residui, non oligomerizza in un ambiente di membrana.

Sono stati condotti studi approfonditi in vitro per determinare la concentrazione minima inibitoria del pexiganan per una vasta gamma di microbi. Le principali categorie di microbi di interesse come potenziali bersagli del pexiganan comprendono sia batteri aerobi che anaerobi, nonché batteri Gram positivi e Gram negativi. Valutando i valori di MIC ottenuti per il Pexiganan da due fonti con i dati comparativi per l'ofloxacina, il farmaco approvato dalla FDA e utilizzato come trattamento di confronto negli studi clinici di fase III del Pexiganan, mostrano chiaramente l'efficacia e l'attività ad ampio spettro del Pexiganan in vitro.

Inoltre, i tentativi di generare resistenza nei batteri mediante trattamenti ripetuti a concentrazioni subinibitorie del peptide non hanno avuto successo. È importante notare come *S. aureus*, un batterio che ha sviluppato rapidamente una resistenza multipla agli attuali composti antimicrobici, tra cui la meticillina e la vancomicina, è stato incluso in questi tentativi e non ha mostrato alcuna resistenza al Pexiganan.

La struttura ad alta risoluzione, il ripiegamento e la topologia (o orientamento della membrana) di un'AMP sono essenziali per comprenderne appieno le proprietà funzionali di queste molecole.

Ad esempio, l'esatto orientamento della membrana di un'AMP può fornire indicazioni sul meccanismo con cui un AMP distrugge le cellule batteriche. Esperimenti NMR allo stato solido su campioni allineati sono stati utilizzati per ottenere queste informazioni su diversi AMP. [53]

Studi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) e di spettroscopia NMR hanno individuato la formazione di pori toroidali da parte del Pexiganan nei bilayer lipidici. I risultati NMR allo stato solido di bilayer meccanicamente allineati sono stati utilizzati per determinare la geometria dei pori toroidali in presenza di pexiganan e hanno mostrato i disturbi indotti dal peptide nella regione idrofobica del bilayer lipidico e anche il comportamento detergente del peptide.

Gli effetti di assottigliamento della membrana del Pexiganan sono stati osservati visivamente utilizzando la microscopia a forza atomica (AFM). [57]

## 5.1 Studi clinici del pexiganan ad oggi

Tra gli studi clinici ad oggi disponibili sul pexiganan i campi nel quale maggiormente si indaga e sul quale si sono ottenuti i migliori risultati sono: le infezioni cutanee e dei tessuti molli, le ulcere da piede diabetico e la batteriemia. Il pexiganan è tra gli AMP più studiati per strategie di trattamento alternative, in particolare, in soluzioni topiche nelle infezioni da batteri anaerobi. [58]

Dopo due studi clinici di fase III, è stato osservato che il pexiganan non si è dimostrato più efficace di altri trattamenti disponibili per le ulcere da piede diabetico. In uno studio clinico condotto da Lipsky et al. (2008), sono stati confrontati gli effetti della somministrazione topica di pexiganan e della somministrazione sistemica di ofloxacina ed è emerso che per le ulcere da piede diabetico lievemente infette, entrambi i farmaci hanno presentato risultati clinici comparabili. [59]

Attualmente esistono solo dieci AMP approvati dalla FDA e questo elenco non comprende il pexiganan. Tuttavia, questo dato è interessante, in quanto la somministrazione topica di pexiganan è una valida alternativa alla somministrazione sistemica di antibiotici per il trattamento delle ulcere del piede lievemente infette, con il vantaggio che questo peptide, a differenza della classica terapia antibiotica sistemica, eviterebbe lo sviluppo di resistenze. Quindi la ridotta suscettibilità allo sviluppo di resistenze e l'ampio spettro di attività del pexiganan ne giustificano l'ulteriore ricerca nella terapia delle ulcere infette del piede.

Il pexiganan ad oggi è ancora in fase di studio clinico per la sua approvazione in questo ambito, ma potrebbe arrivare nel prossimo futuro. [60]

Per la sua attività antimicrobica ad ampio spettro e la sua attività verso batteri anaerobi, molto frequenti nelle infezioni di ferite cutanee o infezioni dei tessuti molli si è valutata l'incorporazione del pexiganan in un idrogel. Il gruppo di ricerca di Durão et al. (2019) ha voluto valutare, quindi, il pexiganan nel campo della guarigione delle ferite. I ricercatori hanno formato un idrogel composto dal peptide N-Fmoc-pexiganan, modificato tramite un cambiamento di pH ed NO gassoso. Il peptide in seguito alla reazione incorpora in una parte donatrice l'NO (NONOato). Questo composto, in soluzioni acquose ha dimostrato di rilasciare NO.

Per valutare l'attività antimicrobica del peptide funzionalizzato con NO sono state costruite curve time-kill, con E. coli, che hanno evidenziato una maggiore attività battericida rispetto al peptide non modificato. Il gruppo ritiene che questo effetto possa essere una conseguenza del rilascio diretto dell'NO, noto agente antimicrobico.

È stata quantificata la produzione di collagene da parte di fibroblasti cutanei umani incubati con Fmoc-PXG/NO, che ha mostrato un aumento dose-dipendente in presenza del donatore di NO in un intervallo di 0-20  $\mu$ M. Quindi anche in questo campo i risultati sono abbastanza soddisfacenti. [61]

Oltre che per i batteri ESKAPE alcuni ricercatori hanno utilizzato gli AMP e il pexiganan, in particolare, nella valutazione dell'efficacia di questo antibiotico contro H. pylori. Nel 2017, con la diffusione del ceppo MDR di Helicobacter pylori, l'Organizzazione mondiale della sanità ha inserito questo batterio nella lista dei 20 più resistenti alle terapie antibiotiche, con un tasso di eradicazione inferiore all'80% in tutto il mondo. [62]

Ad esempio, nel 2024, il gruppo di Ghazvini et al. ha valutato l'efficacia del pexiganan in conformazione di cristalli lipido-liquidi (LLC) nell'eradicare l'Helicobacter pylori nello stomaco dei topi. I risultati di questo studio hanno rivelato una riduzione dell'infiammazione gastrica nei topi che ricevevano LLC-pexiganan rispetto al placebo, con una riduzione dell'infiltrazione di cellule infiammatorie nella sottomucosa gastrica.

Le indagini in vitro e in vivo, però, dimostrano che la monoterapia LLC-pexiganan non ha il potenziale per eliminare con successo l'infezione da H. pylori. Tuttavia, i dati dimostrano che il peptide può migliorare l'efficacia dei regimi terapeutici convenzionali contro l'H. pylori. È quindi necessario fare ulteriori ricerche per valutare l'impatto del pexiganan contro questo batterio. [63]

## **6. MATERIALI E METODI**

### **6.1 Agenti antimicrobici e studio in vitro**

Il Pexiganan è stato sintetizzato mediante la chimica in fase solida dal 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc) secondo la seguente procedura:

1) Passaggi di deprotezione: delle durate di 2-20 minuti utilizzando piperidina al 20% in dimetilformammide (DMF) in presenza di Triton all'1%;

2) Reazioni di accoppiamento: sono state effettuate con l'amminoacido protetto diluito in DMF in presenza di Triton all'1% e utilizzando diisopropilcarbodiimmide (DIC) come reagente di accoppiamento in presenza di 1-idrossibenzotriazolo (HOBt) per 2 ore.

La completezza di ciascuna reazione di accoppiamento è stata monitorata mediante il test del cloranil [59]. La resina peptidilica protetta è stata trattata con la miscela: 95% acido trifluoroacetico (TFA), 2,5% acqua e 2,5% triisopropilsilano (TIS) per 2 ore. Dopo la scissione il supporto solido è stato rimosso mediante filtrazione e il filtrato è stato concentrato sotto pressione ridotta. Il peptide scisso è stato precipitato con dietil etere e liofilizzato.

Il pexiganan è stato purificato mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) su un sistema a due pompe Knauer K501. Le frazioni ottenute con purezza superiore al 97-98% sono state testate mediante HPLC. Il peptide è stato analizzato mediante ionizzazione con desorbimento laser assistito a matrice della spettrometria di massa di volo (MALDITOF).

La preparazione delle soluzioni sterili di imipenem (Merck Sharp e Dohme Italia SpA, Roma, Italia) e pexiganan è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore. La determinazione dell'intervallo MIC per ciascun ceppo è stata effettuata secondo gli standard CLSI M100, 33<sup>a</sup> edizione (2023). L'uso di questi standard garantisce che le procedure adottate siano in linea con le pratiche più recenti e accettate a livello internazionale, assicurando l'accuratezza e la comparabilità dei risultati ottenuti [61]. La sub-MIC utilizzata era 0,125, 0,25 e 0,5 del valore MIC più basso, ogni volta che veniva aggiunto un solo antibiotico alla sospensione cellulare batterica.

Queste concentrazioni non erano sufficientemente elevate da inibire la crescita batterica.

## 6.2 Preparazione del substrato

Gli stent ureterali utilizzati (Biosoft Duo, Porges-Mentore, Francia) sono stati tagliati in quadrati di 10 x 10 mm e poi immersi in una soluzione allo 0,2% di un detergente commerciale per una notte, dopo di che sono stati trasferiti in una nuova soluzione allo 0,2% di un detergente commerciale e lavati a 40°C con forte centrifugazione per 5 minuti. I quadrati sono stati, poi, risciacquati accuratamente con acqua distillata, ed in seguito risciacquati con acqua ultrapura e asciugati a 60°C, per una notte.

Per i test sul biofilm, le superfici sono state sterilizzate a caldo mediante immersione in acqua distillata e autoclavaggio a 121°C per 15 minuti.

## 6.3 Preparazione delle cellule

In questo studio abbiamo utilizzato l'isolato clinico AN207 di *P. aeruginosa*. I batteri sono stati conservati a -70°C in un mezzo di infusione cervello-cuore (Merck Italia, Milano Italia) contenente glicerolo al 20%. Abbiamo preparato, secondo le istruzioni del produttore, il brodo di soia triptico (TSB) e l'agar di soia triptico (TSA) (Oxoid SpA, Milano, Italia).

Il ceppo è stato poi inoculato prima in piastre TSA e poi trasferito in 15 ml di TSB. Il trasferimento è stato fatto da piastre contenenti il ceppo batterico da meno di due giorni. Le colture liquide sono state coltivate per 24 ( $\pm 2$ ) ore a 37°C in un agitatore orbitale a 130 giri/min.

Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione (per 5 minuti a 1000 g 4°C), sono state, poi, lavate e risospese in una soluzione salina (0,9% NaCl preparata con acqua distillata) ad una densità ottica equivalente a  $1 \times 10^9$  cellule  $\text{ml}^{-1}$ .

Questa sospensione è stata utilizzata nei test sul biofilm. Per i test di aderenza, 1 ml di questa sospensione cellulare è stato trasferito in 30 ml di TSB fresco contenente sub-MIC degli antibiotici di 0,125, 0,25 e 0,50 MIC e incubato per 18 ( $\pm 2$ ) ore a 37°C con agitazione a 130 giri al minuto.

Dopo essere state raccolte mediante centrifugazione, le cellule sono state lavate due volte e risospese in una soluzione (0,9% NaCl preparato in acqua distillata) e regolata ad una densità ottica equivalente a  $1 \times 10^9$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  e utilizzato nei test di aderenza [66, 67].

## 6.4 Valutazione dell'aderenza

Lo studio è stato eseguito secondo la procedura descritta da Cerca con alcune modifiche. In breve, i quadrati di stent ureterale sono stati posizionati in piastre di coltura tissutale a 6 pozzetti contenenti 6 ml di una sospensione cellulare ciascuna. Ogni sospensione era stata fatta crescere in presenza di sub-MIC di antibiotici e regolata ad una densità ottica equivalente a  $1 \times 10^9$  cellule/ml.

L'adesione iniziale al substrato è stata lasciata avvenire per 2 ore a  $37^\circ\text{C}$  in un agitatore a 120 giri al minuto. I controlli negativi, invece, li abbiamo ottenuti posizionando i quadrati di stent acrilici in piastre per coltura tissutale a 6 pozzetti contenenti 6 ml di batteri cresciuti in TSB fresco senza antibiotici.

Tutti i quadrati sono stati poi accuratamente lavati per immersione ed essiccati a  $37^\circ\text{C}$ . Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplice copia [63, 64]. Per l'osservazione delle immagini e l'enumerazione delle cellule batteriche aderenti, i quadrati acrilici sono stati colorati con una soluzione di safranina allo 0,2%, per contrasto. La conta batterica diretta è stata effettuata utilizzando un microscopio a contrasto di fase accoppiato ad una videocamera 3CCD. [66] Per ogni superficie analizzata sono state scattate 20 immagini. Le cellule poi sono state contate in maniera automatizzata tramite l'utilizzo di un software apposito.

## **7. ESPERIMENTI IN VITRO**

### **7.1 Valutazione del biofilm**

Per quanto riguarda gli esperimenti in vitro sul biofilm abbiamo posizionato i quadrati di stent ureterale sterilizzati in piastre contenenti una coltura tissutale a 6 pozzetti con 6 ml di TSB integrati con lo 0,25% di glucosio e la rispettiva quantità di antibiotico: 0,125, 0,25 e 0,50 MIC.

Quindi 200 µl di una soluzione di NaCl allo 0,9% contenente  $1 \times 10^9$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Poi sono stati lasciati crescere 48 ore a 37°C in un agitatore a 120 giri al minuto. Ogni otto ore il mezzo TSB contenente cellule batteriche sospese è stato rimosso e poi aggiunto un volume uguale di TSB fresco con glucosio allo 0,25% e antibiotico.

I controlli negativi sono stati ottenuti incubando le superfici in TSB integrato con glucosio allo 0,25% e antibiotici senza aggiungere cellule batteriche. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplice copia. [67]

Il biofilm è stato valutato mediante determinazioni del peso secco. Le superfici colonizzate sono state rimosse dalle piastre e poste a 80°C per tutta la notte. Il loro peso è stato determinato su una scala digitale. Le superfici sono state riposte a 80°C per altre 2 ore e pesate nuovamente, per verificare la stabilità del peso secco. Infine, abbiamo rimosso il biofilm meccanicamente dalla superficie di ciascun quadrato.

Poi abbiamo lavato accuratamente le superfici con una soluzione detergente commerciale allo 0,2%. Le superfici pulite sono state mantenute per una notte a 80°C in modo tale da poter ottenere una terza determinazione del peso.

La differenza nel peso della superficie con e senza la biomassa attaccata costituisce il peso secco del biofilm.

### **7.2 Valutazione dell'antibiotico resistenza**

Le MIC per le cellule batteriche nel biofilm formato in presenza e in assenza di concentrazioni subinibitorie di imipenem e pexiganan sono state determinate utilizzando il protocollo CLSI. [65]

In breve, il biofilm è stato raschiato dalla superficie degli stent urinari, risospeso in TSB e sonicato per 10 secondi a 20 W. I preparati sono state regolati per ottenere un inoculo cellulare standard. Poi sono state incubate in piastre per microtitolazione da 96 pozzetti con diverse diluizioni doppie di imipenem e pexiganan per 24 ore a 37°C in TSB. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

## 8. ESPERIMENTI IN VIVO

Sono stati utilizzati ratti Wistar femmine adulte (intervallo di peso da 170 a 230 g) (n = 5). Lo studio includeva un gruppo di controllo (C) senza provocazione batterica per valutare la sterilità della procedura chirurgica, un gruppo di controllo (C) infettato con *P. aeruginosa* ceppo non precedentemente trattato e due gruppi (imipenem e pexiganan) infettati da *P. aeruginosa* ceppo precedentemente trattato con imipenem o pexiganan.

Negli studi sugli animali, per ciascun antibiotico è stata scelta la concentrazione più efficace per inibire l'adesione e il biofilm. Gli esperimenti sono stati eseguiti in doppio (10 gruppi, ciascuno composto da 5 animali). Per l'analisi statistica, i dati sono stati raggruppati e riferiti a tutti i 10 animali di ciascuna coppia di gruppi.

I ratti sono stati anestetizzati mediante iniezione intramuscolare di ketamina e xilazina (30 mg/kg e 8 mg/kg rispettivamente), i peli sono stati rasati e la pelle pulita con una soluzione di iodio povidone al 10%.

La vescica è stata esposta attraverso un'incisione sovrapubica e aperta a livello della cupola. [68] Dopo la cistotomia, sono stati inseriti degli stent nella vescica. La vescica è stata suturata con 000 seta chirurgica. Dopo l'intervento chirurgico, una soluzione salina (1 ml) contenente  $2 \times 10^7$  CFU/ml dell'isolato clinico sono stati inoculati nella vescica utilizzando una siringa da tuberculina.

Gli animali, poi sono stati riportati in gabbie individuali ed esaminati approfonditamente ogni giorno. Ventiquattro ore dopo il posizionamento dello stent ureterale, sono state eseguite colture di urina attraverso un campione transvescicale prelevato con una siringa da insulina, per verificare la sterilità o l'infezione.

Gli stent ureterali sono stati espianati al giorno 5 dopo l'impianto e i batteri del biofilm sono stati enumerati come descritto [67]. Lo studio è stato approvato dal comitato etico per la ricerca sugli animali dell'INRCA, Ancona, Italia.

Il limite di rilevamento per questo metodo era di circa 10 CFU/ml.

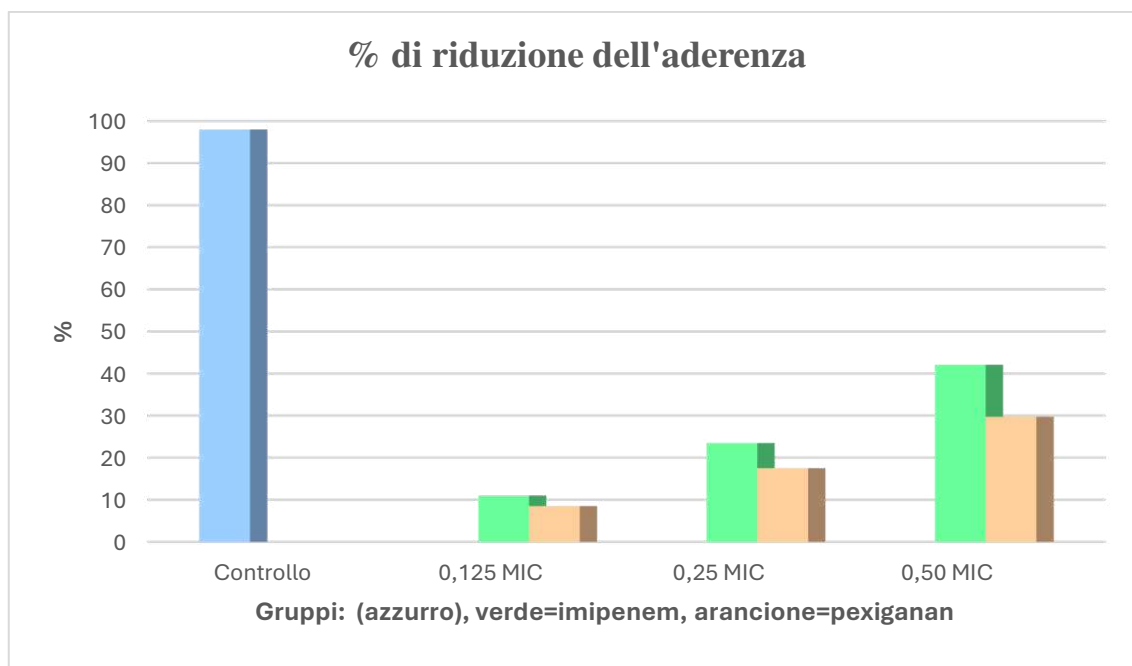
## **9. RISULTATI DEGLI ESPERIMENTI**

### **9.1 Analisi statistica**

I valori MIC sono presentati come la media geometrica di tre esperimenti separati. I risultati quantitativi riguardanti gli esperimenti in vivo sono stati presentati come varianze  $\pm$  DS della media e confrontati statisticamente tra i gruppi mediante l'analisi della varianza (ANOVA) sui dati trasformati in log con il test delle differenze significative di TukeyKramer. I dati sono stati accettati come statisticamente significativi con un valore della P value  $\leq 0,05$ .

### **9.2 Risultati degli studi in vitro**

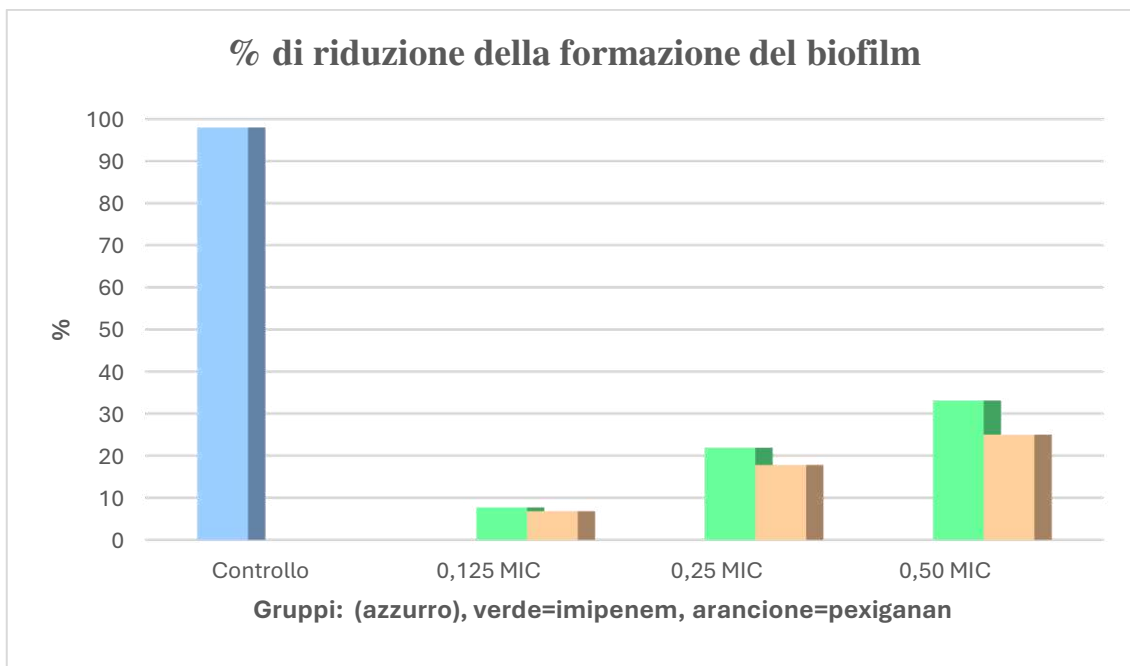
L'isolato clinico è sensibile ad entrambi gli antibiotici con MIC di 2 e 4 mg/L rispettivamente per imipenem e pexiganan. Per quanto riguarda i risultati relativi agli effetti delle sub-MIC degli antibiotici scelti, in relazione alla crescita batterica sullo stent ureterale, hanno mostrato che entrambi i composti impedivano l'adesione iniziale ad ogni concentrazione di MIC utilizzata. Sia per l'imipenem che per il pexiganan, la MIC 0,50 è risultata essere la concentrazione più efficace in grado di inibire l'adesione (Figura 8). L'imipenem è risultato l'antibiotico con la massima efficacia (riduzione media del  $42\pm 5\%$ ), mentre il pexiganan si è rivelato leggermente meno efficace, raggiungendo quasi il 30% di inibizione.



**Figura 8.** Tabelle sull'Influenza delle concentrazioni sub-MIC di imipenem e pexiganan sull'adesione di *Pseudomonas aeruginosa*. I batteri sono stati coltivati senza antibiotici (barra azzurra), con concentrazioni sub-inibitrici (0,125, 0,25 e 0,50 MIC) di imipenem (barre verdi) e con concentrazioni sub-inibitrici (0,125, 0,25 e 0,50 MIC) di pexiganan (barre arancioni).

I dati riguardanti, invece, la formazione di biofilm sulla superficie dello stent hanno mostrato similmente una buona attività di entrambi gli antibiotici. Anche in questo caso l'imipenem è risultato il composto con la maggiore efficacia. Quando si utilizzano antibiotici a 0,50 di sub-MIC entrambi gli antibiotici prevengono la formazione del biofilm. Imipenem mostra una riduzione media del  $34 \pm 8\%$  mentre il pexiganan del  $27 \pm 4\%$  (Figura 9).

Negli studi sulla resistenza agli antibiotici, è stato osservato un leggero aumento della resistenza per imipenem (mediana 1 mg/L, intervallo 1-2 mg/L) nelle cellule coltivate in presenza di questo antibiotico. Per quanto riguarda il pexiganan, invece, non è stata registrata nessuna variazione nella MIC per le colonie prese da piastre di agar contenenti questo antibiotico e le MIC delle colonie prese dall'inoculo originale. Infine, non è stata documentata alcuna resistenza incrociata.



**Figura 9.** -Influenza delle concentrazioni sub-MIC di imipenem e pexiganan sulla formazione del biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*. I batteri sono stati coltivati senza antibiotici (barra azzurra), con concentrazioni sub-inibitrici (0,125, 0,25 e 0,50 MIC) di imipenem (barre verdi) e con concentrazioni sub-inibitrici (0,125, 0,25 e 0,50 MIC) di pexiganan (barre arancioni).

### 9.3 Risultati degli studi in vivo

Il gruppo di controllo non ha dimostrato avere segni di infezione microbiologica dello stent. Il gruppo di controllo C infetto e i due gruppi imipenem e pexiganan hanno dimostrato evidenza di infezione. Tuttavia, i gruppi trattati con imipenem e pexiganan hanno mostrato risultati quantitativi della coltura significativamente inferiori a C (imipenem  $3,3 \times 10^2 \pm 0,4 \times 10^2$ , pexiganan  $5,0 \times 10^2 \pm 0,9 \times 10^2$ , gruppo di controllo  $6,8 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ ).

Diversamente, le colture di urina hanno mostrato la presenza di infezione senza differenze significative in tutti i gruppi infetti con una carica batterica pari a  $10^5$  per i gruppi C, imipenem e pexiganan.

<b>Gruppi<sup>a</sup></b>	<b>Coltura quantitativa dello stent (CFU/ml)<sup>D</sup></b>	<b>Coltura delle urine (CFU/ml)</b>
<b>Controllo C<sub>0</sub></b>	<10	<10
<b>Controllo C<sub>1</sub><sup>a</sup></b>	$6.8 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^6$	$7.5 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$
<b>Gruppo imipenem<sup>b</sup></b>	$3.3 \times 10^2 \pm 0.4 \times 10^{2e}$	$4.3 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$
<b>Gruppo pexiganan c</b>	$5.0 \times 10^2 \pm 0.9 \times 10^{2e}$	$6.2 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$

<sup>a</sup> *P. aeruginosa* non pretrattato con sub-MIC antibiotiche. <sup>b</sup> *P. aeruginosa* pretrattato con 0,50 MIC di imipenem, <sup>c</sup> *P. aeruginosa* pretrattato con 0,50 MIC di pexiganan, <sup>D</sup> il limite detettabile del metodo era  $\leq 10$  CFU/ml, <sup>e</sup> statisticamente significativo se confrontato con il gruppo di controllo e con il C<sub>1</sub>.

## 10. CONCLUSIONI

Un aspetto cruciale emerso da questa ricerca riguarda l'importanza di considerare nuove strategie terapeutiche per aggirare le ormai numerose resistenze di *Pseudomonas aeruginosa*. Il batterio, attraverso l'adozione di diverse strategie come l'alterazione delle porine, l'uso di pompe di efflusso e la modificazione dei siti bersaglio, riesce a evadere l'azione degli antibiotici convenzionali, rendendo sempre più complesso il trattamento delle infezioni associate. In questo batterio quello che più ci preoccupa è la sua elevata adattabilità agli ambienti ostili e la sua ampia diffusione negli ambienti ospedalieri. I peptidi antimicrobici sono ottimi perché hanno la capacità di interferire con più meccanismi contemporaneamente e sembra che questo batterio attualmente non abbia armi per difendersi da questo gruppo di molecole.

L'approccio multifunzionale, inoltre, dei peptidi antimicrobici, come il pexiganan, rappresenta una risposta promettente a questa sfida. La loro capacità di interagire con le membrane batteriche, di prevenire la comparsa del biofilm e di indurre la morte cellulare per numerose vie interconnesse tra di loro, riduce significativamente il rischio di sviluppo di resistenze. Inoltre, essendo estremamente versatili sono adatti a essere utilizzati in diverse formulazioni terapeutiche, incluse applicazioni topiche, che potrebbero rivoluzionare il trattamento di infezioni cutanee e infezioni dei tessuti molli.

Un ulteriore vantaggio del pexiganan risiede nella sua potenziale applicazione come agente preventivo, in grado di impedire l'insorgenza di infezioni in pazienti sottoposti a procedure mediche invasive. Gli studi condotti hanno mostrato che, il pexiganan grazie alla sua azione previene la formazione del biofilm e potrebbe essere particolarmente utile in ambito ospedaliero per ridurre le complicanze associate a infezioni nosocomiali, specialmente in pazienti immunocompromessi o con dispositivi medici.

Tuttavia, nonostante i risultati promettenti, è evidente che l'introduzione del pexiganan nella pratica clinica richiederà un'attenta valutazione dei possibili effetti collaterali e della sicurezza a lungo termine. In più il nostro studio in vivo è stato condotto su ratti Wistar, che sono spesso utilizzati perché simulano efficacemente la risposta immunitaria umana, ma comunque non sono esenti dalla limitazione del modello animale. Non è infrequente la comparsa di reazioni avverse o una ridotta efficacia di alcuni farmaci approvati su

modello animale, una volta introdotti nell'uomo, in quanto hanno due sistemi immunitari differenti.

Sarà, quindi, necessario esplorare ulteriormente il suo profilo farmacocinetico e farmacodinamico, nonché la sua interazione con altri trattamenti antimicrobici. Inoltre, l'implementazione di terapie a base di peptidi antimicrobici dovrà essere accompagnata da strategie di monitoraggio per prevenire l'insorgenza di eventuali resistenze, assicurando così la sostenibilità delle nuove terapie nel tempo.

Il futuro della ricerca in questo campo dovrà anche concentrarsi sull'identificazione di nuove combinazioni terapeutiche, in cui il pexiganan possa essere utilizzato insieme ad altri agenti antimicrobici per potenziare l'efficacia del trattamento e ridurre al minimo la selezione di ceppi resistenti. Inoltre, l'applicazione delle tecniche di evoluzione molecolare sintetica potrebbe portare alla creazione di peptidi ancora più efficaci, con un'azione mirata contro specifici patogeni o meccanismi di resistenza.

In definitiva, questa tesi pone anche le basi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo dei peptidi antimicrobici. Mentre la resistenza agli antibiotici continua a rappresentare una minaccia globale, la ricerca sui peptidi antimicrobici offre una via promettente per contrastare questo fenomeno, aprendo nuove prospettive per il trattamento delle infezioni resistenti e per la protezione della salute pubblica a livello mondiale.

## BIIBLIOGRAFIA

1. Miller, W.R., Arias, C.A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat Rev Microbiol* (2024). <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w>
2. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.* 2020 Dec 3;21(12):e51034. doi: 10.15252/embr.202051034. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33400359; PMCID: PMC7726816.
3. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life- years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(1):56-66.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018/2019 Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial-consumption-EU-EEA.pdf>
5. Principi di microbiologia medica di G. Antonelli, M. Clementi, G. Pozzi 2017.
6. Pezzoni, M., Lemos, M., Pizarro, R. A., & Costa, C. S. (2022). UVA as environmental signal for alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*: role of this polysaccharide in the protection of planktonic cells and biofilms against lethal UVA doses. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 21(8), 1459–1472. <https://doi.org/10.1007/s43630-022-00236-w>
7. Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). "The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Drugs*, 67(3), 351-368.
8. Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). "Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 551-560.
9. Lund-Palau, H., Turnbull, A. R., Bush, A., Bardin, E., Cameron, L., Soren, O., Wierre-Gore, N., Alton, E. W., Bundy, J. G., Connett, G., Faust, S. N., Filloux,

- A., Freemont, P., Jones, A., Khoo, V., Morales, S., Murphy, R., Pabary, R., Simbo, A., Schelenz, S., ... Davies, J. C. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert review of respiratory medicine*, 10(6), 685–697. <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1177460>
10. Rolston, K. V., & Bodey, G. P. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cancer patients. *Cancer investigation*, 10(1), 43–59. <https://doi.org/10.3109/07357909209032787>
  11. 6 Magill SS, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014;370(13):1198–1208. doi: 10.1056/NEJMoa1306801.
  12. 7 Weiner LM, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37(11):1288–1301. doi: 10.1017/ice.2016.174
  13. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*. 2010;15(7):1037–1056. doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01819.
  14. Rosenthal VD, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010–2015: device-associated module. *Am J Infect Control*. 2016;44(12):1495–1504. doi: 10.1016/j.ajic.2016.08.007.
  15. Mittal R, et al. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *J Infect Public Health*. 2009;2(3):101–111. doi: 10.1016/j.jiph.2009.08.003.
  16. Kitagawa K, et al. Bacteremia complicating urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa*: mortality risk factors. *Int J Urol*. 2019;26(3):358–362. doi: 10.1111/iju.13872.
  17. Sawa, T., Momiyama, K., Mihara, T., Kainuma, A., Kinoshita, M., & Moriyama, K. (2020). Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. *Microbiology and immunology*, 64(5), 331–344. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12776>

18. Istituto Superiore di Sanità. (2022). Antibiotico-resistenza *Pseudomonas Aeruginosa*. Recuperato da <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss-rapporto-pseudomonas-aeruginosa#:~:text=del%20tratto%20urinario.-,P.,penetrare%20nella%20sua%20membrana%20esterna.>
19. Nasrin, S., Hegerle, N., Sen, S., Nkeze, J., Sen, S., Permala-Booth, J., Choi, M., Sinclair, J., Tapia, M. D., Johnson, J. K., Sow, S. O., Thaden, J. T., Fowler, V. G., Jr, Krogfelt, K. A., Brauner, A., Protonotariou, E., Christaki, E., Shindo, Y., Kwa, A. L., Shakoor, S., ... Tennant, S. M. (2022). Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection. *BMC microbiology*, 22(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02427-4>
20. Fernandes, M., Leite, A., Basto, M. et al. Non-adherence to antibiotic therapy in patients visiting community pharmacies. *Int J Clin Pharm* 36, 86–91 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11096-013-9850-4>
21. Almomani BA, Hijazi BM, Awwad O, Khasawneh RA (2022) Prevalence and predictors of non-adherence to short-term antibiotics: A population-based survey. *PLOS ONE* 17(5): e0268285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268285>
22. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177–192.
23. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019 May; 44:100640. doi: 10.1016/j.drup.2019.07.002. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31492517.
24. Poole, K. (2004). "Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria." *Clinical Microbiology and Infection*, 10(1), 12-26.
25. Livermore, D. M. (2002). "Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?" *Clinical Infectious Diseases*, 34(5), 634-640.
26. Tam, V. H., & Schilling, A. N. (2005). "Detection of antibiotic-resistant bacteria." *Infectious Disease Clinics of North America*, 19(4), 817-835.

27. Poole, K. (2001). "Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 255-264.
28. Drlica, K., & Zhao, X. (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3), 377-392.
29. Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 34–40. 17
30. Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34–39.
31. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1318–1322.
32. Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future medicinal chemistry*, 7(4), 493–512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
33. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(22):8671.
34. Yang, B., Jiang, Y., Jin, Y., Bai, F., Cheng, Z., & Wu, W. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* Oligoribonuclease Controls Tolerance to Polymyxin B by Regulating Pel Exopolysaccharide Production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 66(3), e0207221. <https://doi.org/10.1128/AAC.02072-21>
35. Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522–554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
36. Bin Hafeez A, Jiang X, Bergen PJ, Zhu Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 28;22(21):11691. doi: 10.3390/ijms222111691. PMID: 34769122; PMCID: PMC8583803.
37. Dubos RJ. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS : I. PREPARATION OF THE AGENT. ITS ACTIVITY IN VITRO. *J Exp Med*. 1939 Jun 30;70(1):1-10. doi: 10.1084/jem.70.1.1. PMID: 19870884; PMCID: PMC2133784.

38. Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2012;32:143–171. doi: 10.3109/07388551.2011.594423.
39. Hancock R.E.W., Nijnik A., Philpott D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10:243–254. doi: 10.1038/nrmicro2745.
40. Wang C.K., Craik D.J. Designing macrocyclic disulfide-rich peptides for biotechnological applications perspective. *Nat. Chem. Biol.* 2018;14:417–427. doi: 10.1038/s41589-018-0039-y.
41. Mahlapuu M., Björn C., Ekblom J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2020;40:978–992. doi: 10.1080/07388551.2020.1796576.
42. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R.E.W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1999;38:7235–7242. doi: 10.1021/bi9826299.
43. Bechinger B. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: A 31P solid-state NMR spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2005;1712:101–108. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.03.003.
44. Pouny Y., Rapaport D., Shai Y., Mor A., Nicolas P. Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and its Fluorescently Labeled Analogs with Phospholipid Membranes. *Biochemistry.* 1992;31:12416–12423. doi: 10.1021/bi00164a017.
45. Shimazaki K., Tazume T., Uji K., Tanaka M., Kumura H., Mikawa K., Shimo-Oka T. Properties of a Heparin-binding Peptide Derived from Bovine Lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 1998;81:2841–2849. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75843-6.
46. Vanzolini T, Bruschi M, Rinaldi AC, Magnani M, Fraternali A. Multitalented Synthetic Antimicrobial Peptides and Their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 4;23(1):545. doi: 10.3390/ijms23010545. PMID: 35008974; PMCID: PMC8745555.
47. Mohanram, H.; Bhattacharjya, S. Cysteine deleted protegrin-1 (CDP-1): Antibacterial activity, outer-membrane disruption and selectivity. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2014, 1840, 3006–3016.

48. Dhople, V.; Krukemeyer, A.; Ramamoorthy, A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2006, 1758, 1499–1512.
49. Chen, C. H., Bepler, T., Pepper, K., Fu, D., & Lu, T. K. (2022). Synthetic molecular evolution of antimicrobial peptides. *Current opinion in biotechnology*, 75, 102718.
50. Luong, H.X.; Thanh, T.T.; Tran, T.H. Antimicrobial Peptides—Advances in Development of Therapeutic Applications. *Life Sci.* 2020, 260, 118407.
51. Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2020). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein and peptide letters*, 27(1), 4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>
52. Urmi, U. L., Vijay, A. K., Kuppusamy, R., Islam, S., & Willcox, M. D. P. (2023). A review of the antiviral activity of cationic antimicrobial peptides. *Peptides*, 166, 171024. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171024>
53. Tonk, M., Růžek, D., & Vilcinskis, A. (2021). Compelling Evidence for the Activity of Antiviral Peptides against SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(5), 912. <https://doi.org/10.3390/v13050912>
54. Gottler, L. M., & Ramamoorthy, A. (2009). Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan—a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(8), 1680–1686. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.009>
55. Zasloff M, Martin B, Chen HC. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85:910–913.
56. Chen HC, Brown JH, Morell JL, Huang CM. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 1988;236:462–466.
57. Hallock KJ, Lee DK, Ramamoorthy A. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophys J.* 2003;84:3052–3060
58. Goldstein, E. J. C., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Leoncio, E. S. (2017). In Vitro Activities of Pexiganan and 10 Comparator Antimicrobials against 502 Anaerobic Isolates Recovered from Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), e01401-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01401-17>

59. Lipsky B.A., Holroyd K.J., Zasloff M. 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.* 2008;47:1537–1545. doi: 10.1086/593185.
60. Soares, R. S., Gomes, D., Serrano, I., Cunha, E., Tavares, L., & Oliveira, M. (2023). Absence of Synergism between a Dual-AMP Biogel and Antibiotics Used as Therapeutic Agents for Diabetic Foot Infections. *International journal of molecular sciences*, 25(1), 407. <https://doi.org/10.3390/ijms25010407>
61. Durão, J., Vale, N., Gomes, S., Gomes, P., Barrias, C. C., & Gales, L. (2018). Nitric Oxide Release from Antimicrobial Peptide Hydrogels for Wound Healing. *Biomolecules*, 9(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom9010004>
62. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., ... WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
63. Ghazvini, K., Kamali, H., Farsiani, H., Yousefi, M., & Keikha, M. (2024). Sustain-release lipid-liquid crystal formulations of pexiganan against *Helicobacter pylori* infection: in vitro evaluation in C57BL/6 mice. *BMC pharmacology & toxicology*, 25(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40360-024-00731-z>
64. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., et al. Effects of pexiganan alone and combined with betalactams in experimental endotoxic shock. *Peptides* 26, 207-216, 2005.
65. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (33rd ed., CLSI supplement M100). Clinical and Laboratory Standards Institute
66. Fonseca A., Sousa J.C. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*

strains under different physiological states. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1828-1837, 2007.

67. Cerca N., Martins S., Pier G.B., Oliveira R., Azeredo J. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MIC of antibiotics and subsequent development of a biofilm. *Res. Microbiol.* 156, 650-655, 2005.
68. Barros M., Martinelli R., Rocha H. Experimental supratrigonal cystectomy. Evaluation of long term complications. *Int. Braz. J. Urol.* 32, 350-354, 2006.

## BIBLIOGRAFIA IMMAGINI

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2023). Colonia di *Pseudomonas aeruginosa* su agar. Recuperato da <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2118>
2. Istituto Superiore di Sanità. (2022). Antibiotico-resistenza *Pseudomonas Aeruginosa*. Recuperato da <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss-rapporto-pseudomonas-aeruginosa#:~:text=del%20tratto%20urinario.-,P.,penetrare%20nella%20sua%20membrana%20esterna.>
3. Istituto Superiore di Sanità. (2022). Antibiotico-resistenza *Pseudomonas Aeruginosa*. Recuperato da <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss-rapporto-pseudomonas-aeruginosa#:~:text=del%20tratto%20urinario.-,P.,penetrare%20nella%20sua%20membrana%20esterna.>
4. Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
5. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(22):8671.
6. Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
7. Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>

