

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**ANTIBIOTICO RESISTENZA : UN'ANALISI
GLOBALE DELLE CAUSE E DELLE STRATEGIE DI
MITIGAZIONE**

Relatrice: Chiar.ma Prof.ssa Conconi Maria Teresa

**Laureanda: Beatrice Burati
Matricola 1197044**

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUZIONE | 4 |
| Capitolo 1 : Antibiotico Resistenza e Meccanismi di Resistenza | 6 |
| 1.1 Riduzione dell'accumulo intracellulare di farmaci con ridotta permeabilità e pompe di efflusso | 8 |
| 1.1.1 Diminuzione della permeabilità | 8 |
| 1.1.2 Pompe di efflusso | 10 |
| 1.2 Alterazione, modifica e protezione del bersaglio | 13 |
| 1.3 Protezione del bersaglio | 13 |
| 1.5 Modifica degli antibiotici mediante trasferimento di un gruppo chimico | 17 |
| 1.6 Bypassare il bersaglio | 19 |
| 1.8 Sepsi | 23 |
| 1.9 Difese Immunitarie Compromesse | 24 |
| 1.10 Microbioma | 25 |
| Capitolo 2: Strategie proposte per contrastare il fallimento degli antibiotici | 27 |
| 2.1 Diagnosi rapida dei fattori che contribuiscono al fallimento degli antibiotici | 27 |
| 2.2 Terapie che mirano selettivamente al biofilm | 29 |
| 2.3 Terapie antibiotiche combinate | 33 |
| 2.4 Terapie anti-virulenza | 34 |
| 2.5 Terapie dirette dell'ospite | 35 |
| 2.6 Terapie alternative | 39 |
| Capitolo 3: Il ruolo del quorum sensing nella resistenza batterica: Meccanismi e implicazioni terapeutiche. | 41 |
| 3.1 Sistema di rilevamento del quorum sensing nei batteri gram-negativi | 42 |
| 3.2 Sistema di rilevamento del quorum sensing nei batteri gram-positivi | 43 |
| 3.3 Inibizione del Quorum Sensing | 44 |
| 3.4 Possibili meccanismi del QSI | 45 |
| 3.5 Prevenire la produzione di AHL nei batteri Gram-negativi | 48 |
| 3.6 Prevenire la sintesi degli AIP nei batteri Gram-positivi | 49 |
| 3.7 Targeting della sintasi AI-2 | 49 |
| 3.8 Targeting dei recettori dell'IA | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 3.9 Mirare ai recettori AHL sui batteri Gram-negativi | 51 |
| 3.10 Targeting del recettore dell'istidina nei batteri Gram-positivi | 54 |
| 3.11 Mirare ai recettori LuxP | 54 |
| 3.12 Inattivazione enzimatica degli IA | 55 |
| 3.13 Enzima lattonasi | 55 |
| 3.14 Enzima acilasi | 56 |
| 3.15 Enzima ossidoreduttasi | 56 |
| 3.16 Assorbimento attivo delle molecole di segnalazione dell'IA da parte dei batteri benefici | 57 |
| 3.17 Applicazioni dei QSI nella lotta alla formazione di biofilm batterici | 57 |
| 3.18 Polifenoli come QSI | 63 |
| 3.19 Nuovi approcci che utilizzano QSI per combattere i batteri resistenti | 64 |
| 3.19.1 QSI-NP | 64 |
| 3.19.2 Combinazione di QSI con antibiotici tradizionali tramite linker | 70 |
| 3.19.3 Riutilizzo di farmaci precedentemente noti come QSI | 73 |
| Capitolo 4 : Conclusioni | 76 |
| BIBLIOGRAFIA | 81 |

INTRODUZIONE

La resistenza agli antibiotici è uno dei problemi più critici per la salute pubblica globale.

Questo fenomeno si verifica quando i batteri si evolvono e sviluppano la capacità di sopravvivere all'azione degli antibiotici che dovrebbero distruggerli o inibirli.

Questa evoluzione naturale è accelerata dall'uso eccessivo e improprio degli antibiotici, rendendo molte infezioni comuni, come polmoniti o infezioni urinarie, più difficili da trattare.

Negli ultimi decenni, la resistenza agli antibiotici ha avuto una rapida espansione, minacciando i progressi della medicina moderna.

Interventi chirurgici, chemioterapia e altre terapie mediche cruciali dipendono dalla capacità di prevenire e trattare le infezioni batteriche.

Senza un'azione tempestiva, potremmo tornare a un'era pre-antibiotica, in cui le infezioni minori possono risultare fatali.

Tra le cause troviamo, un uso eccessivo e inappropriato degli antibiotici in quanto questi vengono prescritti in modo eccessivo o per condizioni anche non batteriche, come infezioni virali, promuovendo la selezione di batteri resistenti.

Inoltre anche le scarse misure igieniche e di controllo delle infezioni possono favorire la resistenza antibiotica, soprattutto negli ospedali o nelle comunità dove le pratiche igieniche risultano insufficienti e di conseguenza la mancata adozione di protocolli di prevenzione delle infezioni facilitano la diffusione di batteri resistenti sia ai pazienti che al personale.

Oltre a ciò, anche l'uso empirico e non mirato di antibiotici, dovuto alla mancanza di tecnologie diagnostiche rapide e precise, porta spesso alla prescrizione di farmaci ad ampio spettro, aumentando il rischio di sviluppo della resistenza.

La resistenza agli antibiotici richiede un approccio globale e multidisciplinare.

Le azioni necessarie vanno dalla ricerca scientifica allo sviluppo di nuovi farmaci, all'implementazione di pratiche sanitarie più sicure.

Senza interventi mirati, immediati e coordinati, il rischio di affrontare infezioni sempre più difficili da trattare continuerà a crescere, minacciando il futuro della salute globale.

Capitolo 1 : Antibiotico Resistenza e Meccanismi di Resistenza

La scoperta, la commercializzazione e la somministrazione degli antibiotici ha rivoluzionato la medicina nel XX secolo, fornendo un'efficace terapia contro le malattie infettive.

In pratica, l'uso degli antibiotici è diventato uno degli interventi medici più importanti e più usati anche nelle procedure mediche complesse.

Purtroppo, l'abuso e l'uso inappropriato di questi farmaci ha portato allo sviluppo di ceppi batterici sempre più resistenti, minacciando l'efficacia dei trattamenti e la salute pubblica.

Infatti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha indicato la resistenza antibiotica come una tra le minacce più importanti, considerando come Era post-antibiotica, quella nella quale perfino le infezioni più banali possono diventare anche causa di morte.

Secondo un'indagine condotta da un farmacista, l'antibiotico resistenza è dovuta a una scarsa conoscenza da parte dei pazienti sull'uso appropriato degli antibiotici.

A questo proposito l'Italia è uno dei paesi europei riconosciuto per il "fai da te" in ambito di antibiotici portando così a un maggior sviluppo della resistenza.

La resistenza agli antibiotici rappresenta attualmente una delle sfide più pressanti per la sanità globale, richiedendo un approccio multidisciplinare per comprenderne le cause, implicazioni e strategie che permettono di attenuare questa situazione complessa.

È un problema crescente a livello globale e richiede degli sforzi coordinati per affrontarlo, attraverso pratiche di utilizzo appropriato degli antibiotici e lo sviluppo di nuovi farmaci.

Per comprendere la reale questione della resistenza antibiotica è necessario approfondire alcuni concetti significativi.

In primo luogo, è necessario introdurre il concetto di resistenza antimicrobica, la quale è un fenomeno molto antico derivante dall'interazione di molti organismi con l'ambiente esterno.

L'antibiotico resistenza si verifica quando i batteri diventano capaci di resistere agli effetti degli antibiotici, rendendo più difficile il trattamento delle infezioni.

Conoscere i meccanismi molecolari che i batteri utilizzano per resistere all'azione degli antimicrobici è cruciale per affrontare l'aumento globale della resistenza agli antibiotici.

Questa conoscenza non solo aiuta ad ottimizzare l'uso dei farmaci esistenti, ma è anche essenziale per lo sviluppo di nuovi farmaci e nuove strategie che possono evitare o superare la resistenza batterica.

I batteri sfruttano diversi meccanismi di resistenza. Questi infatti possono essere intrinseci, quando la cellula utilizza i geni che possiede per sopravvivere all'esposizione degli antibiotici oppure acquisiti, quando la capacità di sopravvivenza è data dall'acquisizione di nuovo materiale genetico.

I meccanismi molecolari di resistenza agli antibiotici che i batteri utilizzano per sopravvivere all'azione di questi farmaci possono essere suddivisi in diverse categorie: (1) riduzione dell'accumulo intracellulare di farmaci con ridotta permeabilità e pompe di efflusso, (2) modifica o alterazione del bersaglio antibiotico, (3) modifica o distruzione del farmaco stesso, (4) bypass di intere vie metaboliche (figura 1).

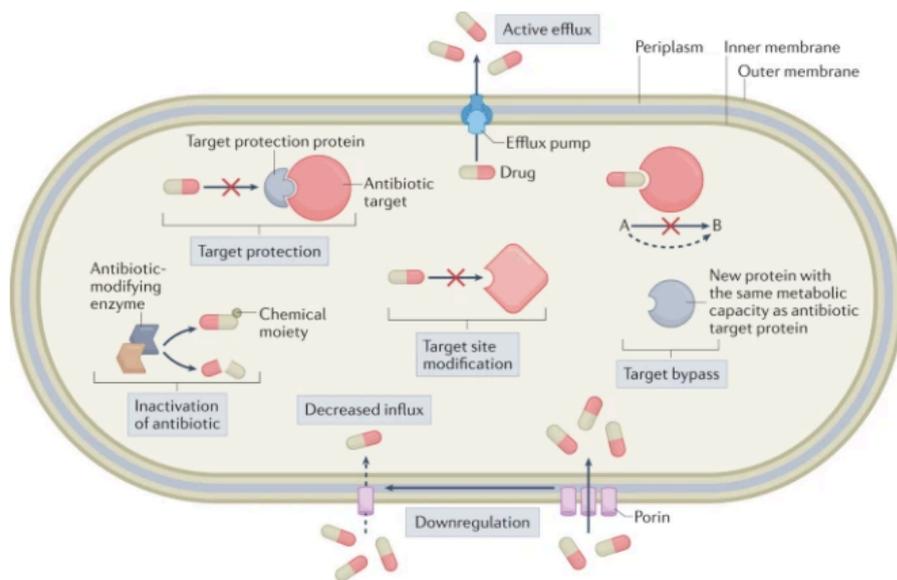


Figura 1 | Quadro generale dei meccanismi molecolari della resistenza agli antibiotici (immagine tratta da Darby et al., 2023)

1.1 Riduzione dell'accumulo intracellulare di farmaci con ridotta permeabilità e pompe di efflusso

1.1.1 Diminuzione della permeabilità

Molti degli antibiotici utilizzati nella pratica medica hanno azione contro batteri a livello intracellulare; nel caso dei gram-negativi i bersagli sono localizzati nella membrana interna a livello della membrana citoplasmatica. Di conseguenza, gli antimicrobici possono esercitare la loro attività solo se attraversano l'involucro della cellula batterica raggiungendo così il loro bersaglio.

I batteri possono essere suddivisi in due grandi famiglie: Gram-positivi e Gram-negativi.

I batteri gram-positivi, essendo caratterizzati dall'assenza della membrana esterna, risultano più permeabili a molti antibiotici.

Mentre la cellula batterica dei gram-negativi è contraddistinta da una struttura complessa, in particolare presenta diverse barriere che gli antimicrobici devono superare. Strutturalmente i gram-negativi sono

caratterizzati da una doppia membrana esterna impermeabile, fornendo resistenza intrinseca a molti antibiotici.

L'alterazione della struttura dell'involucro, con la perdita delle porine o il cambiamento della membrana citosolica con le modifiche di fosfolipidi e acidi grassi, riescono ad influenzare la capacità del farmaco di penetrare nella cellula, contribuendo così allo sviluppo della resistenza antimicrobica.

La permeabilità della membrana esterna viene modificata in modo dinamico durante la crescita batterica, influenzando di conseguenza anche la permeabilità del farmaco che può attraversare la membrana.

La membrana esterna è caratterizzata dalla presenza di porine ovvero dei canali proteici responsabili dell'afflusso di piccoli composti idrofili e ioni. Sono particolarmente importanti nelle membrane esterne dei batteri gram-negativi perché facilitano il trasporto di nutrienti ed altre sostanze essenziali.

Strutturalmente le porine possono assumere diverse conformazioni: trimerica oppure monomerica. Le porine vengono classificate anche in base alla loro selettività, infatti possono essere aspecifiche, permettendo il passaggio di una vasta gamma di molecole oppure specifiche, quindi consentendo il passaggio di determinati substrati.

Le modifiche legate alla struttura delle porine contribuiscono allo sviluppo di resistenza agli antibiotici in quanto la riduzione del numero di porine o le alterazioni nella loro struttura possono limitare l'entrata degli antibiotici nelle cellule batteriche.

Le alterazioni a livello delle porine possono essere ottenute attraverso dei processi generali come la modifica e la compromissione delle funzioni ed espressione delle porine.

Un esempio di resistenza mediata dalle porine è la produzione della forma aberrante di Oprd in *Pseudomonas Aeruginosa*, la quale normalmente viene usata per l'assorbimento di antibiotici come imipenem (potente antibiotico della classe dei carbapenemi). La perdita di questa porina causa un meccanismo di resistenza ai carbapenemi.

Un ulteriore sviluppo della resistenza antibiotica è dato dallo spostamento dell'espressione delle porine, come ad esempio il

cambiamento della porina da Ompk35 a Ompk36, provocando una costrizione dei pori e un aumento della tolleranza ai carbapenemi.

1.1.2 Pompe di efflusso

I batteri possono impedire ai farmaci di entrare nella cellula oppure possono esportarli attivamente attraverso un processo di efflusso. Le pompe di efflusso sono delle proteine transmembrana che trasportano, attraverso la membrana batterica, composti tossici come gli antibiotici in una modalità energia dipendente. Questi sistemi di trasporto sono fondamentali per la resistenza agli antibiotici perchè permettono di rimuovere gli antibiotici dall'interno delle cellule riducendo la loro concentrazione e anche la loro efficacia per il trattamento.

Le pompe di efflusso vengono classificate in diverse famiglie: Pompe ATP-binding cassette (ABC), Pompe di efflusso resistenti ai farmaci (MDR), Sistemi RND (Resistance Nodulation Division).

I trasportatori di efflusso che conferiscono maggior resistenza a livello dei batteri gram-negativi sono i sistemi RND.

Le pompe di efflusso RND (Resistance-Nodulation-Division) sono una classe di sistemi di trasporto presenti in batteri rilevanti da un punto di vista clinico come *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Neisseria*, *Gonorrhoeae* in parte perché hanno una vasta gamma di substrati. Infatti, tali sistemi di trasporto appartengono a una classe di pompe di efflusso batterico coinvolti nella resistenza agli antibiotici.

Queste pompe fanno parte del sistema di difesa dei batteri nei confronti degli antibiotici e altre sostanze tossiche, contribuendo alla loro capacità di sopravvivere in ambienti ostili.

Le pompe RND sono proteine di membrana presenti in molti batteri Gram-negativi. Queste proteine funzionano come pompe di efflusso, rimuovendo ed eliminando una varietà di composti tossici fuori dalla cellula batterica, tra cui antibiotici come tetracicline, macrolidi e beta-lattamici.

Il meccanismo d'azione di queste pompe di efflusso si avvale dell'energia fornita dal gradiente elettrochimico di protoni per espellere le sostanze fuori dalla cellula. Queste pompe sono antiporto e permettono di scambiare i protoni che entrano nella cellula con le sostanze tossiche che vengono espulse.

Le pompe RND sono formate da tre componenti: una proteina di trasporto nella membrana interna, una proteina di legame periplasmatica e una proteina canale della membrana esterna. La proteina di membrana interna forma il canale attraverso il quale le molecole tossiche vengono espulse dalla cellula; il canale di membrana esterna permette il passaggio delle molecole dalla membrana interna all'esterno della cellula; la proteina periplasmatica è in grado di collegare il sistema di trasporto tra la membrana interna ed esterna, in modo tale da facilitare il trasferimento delle molecole. Quindi questa struttura tripartita permette di trasportare direttamente dal citoplasma all'esterno della cellula attraversando sia la membrana interna che quella esterna.

Le pompe RND sono una delle principali cause di resistenza antibiotica nei confronti dei batteri gram-negativi (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Infatti, questi batteri possono espellere una vasta gamma di antibiotici, riducendo l'efficacia del trattamento e rendendo le infezioni più difficili da superare. Tali pompe possono essere attivate in risposta alla presenza di antibiotici, in modo tale da aumentare la capacità dei batteri di sopravvivere e moltiplicarsi anche in presenza del trattamento.

L'inibizione delle pompe RND è un argomento di ricerca molto attivo. Infatti, l'obiettivo della ricerca è quello di sviluppare farmaci in grado di bloccare queste pompe e di ripristinare l'efficacia degli antibiotici. Purtroppo, questo approccio presenta diverse sfide, come la specificità e la sicurezza degli inibitori, considerando anche la capacità dei batteri di sviluppare ulteriori meccanismi di resistenza.

Riassumendo, le pompe RND giocano un ruolo fondamentale e cruciale nella resistenza batterica agli antibiotici, rendendo necessaria una continua ricerca di nuove strategie terapeutiche per combattere le infezioni causate da batteri resistenti.

Tra le pompe RND, uno dei sistemi di efflusso maggiormente studiato è AcrAB-TolC. AcrAB-TolC è un complesso di pompe di efflusso che gioca un ruolo cruciale nella resistenza agli antibiotici, presente esclusivamente nei batteri Gram-negativi, in particolare in *Escherichia Coli*. Questo sistema di pompe è uno dei meccanismi principali attraverso il quale i batteri riescono ad eliminare sostanze tossiche e antibiotici, contribuendo alla resistenza antibiotica.

Il complesso AcrAB-TolC è costituito da tre componenti principali. Infatti, troviamo una proteina di membrana interna che si trova nella membrana citoplasmatica del battere (AcrB), una proteina linker situata nello spazio periplasmatico (AcrA) e una proteina canale situata nella membrana esterna (TolC) (figura 2).

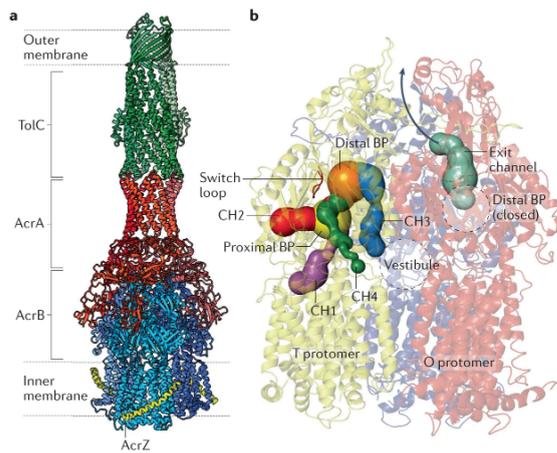


Figura 2 | Struttura dei sistemi di efflusso AcrAB-TolC. (immagine tratta da Darby et al., 2023)

Le pompe RND sono un meccanismo fondamentale attraverso il quale i batteri sviluppano resistenza agli antibiotici e di conseguenza la loro capacità di espellere diverse classi di antibiotici riduce in modo significativo l'efficacia dei trattamenti antibiotici contribuendo alla difficoltà di eradicazione delle infezioni batteriche.

Le pompe RND rappresentano un bersaglio importante per lo sviluppo di nuovi inibitori che possono potenziare l'efficacia degli antibiotici. Comprendere il funzionamento delle pompe RND è essenziale per

sviluppare strategie efficaci contro la resistenza antibiotica. Nel complesso le pompe di efflusso RND giocano un ruolo cruciale nella capacità dei batteri di resistere a molteplici antibiotici rendendo le infezioni più difficili da trattare. La ricerca e lo studio di queste pompe e lo sviluppo di inibitori efficaci rappresentano passi fondamentali nella lotta contro la resistenza antibiotica.

1.2 Alterazione, modifica e protezione del bersaglio

La resistenza antimicrobica può essere ottenuta attraverso una strategia comune che i batteri utilizzano interferendo con il sito bersaglio del farmaco e impedendo così l'azione dell'antibiotico. Per fare ciò, i batteri hanno sviluppato diverse tattiche come la protezione del bersaglio quindi impedendo all'antibiotico di raggiungere il sito di legame, e le modifiche del sito bersaglio determinando così una diminuzione dell'affinità per la molecola dell'antibiotico.

1.3 Protezione del bersaglio

Una strategia comune usata dai batteri per sviluppare resistenza antimicrobica è quella di evitare l'azione dell'antibiotico interferendo con il sito bersaglio.

Per ottenere questo risultato, i batteri hanno sviluppato diverse strategie, tra cui la protezione del bersaglio, in modo tale da determinare una diminuzione dell'affinità per la molecola dell'antibiotico. Questo meccanismo comporta la modifica del bersaglio dell'antibiotico in modo tale che l'antibiotico non possa più legarsi efficacemente. I batteri, quindi, sono in grado di produrre delle proteine che si legano al bersaglio dell'antibiotico alterandone la conformazione e rendendo il bersaglio irriconoscibile all'antibiotico. Il bersaglio resta però ancora funzionale per il batterio.

La struttura del bersaglio viene alterata attraverso il legame o l'aggiunta di una proteina di protezione del bersaglio che può indurre un cambio conformazionale, rimuovere il farmaco dal bersaglio o mediare la dissociazione allosterica del farmaco (figura 3).

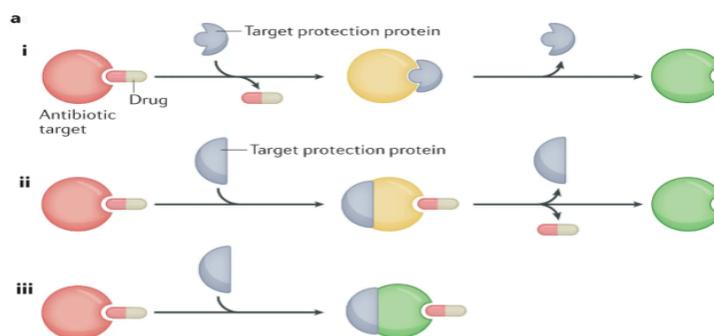


Figura 3 | Meccanismi di protezione del bersaglio: le proteine di protezione (i) si legano al farmaco e lo rimuovono dal bersaglio, (ii) legano il farmaco e mediano la sua dissociazione allosterica dal bersaglio; (iii) si legano al farmaco e inducono modifiche conformazionali tali da permettere la funzione del bersaglio anche in presenza del farmaco (immagine tratta da Darby et al., 2023).

1.4 Inattivazione e modifiche del farmaco

Una delle migliori strategie batteriche di maggior successo e molto diffusa nei batteri patogeni come meccanismo di resistenza è la modifica o l'inattivazione dei farmaci antimicrobici, ottenuti attraverso l'azione di enzimi. Questi enzimi vanno ad inattivare il farmaco aggiungendo porzioni chimiche specifiche al composto oppure distruggendo la molecola stessa, rendendo così l'antibiotico incapace di interagire con il suo bersaglio.

Sono stati descritti molti tipi di enzimi inclusi in queste alterazioni chimiche e tra le reazioni biochimiche più frequenti che catalizzano troviamo le reazioni di acetilazione, fosforilazione e adenilazione.

Gli enzimi sono in grado di idrolizzare il gruppo funzionale del farmaco, così facendo riescono a distruggere l'attività antibatterica. Altri enzimi coinvolti, come acetiltransferasi, metiltransferasi e fosfodiesterasi, sono in grado di modificare il farmaco attraverso il trasferimento covalente di diversi gruppi chimici in modo tale da impedirgli di legarsi al suo bersaglio.

Il risultato finale, indipendentemente dalla reazione biochimica, è correlato all'ingombro sterico che diminuisce la selettività del farmaco per il suo bersaglio mentre aumenta la MIC (Minima Concentrazione Inibente) batterica (figura 4).

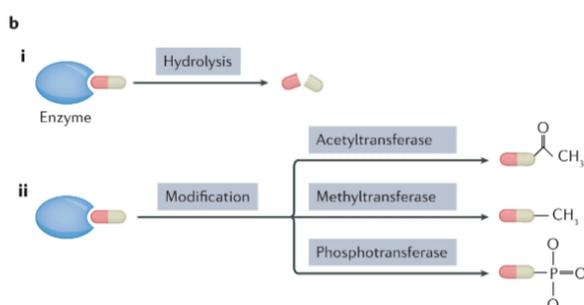


Figura 4 | Meccanismi di alterazione dei farmaci; (i) gli enzimi sono in grado di idrolizzare il gruppo funzionale del farmaco in modo tale da distruggere l'attività batterica; (ii) Gli enzimi come *acetiltransferasi*, *metiltransferasi* e *fosfotransferasi* modificano il farmaco mediante trasferimento di vari gruppi chimici impedendo il legame con il bersaglio (immagine tratta da Darby et al., 2023)

L'inattivazione degli antibiotici viene considerata come uno dei principali meccanismi di resistenza ai farmaci, in quanto la struttura del farmaco viene danneggiata o anche degradata rendendo il farmaco meno efficace. Tale meccanismo di resistenza prende in considerazione diversi enzimi, tra cui le β -lattamasi. Le β -lattamasi sono degli enzimi prodotti da alcuni batteri in grado di conferire resistenza agli antibiotici β -lattamici, una classe di antibiotici che include penicilline cefalosporine monobattami e carbapenemi. Questi enzimi agiscono idrolizzando l'anello β -lattamico presente nella struttura di questi antibiotici, disattivando l'azione antibatterica.

Le β -lattamasi vengono classificate principalmente in base alla loro struttura molecolare e alla loro funzione. La classificazione molecolare (Ambler) prevede quattro classi, classe A, classe B, classe C, classe D.

Classe A include le β -lattamasi sia a spettro ristretto che quelle a spettro esteso (ESBL). Sono inibite da inibitori delle β -lattamasi come ad esempio l'acido clavulanico.

Classe B, chiamate anche come metallo- β -lattamasi, vanno ad usare ioni metallici, spesso zinco, per idrolizzare l'anello β -lattamico.

Classe C, comprende le cefalosporinasi AmpC, che sono in grado di conferire resistenza alle cefalosporine sia di prima che di seconda generazione e sono difficili da inibire.

Mentre la classe D, include le oxacillinasi, le quali mostrano attività contro le penicilline e alcuni carbapenemi. Questa classe risulta essere particolarmente resistente agli inibitori delle β -lattamasi.

Tra i tipi di β -lattamasi di importanza clinica troviamo ESBL (Extended-Spectrum- β -Lactamase), Carbapenemasi e AmpC β -lattamasi.

Le ESBL sono spesso prodotte dai batteri gram-negativi come *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, inoltre idrolizzano le penicilline, cefalosporine di terza generazione e aztreonam. Le infezioni causate da batteri produttori di ESBL sono difficili da trattare in quanto richiedono antibiotici più potenti.

Le carbapenemasi, quindi enzimi come KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi), NDM (New Delhi metallo β -lattamasi) idrolizzano i carbapenemi, spesso usati come ultima linea di difesa contro le infezioni multiresistenti. La diffusione di carbapenemasi è particolarmente preoccupante poiché limita notevolmente le opzioni terapeutiche e porta a tassi di mortalità elevati.

Le Ampc β -lattamasi vengono prodotte da batteri come *Enterobacter* e *Pseudomonas* e sono in grado di idrolizzare cefalosporine sia di prima che di seconda generazione. Le infezioni causate da batteri produttori di AmpC sono trattate con cefalosporine di terza generazione o carbapenemi.

Concludendo, le β -lattamasi rappresentano una delle principali sfide nel trattamento delle infezioni batteriche, in quanto possono neutralizzare alcuni farmaci antibatterici più usati.

Tuttavia, la comprensione di questi enzimi è sempre in aumento e questa crescita ha permesso lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, includendo anche le combinazioni di farmaci e lo sviluppo di nuovi antibiotici e inibitori, i quali possono contribuire a gestire e superare queste resistenze.

Un altro importante esempio di inattivazione degli antibiotici è rappresentato dagli enzimi che inattivano le tetracicline, i quali catalizzano l'ossidazione delle tetracicline.

La più conosciuta è la famiglia Tet(X), che è stata identificata in diverse classi di batteri ed è in grado di conferire un elevato livello di resistenza alla tetraciclina. Infatti, Tet(X) è un gene che codifica per una proteina della famiglia delle tetracicline. A differenza della maggior parte dei geni

di resistenza alle tetracicline, tale gene conferisce resistenza attraverso la degradazione enzimatica delle tetracicline. Questo processo rende inefficace l'antibiotico e conferisce al batterio che ospita il gene Tet(X) una resistenza a una vasta gamma di tetracicline, inclusi antibiotici di nuova generazione.

Dal punto di vista clinico, il gene Tet(X) risulta essere abbastanza preoccupante in quanto può conferire resistenza non solo alle tetracicline classiche ma anche a quelle di ultima generazione, quindi la presenza del gene Tet(X) può limitare le opzioni terapeutiche disponibili.

1.5 Modifica degli antibiotici mediante trasferimento di un gruppo chimico

Il trasferimento di gruppi chimici può effettivamente rendere gli antibiotici inefficaci. Questo fenomeno è legato all'azione di specifici enzimi batterici, noti come enzimi modificanti, che vanno ad alterare la struttura chimica degli antibiotici. Questi enzimi possono aggiungere vari gruppi chimici agli antibiotici, come gruppi acetilici, fosforici, nucleotidici. Tali modifiche chimiche impediscono all'antibiotico di legarsi efficacemente al bersaglio all'interno del batterio, riducendo così la sua capacità di inibire o uccidere il patogeno. Sono stati identificati degli enzimi modificanti in grado di modificare gli antibiotici come gli aminoglicosidi, macrolidi, rifamicine, streptogramine, lincosamidi e fenicoli.

Gli aminoglicosidi possono essere modificati da enzimi come acetiltransferasi, fosfotransferasi e nucleotidiltrasferasi i quali modificando i gruppi sia idrossilici che amminici del farmaco, permettono di ridurre, a loro volta, anche l'affinità del farmaco stesso con il suo bersaglio. Molti di questi enzimi responsabili delle modifiche agli aminoglicosidi sono codificati sia da elementi genetici mobili che sui cromosomi, e sono presenti sia sui batteri gram-positivi che in quelli gram-negativi. Recentemente è emerso un nuovo enzima in grado di modificare gli aminoglicosidi, l' ApmA, ovvero un acetiltransferasi in grado di inattivare l'Apramicina.

Gli antibiotici lincosamidici vengono modificati da enzimi nucleotidiltransferasi, i quali aggiungono gruppi fosfato all'antibiotico. Le nucleotidiltransferasi sono degli enzimi codificati da geni che prendono il nome di *lnu*. Tali geni sono ancora in fase di studio, ma anche se il loro impatto clinico rimane incerto, risulta essere molto preoccupante il fatto che molto spesso, questi geni, risultino essere presenti su elementi genetici mobili con un'aumentata capacità di diffondersi.

Gli antibiotici fenicolo e streptogramine subiscono entrambi le stesse modifiche da parte delle acetiltransferasi. L'enzima CAT, cloramfenicolo acetiltransferasi, trasferisce un gruppo acetile dal coenzima A, in modo tale da impedire al cloramfenicolo di legarsi con il suo bersaglio. Mentre gli antibiotici streptogramine, ovvero degli antibiotici che agiscono inibendo la sintesi proteica dei batteri, possono essere classificati in base alla loro struttura in due gruppi: Gruppo A e Gruppo B. Il gruppo A si lega al centro della peptidil transferasi in modo tale da bloccare l'allungamento della catena polipeptidica, mentre il gruppo B va a legarsi all'uscita del peptide. Le streptogramine subiscono delle modifiche enzimatiche da parte della virginiamicina acetiltransferasi (Vats), la quale è in grado di acetilare l'alcol e di modificare la conformazione del farmaco e conseguentemente ridurre l'efficacia dell'antibiotico. La ricerca di antibiotici streptograminici meno colpiti da Vats, è un'area di studio importante per combattere la resistenza agli antibiotici e soprattutto ha come obiettivo quello di sviluppare dei farmaci più efficaci.

Infine, le rifamicine possono essere inattivate e modificate dall'enzima ADP-ribosil transferasi, glicosiltransferasi, fosfotransferasi e monoossigenasi. L'enzima ADP-ribosil transferasi appartiene a una classe di enzimi che catalizzano il trasferimento di un gruppo ADP-ribosio della molecola di NAD⁺ alla molecola dell'antibiotico, in modo tale da bloccare l'interazione con la RNA polimerasi. La resistenza alla rifamicina mediata dalle glicosiltransferasi è simile all'azione delle ADP-ribosil transferasi. In questo caso, gli enzimi glicosilano l'ossidrilico presente nella molecola della rifamicina, alterando la struttura dell'antibiotico e impedendone il corretto

funzionamento. Inoltre, le fosfodiesterasi contribuiscono alla esistenza convertendo le rifamicine in sosforifamicine, una forma inattiva dell'antibiotico, neutralizzandone così l'efficacia.

Questo meccanismo di resistenza, quindi la modifica degli antibiotici mediante il trasferimento di un gruppo chimico, risulta essere particolarmente problematico perché può diffondersi tra i batteri attraverso elementi genetici mobili, come ad esempio plasmidi, contribuendo all'aumento della resistenza agli antibiotici a livello globale.

1.6 Bypassare il bersaglio

Bypassare il bersaglio è un altro processo attraverso il quale i batteri possono diventare resistenti agli antibiotici. In questa maniera i batteri riescono ad aggirare l'effetto inibitorio di un antibiotico attraverso lo sviluppo di vie metaboliche alternative. Così facendo i batteri sono in grado di sviluppare nuovi bersagli che svolgono funzioni biochimiche simili al bersaglio originale, ma non vengono inibiti dalla molecola antimicrobica e continuano a svolgere le proprie funzioni cellulari anche in presenza dell'antibiotico.

L'obiettivo è quello di produrre un processo alternativo che vada a bypassare l'antibiotico rendendo ridondante il target.

Questo può verificarsi tramite il legame con un gene alternativo in grado di conferire alla cellula le proprietà richieste senza essere inibito dall'antibiotico.

Usando questa strategia, i batteri riescono a sviluppare nuovi bersagli che svolgono funzioni biochimiche simili al bersaglio originale e che non vengono inibiti dalla molecola antibiotica.

Inoltre, un altro percorso che mira ad evitare l'azione antibiotica consiste nell'aggirare la via metabolica che l'antibiotico inibisce producendo in eccesso il bersaglio. I batteri sono in grado, quindi, di sovrapprodurre l'enzima o la proteina bersaglio in modo tale da bypassare l'inibizione dell'antibiotico e quindi riuscire a superare l'effetto inibitorio del farmaco (figura 5).

Il bypass del bersaglio rappresenta un meccanismo avanzato di resistenza agli antibiotici, permettendo ai batteri di sopravvivere anche quando i loro bersagli primari sono inibiti. La comprensione di questi fenomeni è

essenziale per sviluppare nuove strategie terapeutiche e affrontare la crescente minaccia della resistenza antibiotica.

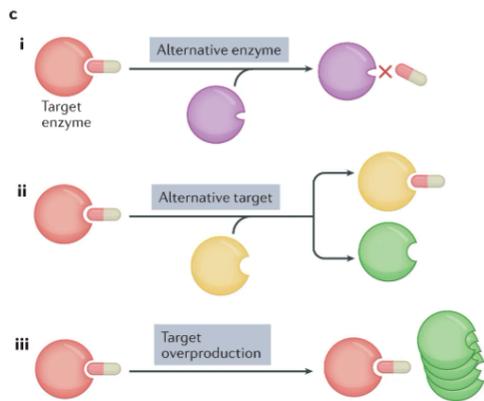


Figura 5 | Meccanismi di Bypass del target. (i) il bersaglio (per esempio un enzima) viene sostituito grazie all'acquisizione di un gene che codifica un enzima alternativo che, pur avendo le stesse funzioni, non interagisce con il farmaco, (ii) il bersaglio viene sostituito da un'altra proteina che sequestra il farmaco e permette al bersaglio di svolgere la sua funzione, (iii) il bersaglio viene prodotto in eccesso rendendo insufficiente la quantità di farmaco utilizzata (immagine tratta da Darby et al., 2023)

L'esempio più noto e rilevante che rappresenta il bypass del target risulta essere quello legato allo sviluppo di farmaci resistenti alla meticillina *S.aureus* (MRSA). La meticillina è un antibiotico appartenente alla classe dei β -lattamici. La modalità d'azione degli antibiotici β -lattamici è quella di legarsi alle PBP e di inibire il dominio delle transpeptidasi in modo tale da causare l'interruzione della sintesi della parete cellulare. Ad ogni modo *S. aureus* può acquisire una PBP esogena (PBP2a), la quale risulta essere omologa al bersaglio originale ma che presenta minor affinità per gli antibiotici β -lattamici. La proteina PBP2a viene codificata dal gene *mecA*, un gene resistente alla meticillina, situato nel cromosoma della cassetta stafilococcica *mec*, definito come un gene mobile che conferisce resistenza alla meticillina. La meticillina si lega al sito bersaglio alternativo, quindi a PBP2a, ed è proprio questo legame che permette di inibire la sintesi della parete cellulare e di conseguenza permette di garantire la sopravvivenza cellulare.

Un altro esempio di resistenza attraverso il bypass del target si osserva in *Escherichia coli*, dove la produzione di un meccanismo di reticolazione alternativo, che include la L,D-transpeptidasi YcbB, può aggirare l'attività degli antibiotici e portare alla resistenza ai β -lattamici.

Inoltre, anche la vancomicina può essere soggetta al bypass del target. Infatti la vancomicina è un antibiotico glicopeptidico ampiamente usato per il trattamento delle infezioni da enterococchi e MRSA. La vancomicina, legandosi al terminale D-alanina-D-alanina, inibisce la reticolazione del peptidoglicano, il quale risulta essere essenziale per la sintesi della parete cellulare batterica.

Negli enterococchi, la resistenza alla vancomicina è mediata dall'acquisizione di due fenotipi di resistenza, vanA e vanB. Principalmente è il fenotipo vanA, il più comune, che conferisce un'elevata resistenza alla vancomicina. Questo fenotipo è mediato da un insieme di geni, cluster di geni vanA, i quali sono in grado di codificare per enzimi capaci di modificare il bersaglio della vancomicina, ossia il peptide D-alanina-D-alanina della parete cellulare batterica. Questi enzimi sono in grado di sostituire D-alanina-D-alanina con D-alanina-D-lattato, permettendo così di ridurre l'affinità della vancomicina per il suo target e conferendo resistenza.

La combinazione di due antibiotici, come l'associazione tra trimetoprim e sulfametossazolo, risulta essere molto funzionale nel trattamento di infezioni. I due principi attivi sono in grado di bloccare la biosintesi dell'acido folico batterico essenziale per la sintesi dell'acido nucleico e delle proteine. Infatti, il trimetoprim agisce come un inibitore della diidrofolato reduttasi, mentre il sulfametossazolo inibisce la diidropteroato sintasi. Anche se risulta essere una valida terapia, anche questa combinazione può subire delle modifiche in grado di sviluppare resistenza. La resistenza a trimetoprim e sulfametossazolo si verifica quando vengono acquisiti o prodotti in eccesso nuovi alleli sia della diidrofolato reduttasi che della diidropteroato sintasi. Questo determina un aumento della disponibilità del target e una minor attività dei principi attivi, mantenendo sia la produzione di acido folico che la sopravvivenza della cellula.

Il fallimento degli antibiotici viene correlato a situazioni in cui la somministrazione di antibiotici e quindi il trattamento antimicrobico non

risultano efficaci nell'eliminare l'infezione riflettendosi negativamente sullo stato di salute dei pazienti.

Tra le principali cause del fallimento antimicrobico, oltre alla resistenza antimicrobica, troviamo: Biofilm, con infezioni ad esso associate, Sepsis ed Infezioni associate a pazienti immunodepressi (figura 6).

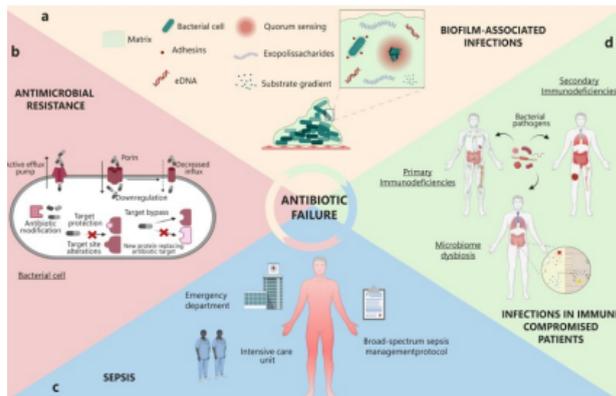


Figura 6 | Principali fattori che contribuiscono al fallimento antimicrobico: Resistenza antimicrobica, Infezioni associate a biofilm, sepsi e grave condizioni in pazienti immunocompromessi. (immagine tratta da De la Fuente Nunez et al., 2023)

1.7 Biofilm

Con il termine di biofilm batterico si fa riferimento ad aggregazioni di colonie di microbi che sono racchiusi in una matrice polimerica.

I biofilm contribuiscono in modo determinante sia nello sviluppo delle infezioni, con una percentuale pari al 65%, che nel fallimento antimicrobico e sono implicanti in una vasta gamma di infezioni legate anche a dispositivi medici, infezioni croniche e polmonari.

I biofilm batterici si sviluppano in 5 fasi che possono essere così descritte: attacco alla superficie delle singole cellule, attacco irreversibile alla superficie con formazione di una matrice extra polimerica, formazione di cluster cellulari incorporati nella matrice del biofilm, proliferazione e maturazione delle microcolonie, e distacco e dispersione di alcune cellule batteriche con formazione di nuovi focolai di biofilm.

Questa formazione e sviluppo del biofilm è gestita da moltissimi geni, tra cui anche geni regolatori, che riescono a determinare alterazioni dello stato di crescita e del metabolismo cellulare.

La crescita delle cellule del biofilm può essere associata ad un adattamento allo stress, conseguito tramite l'acquisizione di un gene

alternativo che conferisce le proprietà necessarie in modo tale da evitare di essere inibito dall'antibiotico. Questa modifica consente di sopravvivere in situazioni ambientali ostili, quindi risultano resistenti all'azione degli antibiotici.

In aggiunta, i biofilm sono in grado di sfuggire ai meccanismi di difesa dell'ospite, facilitando la capacità di resistere e causare infezioni croniche. I biofilm mostrano una resistenza adattativa. Con il termine di resistenza adattativa ci si riferisce alla capacità di un organismo, come i batteri che formano il biofilm, di sopravvivere e di proliferare in ambienti difficili attraverso l'adozione di meccanismi che aumentano la tolleranza a stress, agenti antimicrobici. Nella pratica questa resistenza può portare alla produzione di una matrice extracellulare protettiva, oppure ad alterazioni metaboliche o modificare l'espressione di geni specifici che non vengono efficacemente inibiti dagli antibiotici. Questi adattamenti permettono alle cellule del biofilm di sopravvivere e prosperare anche in presenza di antimicrobici, i quali risulterebbero letali per le cellule batteriche libere.

1.8 Sepsi

La sepsi è una condizione medica grave che si verifica quando l'organismo risponde in modo estremo a un'infezione. Questa risposta anomala può portare a danni ai tessuti e agli organi, e se non trattata rapidamente, può progredire fino a uno shock settico, insufficienza multiorgano o morte. La sepsi è spesso causata da infezioni batteriche, ma può essere dovuta anche da infezioni fungine virali o parassitarie.

È causa di molti decessi, circa il 20%, ed è considerata come la principale causa di mortalità.

Nel trattamento di questa tempesta citochinica iper-infiammatoria risultano efficaci gli interventi che implicano un controllo immediato della presunta infezione.

Il trattamento antibiotico deve avvenire tempestivamente in quanto la somministrazione ritardata è direttamente associata a progressione della malattia e all'aumento della mortalità con un rischio di morte aumentato anche del 7,6%.

Nella terapia della sepsi, spesso i medici prescrivono come terapia iniziale antibiotici ad ampio spettro o terapie combinate in modo tale da evitare ritardi fino a quando non si conosce effettivamente l'agente patogeno.

Nel trattamento della sepsi, il fallimento antimicrobico viene collegato a ritardi sia nella determinazione dell'effettiva condizione di sepsi in un paziente, in quanto i sintomi sono molto spesso aspecifici, che della determinazione del patogeno coinvolto.

1.9 Difese Immunitarie Compromesse

Il sistema di difesa dell'ospite è una rete di meccanismi molto complessa, svolge la funzione di protezione dai microbi e coinvolge numerose barriere fisiche (come cute e acido gastrico), includendo anche l'immunità innata (con cellule fagocitiche e proteine del complemento) e l'immunità adattativa (linfociti B, cellule T e anticorpi). Quando uno di questi sistemi di difesa viene a mancare o viene compromesso aumenta la suscettibilità agli agenti patogeni, generando di conseguenza infezioni frequenti e ricorrenti. Questo può derivare da mutazioni genetiche oppure da fattori esterne che sono in grado di portare a pazienti immuno-compromessi. L'immunodeficienza può essere primaria o secondaria.

L'immunodeficienza primaria si ha quando un singolo disturbo genetico è in grado di alterare la funzione immunitaria. Questa classe comprende numerose condizioni ereditarie come, ad esempio, malattie autosomiche recessive o legate al cromosoma X. In questi pazienti il trattamento degli antibiotici risulta temporaneo in quanto queste immunodeficienze sono associate ad una assenza totale o parziale dell'immunità adattativa cellulo-mediata e di conseguenza sono molto più vulnerabili nei confronti di un'ampia gamma di infezioni.

L'immunodeficienza secondaria è causata da una malattia oppure da una terapia immunosoppressiva, o da condizioni acquisite derivanti da fattori esterni come cancro, malattie autoimmuni o metaboliche, malnutrizione, chemioterapia e interventi chirurgici. Ciascuna di queste condizioni prevede un trattamento antibiotico diverso che potrebbe anche non avere successo.

Inoltre, ci sono delle situazioni che aggravano le condizioni cliniche compromettendo le difese immunitarie dell'ospite come ad esempio, traumi o altre patologie come asma fibrosi cistica e malattie cardiache.

Per i pazienti immunocompromessi, il trattamento con antibiotici risulta spesso necessario per prevenire le complicanze a lungo termine associate alle infezioni croniche.

La distruzione del sistema immunitario mette a dura prova l'efficienza della terapia antibiotica, aumentando la probabilità di fallimento del trattamento.

1.10 Microbioma

Il Microbioma viene definito come l'insieme dei microorganismi, quindi di batteri, virus, funghi e altri microrganismi, i quali vivono in un ambiente specifico, come nel corpo umano, nel suolo, nell'acqua o in qualsiasi altro ecosistema.

Nell'uomo, il microbioma più studiato è quello intestinale, il quale ha un ruolo fondamentale nella digestione, nel sistema immunitario e in altre funzioni fisiologiche.

Il microbioma umano è composto da moltissimi microrganismi, circa trilioni, i quali riescono a vivere in simbiosi con il nostro corpo.

Questi microrganismi influenzano la nostra salute in molti modi, infatti l'equilibrio del microbioma è fondamentale per mantenere il benessere generale.

La ricerca del microbioma è in continua espansione e sta rivelando quanto sia cruciale per diverse condizioni di salute, comprese le malattie metaboliche e autoimmuni.

Il microbioma può essere influenzato da vari fattori, come la dieta, lo stile di vita, l'uso di antibiotici e altri fattori ambientali.

L'antibiotico resistenza e il microbioma sono strettamente collegati, e tale relazione risulta essere fondamentale e molto interessante sia per la ricerca scientifica che per la salute pubblica.

Infatti, l'uso di antibiotici, pur essendo essenziale per il trattamento delle infezioni batteriche, ha un impatto relativamente significativo sul microbioma umano, in particolare su quei microrganismi che troviamo a

livello intestinale. Gli antibiotici non sono selettivi, oltre ad eliminare i batteri patogeni, quindi quelli responsabili delle infezioni, colpiscono anche i batteri benefici che appunto svolgono funzioni importanti per la nostra salute.

Inoltre, l'utilizzo di antibiotici può favorire la proliferazione di batteri resistenti, i quali riescono a sopravvivere al trattamento antibiotico e di conseguenza riducono l'efficacia del trattamento stesso.

In alcuni casi, le modifiche indotte dagli antibiotici nel microbioma possono essere durature. Infatti, anche dopo la cessazione del trattamento antibiotico, il microbioma difficilmente recupera completamente la composizione originale, portando di conseguenza un equilibrio microbico alterato, il quale potrebbe portare a infezioni ricorrenti e ad altre problematiche di salute.

Per ridurre l'impatto degli antibiotici sul microbioma e prevenire lo sviluppo di resistenze, è fondamentale un uso prudente e mirato degli antibiotici, limitando la somministrazione nei casi strettamente necessari e seguendo le indicazioni del medico. Inoltre, l'adozione di strategie, come l'uso di probiotici e prebiotici, possono aiutare a mantenere l'equilibrio del microbioma durante il trattamento antibiotico.

Capitolo 2: Strategie proposte per contrastare il fallimento degli antibiotici

Per affrontare questa sfida e diminuire l'enorme impatto sulla salute umana è essenziale adottare dei metodi e delle strategie di screening alternative che vadano ad affrontare le basi del fallimento.

Le strategie diagnostiche e terapeutiche che sono state progettate per prevenire e trattare le situazioni di fallimento antibiotico possono essere così classificate: diagnosi rapida dei fattori che contribuiscono al fallimento, terapie anti-virulenza, terapie che colpiscono selettivamente il biofilm, terapie dirette all'ospite, terapie antibiotiche combinate e terapie alternative. [Figura 7]

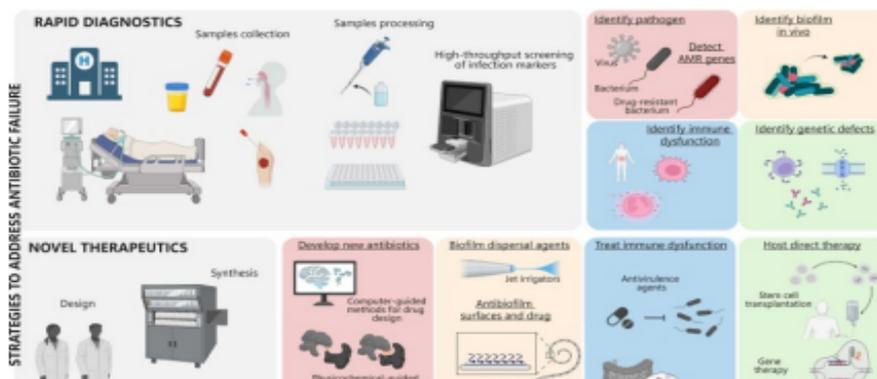


Figura 7 | Strategie per affrontare il fallimento antibiotico: in questa immagine vengono mostrati diverse potenziali strategie. Questi metodi hanno come obiettivo quello di affrontare e superare le problematiche associate al fallimento degli antibiotici offrendo soluzioni innovative (immagine tratta da de la Fuente-Nunez et al., 2023).

2.1 Diagnosi rapida dei fattori che contribuiscono al fallimento degli antibiotici

Risulta fondamentale saper riconoscere le condizioni e situazioni che contribuiscono al fallimento dell'antibiotico. La terapia, spesso empirica, di quando si verifica un'infezione è approssimativa e tiene conto della zona del corpo colpita, dei batteri coinvolti, della resistenza e dell'urgenza. Tutto questo ha come conseguenza la prescrizione eccessiva di farmaci ad ampio spettro determinando nel tempo la perdita di efficacia degli antibiotici a causa dello sviluppo di resistenza genetica.

Oltre a questo, un altro problema consiste nell'uso di antibiotici. Essenziale nel limitare il fallimento antibiotico è cercare di evitare la somministrazione di antibiotici quando non sono necessari come ad esempio per infezioni virali, o nel tratto respiratorio.

Fondamentale, in questo caso, è la diagnostica basata su PCR. La PCR è una tecnica di biologia molecolare che amplifica specifiche sequenze di DNA in modo tale da rilevare la presenza di geni di resistenza agli antibiotici. Risulta essere particolarmente efficace in quanto permette di distinguere le infezioni batteriche da quelle virali; mentre la PCR multiplex permette di determinare la classe batterica coinvolta e anche di identificare le classi più comuni di resistenza agli antibiotici.

Questi metodi, definiti new age ma con un orientamento tradizionale, permettono di fornire informazioni cliniche critiche e di conseguenza l'orientamento delle opzioni terapeutiche possono essere molto più rapide rispetto alla coltura dei batteri.

Questo approccio può essere particolarmente utile in situazioni in cui è necessario un intervento terapeutico immediato.

Tuttavia, è importante ricordare che la coltura dei batteri rimane uno strumento fondamentale per la diagnosi accurata delle infezioni batteriche e per guidare la scelta degli antibiotici in modo mirato.

La sepsi è una grave complicanza di un'infezione che si diffonde in tutto il corpo attraverso il flusso sanguigno, causando un'infiammazione sistemica e danni agli organi. È una condizione di emergenza medica che richiede un trattamento tempestivo. I sintomi tipici includono febbre alta, frequenza cardiaca accelerata, difficoltà respiratorie.

La diagnosi precoce e il tempestivo trattamento sono fondamentali per migliorare le probabilità di sopravvivenza del paziente.

La diagnosi della sepsi può essere complessa poiché i sintomi possono essere simili ad altre condizioni mediche. Tuttavia, i medici utilizzano una serie di criteri clinici e degli esami di laboratorio per effettuare la diagnosi. La diagnosi mira a individuare la risposta disfunzionale dell'ospite, in quanto è un segno distintivo della sepsi.

Inoltre, un altro importante fattore che ostacola la terapia è legato alla complessità della sepsi, la quale oltre a comprendere fattori comuni è data anche da altri fattori come la variazione genetica individuale, fattori demografici, fonte e agente di infezione, comorbidità.

Di conseguenza, la sepsi è caratterizzata da endotipi, ovvero da dei sottogruppi di malattie con meccanismi e fisiopatologia distinti. Un recente studio RNA-seq è riuscito ad identificare cinque endotipi e due di questi hanno individuato un sostanziale aumento sia della mortalità che della gravità. Due fenotipi opposti, NPS (neutrophilic/immune-suppressive) e INF (infiammatorio), sono in grado di spiegare, fino ad oggi, il fallimento delle terapie riguardo il trattamento della sepsi precoce.

Attraverso due metodi, identificazione dell'hub mediante biologia di rete e interazione farmaco-gene, vengono individuati gli endotipi, i quali sono alla base di bersagli farmacologici. Dato che la sepsi è caratterizzata da una carenza della risposta immunitaria, la diagnosi degli endotipi fornisce speranza per nuovi farmaci immuno correttivi precoci in grado di agire in modo sinergico con gli antibiotici, ottenendo così un impatto positivo con gli esiti.

2.2 Terapie che mirano selettivamente al biofilm

Le gravi infezioni associate al biofilm, attualmente vengono gestite somministrando localmente antibiotici per controllare l'infezione e prevenire la dispersione delle cellule del biofilm in altre zone del corpo. Dato che i biofilm risultano essere molto resistenti, vengono spesso co-somministrati diversi antibiotici insieme ma comunque tendono ad essere poco efficienti soprattutto nei confronti delle recidive.

Per affrontare queste sfide sono in fase di studio e di sviluppo delle strategie specifiche antibiofilm le quali prendono di mira le fasi di crescita di crescita del biofilm, anche se ad oggi non è stata approvata alcuna terapia specifica per il biofilm.

Ci sono dei metodi fisico-meccanici come spray ad alta velocità e irrigatori a getto discretamente efficaci. Tali strategie utilizzano come forza

meccanica il fluido, il quale è in grado di rimuovere il biofilm e di fornire antibiotici al sito di infezione.

Ad ogni modo questi metodi vengono usati per lo più per trattare infezioni dentali o tessuti necrotici.

In più esistono delle sostanze chimiche antiadesive, le quali fungono da rivestimento per proteggere, prevenire l'attacco e la formazione di biofilm su dispositivi medici, come cateteri, tubi endotracheali, e medicazioni per ferite. Tali rivestimenti, soprattutto quelli che incorporano antimicrobici o comunque quelli che hanno proprietà antibiotiche a lento rilascio, si sono dimostrati efficaci nell'uccidere i microbi e prevenire la formazione di biofilm.

Infatti, la combinazione di una superficie antiadesiva con peptidi anti-biofilm ha dimostrato efficacia nel trattamento dell'infezione da biofilm associata a catetere nel tratto urinario.

Questa strategia permette di superare un problema comune delle superfici antimicrobiche, ovvero quello che i batteri morti possono ricoprire gli agenti antimicrobici, impedendo loro di continuare a uccidere ulteriori batteri.

I biofilm sono complessi ecosistemi microbici che possono resistere a trattamenti antimicrobici e rappresentare una sfida significativa nelle infezioni croniche. La varietà di adesioni, componenti della matrice e regolatori specifici rende difficile trovare un trattamento univoco ed efficace.

Tuttavia, la scoperta di peptidi anti-biofilm suggerisce che ci potrebbe essere una funzione comune selezionabile, ossia la risposta allo stress, che incoraggia la crescita del biofilm.

I peptidi anti-biofilm, una classe di peptidi di difesa dell'ospite, rappresentano una promettente soluzione per combattere i biofilm grazie alla loro capacità di agire su una vasta gamma di batteri e funghi. Questi peptidi possono interferire con i diversi aspetti della formazione e della maturazione del biofilm, grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche e meccanismi di azione diversificati. Infatti, mostrano una notevole capacità di ostacolare e sradicare i biofilm maturi, inclusi quelli formati da specie batteriche multiresistenti, come il gruppo ESKAPEE (*Enterococcus*

faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* ed *Escherichia coli*).

La loro azione ad ampio spettro è data dalla loro capacità di colpire un segnale di stress comune, la guanosina tetrafosfato (ppGpp), la quale è necessaria e fondamentale per la formazione dei biofilm.

La guanosina tetrafosfato è una molecola importante nella regolazione della risposta di stress dei batteri, in particolare durante la risposta stringente. Tale risposta viene considerata come un meccanismo che i batteri utilizzano per adattarsi a condizioni sfavorevoli come carenza dei nutrienti soprattutto per quanto riguarda gli amminoacidi.

Dal punto di vista della funzione e del ruolo, la molecola ppGpp agisce come un segnale all'interno della cellula batterica in modo tale da modulare la sintesi delle proteine. Infatti, in risposta a condizioni di stress, tale molecola inibisce la sintesi sia di RNA ribosomiale che di RNA transfer, in modo tale da rallentare la produzione di proteine. Tutto ciò permette ai batteri di sopravvivere anche durante i periodi di scarsità energetica e nutritiva. In più, la ppGpp è in grado di influenzare la trascrizione di diversi geni, alterando di conseguenza l'espressione genica, favorendo la sopravvivenza dei batteri anche in condizioni di stress.

La ppGpp ha effetti sulla fisiologia batterica, in quanto è implicata sia nella resistenza agli antibiotici che nella formazione del biofilm. Per quanto riguarda la resistenza agli antibiotici la molecola ppGpp prevede la regolazione dei meccanismi di tolleranza agli antibiotici, in grado di contribuire alla formazione di cellule persister, ovvero cellule che sopravvivono al trattamento antibiotico senza mutazioni di resistenza. Infatti, la risposta stringente adottata dalla ppGpp può indurre uno stato di dormienza che rende i batteri meno suscettibili agli antibiotici. Inoltre, la ppGpp è in grado di influenzare anche la formazione del biofilm, adottando una strategia di sopravvivenza, attraverso la quale i batteri formano una comunità sessile (biofilm) protette da una matrice extracellulare, rendendoli più resistenti agli agenti antimicrobici.

Concludendo, la guanosina tetrafosfato (ppGpp) è un regolatore centrale della risposta di adattamento dei batteri a condizioni di stress. Il suo ruolo nella modulazione della sintesi proteica, nella trascrizione genica e nella regolazione dei meccanismi di resistenza agli antibiotici la rende un

elemento chiave nella fisiologia batterica e soprattutto un potenziale target per nuove strategie terapeutiche.

I peptidi anti-biofilm hanno dimostrato una forte sinergia con diversi antibiotici, contribuendo alla completa eradicazione dei biofilm. Questa sinergia è cruciale per superare le sfide associate ai biofilm batterici, inclusi quelli formati da specie multiresistenti (ESKAPEE).

Una strategia promettente per rendere i batteri più suscettibili agli antibiotici convenzionali risulta essere quella deputata nella dispersione dei biofilm. La dispersione dei biofilm è un processo attraverso il quale i batteri che compongono il biofilm si staccano dalla matrice extracellulare e tornano a uno stato planctonico, cioè libero, mobile e soprattutto più suscettibile all'azione degli antibiotici convenzionali. Un metodo efficace per promuovere la dispersione è l'uso di ossido nitrico (NO) o analoghi di NO, il quale è già in uso in medicina umana per trattare diverse condizioni respiratorie. L'ossido nitrico ha dimostrato di essere in grado di disgregare i biofilm e migliorare l'attività degli antibiotici stimolando la fosfodiesterasi, che degrada la cGMP in modo tale da convertire la crescita batterica dalla modalità biofilm a quella planctonica.

Altre terapie mirate includono l'azione di agenti disgreganti la matrice extracellulare, rendendo i microrganismi nel biofilm più vulnerabili agli antibiotici. Tra questi troviamo le DNAsi, che degradano il DNA extracellulare nella matrice del biofilm, la dispersina B e la α -amilasi.

Un'altra strategia risulta essere quella che punta all'uso di inibitori verso il quorum sensing. Il quorum sensing è un meccanismo di comunicazione tra batteri che regola la formazione del biofilm. Tali inibitori di quorum sensing possono prevenire la formazione del biofilm o destabilizzare quelli già esistenti. Molecole come l'Azatioprina e gli analoghi delle furanoni sono esempi di inibitori del quorum sensing.

Inoltre, anche l'uso di batteriofagi può essere promettente. I batteriofagi o fagi sono virus che infettano e uccidono i batteri. I fagi vengono progettati per colpire specifici batteri presenti nel biofilm e possono essere

progettati e usati in combinazione con antibiotici per migliorare l'efficacia del trattamento.

2.3 Terapie antibiotiche combinate

Il fallimento antibiotico può essere superato attraverso la combinazione di più antibiotici.

Le terapie antibiotiche combinate sono delle strategie di trattamento che utilizzano due o più antibiotici contemporaneamente per combattere l'infezione.

L'obiettivo di tale piano è quello di migliorare l'efficacia del trattamento, ridurre il rischio di sviluppo di resistenza batterica e affrontare infezioni particolarmente difficili e complesse.

Inoltre, le terapie antibiotiche combinate offrono diversi vantaggi. Tra gli aspetti vantaggiosi di tale strategia troviamo una maggior efficacia terapeutica, sia per quanto riguarda la sinergia che per l'ampliamento dello spettro d'azione; la riduzione degli effetti collaterali, in quanto con la combinazione degli antibiotici è spesso possibile utilizzare delle dosi inferiori in modo tale da diminuire sia la tossicità che gli effetti collaterali associati; riduzione del rischio di resistenza quindi associato alla difficoltà dei batteri di adattamento in quando l'uso di più antibiotici simultaneamente rende più difficoltoso lo sviluppo di resistenza poiché dovrebbero mutare in modi diversi per resistere a ciascun farmaco. In più, un altro vantaggio sta nel fatto che questa strategia di combinazione permette di prevenire lo sviluppo di batteri resistenti, in quanto se un antibiotico non riesce ad eliminare completamente un batterio, l'altro antibiotico può provvedere a questa lacuna, riducendo la probabilità della proliferazione dei batteri resistenti.

Ad oggi sono disponibili circa 300 antibiotici, i quali in combinazione possono dar vita a circa 44 850 mila coppie di antibiotici, tenendo sempre in considerazione sia dosaggio che ceppi batterici.

Le terapie antibiotiche combinate rappresentano un approccio potente nella gestione delle infezioni batteriche, specialmente in un'era in cui la resistenza agli antibiotici è in aumento.

Infatti, la corretta combinazione di antibiotici può migliorare l'efficacia terapeutica legata sia all'attacco simultaneo dei punti deboli dei batteri che all'ottenimento di una risposta rapida e completa, prevenire lo sviluppo di resistenze e ridurre gli effetti collaterali, ma richiede una conoscenza approfondita delle interazioni farmacologiche e soprattutto un attento monitoraggio clinico.

Ciononostante, esiste una limitazione, correlata al fatto che gli organismi possono diventare resistenti a uno degli antibiotici, mitigando così la sinergia della combinazione e riducendo anche l'effetto.

2.4 Terapie anti-virulenza

Comprendere quello che è la comunicazione intercellulare e la patogenesi batterica ha permesso di identificare delle strategie terapeutiche alternative per la terapia delle malattie indotte da batteri. I batteri invasori, per causare la malattia devono superare diversi ostacoli, rappresentati da barriere fisiche, risposte immunitarie e microbioma residente. Questo è promosso e favorito dall'attivazione di fattori di virulenza che aiutano nella colonizzazione, invasione, soppressione della risposta immunitaria e nell'acquisizione di nutrienti.

Infatti, a differenza degli antibiotici tradizionali che mirano a eliminare i batteri, la terapia anti virulenza mira a neutralizzare le armi che i batteri utilizzano per causare malattie, rendendoli meno capaci di indurre danno all'ospite e permettendo al sistema immunitario di eliminarli più facilmente.

La terapia anti virulenza presenta dei vantaggi. Tali benefici riguardano la riduzione del rischio di resistenza in quanto la terapia anti virulenza non esercita una pressione selettiva per la sopravvivenza dei batteri, come fanno gli antibiotici, e quindi di conseguenza il rischio di sviluppare resistenza si riduce significativamente. I batteri rimangono vitali, ma meno virulenti, riducendo la probabilità che sviluppino mutazioni di resistenza.

Esiste una correlazione tra i fattori di virulenza e il danno cellulare alla cellula ospite in quanto il danno cellulare è una conseguenza ai fattori di virulenza. Quindi, inibendo i fattori di virulenza si può ridurre la

suscettibilità alla colonizzazione batterica ed aumentare la risposta immunitaria dell'ospite. Dal momento che gli antibiotici tradizionali spesso distruggono anche i batteri benefici del microbioma umano, portando a disbiosi o a infezioni opportunistiche, un vantaggio della terapia anti virulenza risulta essere quello di riuscire a preservare il microbioma grazie al fatto che tale terapia non colpisce la crescita batterica, e quindi di conseguenza preserva l'equilibrio del microbioma. Un ulteriore vantaggio riguarda la possibilità di combinazione della terapia anti virulenza con la terapia antibiotica tradizionale in modo tale da potenziare l'effetto terapeutico. Questa combinazione può sia migliorare l'efficacia del trattamento che ridurre la durata dell'infezione.

Tuttavia, la terapia anti virulenza, oltre ad avere diversi vantaggi, presenta anche delle limitazioni. I limiti che questa terapia impone riguardano il tempo di risposta e la specificità.

Dato che la terapia anti virulenza non uccide direttamente i batteri, la manifestazione dell'effetto terapeutico può richiedere più tempo rispetto all'uso degli antibiotici convenzionali. Inoltre, le terapie anti virulenza devono essere specifiche per i fattori di virulenza dei patogeni target. Di conseguenza questo approccio richiede una comprensione approfondita dei meccanismi di virulenza specifici per ciascun patogeno.

La terapia anti-virulenza rappresenta una promettente e valida alternativa, sia in associazione che non agli antibiotici tradizionali. Risulta avere un significativo potenziale nel ridurre l'incidenza di resistenza batterica e di preservare il microbioma. Anche se ancora in fase di ricerca e sviluppo, questo approccio potrebbe rivoluzionare il trattamento delle infezioni batteriche e aprire nuove strade per la gestione delle malattie infettive. Esempi includono il targeting dei sistemi di secrezione di tossine da parte dei batteri, delle adesine, degli elementi di comunicazione batterica e dei RNA non-codificanti.

2.5 Terapie dirette dell'ospite

I meccanismi di difesa dell'ospite svolgono un ruolo fondamentale nella protezione dalle infezioni. Questi meccanismi possono venire meno e

quindi essere meno funzionali a causa di immunodeficienze, lesioni gravi, ustioni o terapia immunosoppressiva, portando di conseguenza ad aumentare la suscettibilità dell'ospite alle infezioni quindi maggior rischio di fallimento dell'antibiotico.

Le terapie dirette all'ospite donano un'efficiente soluzione andando a compensare sia le carenze immunitarie che i difetti dell'ospite. Pertanto, offrono delle strategie tali da permettere di aumentare le risposte immunitarie sia innate che adattative e di attenuare le vie dell'infezione.

Le terapie dirette dell'ospite agiscono da potenziatori, quindi, vanno a limitare la progressione delle infezioni e alleviano il fallimento antibiotico. Un metodo affermato e ben consolidato riguarda l'uso di immunoglobuline per via esogena, usato soprattutto nel trattamento di disturbi come infezioni e le infiammazioni annesse.

Come già visto in precedenza, in qualsiasi situazione, soprattutto nelle immunodeficienze è importante individuare ed affrontare le cause, in modo tale da aumentare l'efficacia del trattamento antibiotico. Un altro approccio molto valido ed altamente efficace nel trattamento delle immunodeficienze è la terapia allogenica, che consiste nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. Ciononostante, il successo di questa terapia dipende dalla compatibilità del donatore; tale ricerca risulta essere molto impegnativa e svantaggiosa soprattutto per il fatto che vengono usati farmaci immunosoppressori che aumentano il rischio dell'infezione.

Inoltre, anche la terapia genica correttiva, fornendo una copia efficace del gene mutato, è in grado di diminuire la suscettibilità alle infezioni. Tale terapia consiste nell'utilizzo di una copia efficace del gene mutato usando sia vettori virali che retrovirali. I vettori retrovirali risultano essere quelli più efficienti ed efficaci; infatti, mostrano un'elevata efficienza di trasduzione e un'espressione del gene tradotto più duratura nel tempo. Recentemente ha preso notevole attenzione un nuovo approccio basato su nanoparticelle liposomiali, metodo che permette il rilascio di acidi nucleici come RNA interferenti inibitori o gli mRNA complementari. Ovviamente questo approccio è da applicare in combinazione con gli antibiotici in modo tale da permettere di sopprimere l'infezione.

Il progresso delle tecnologie di modifica del genoma, quindi le tecniche di trapianto allogenico di cellule staminali e la terapia genica autologa, hanno permesso di superare importanti ostacoli e di permettere di affrontare le malattie da immunodeficienza primaria. Ad esempio, per quanto riguarda il trattamento dell'immunodeficienza combinata grave (SCID), questa viene affrontata attraverso l'uso di strategie tecnologiche correttive del gene CRISPR, utilizzando le cellule staminali. Inoltre, piattaforme innovative usano nucleasi, come ad esempio nucleasi zinc finger (ZFN), le nucleasi effettrici attivatrici della trascrizione (TALEN) e Cas9, le quali offrono un potenziale per una correzione accurata dei geni che causano malattie, in modo tale da consentire nuove possibilità terapeutiche per il trattamento di pazienti immunocompromessi. La terapia genica presenta delle limitazioni per quanto riguarda l'uso, soprattutto la popolazione di pazienti è ampia, e in più è molto costosa. In più, i pazienti con immunodeficienza secondaria, il cui sistema immunitario è compromesso e influenzato da molteplici fattori genetici, non possono affidarsi completamente alla sola terapia genica. Risulta quindi fondamentale conoscere e comprendere i meccanismi alla base della patogenesi di microbi specifici, importante nell'efficacia delle strategie di mitigazione nei confronti delle infezioni microbiche.

Recentemente degli studi hanno dimostrato l'efficacia di una libreria knockout CRISPR/Cas9 su scala genomica nei macrofagi umani THP-1; questi sono in grado di creare delle mutazioni con perdita di funzionalità in modo tale da prevenire le infezioni da salmonella. Lo screening ha permesso di evidenziare diversi geni coinvolti in vari percorsi. I percorsi coinvolti, come la segnalazione dei recettori, la dinamica del citoscheletro, il trasporto del calcio, il metabolismo dei glicosaminoglicani e del colesterolo, consentono di evidenziare il ruolo del gene NHLRC2. Questo gene è coinvolto nella differenziazione dei macrofagi e nell'invasione dei patogeni. Questi studi sono in grado di elaborare delle terapie dirette all'ospite efficaci ed alternative ai trattamenti convenzionali o in caso anche in aggiunta agli antibiotici.

L'immunità dell'ospite contro le infezioni può essere potenziata grazie all'uso di terapie immunomodulatorie. Tali terapie sono caratterizzate dalla presenza di agonisti mirati ai recettori di riconoscimento di pattern

come i TOLL-like (TRL) o i NOD-like oppure anche i peptidi di difesa dell'ospite, i quali appartengono ai potenziatori immunitari selettivi. Queste terapie immunomodulatorie vengono usate e somministrate in concomitanza con gli agenti antimicrobici convenzionali in modo tale da potenziare l'effetto.

I TOLL- like receptors (TRL) sono una classe di proteine che svolgono un ruolo cruciale nel sistema immunitario innato, riconoscendo i patogeni e attivando le risposte immunitarie. Questi recettori sono presenti sulla superficie delle cellule immunitarie, come macrofagi, cellule dendritiche e cellule epiteliali, e sono in grado di riconoscere molecole associate ai patogeni quindi le PAMPS (pathogens associated molecular patterns); tra queste riconosciamo il lipopolisaccaride dei batteri gram-negativi (LPS), i peptidoglicani dei batteri gram-positivi, RNA virale e altri componenti microbici.

Le funzioni principali dei TLR prevedono il riconoscimento dei patogeni, l'attivazione della risposta immunitaria e l'induzione dell'immunità adattativa.

Il riconoscimento dei patogeni avviene quando i TRL identificano e legano le molecole presenti sui patogeni. Dopo il legame con il patogeno si ha l'attivazione della risposta immunitaria attivando delle vie di segnalazione intracellulare che portano alla produzione di citochine infiammatorie e altre molecole che regolano la risposta immunitaria. Grazie all'attivazione delle cellule dendritiche, i TRL consentono di attivare la risposta immunitaria adattativa migliorando la capacità di memoria del corpo in caso di infezioni future dello stesso patogeno.

I peptidi di difesa dell'ospite, noti come peptidi antimicrobici (AMP) sono una componente fondamentale del sistema immunitario innato. Questi peptidi sono delle piccole molecole proteiche prodotte da vari tipi cellulari dell'organismo e che svolgono un ruolo importante della difesa contro le infezioni. Di fatto, queste molecole sono in grado di neutralizzare una vasta gamma di patogeni includendo batteri, virus, funghi e parassiti.

I peptidi di difesa dell'ospite possono essere sia naturali che sintetici ed entrambi offrono azioni immunomodulatorie. Gli HDP (Host defense peptides), peptidi di difesa dell'ospite, sono una componente essenziale del sistema immunitario innato e sono noti per le loro funzioni

antimicrobiche e immunomodulanti, quindi sono in grado di influenzare le varie risposte immuno modulatorie nell'ospite, migliorando gli elementi dell'immunità protettiva e di conseguenza inibendo le risposte pro infiammatorie stimulate dai batteri.

Mentre gli IDR (Immunomodulatory Defense Regulator), regolatori di difesa immunologica, sono sempre una classe di peptidi, i quali possiedono un'attività antimicrobica e in più sono in grado di modulare il sistema immunitario dell'ospite migliorando la risposta alle infezioni. Vengono progettati in modo tale da poter essere assunti in combinazione con antibiotici convenzionali.

2.6 Terapie alternative

Le alternative agli antibiotici stanno diventando sempre più rilevanti a causa dell'aumento della resistenza agli antibiotici, un problema globale che minaccia la salute pubblica.

Queste alternative possono essere utilizzate per prevenire o trattare le infezioni batteriche senza ricorrere agli antibiotici tradizionali, contribuendo a ridurre la pressione selettiva che favorisce lo sviluppo di ceppi resistenti.

Per la prevenzione e il trattamento delle infezioni batteriche esistono delle strategie antimicrobiche classificate come non convenzionali. In questo caso parliamo di probiotici, terapia fagica e di lisine.

I probiotici sono microrganismi vivi, principalmente batteri e lieviti che apportano benefici alla salute quando assunti in quantità adeguate. Questa terapia di microrganismi viventi esercita effetti benefici attraverso numerosi meccanismi, tra cui quella legata al sistema immunitario dell'ospite. L'assunzione di questi probiotici determina un aumento delle difese immunitarie riducendo l'incidenza di infezioni.

I probiotici sono utili anche perché riescono a contrastare e prevenire la diarrea dovuta all'assunzione di antibiotici. Allo stesso modo i prebiotici, ovvero sostanze non digeribili che vanno a stimolare la crescita e l'attività dei batteri benefici presenti nell'intestino, hanno dimostrato di avere degli effetti positivi sia sulla salute dell'ospite che a livello del microbioma. I prebiotici sono in grado di modificare la composizione del microbiota

intestinale, promuovendo la proliferazione di batteri benefici e la secrezione di metaboliti specifici.

La terapia fagica è un trattamento che utilizza batteriofagi, ovvero sono dei virus che infettano e distruggono i batteri per combattere infezioni batteriche. Poiché la resistenza agli antibiotici è una preoccupazione sempre in aumento, la terapia fagica rientra tra le terapie alternative per combattere il fallimento antibiotico. La terapia fagica è stata una delle prime strategie impiegate contro le infezioni, ma è stata esclusa dalla nascita e scoperta degli antibiotici. Ciononostante, ha ripreso interesse per la sua specificità di colpire e uccidere particolari ceppi batterici e cellule del biofilm, preservando il microbioma e mostrando una tossicità minima. Inoltre, viene usata in concomitanza con antibiotici contro i batteri resistenti in modo tale da rafforzare il sistema immunitario.

Oltre ai probiotici e alla terapia fagica, come terapia alternativa agli antibiotici troviamo le lisine. Le lisine sono degli enzimi sintetizzati dai batteriofagi che sono in grado di distruggere le pareti cellulari dei batteri. Risultano essere molto vantaggiose soprattutto perché sono molto selettive, mostrano un basso rischio di sviluppo di resistenza, hanno un'azione rapida e una tossicità minima.

Capitolo 3: Il ruolo del quorum sensing nella resistenza batterica: Meccanismi e implicazioni terapeutiche.

La resistenza agli antibiotici è un problema grave e anche una delle principali preoccupazioni per la salute globale. Complessivamente, si contano annualmente circa 16 milioni di morti per malattie infettive, di cui almeno il 65% di queste malattie infettive, sono causate da comunità microbiche che proliferano attraverso la formazione del biofilm. Conseguentemente, l'uso eccessivo di antibiotici ha portato allo sviluppo di ceppi microbici multiresistenti.

Attualmente, a causa di questo enorme problema, sono risultate di maggior interesse le terapie non antibiotiche, rispetto a quelle antibiotiche, per trattare le infezioni batteriche.

Tra queste strategie non antibiotiche, non tradizionali e rivoluzionarie, quella che ha suscitato maggior attenzione prevede l'uso degli inibitori del quorum sensing.

Il quorum sensing è un meccanismo di regolazione dell'espressione genica utilizzato dai batteri per comunicare tra loro ed inoltre è in grado di percepire i cambiamenti della densità della popolazione cellulare.

Il quorum sensing è un meccanismo chiave nella formazione e nello sviluppo del biofilm nei batteri. Il quorum sensing permette ai batteri di contare il numero di cellule presenti in un ambiente attraverso la produzione e il rilevamento degli autoinduttori, ovvero delle molecole segnale. Quando la concentrazione degli autoinduttori raggiunge la soglia critica, i batteri percepiscono e captano che la densità cellulare è sufficientemente alta da poter permettere e avviare la formazione di un nuovo biofilm. Una volta raggiunta la soglia di autoinduttori, il quorum sensing è in grado di attivare l'espressione di specifici geni, i quali sono associati alla produzione della matrice extracellulare, che include polisaccaridi, proteine e DNA extracellulare. Questi componenti, insieme,

formano la struttura del biofilm, che consente ai batteri di aderire saldamente sia tra loro che sulle superfici.

Inoltre, il quorum sensing coordina il comportamento collettivo dei batteri, inducendoli a produrre la matrice extracellulare e a esprimere fattori di virulenza necessari per la formazione del biofilm. Questo comportamento coordinato risulta essere fondamentale per mantenere sia la stabilità che la resistenza del biofilm.

Durante la maturazione del biofilm, il quorum sensing continua a modulare l'espressione dei geni che influenzano la crescita del biofilm e la sua struttura. In più, regola anche la produzione di enzimi e altre sostanze che hanno il ruolo di proteggere il biofilm da agenti esterni, inclusi gli antibiotici.

Il quorum sensing può anche controllare la dispersione delle cellule batteriche del biofilm maturo, un processo che permette ai batteri di colonizzare nuovi ambienti. Questa fase è cruciale per la diffusione dell'infezione e per la formazione di nuovi biofilm in altre aree.

Il quorum sensing regola molti processi come la motilità, la coniugazione, lo sviluppo di biofilm, la resistenza ai farmaci e la tolleranza agli antibiotici.

Tale meccanismo di regolazione è presente sia nei batteri gram-positivi che nei batteri gram-negativi, i quali utilizzano molecole segnale, autoinduttori, differenti per favorire il quorum sensing.

3.1 Sistema di rilevamento del quorum sensing nei batteri gram-negativi

I batteri gram-negativi, come *Pseudomonas Aeruginosa* ed *Escherichia Coli*, sono in grado di esprimere il quorum sensing. Nei batteri gram-negativi il responsabile del meccanismo del quorum sensing è l'N-acil omo-serina lattone (AHL), il quale è stato scoperto ed identificato la prima volta nel batterio marino *V. fischeri*. Praticamente, i batteri gram-negativi producono degli autoinduttori, che prendono il nome di

N-acil omoserina lattone (AHL). Gli N-acil omoserina lattone (AHL) sono delle piccole molecole, le quali riescono ad attraversare la membrana cellulare facilmente e a diffondersi nell'ambiente (figura 8). Queste molecole vengono sintetizzate da enzimi che prendono il nome di LuxI. Quindi, la cellula batterica cresce progressivamente e di conseguenza la concentrazione di AHL nell'ambiente aumenta. Quando raggiunge la soglia critica, queste molecole possono ritornare all'interno delle cellule batteriche. Gli AHL, all'interno della cellula, si legano a dei specifici recettori proteici, LuxR. Questa interazione, attiva il recettore e di conseguenza regola l'espressione dei geni bersaglio. Inoltre, l'attivazione di questi geni induce alla produzione di vari fattori, come enzimi degradativi, tossine e componenti della matrice del biofilm. [Figura 8].

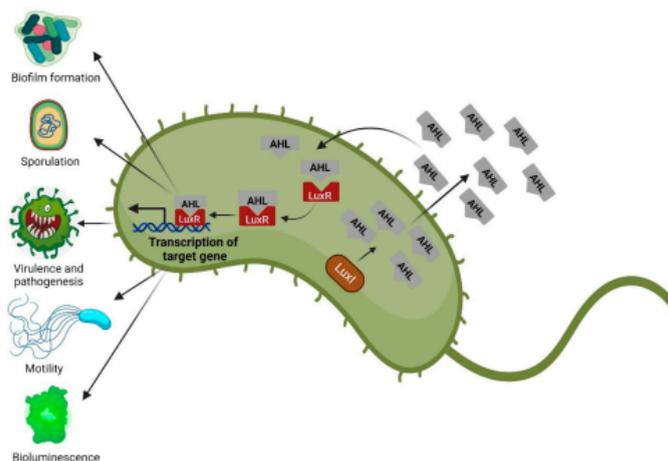


Figura 8 | Meccanismo QS nei batteri gram-negativi: produzione dell' autoinduttore N.acil omoserina lattone (AHL). Immagine tratta da Hetta et al., 2024.

3.2 Sistema di rilevamento del quorum sensing nei batteri gram-positivi

I batteri gram-positivi, attraverso l'autoinduzione di peptidi ciclici, con annesse cascate di fosforilazione che agiscono come un meccanismo di segnalazione, sono in grado di regolare il quorum sensing. Quindi i batteri gram-positivi sono in grado di produrre e secernere piccole sequenze peptidiche chiamate oligopeptidi o peptidi segnale, i quali vengono

sintetizzati nel citoplasma e poi trasportati fuori dalla cellula attraverso un sistema di trasporto specializzato (figura 9). Quando la popolazione batterica cresce, di conseguenza aumenta anche la concentrazione degli oligopeptidi nell'ambiente extracellulare. I peptidi segnale, non essendo in grado di attraversare la membrana della cellula batterica, vengono rilevati dai batteri attraverso dei recettori di membrana, i quali sono caratterizzati da due componenti. Il primo componente, quindi il recettore di membrana rileva la presenza degli oligopeptidi e subisce una fosforilazione, in modo tale da poter trasferire un gruppo fosfato a una proteina regolatrice intracellulare, ovvero il secondo componente. La proteina fosforilata agisce come un fattore di trascrizione e quindi regola l'espressione dei geni specifici in risposta al quorum sensing, in modo tale da consentire la produzione di enzimi degradativi, la produzione di tossine e la formazione del biofilm. I batteri gram-positivi che attuano questo tipo di meccanismo con il quorum sensing sono *S. Aureus*, *S. Pneumoniae*, *C. Botulino*, e *B. Subtilis*, e in più sono in grado di controllare diversi fenotipi. [Figura 9]

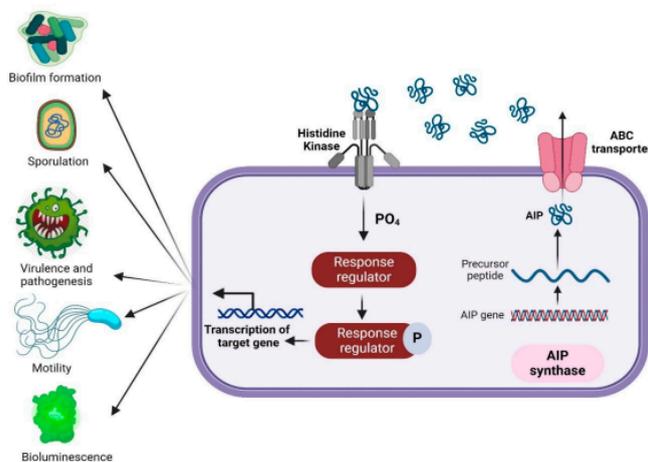


Figura 9 | QS nei batteri gram-positivi. Immagine tratta da Hetta et al., 2024.

3.3 Inibizione del Quorum Sensing

L'inibizione del quorum sensing, nota anche come quorum quenching, è una strategia che mira a interrompere la comunicazione tra i batteri per

prevenire situazioni coordinate come la formazione del biofilm, la produzione di tossine e altri fattori di virulenza.

Questo approccio risulta essere particolarmente interessante come alternativa agli antibiotici tradizionali, in quanto può ridurre la virulenza batterica senza necessariamente uccidere i batteri, e di conseguenza potrebbe ridurre lo sviluppo della resistenza agli antibiotici.

Il meccanismo di inibizione del quorum sensing avviene attraverso l'azione di diversi meccanismi, quali l'inibizione della sintesi di molecole segnale, la scomposizione delle molecole segnale attraverso la degradazione enzimatica, la competizione con le molecole segnale per il legame ai siti recettoriali, il blocco del legame delle molecole segnale ai promotori dei geni e l'inibizione dell'espressione dei geni e l'eliminazione degli autoinduttori da parte di anticorpi e macromolecole come le ciclodestrine.

Alcuni enzimi come acilasi, lattonasi e ossidoreduttasi, sono in grado di degradare le molecole segnale del quorum sensing, o in caso gli AHL nei gram-negativi, in modo tale da impedire che raggiungano la soglia necessaria per attivare la risposta coordinata, ovvero impedendo che attivino il quorum sensing che porterebbe alla formazione del biofilm.

Un inibitore del quorum sensing, per essere efficace, deve soddisfare determinati requisiti.

Infatti, per avere il massimo dell'azione, l'inibitore del quorum sensing, deve essere di dimensioni ridotte, deve avere un'elevata specificità per un particolare regolatore quorum sensing. Inoltre, deve avere una buona stabilità chimica e resistere alla degradazione da parte dei sistemi metabolici dell'ospite

3.4 Possibili meccanismi del QSI

Un fattore chiave nell'inibizione del quorum sensing e nella limitazione dello sviluppo di sintomi patogeni è la riduzione della comunicazione

cellula-cellula e l'impedimento della formazione di queste connessioni. Questo approccio mira a bloccare i segnali molecolari che i batteri utilizzano per coordinare il loro comportamento collettivo, come la produzione di tossine e la formazione di biofilm, i quali risultano essere essenziali per la virulenza e la persistenza delle infezioni.

Dal punto di vista dello sviluppo e della progettazione di questi inibitori, risulta essere di maggior rilevanza la riduzione della comunicazione cellula-cellula attraverso l'inibizione della sintesi delle molecole segnale, quindi degli autoinduttori.

Il precursore S-adenosil-omocisteina (SAH) subisce una conversione nelle molecole segnale AI-2, molecola autoinduttore-2, per mezzo di una sequenza di due enzimi distinti. L'autoinduttore AI-2 è una molecola di segnalazione utilizzata nel sistema di quorum sensing.

LuxS/AI-2 svolge un ruolo importante che riguarda la caratterizzazione della crescita, la formazione di biofilm, la produzione di fattori di virulenza e anche nel metabolismo di diversi ceppi batterici.

Nei procarioti, LuxS/AI-2 è presente in circa metà di tutti i genomi batterici sequenziati. Inoltre, sia i batteri gram-positivi che i batteri gram-negativi utilizzano l'enzima LuxS per la segnalazione. Pertanto, LuxS appare come un promettente bersaglio per lo sviluppo di inibitori volti a impedire la QS in vari batteri.

Diversi peptidi, che possono interagire con l'enzima LuxS nello streptococco, sono stati utilizzati per esaminare l'inibizione di LuxS. Recentemente, uno studio ha evidenziato come alcuni peptidi, legandosi al LuxS, riescano ad inibire e bloccare la loro azione parzialmente. Il peptide 5906 codificato dal plasmide p5906 è stato impiegato come QSI antibatterico ad ampio spettro, in grado di inibire l'attività di LuxS tramite meccanismi non del tutto compresi.

I batteri lattici probiotici, come *Lactobacillus sakei* NR28, grazie alla loro biocompatibilità e adattamento intestinale, sono considerati dei candidati interessanti per testare la loro capacità di inibire AI-2 nei batteri patogeni.

Il sistema di segnalazione gioca un ruolo essenziale nella regolazione dei meccanismi di virulenza di *Escherichia Coli* (EHEC), il patogeno emorragico che causa colite emorragica. Sono stati valutati gli effetti antimicrobici di *Lactobacillus sakei* (Lsake) su *Escherichia Coli*, e i risultati indicano che Lsake è in grado di ridurre leggermente l'attività di *E. Coli*. Tuttavia, l'analisi trascrizionale di una co-coltura di *Lactobacillus sakei* (Lsake) e *Escherichia coli* ha dimostrato che Lsake riduce l'espressione dei geni coinvolti nella regolazione del quorum sensing, come LuxS, e nella sintesi di AI-2.

Inoltre, composti furanonici presenti nelle alghe marine *Delisea pulchra*, come ad esempio il furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromometilene)-3-butil-2(5H)-furanone, possono inibire AI-2 nel QS di *Escherichia coli*.

La molecola di segnalazione AI-2 è fosforilata dall'enzima chinasi Lsrk. Pertanto, l'inibizione di Lsrk porterebbe all'inattivazione del quorum sensing e alla cessazione della produzione di fattori virulenti. L'attivazione della cascata del quorum sensing avviene quando la forma fosforilata di AI-2 si lega alla proteina repressore trascrizionale LsrR, provocandone la dissociazione dal promotore dell'operone. Quando AI-2 non è fosforilato non riesce a legarsi efficacemente al recettore, impedendo così l'inizio dell'espressione di alcuni geni. Dato che Lsrk è cruciale per la fosforilazione necessaria al rilascio del repressore e all'attivazione delle vie del quorum sensing, è considerato un potenziale bersaglio per le strategie di inibizione del QS. Recentemente è stato sviluppato un test rapido che permette di valutare l'inibizione di Lsrk da parte di 91 composti e di investigare l'interruzione del quorum sensing. I risultati hanno mostrato che tutti i composti testati erano efficaci contro la chinasi Lsrk e hanno portato alla disattivazione del quorum sensing. Per testare l'efficacia degli inibitori di Lsrk, è stata sviluppata una libreria di molecole base su precursori dell'AI-2 e analoghi di DPD. I risultati hanno evidenziato che la porzione pirazolica era il componente strutturale chiave responsabile dell'inibizione di Lsrk.

3.5 Prevenire la produzione di AHL nei batteri Gram-negativi

Con quorum quenching ci si riferisce ad un processo atto ad interrompere il quorum sensing, quindi un processo volto ad ostacolare l'incremento delle molecole segnale che portano alla formazione del biofilm.

Il quorum quenching può avvenire attraverso l'inibizione della sintesi delle molecole segnale, quindi inibendo la produzione delle AHL.

Gli AHL sono tipicamente caratterizzati dalla presenza di una catena laterale acilica grassa, la quale può variare in lunghezza andando da 4 a 18 atomi di carbonio, e da un anello lattone omoserina. Le fonti di AHL sono gli enzimi appartenenti alla famiglia LuxI, quindi troviamo SAM, substrati acil-ACP e acil-HSL sintasi. Di conseguenza, concentrarsi sull'inibizione di questi enzimi potrebbe ridurre la produzione di AHL. Questo metodo, inoltre, presenterebbe un vantaggio in quanto gli enzimi necessari per la produzione degli induttori sono codificati all'interno del genoma di molti batteri.

L'enzima AHL-sintasi è l'enzima responsabile della sintesi degli acil-omoserina lattoni, ovvero i principali autoinduttori coinvolti nel quorum sensing. L'enzima AHL-sintasi viene generato da tre sistemi enzimatici: HdtS, LuxI e LuxM.

Un Esempio comune di AHL-sintasi è l'enzima LuxI del batterio *Vibrio fischeri*, il quale sintetizza un AHL specifico e necessario per la bioluminescenza regolata dal quorum sensing in questo organismo.

Nonostante ciò, gli analoghi strutturali della S-adenosil-metionina (SAM) risultano essere gli inibitori della AHL sintasi più studiati. È stato osservato che la sinefugina, la L/D s-adenosil omocisteina e il butirril-SAM sono in grado di inibire il primo passaggio del quorum sensing, inoltre è emerso che riescono a ridurre la sintesi di AHL nei patogeni.

La SAM, quindi S.adenosil- metionina, è una molecola biologica importante che interviene in numerosi processi biochimici nelle cellule, e i suoi analoghi hanno la capacità di inibire la produzione di AHL. In particolare, si è verificato che tutti i componenti del ciclo metilico nei batteri sono diminuiti soprattutto quando *Escherichia Coli* viene coltivato in ambiente privo di metionina.

3.6 Prevenire la sintesi degli AIP nei batteri Gram-positivi

Con AIP ci si riferisce ai peptidi autoinduttori, coinvolti nel quorum sensing. Questo termine risulta essere particolarmente rilevante in quanto essi risultano essere coinvolti nel quorum sensing nei batteri gram.positivi, dove AIP è in grado di regolare l'espressione dei geni associati alla virulenza e alla formazione del biofilm.

Gli AIP, quindi i peptidi autoinduttori, sono sintetizzati attraverso un processo che coinvolge sia i ribosomi che specifici enzimi, tra cui le peptidasi. Gli enzimi peptidasi, pur essendo cruciali per la vita batterica, non sono direttamente coinvolti nella sintesi degli AIP, ma risultano essere fondamentali per la degradazione e maturazione delle proteine, processi essenziali per la crescita e la sopravvivenza dei batteri. Di conseguenza la loro inibizione risulta avere un'azione battericida e in più contribuisce a sviluppare resistenza batterica.

3.7 Targeting della sintasi AI-2

AI-2 è una molecola segnale coinvolta nel quorum sensing. A differenza degli AIP, i quali sono prevalentemente usati dai batteri gram-positivi, l'AI-2 è prodotto da una vasta gamma di batteri, sia batteri gram-positivi che batteri gram-negativi, e gioca un ruolo fondamentale nella comunicazione dei batteri.

Il passo cruciale nella sintesi dell'AI-2 è la trasformazione della molecola SAH in DPD, in 4,5-diidrossi-2,3-pentanedione (DPD), e L-omocisteina.

Tutto ciò avviene tramite un processo enzimatico che coinvolge l'enzima LuxS. Inoltre, il DPD risulta essere l'intermedio chiave per la produzione di AI-2. Pertanto, prendere come bersaglio terapeutico l'enzima LuxS, quindi mirare alla sintesi dell'AI-2 risulta essere una strategia promettente per interferire sia con il quorum sensing che efficace nel contrastare le infezioni batteriche.

È stato rilevato che una varietà di furanoni bromurati, presenti in natura, sono in grado di inibire, in modo concentrazione-dipendente, l'enzima LuxS. Ad esempio, dal batterio *B. Subtilis* è stata isolata la surfatina, un composto naturale in grado di colpire il sistema LuxS/AI-2 nel quorum sensing e di riuscire ad inibire del 70% la formazione del biofilm.

3.8 Targeting dei recettori dell'IA

Tramite competizione o inattivazione dei recettori coinvolti nella segnalazione del quorum sensing è possibile ridurre sia la virulenza batterica che l'infezione. Sono state individuate due classi di inibitori del quorum sensing, particolarmente promettenti, i flavonoidi e i furanoni, i quali sono in grado di legarsi ai recettori di diversi agenti patogeni.

I furanoni alogenati furono i primi inibitori del QS e vengono generati da una macroalga marina, la *Delisea pulchra*. La loro azione si basa sul legame competitivo con il recettore LuxR. Studi hanno dimostrato che il legame dei flavonoidi ai recettori del quorum sensing può inibire la produzione di fattori di virulenza in *P. aeruginosa*.

Inoltre, un farmaco usato per trattare il diabete di tipo 2, il sitagliptin, risulta essere in grado di interagire con il recettore LasR in *P. aeruginosa*. Oltretutto, la formazione del biofilm risulta essere inibita anche a concentrazioni minime di sitagliptin.

In aggiunta, alcuni inibitori del quorum sensing risultano essere in grado di legarsi a più recettori contemporaneamente.

Ad esempio, i lattobacilli sono in grado di produrre un inibitore del quorum sensing, ovvero l'acido lattico 3-benzene (PLA), il quale si lega a diversi recettori come RhIR e PQ. Il legame che PLA instaura con questi recettori risulta essere più forte rispetto ai legami con i suoi ligandi affini BHL e PQS in *P. aeruginosa*. Peraltro, anche sostanze naturali come la piperina e l'embelina risultano essere essenziali nella prevenzione della produzione di biofilm in *S. mutans*, in quanto riescono a disattivare i recettori coinvolti nei percorsi del quorum sensing.

Analoghi strutturali dell'AHL, come N-decanoil-L-omoserina benzil estere e tiolattoni, possono ridurre la produzione di elastasi, ramnolipidi e altri fattori coinvolti nella virulenza e bloccano i recettori in *P. aeruginosa*.

In particolari circostanze, gli antagonisti dei recettori di quorum sensing permettono di ridurre il dosaggio terapeutico degli antibiotici, migliorandone l'efficacia. Gli antibiotici aminoglicosidici, somministrati a dosi sub-inibitorie, hanno dimostrato proprietà anti-virulenza e antibiofilm grazie alla loro capacità di legarsi ai recettori del quorum sensing.

Il flavonoide naringenina, legandosi direttamente ai recettori LasR, inibisce dei fattori di virulenza regolati dal quorum sensing. Inoltre, anche il meta-bromo-tiolattone, un inibitore del QS, è in grado di disattivare direttamente i recettori in modo tale da fermare la produzione dei fattori di virulenza e la formazione di biofilm. Molti antagonisti del quorum sensing (QSI) bloccano l'attività dei recettori dei segnali batterici, ostacolando la comunicazione tra cellule e diminuendo la patogenicità e la virulenza dei batteri infettivi, formando complessi recettore-segnale inattivi. La strategia più evidente è quella di mirare ai recettori del segnale AI. Tuttavia, non tutti i QSI identificati agiscono come antagonisti dei recettori dell'AI.

3.9 Mirare ai recettori AHL sui batteri Gram-negativi

LuxR-AHL è una proteina di quorum sensing nei batteri gram-negativi e quale gioca un ruolo cruciale nella regolazione della comunicazione e del comportamento collettivo tra le cellule batteriche. Questa proteina è

molto diffusa nei batteri gram-negativi ed è la proteina del recettore AI. In seguito a quanto detto, colpire il complesso LuxR-AHL con inibitori del quorum sensing specifici è una strategia utile per il controllo della patogenesi.

La base delle strategie volte a interrompere il legame tra le proteine del recettore del segnale e gli AHL è rappresentata dalla sintesi e progettazione di inibitori come gli analoghi dell'AHL, gli AHL strutturalmente indipendenti e i QSI presenti in natura.

Gli analoghi AHL contengono una struttura di base simile a quella degli AHL naturali, composta da un lattone ciclico e una catena acilica. Gli analoghi dell'AHL (acil-omoserina lattone) sono molecole chimiche simili agli AHL naturali, ma modificate in modo da influenzare il sistema di quorum sensing senza essere metabolizzati o riconosciuti come segnali naturali dai batteri. Di conseguenza, ogni variazione nella struttura degli analoghi, come ad esempio l'incorporazione di qualsiasi gruppo funzionale, oppure modifiche legate alla chiralità e nella geometria, può interrompere l'interazione tra il recettore e il segnale. Ad esempio, l'aggiunta di un gruppo metile attivo su AHL ha permesso di abbassare del 50% il legame del segnale proteico del recettore, inoltre con l'aggiunta di un secondo metile l'attività si è ridotta del 90%. In effetti, l'adozione di analoghi AHL è una strategia valida e di successo per la regolazione dei processi mediati dal quorum sensing. In *P. aeruginosa*, *A. tumefaciens* e *V. Fscheri*, l'aggiunta di diversi gruppi voluminosi alla catena acilica può inibire rispettivamente LasR, TraR e LuxR, producendo analoghi di AHL.

AHL strutturalmente non correlati sono molecole che, pur non condividendo la forma chimica tipica degli AHL, possono comunque influenzare i processi del quorum sensing o bloccare l'attività degli AHL naturali. Ad ogni modo, queste molecole agiscono spesso come antagonisti del quorum sensing, interferendo con il riconoscimento del segnale da parte di recettori batterici. L'impiego *in vivo* degli AHL strutturalmente non correlati è ancora piuttosto limitato, mentre *in vitro* si sono ottenuti ottimi risultati con riduzione quasi pari al 90% della capacità

legante. È stata dimostrata l'azione di molti antibiotici come azitromicina, doxiciclina, ciprofloxacina, alcuni B-lattamici come ceftazidima, cefepime e imipenem, a concentrazione sub-inibitorie, e vari furanoni sintetici. Tutti questi antibiotici sono in grado di inibire la segnalazione del quorum sensing e inoltre riescono a diminuire i fattori di virulenza come la motilità, la formazione di film in alcuni batteri gram- negativi. Inoltre, anche una classe di FANS, farmaci antinfiammatori non steroidei, che comprende meloxicam e piroxicam, si è rivelata efficace come QSI. Curiosamente, è stato riportato come le nanoparticelle (NP) riescano a ridurre la patogenicità di certi batteri. Per esempio, l'uso di nanoparticelle degli ioni rame e di nanoparticelle dell'argento hanno inibito il sistema di segnalazione del quorum sensing in *P. aeruginosa*, mentre *V. cholerae* è stato inibito dalle nanoparticelle d'oro.

Molti composti naturali hanno la capacità di bloccare le vie di segnalazione del quorum sensing di specifici microrganismi.

Ad esempio, il limonene di Agrumi reticolati è in grado di inibire del 33% la produzione della segnalazione AHL in *P. aeruginosa*, inoltre inibisce la formazione di biofilm del 41%.

Allo stesso modo, la motilità e la formazione di biofilm sono state inibite dall'estratto fenolico di *Rubus rosifolius*.

Il composto metossiisoflavano è in grado di inibire la formazione di piocianina, la proteasi, l'attività dell'emolisina e la formazione di biofilm in *P. aeruginosa* e inoltre ha diminuito la produzione di violaceina in *C. violaceum*.

L'estratto etanolic di *Amomum tsapko* è in grado di ridurre i biofilm dei patogeni di origine alimentare rispettivamente del 51.96% in *S. typhimurium*, 47.06% in *A. aureus* e 45.28% in *P. aeruginosa*.

L'estratto di aglio può inibire le infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*, andando a inibire il sistema di segnalazione e riducendo la formazione del biofilm. Allo stesso modo, anche gli estratti di mirtillo rosso idrosolubili

hanno evidenziato avere un'azione inibitoria nella formazione di biofilm di *V. Cholerae*.

3.10 Targeting del recettore dell'istidina nei batteri Gram-positivi

I batteri gram-positivi utilizzano diversi sistemi di quorum sensing per coordinare comportamenti collettivi, e questi sistemi possono essere regolati da recettori e regolatori trascrizionali. In generale, i batteri gram-positivi hanno due principali meccanismi di quorum sensing che si distinguono per il loro sistema di segnalazione e rilevamento. Nel sistema a due componenti, si osservano i seguenti elementi: recettore della chinasi attaccato alla membrana e regolatore trascrizionale. Questo sistema a due componenti lo troviamo negli *Staphylococcus aureus*, rappresentati dal sistema Agr. Il sistema Agr è un sistema fondamentale per la regolazione di comportamenti collettivi, come la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm. Attualmente, il sistema a due componenti nei batteri gram-positivi può essere inibito attraverso l'uso di antagonisti verso AIP.

3.11 Mirare ai recettori LuxP

I recettori proteici identificati e responsabili della mediazione nel segnale di AI-2 sono LuxP, LsrB e RbsB. La progettazione di molecole che si legano a questi recettori proteici rappresenta un approccio innovativo per interferire con le funzioni del sistema AI-2. Il LuxP è un recettore specifico per AI-2, che si trova all'interno della *S. Typhimurium*. Mirare ai recettori LuxP, quindi al sistema di quorum sensing basato su AI-2 può prevenire la comunicazione tra i batteri. Questo può ridurre o bloccare la formazione di biofilm e la produzione di fattori di virulenza, rendendo i batteri più suscettibili agli antibiotici. Ad esempio, è emerso come il composto solfone abbia un effetto antagonista sui recettori LuxP. Inoltre, anche gruppi aromatici specifici come polifenoli e fenilboronici, a concentrazioni sub-MIC sono in grado di inibire la produzione di bioluminescenza nel batterio *V. Harvey*.

3.12 Inattivazione enzimatica degli IA

Un approccio efficace consiste nell'inattivazione o nella degradazione enzimatica dei peptidi antimicrobici extracellulari, poiché questo metodo è in grado di abbattere la resistenza microbica senza causare stress alla cellula batterica.

Gli enzimi QQ (quorum quenching) sono un gruppo di enzimi che svolgono un ruolo cruciale nell'interferire con il quorum sensing. Quindi gli enzimi QQ agiscono per spegnere o neutralizzare i segnali del quorum sensing, impedendo ai batteri di comunicare efficacemente tra loro, in modo tale da impedire lo sviluppo di virulenza e bloccare la formazione di biofilm.

3.13 Enzima lattonasi

Le lattonasi sono degli enzimi che svolgono un ruolo cruciale nella degradazione delle molecole segnale coinvolte nel quorum sensing, in particolare negli autoinduttori come, ad esempio, gli N-acil omoserina lattone (AHL), usati dai batteri gram-negativi per la comunicazione intercellulare (figura 10). Degradando gli AHL, le lattonasi possono interferire con il quorum sensing, impedendo ai batteri di coordinare comportamenti come la formazione del biofilm, la produzione di fattori di virulenza e altre attività. Nei tessuti dei mammiferi, l'enzima lattonasi viene identificato come PON, il quale viene suddiviso in diverse categorie: PON1, PON2, PON3. I geni PON1 e PON3 sono stati identificati e localizzati nel fegato e nei reni. [Figura 10]

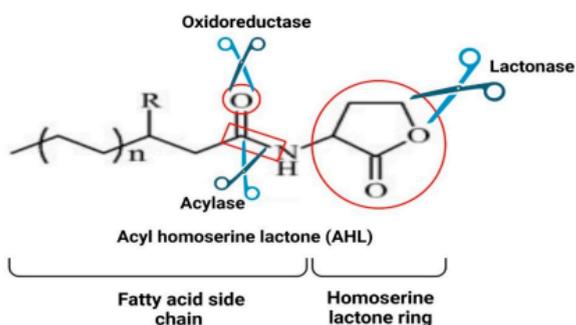


Figura 10 | Inattivazione enzimatica degli autoinduttori da parte di enzimi, come lattonasi, acilasi, ossidoriduttasi. Immagine tratta da Hetta et al., 2024.

3.14 Enzima acilasi

L'unica fonte di energia e di azoto per l'enzima acilasi sono le AHL. L'enzima acilasi agisce andando a rompere il legame ammidico tra le catene laterali dell'acido grasso e l'anello lattonico.

Il primo microbo noto per produrre l'enzima acilasi è il *Paradosso di Variovorax*, ed è stato individuato nei reni dei suini.

Un esempio di acilasi è PvdQ, trovata in *Pseudomonas Aeruginosa*, la quale degrada gli AHL. Dato che le acilasi sono in grado di riconoscere le catene alchiliche, risultano avere una maggior selettività di substrato rispetto alle lattonasi.

3.15 Enzima ossidoreduttasi

Le ossidoreduttasi sono una vasta classe di enzimi coinvolti nelle reazioni di ossidoriduzione, i quali facilitano il trasferimento di elettroni tra molecole. In relazione al quorum sensing, gli enzimi ossidoreduttasi sono in grado di influenzare vari aspetti di questo sistema di comunicazione batterica, soprattutto attraverso la regolazione dello stato redox intracellulare e la produzione di molecole segnale. Riducendo o ossidando le catene alchiliche degli AHL, gli enzimi ossidoreduttasi alterano la struttura chimica degli AHL, impedendo il loro legame con i recettori specifici. Questo blocco del legame compromette la capacità dei batteri di attivare l'espressione genica regolata dal quorum sensing, interferendo con la coordinazione di comportamenti collettivi come la formazione di biofilm e la produzione di fattori di virulenza.

3.16 Assorbimento attivo delle molecole di segnalazione dell'IA da parte dei batteri benefici

Altri batteri, come le enterobacteriaceae, possono sequestrare e ostacolare la comunicazione cellulare. Alcuni di questi batteri includono *S. Meliloti*, *S. Typhimurium*, *Escherichia coli* commensale e *B. Anthracis*. I batteri commensali eliminano l' AI-2 dall'ambiente, rendendo impossibile per gli altri membri utilizzare i segnali dell' AI-2 per modificare il loro comportamento. E' stato osservato che la bioluminescenza causata dai segnali del quorum sensing è stata ridotta del 28% quando *Escherichia coli* è stata coltivata insieme a *V. Harveyi* e del 90% quando è stata coltivata insieme a un ceppo mutante di *Escherichia coli* che conteneva un Lsrk costitutivamente inibito.

3.17 Applicazioni dei QSI nella lotta alla formazione di biofilm batterici

Un biofilm è una comunità complessa di batteri che si organizza per resistere a condizioni ambientali avverse, come l'attacco di antibiotici, la presenza di sostanze tossiche o le difese del sistema immunitario umano. I batteri possono esistere in due forme principali: planctonica, in cui i singoli organismi fluttuano liberamente nel loro ambiente, o sessile, in cui i batteri aderiscono a superfici formando strutture organizzate come i biofilm. Nei biofilm, i batteri si raggruppano e vengono avvolti da una sostanza chiamata matrice polimerica extracellulare (EPS), un materiale vischioso che svolge diverse funzioni: aiuta i batteri a rimanere ancorati alle superfici, li protegge da agenti chimici esterni, inclusi anche gli antibiotici e rende più difficile per il sistema immunitario umano eliminarli. Questa forma di crescita rende i batteri più resistenti e complicati da eradicare, rendendo i biofilm una sfida importante per la medicina.

L'EPS (matrice polimerica extracellulare) risulta essere un componente chiave del biofilm, ed è costituita principalmente da carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici. Questa matrice rappresenta circa i due terzi del volume totale del biofilm e fornisce ai batteri una struttura

tridimensionale protettiva. La struttura 3D dell'EPS non solo mantiene i batteri saldamente attaccati alla superficie, ma crea anche un ambiente sicuro e stabile in cui i batteri possono crescere e prosperare. I batteri all'interno della matrice del biofilm non solo sono protetti, ma possono anche collaborare tra loro in modo efficace. Grazie alla stretta vicinanza e all'organizzazione strutturale fornita dall'EPS, i batteri possono scambiare informazioni attraverso segnali chimici in un processo noto come quorum sensing. Inoltre, all'interno del biofilm, i batteri hanno la possibilità di trasferire geni di resistenza agli antibiotici attraverso il processo di coniugazione o altre forme di trasferimento genico orizzontale. Questo scambio di materiale genetico rende la popolazione batterica nel biofilm altamente adattabile e resistente, contribuendo a rendere le infezioni associate ai biofilm particolarmente difficili da trattare. Nella parte più profonda della matrice del biofilm, i livelli ridotti di ossigeno e di nutrienti creano un ambiente in cui alcuni batteri entrano in uno stato di quiescenza o latenza, formando quelle che sono note come cellule persistenti. Queste cellule sono metabolicamente inattive o molto poco attive, il che le rende particolarmente tolleranti agli antibiotici. Gli antibiotici, infatti, tendono ad essere più efficaci contro i batteri in crescita attiva, ma le cellule persistenti, essendo dormienti, possono sopravvivere al trattamento. Quando l'antibiotico viene rimosso, queste cellule possono riattivarsi e ripopolare il biofilm, contribuendo alla resistenza antibatterica e rendendo il trattamento delle infezioni associate ai biofilm particolarmente difficile. Questo comportamento delle cellule persistenti è uno dei principali fattori che rende il biofilm così resistente e problematico nei confronti delle infezioni croniche.

Il trattamento delle infezioni causate da biofilm multiresistenti (MDR) è estremamente complesso, principalmente a causa della barriera fisica rappresentata dalla matrice del biofilm. Questa matrice, costituita dall'EPS, non solo protegge i batteri dagli antibiotici, ma impedisce anche il sistema immunitario di raggiungere e attaccare efficacemente i batteri all'interno.

L'uso di inibitori del quorum sensing (QSI) rappresenta un approccio significativo nella lotta contro le infezioni da biofilm. Il quorum sensing è

un meccanismo di comunicazione che i batteri utilizzano per coordinare comportamenti collettivi, inclusa la formazione e la maturazione del biofilm. Bloccando questa comunicazione, i QSI possono interferire con il processo di formazione del biofilm, rendendo i batteri più vulnerabili ai trattamenti. Diversi studi moderni hanno dimostrato l'efficacia dei QSI nel combattere i biofilm. Ad esempio, in un modello murino di infezioni polmonari, l'acilasi PvdQ si è dimostrata un agente inibitore del quorum sensing con una notevole efficacia terapeutica. La PvdQ agisce idrolizzando irreversibilmente le molecole segnale note come AHL (acil-omoserina lattone), che sono cruciali per la comunicazione batterica nel quorum sensing. Senza queste molecole di segnalazione, i batteri non possono coordinare la formazione del biofilm né la loro resistenza, rendendo l'infezione più suscettibile all'azione degli antibiotici e del sistema immunitario. Le infezioni causate dalla formazione di biofilm su dispositivi medici rappresentano un grave problema clinico, poiché i biofilm costituiscono un importante fattore di virulenza per i batteri patogeni. Questi biofilm rendono gli agenti patogeni particolarmente resistenti alle terapie convenzionali e difficili da eradicare. Per affrontare questo problema, è possibile inibire la formazione di biofilm utilizzando un rivestimento multifunzionale a base di polietilenglicole (PEG). Questo tipo di rivestimento può essere progettato per incorporare covalentemente un inibitore sintetico del QS, come ad esempio il 5-metilene-1-(prop-2-enil)-4-(2-fluorofenil)-diidropirrol-2-one. Applicato sulla superficie dei dispositivi medici, questo rivestimento impedisce ai batteri di comunicare tra loro, e di conseguenza, di formare biofilm. L'utilizzo di questo rivestimento rappresenta un mezzo pratico ed efficace per prevenire infezioni associate ai dispositivi medici, come cateteri, protesi e altri impianti. Inoltre, gli inibitori del quorum sensing possono essere utilizzati in combinazione con antibiotici, agendo come acceleratori antibiotici. In questo modo, essi aumentano l'efficacia degli antibiotici contro i batteri che formano biofilm, facilitando il trattamento delle infezioni e riducendo il rischio di sviluppare nuove resistenze. Due derivati degli acidi cinnamici, l'acido 4-dimetilammino cinnamico e l'acido 4-metossicinnamico, si sono rivelati promettenti come inibitori delle molecole segnale AHL nel quorum sensing batterico. Questi composti

non solo inibiscono in modo significativo la formazione del biofilm, ma aumentano anche la sensibilità dei batteri alla tobramicina, un antibiotico comunemente utilizzato.

La capacità di questi acidi di interferire con il quorum sensing impedisce ai batteri di organizzarsi in biofilm, una strategia difensiva che li rende tipicamente più resistenti ai trattamenti. Inoltre, la maggiore sensibilità alla tobramicina significa che i batteri, una volta privati della protezione del biofilm, diventano più vulnerabili all'azione antibiotica. Questo duplice effetto rende i derivati dell'acido cinnamico dei potenziali agenti terapeutici nel trattamento delle infezioni da biofilm, specialmente quando combinati con antibiotici come la tobramicina.

In *Acinetobacter baumannii*, la formazione di biofilm è strettamente legata all'attivazione di un sistema di quorum sensing (QS) di tipo LuxI/LuxR, che include l'enzima sintasi AbaI, il recettore AbaR, e numerosi segnali AHL. È stato osservato che la mutazione della sintasi AHL AbaI altera significativamente la motilità batterica associata alla superficie e compromette la formazione persistente del biofilm in *A. baumannii*.

Gli studi hanno dimostrato che vari inibitori del QS, come gli analoghi delle AHL, gli antagonisti anoR, come la virstatina, gli antagonisti AbaR, come la streptomina, e gli inibitori dell'enzima di-guanilato ciclasi, il quale è responsabile della produzione del di-GMP ciclico, possono efficacemente impedire il QS. Questo, a sua volta, ostacola la capacità di *A. baumannii* e di altri patogeni nosocomiali di formare biofilm.

Un'altra interessante scoperta riguarda la sifonocolina, uno steroide marino isolato da *Siphonochalina siphonellae*, che ha mostrato un'efficace attività inibitoria del quorum sensing. Questo composto è in grado di sopprimere la sintesi della matrice polimerica extracellulare (EPS), ridurre la motilità, e inibire la formazione di biofilm in *A. baumannii*, MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*.

Un altro esempio di inibizione del quorum sensing è dato dalla glabridina, un bioattivo presente nei flavonoidi della liquirizia. Gli studi condotti hanno valutato la capacità della glabridina di inibire il QS in ceppi di *A.*

baumannii multiresistenti, dimostrando che questo composto ha un'azione antivirale significativa, in grado di inibire lo sviluppo del biofilm attraverso la sottoregolazione dei geni correlati al QS, Abal e AbaR.

Infine, recenti studi hanno sviluppato una QQ lattonasi geneticamente modificata, un enzima capace di distruggere la struttura del biofilm di *A. baumannii* attraverso la riduzione della biomassa, rappresentando un'altra promettente strategia per combattere le infezioni associate al biofilm.

Diversi studi hanno evidenziato l'efficacia degli inibitori del quorum sensing (QSI) nell'eredicare i biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*. Sia i QSI naturali che quelli sintetici hanno dimostrato la capacità di distruggere la struttura del biofilm e di contribuire all'eliminazione di patogeni resistenti.

Un nuovo approccio innovativo ha visto il caricamento dei QSI su polimeri per migliorare la penetrazione nei biofilm e prolungare l'azione. Gli autori di questo studio hanno scoperto che un coniugato polimero-QSI è in grado di penetrare efficacemente negli strati del biofilm e rilasciare il QSI in modo mirato. Quando questo coniugato è stato combinato con l'antibiotico ciprofloxacina, l'attività antibatterica contro il biofilm di *P. aeruginosa* è aumentata significativamente rispetto all'uso del QSI libero o della ciprofloxacina da sola.

Un approccio interessante è stato l'uso di probiotici (come *Lactobacillus plantarum*), prebiotici (come i fruto-oligosaccaridi), o una combinazione di entrambi per ridurre e inibire la virulenza e la formazione di biofilm in *P. aeruginosa*. Inoltre, è stato scoperto che *L. plantarum*, non solo riusciva a ridurre la formazione di biofilm, ma influenzava anche i profili metabolici dei batteri, suggerendo un effetto più ampio sulla fisiologia del patogeno.

Infine, un ulteriore studio ha scoperto come il trattamento del biofilm di *P. aeruginosa* con DNAsi I risulta essere efficace nell'interrompere la formazione del biofilm e nel distruggere i biofilm già preformati. La DNAsi I agisce degradando il DNA extracellulare che contribuisce alla stabilità del biofilm, disgregando così la struttura e facilitando la rimozione del

biofilm stesso. Questo approccio rappresenta un metodo promettente per il trattamento delle infezioni croniche causate da *P. aeruginosa*.

Numerosi studi hanno evidenziato l'efficacia degli inibitori del quorum sensing (QSI) nel combattere la formazione di biofilm batterici, dimostrando il potenziale di diverse sostanze naturali e sintetiche.

Liu et al. hanno dimostrato che i polifenoli del tè possiedono attività anti-QS contro *Klebsiella pneumoniae*, e producono risultati significativi sia *in vivo* che *in vitro*. In un'indagine *in vitro*, è stato rilevato che i polifenoli del tè hanno un'azione anti-QS contro *Chromobacterium violaceum*. A livelli sub-MIC, quindi livelli sotto la concentrazione minima inibitoria, i polifenoli del tè hanno impedito la motilità batterica, ridotto la sintesi di proteasi EPS, e inibito la formazione di biofilm. Inoltre, in un modello *in vivo*, i polifenoli del tè hanno migliorato la sopravvivenza di *Caenorhabditis elegans* contro l'infezione da *K. pneumoniae*.

Meredith et al. hanno scoperto che un QSI sintetico, quindi N-fenil-4-(3-feniltio ureido) benzenesulfonamide, altera allostericamente il recettore AI-3, inibendo l'attivazione della patogenicità e riducendo lo sviluppo del biofilm in *Escherichia coli*.

Vinothkannan et al. hanno scoperto che l'estere dell'acido furoico del fruttosio isolato dalla pianta *Melia dubia* possiede attività QSI contro il biofilm di *Escherichia coli*. Questo estere compete con il ligando nativo SdiA C8-HSL, influenzando il comportamento specifico del target.

Sully et al. hanno identificato una piccola molecola ad azione inibente chiamata savirina (*S. aureus* inibitore della virulenza), che blocca il rilevamento del quorum mediato da agr in *Staphylococcus aureus*. La savirina prende di mira AgrA, interrompendo così il QS mediato dell'operone agr.

Rajendran et al. hanno dimostrato che i flavonoidi naturali estratti dalla pianta *Scutellaria oblonga* possono ridurre le matrici di biofilm rispettivamente del 73,5% in *S. aureus*, dell'88,9% in *Bacillus subtilis* e del 75,5% in *E.coli*.

Rukayadi et al hanno estratto xanthorrhizol dal rizoma di *Curcuma xanthorrhiza* Roxb e dimostrato che questa sostanza può ridurre significativamente il biofilm di *Streptococcus mutans* del 76% dopo solo un'ora di trattamento.

Questi studi dimostrano il potenziale dei QSI, sia naturali che sintetici, nella gestione e prevenzione della formazione di biofilm batterici, offrendo nuove strade per combattere infezioni resistenti e migliorare l'efficacia delle terapie antibiotiche.

3.18 Polifenoli come QSI

La ricerca sui composti naturali e dietetici con proprietà di inibizione del quorum sensing (QSI) ha rivelato che i polifenoli, ampiamente presenti nelle piante, possiedono un potenziale significativo nel contrastare la formazione di biofilm e la virulenza batterica. I polifenoli sono una vasta famiglia di composti naturali noti per le loro proprietà antimicrobiche e antivegetative. Studi iniziali hanno dimostrato che i composti polifenolici possono alterare il quorum sensing batterico. Utilizzando biosensori come *Pseudomonas putida* ed *Escherichia coli* per testare l'attività inibitoria dei polifenoli su QS, è stato osservato che i polifenoli con porzione di acido gallico possiedono effetti inibitori significativi. Il gallato di metile è stato identificato come un efficace inibitore del QS contro *Chromobacterium violaceum*. Questo batterio produce un pigmento violaceina in risposta all'attivazione del QS acil-omoserina lattone dipendente. Il gallato di metile ha dimostrato di ridurre la produzione di violaceina senza influenzare significativamente la crescita batterica.

I polifenoli del tè verde hanno mostrato un'azione inibitoria del QS in *Pseudomonas aeruginosa* sia *in vivo* che *in vitro*. Questi composti hanno dimostrato di impedire la formazione di biofilm e ridurre la virulenza del batterio.

Rosa rugosa contiene circa l'87% di polifenoli, che costituiscono la maggior parte degli estratti della pianta. L'estratto di *Rosa rugosa* ha

mostrato una significativa attività QSI quando valutato utilizzando *C. violaceum*. Ha ridotto notevolmente la produzione di violaceina senza inibire la crescita batterica. Inoltre, i fenoli contenuti in *Rosa rugosa* e nel tè hanno inibito la motilità e la formazione di biofilm in *P. aeruginosa* ed *Escherichia Coli*.

Questi studi evidenziano come i polifenoli, grazie alla loro abbondanza nelle risorse naturali e alle loro proprietà inibitorie del QS, possano rappresentare una promettente strategia per controllare la formazione di biofilm e migliorare il trattamento delle infezioni batteriche.

3.19 Nuovi approcci che utilizzano QSI per combattere i batteri resistenti

3.19.1 QSI-NP

Recenti sviluppi nella nano-biotecnologia hanno portato alla creazione di nuovi prodotti e formulazioni di inibitori del quorum sensing (QSI) con potenziale terapeutico migliorato, somministrazione personalizzata e ridotta tossicità. I nanomateriali, grazie alla loro grande area superficiale e alle loro dimensioni ridotte, offrono una maggiore reattività e interazione con i bersagli biologici, come i batteri. Questa caratteristica li rende particolarmente efficaci come agenti terapeutici. I nanomateriali vengono progettati per essere biocompatibili e per minimizzare la tossicità, un aspetto cruciale per le applicazioni terapeutiche e diagnostiche. Le loro proprietà chimico-fisiche possono essere ottimizzate in modo tale da poter garantire una somministrazione sicura ed efficace.

Il campo emergente della nanomedicina utilizza i nanomateriali per sviluppare nuove terapie e migliorare i trattamenti esistenti. Le nanotecnologie stanno rivoluzionando la medicina, offrendo soluzioni innovative per affrontare la crescente problematica della resistenza agli antibiotici.

Le nanoparticelle (NP) metalliche hanno mostrato avere un grande potenziale come agenti antibatterici. Possono danneggiare la membrana cellulare batterica e interferire con i processi vitali all'interno delle cellule

batteriche. Studi recenti, compiuti sia *in vivo* che *in vitro*, hanno dimostrato che le NP metalliche possono inibire il sistema di quorum sensing (QS). Le NP possono interferire con il sistema del quorum sensing in diversi modi. Alcuni nanomateriali possono degradare direttamente le molecole di segnalazione QS, riducendo la loro capacità di influenzare il comportamento batterico. Invece, alcuni NP possono interferire con le sintasi di molecole di segnalazione, bloccando la loro produzione. Infine, le NP possono impedire il legame delle molecole di segnalazione ai loro recettori specifici, alterando così la risposta batterica al QS (figura 11). Sebbene la letteratura specifica sull'uso delle NP come QSI o portatori di materiali QQ sia ancora limitata, sono stati documentati alcuni casi di successo. Le nanoparticelle possono essere progettate per mirare ai sistemi QS batterici e migliorare il trattamento delle infezioni e delle malattie causate da biofilm. [Figura 11]

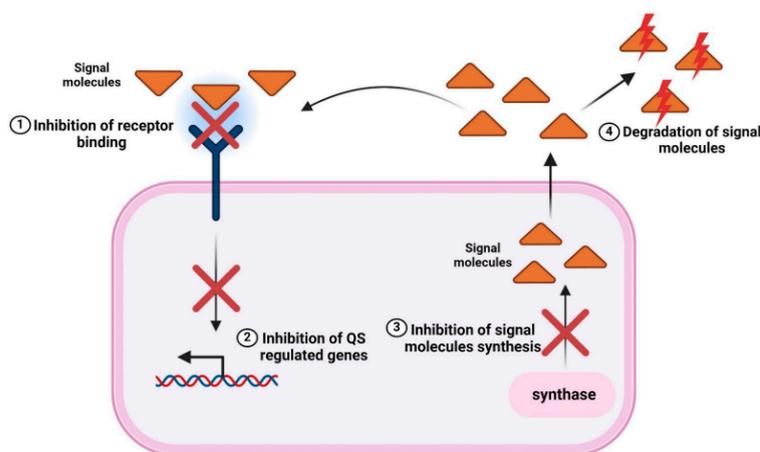


Figura 11 | Illustrazione schematica dei possibili modi in cui le nanoparticelle potrebbero ostacolare il processo quorum sensing. Immagine tratta da Hetta et al., 2024.

Le nanoparticelle (NP) di argento (AgNP) e le nanoparticelle di ossido di ittrio (Y_2O_3) sono state oggetto di numerosi studi per le loro proprietà antimicrobiche e anti-biofilm. Le AgNP sono state ampiamente studiate per la loro attività antibatterica e anti-biofilm. Inoltre, si sono dimostrate efficaci contro una vasta gamma di batteri, tra cui *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli*. Gli studi hanno evidenziato che le AgNP possono inibire la formazione di biofilm e hanno un'azione ad ampio spettro contro vari patogeni.

In aggiunta a questo, le AgNP possono interferire con il quorum sensing (QS) batterico. In particolare, sono risultate efficaci nel prevenire la produzione di segnali di quorum sensing come gli acil-omoserina lattone (AHL). Questo effetto è la risultante dell'inibizione delle sintasi di AHL, come LasI in *Pseudomonas aeruginosa*, in modo tale da ridurre la capacità del batterio di formare biofilm. Le AgNP si sono dimostrate efficaci anche come degli agenti anti-QS contro il *Chromobacterium violaceum*, un batterio che produce il pigmento violaceina in risposta al quorum sensing. Le AgNP possono, quindi, prevenire la formazione di biofilm e la produzione di violaceina, mostrando così il loro potenziale come inibitori del QS.

Le nanoparticelle di ossido di ittrio (Y_2O_3) sono state riconosciute per le loro caratteristiche chimico-fisiche favorevoli, che suscitano un crescente interesse nelle applicazioni biomediche. Le Y_2O_3 NP hanno una forma monodispersa e possono essere progettate come nanosfere con un nucleo. Infatti

Husayn et al hanno creato nanosfere di Y_2O_3 e valutato la loro capacità di inibire l'AHL in *Chromobacterium violaceum* CVO26 e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. I risultati hanno messo in evidenza che le nanoparticelle di Y_2O_3 sono in grado di inibire i vari fattori di virulenza controllati dal QS in *P. aeruginosa*, tra cui la formazione di esopolisaccaridi, piocianina, elastasi,.

Inoltre, Ravindran et al. sono riusciti a sintetizzare nanoparticelle di argento (AgNP) utilizzando l'estratto della radice di *Vetiveria zizanioides*, una pianta conosciuta comunemente come vetiver. Questo processo di sintesi ha permesso di ottenere risultati promettenti nella lotta contro le infezioni batteriche regolando negativamente i fattori di virulenza batterica. Gli AgNP sintetizzati da *Vetiveria zizanioides* sono stati studiati per il loro impatto sul quorum sensing, ovvero su un sistema di comunicazione batterica che regola molteplici fattori di virulenza. I risultati di questo studio evidenziano che queste AgNP sono in grado di sottoregolare i geni regolati dal QS. Ciò comporta una significativa riduzione nella produzione di biofilm, un'importante difesa batterica

contro gli antibiotici e l'azione del sistema immunitario. Inoltre, le nanoparticelle di AgNP risultano avere un'azione inibitoria nei confronti della produzione di fattori di virulenza QS-dipendenti. Tra questi troviamo enzimi come lipasi e proteasi, nonché esopolisaccaridi, tutti elementi cruciali per la formazione e la stabilità dei biofilm batterici.

Oltre alle AgNP, altre nanoparticelle di origine microbica sono state valutate per la loro capacità di interferire con il QS e di inibire lo sviluppo di biofilm.

Infatti, nanoparticelle d'oro (AuNP), conosciute per le loro proprietà antibatteriche, possono bloccare la cascata di segnali QS, interrompendo così la formazione di biofilm. Oltre a queste ci sono anche le nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO), il biossido di titanio (TiO₂) e il biossido di silicio (SiO₂), questi nanomateriali sono stati riconosciuti per la loro efficacia nel prevenire lo sviluppo di biofilm e nel bloccare i segnali QS batterici.

La ricerca ha evidenziato che le nanoparticelle d'oro (AuNP) legate all' N-acil omoserina lattosasi (AHLase), un enzima specifico per la degradazione delle molecole segnale del quorum sensing, possono essere estremamente efficaci nel disturbare i processi di comunicazione batterica e prevenire la formazione di biofilm.

Le AuNP legate all' AHLase sono in grado di rompere specificamente il N-acil omoserina lattone, una molecola di segnalazione chiave nel QS di molti batteri. Questo avviene attraverso l'azione enzimatica dell'AHLase, il quale è in grado di scomporre la porzione di omoserina lattone, fondamentale per il legame con il regolatore trascrizionale LuxR. Questa interruzione di legame impedisce l'attivazione della cascata QS, bloccando la comunicazione tra le cellule batteriche.

Un'altra funzione delle nanoparticelle di AuNP risulta essere quella di inibire la sintesi di EPS. Infatti, le nanoparticelle riescono ad impedire la sintesi di esopolisaccaridi (EPS), ovvero componenti cruciali per la struttura del biofilm, in modo tale da ostacolare la capacità dei batteri di formare e mantenere biofilm stabili. Inoltre, le AuNP possono modificare

l'idrofobicità superficiale dei batteri, riducendo la loro capacità di aderire alle superfici e formare biofilm.

Le AuNP stabilizzate con l'uso del micelio di *Laccari fraterna*, un fungo, hanno mostrato una significativa riduzione nella produzione di piocianina da parte di *Pseudomonas aeruginosa*, una tossina associata alla virulenza batterica. Questa stabilizzazione offre un vantaggio aggiuntivo, poiché le AuNP risultano essere più efficaci e stabili nella loro azione antimicrobica. Le nanoparticelle AgCl-TiO₂ hanno mostrato una notevole efficacia come agenti anti-quorum sensing contro *Chromobacterium violaceum*. Questo risultato è stato ottenuto attraverso osservazioni sperimentali che hanno evidenziato la capacità di queste nanoparticelle di inibire la comunicazione batterica regolata dal quorum sensing. Le nanoparticelle AgCl-TiO₂ hanno dimostrato di essere particolarmente efficaci nell'interrompere il quorum sensing in *C. violaceum*, ovvero un batterio noto per la produzione di violaceina, un pigmento regolato dal QS. L'inibizione del QS da parte di queste nanoparticelle riduce la produzione di violaceina e altri fattori di virulenza, limitando la capacità del batterio di formare biofilm e di esprimere comportamenti coordinati.

Ulteriori studi hanno rivelato che le nanoparticelle rivestite con β -ciclodestrina mostrano una significativa soppressione del QS dipendente da AHL in *Vibrio fischeri*. La β -ciclodestrina legata a nanoparticelle di silicio (SiNP) è in grado di rimuovere efficacemente le molecole di AHL dall'ambiente circostante, diminuendo così la bioluminescenza, un indicatore chiave dell'attività del QS in *V. fischeri*.

Le osservazioni hanno mostrato che queste nanoparticelle rivestite di β -ciclodestrina non solo rimuovono le molecole AHL, ma anche sottoregolano l'espressione dei geni LuxAE e LuxR. Questi geni sono fondamentali per il QS nei batteri, e la loro sottoregolazione contribuisce ulteriormente all'inibizione della comunicazione intercellulare e, di conseguenza, alla riduzione della virulenza e della formazione di biofilm.

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia delle nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO NP) come agenti anti-quorum sensing. Queste nanoparticelle hanno mostrato la capacità di interferire con i meccanismi

di QS, inibendo la formazione di biofilm e riducendo l'espressione dei geni coinvolti nel QS in batteri gram-negativi come in *Pseudomonas aeruginosa*. Le nanoparticelle di ZnO hanno dimostrato di essere particolarmente efficaci contro ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*, isolati da pazienti con fibrosi cistica. Questi ceppi sono noti per formare biofilm densi, che contribuiscono alla loro resistenza agli antibiotici. L'inibizione del QS da parte di queste nanoparticelle ha portato ad una riduzione rilevante della formazione di biofilm. Inoltre, le nanoparticelle di ZnO sono in grado di sopprimere l'espressione dei principali geni coinvolti nel QS di *P. aeruginosa*, come LasR, LasI, RhII e RhIR. Questi geni risultano essere fondamentali per la regolazione della produzione di fattori di virulenza e per la formazione di biofilm. Concludendo, le nanoparticelle di ZnO si sono dimostrate particolarmente efficaci anche contro i sistemi di QS di *Pseudomonas aeruginosa*, in particolare i sistemi di Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) e Las, i quali svolgono un ruolo cruciale nel controllo delle attività virulente di questo patogeno. Infatti, sia QS PQS che Las, regolano diversi fattori di virulenza tra cui la produzione di enzimi degradativi, tossine, e la capacità di formare biofilm. Le nanoparticelle di ZnO hanno dimostrato di essere in grado di inibire l'espressione di questi sistemi, riducendo così la virulenza complessiva del batterio.

Un aspetto chiave dell'effetto delle nanoparticelle di ZnO è la loro capacità di ridurre la motilità natatoria e sciamante dei *P. aeruginosa*. La motilità risulta essere un fattore determinante nella capacità del batterio, in quanto gli permette di diffondersi e di colonizzare nuove superfici, includendo anche tessuti umani e superfici di dispositivi medici.

È stato osservato che la combinazione di nanoparticelle (NP) con agenti antibatterici può avere un effetto sinergico contro il quorum sensing, permettendo di potenziare l'efficacia delle terapie antimicrobiche. Un esempio di questa sinergia è rappresentato dall'uso di nanoparticelle di chitosano caricate con kaempferolo, un flavonoide naturale noto per le sue proprietà antiossidanti e antimicrobiche, presenti in diverse piante. Il kaempferol quando veicolato attraverso nanoparticelle di chitosano, ha dimostrato di possedere un notevole potere inibitorio nei confronti del sistema QS. In particolare, lo studio ha utilizzato *Chromobacterium*

violaceum CV026, quindi si tratta di un ceppo biosensore che produce un pigmento, la violaceina, in risposta a segnali QS, per valutare l'efficacia delle nanoparticelle. Di conseguenza, il kaempferolo, quando caricato di nanoparticelle di chitosano, è in grado di inibire la produzione di violaceina in modo significativo, suggerendo una forte attività anti-QS. La capacità inibitoria delle nanoparticelle caricate con kaempferolo è stata evidente a concentrazioni superiori del 78%, evidenziando che la combinazione di nanoparticelle (NP) e kaempferolo è significativamente più efficace rispetto all'uso di kaempferolo da solo.

3.19.2 Combinazione di QSI con antibiotici tradizionali tramite linker

Nonostante il potenziale terapeutico dei quorum sensing inibitori (QSI), questi non possiedono un impatto diretto sulla vitalità delle cellule batteriche o un'azione antibiotica tradizionale. Infatti, i QSI da soli non sono in grado di eliminare completamente le infezioni batteriche, poiché non agiscono direttamente sui batteri per causarne la morte. Tuttavia, quando combinati con antibiotici tradizionali, i QSI possono aumentare significativamente l'efficacia della terapia. Questa combinazione rappresenta una valida strategia per il trattamento delle infezioni, in particolare quelle causate da batteri resistenti agli antibiotici. L'idea è quella di utilizzare i QSI come veicoli per la somministrazione mirata degli antibiotici. Grazie alla loro capacità di riconoscere i batteri in modo specifico e di interagire con i recettori della loro membrana cellulare, i QSI possono essere legati a molecole antibiotiche attraverso dei linker appropriati, in modo tale da garantire un rilascio mirato e più efficace (figura 12). Questa formulazione combinata offre diversi vantaggi: inibisce la virulenza batterica regolata dal quorum sensing, aumenta l'attività antibatterica, riduce la tossicità per le cellule non bersaglio, e permette di utilizzare dosi più basse di antibiotici, diminuendo così il rischio di effetti collaterali e di sviluppare resistenza. [Figura 12]

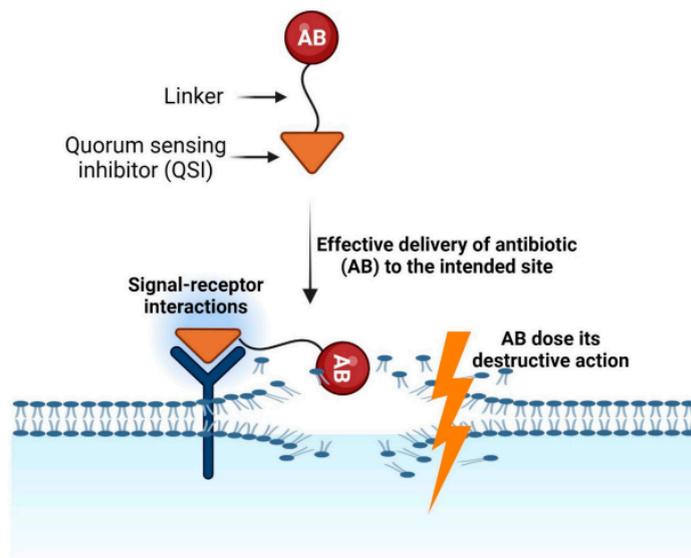


Figura 12 | Diagramma schematico che mostra la somministrazione di antibiotici guidata da inibitori del quorum sensing (QSI). Immagine tratta da Hetta et al., 2024.

Sono stati sviluppati diversi tipi di linker in grado di migliorare la somministrazione mirata di farmaci attraverso l'uso dei quorum sensing inibitori (QSI). Questi linker possono essere suddivisi in due categorie principali: Linker scindibili e Linker non scindibili.

I linker non scindibili, come linker tioetere e maleimidocaproil, possono ridurre sia il rilascio che l'efficacia del farmaco, nonostante garantiscano una maggior stabilità e tolleranza.

I linker scindibili, quindi linker di disolfuro, idrazone e peptidi, sono particolarmente utili nelle terapie mirate poiché permettono il rilascio controllato del farmaco direttamente nel sito dell'infezione, aumentando così l'efficacia del trattamento e minimizzando gli effetti avversi. Questi linker sfruttano le condizioni specifiche del microambiente infettivo e le attività enzimatiche locali per rilasciare il farmaco in modo preciso, migliorando la terapia antibatterica e riducendo il rischio di sviluppare resistenza.

La combinazione di quorum sensing inibitori (QSI) con antibiotici rappresenta una strategia promettente per migliorare l'efficacia delle terapie contro le infezioni batteriche, soprattutto quelle causate da batteri

che formano biofilm e inoltre, quelli che risultano essere resistenti agli antibiotici.

L'uso dei QSI può ridurre la virulenza dei batteri impedendo loro di comunicare e coordinare le loro attività patogene, mentre gli antibiotici possono uccidere direttamente i batteri. L'efficacia di tale combinazione è stata dimostrata da diversi studi:

Brackmann et al. hanno osservato che una terapia combinata ha migliorato i tassi di sopravvivenza di modelli animali infetti da *P. aeruginosa* e *B. cepacia*. La combinazione di tobramicina e cinnamaldeide ha ridotto significativamente la carica nei polmoni di topi BALB/c infetti da *B. cenocepacia*, rispetto all'uso degli antibiotici da soli.

Yu et al. hanno dimostrato che la combinazione di antibiotici sulfamidici, nanoparticelle d'argento, e nitrato d'argento con QSI ha potenziato l'attività antimicrobica nei confronti di *B. subtilis*. Questo approccio ha mostrato un'efficacia rispetto all'uso dei singoli componenti.

Singh et al. hanno sviluppato una formulazione polimerica bioreattiva utilizzando nanoparticelle di alginato modificate per somministrare ciprofloxacina insieme a un QSI, 3-ammino7-cloro-2-nonilchinazolin-4(3H)-one. Questa formulazione ha dimostrato di essere in grado di distruggere efficacemente *P. aeruginosa* in biofilm sia *in vitro* che *in ex-vivo*. Le nanoparticelle di alginato incorporate con un linker sensibile al pH hanno consentito un rilascio controllato e simultaneo di ciprofloxacina e QSI nelle regioni del biofilm a basso pH, ottimizzando l'efficacia della terapia.

Questi studi evidenziano come l'uso combinato di QSI e antibiotici, supportato da tecnologia avanzate come le nanoparticelle, possa migliorare significativamente il trattamento delle infezioni batteriche resistenti, aumentando la capacità di eliminare i biofilm e riducendo la virulenza dei batteri.

3.19.3 Riutilizzo di farmaci precedentemente noti come QSI

Il riutilizzo dei farmaci, noto anche come riciclaggio, reindirizzamento o commutazione medica, implica l'identificazione di nuove indicazioni terapeutiche per farmaci già commercializzati o approvati dalla FDA.

Nell'ambito della lotta contro la resistenza agli antibiotici, il riutilizzo dei farmaci si riferisce al re-impiego e alla sostituzione di farmaci non antibiotici esistenti per combattere patogeni resistenti. Questo approccio può contribuire a colmare il gap nella scoperta di nuovi antibiotici

È interessante notare che Abbas et al hanno dimostrato che la metformina, un farmaco antidiabetico, può agire come un inibitore del quorum sensing contro *Pseudomonas aeruginosa*. Inoltre, gli autori di questo elaborato hanno osservato che la metformina era in grado di ridurre significativamente la produzione del pigmento violaceina, bloccava la piocianina, l'emolisina, la proteasi e l'elastasi e in più era in grado di diminuire notevolmente la formazione di biofilm e la motilità in *Pseudomonas aeruginosa* attraverso l'interazione con i recettori LasR e RhlR.

Successivamente Hegazy et al. hanno scoperto che, sebbene la metformina mostrasse una significativa attività anti-QS *in vivo*, non riusciva a proteggere i topi dall'infezione da questo patogeno.

Più recentemente, Khayat et al. hanno scoperto che sia la metformina che il vildagliptin sono in grado di ridurre l'espressione dei geni QS in *P. aeruginosa*, e che una combinazione di questi due farmaci antidiabetici può ridurre in modo significativo lo sviluppo di biofilm, la motilità batterica, la produzione di enzimi extracellulari virulenti e del pigmento piocianina.

È stato osservato che *P. aeruginosa* diventa più vulnerabile allo stress ossidativo. In un altro studio, condotto da Khayat et al. sono state valutate dieci gliptine per la loro attività come inibitori del quorum sensing (QSI) sia *in vivo* che *in vitro*. I risultati hanno mostrato che tutte le gliptine testate, in particolare sitagliptin, possiedono un'efficace attività

anti-biofilm. Inoltre, il sitagliptin ha dimostrato di proteggere efficacemente i topi dall'infezione da *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. È stato anche riportato che i geni che codificano per il quorum sensing in *S. aureus* e *P. aeruginosa* sono sottoregolati da sitagliptin

Ho sui et al. hanno scoperto che il raloxifene, originariamente usato per il trattamento del carcinoma mammario, si lega a PhB2 in *P. aeruginosa*, inibendo così la formazione del pigmento blu piocianina, un fattore rilevante nell'infezione.

Imperi et al. hanno dimostrato che la niclosamide, un vecchio farmaco antielmintico, è in grado di ridurre significativamente la produzione di molecole di AHL., inibendo quindi la risposta del quorum sensing in *P. aeruginosa*. Gli autori hanno concluso che la niclosamide possiede una forte attività anti-virulenza *in vitro* e protegge efficacemente contro la patogenicità di *P. aeruginosa* *in vivo*.

Infine, Singh et al. hanno scoperto che l'albendazolo ha un potenziale significativo come inibitore del quorum sensing. Esso agisce legandosi ai residui amminoacidi idrofobici nella tasca idrofobica dei recettori LasR e CviR, rispettivamente in *P. aeruginosa* e *Chromobacterium violaceum*. Questo legame consente di inibire la formazione di biofilm in *P. aeruginosa* e la produzione di violaceina in *C. violaceum*.

Come illustrato precedentemente, diversi studi condotti su scala di laboratorio hanno dimostrato il potenziale promettente dei QSI contro vari patogeni batterici. Tuttavia, sono pochi gli studi clinici che hanno valutato la loro efficacia nel combattere la virulenza batterica.

In uno studio clinico condotto da Zhu et al., è stata valutata la sicurezza dell'uso di furanoni o fimbrolidi nelle lenti a contatto di volontari umani e porcellini d'India contro *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Acanthamoeba spp.* L'efficacia delle lenti a contatto rivestite con fimbrolidi è stata testata in un periodo di 30 giorni per gli animali e di 24 ore per gli esseri umani. I risultati hanno mostrato una riduzione dell'adesione batterica tra il 67% e il 92% per tutti i ceppi

testati, supportando il potenziale utilizzo di queste lenti come agenti anti-patogeni. Inoltre, non sono state riscontrate reazioni oculari negative durante il periodo di prova, confermando la sicurezza delle lenti rivestite.

Un altro studio clinico, condotto da Smyth et al., ha esaminato l'effetto di una formulazione a base di aglio come QSI in bambini e adulti affetti da fibrosi cistica e infezione persistente da *P. aeruginosa*. Tuttavia, la formulazione non ha prodotto miglioramenti significativi nei parametri clinici, né ha ridotto la quantità di molecole di QS nei campioni di plasma e di espettorato. Alcuni pazienti hanno manifestato un'anomalia nella funzionalità epatica e lievi effetti collaterali, ma lo studio ha comunque stimolato ulteriori ricerche.

In uno studio randomizzato e controllato con placebo, van Delden et al. hanno valutato l'effetto dell'azitromicina, un antibiotico macrolide con attività QSI, sulla polmonite associata alla ventilazione meccanica (VAP) in pazienti intubati colonizzati da *P. aeruginosa*. I risultati hanno indicato che l'azitromicina è in grado di ridurre significativamente la VAP in soggetti ad alto rischio, suggerendo che la soppressione della virulenza batterica è un approccio antimicrobico praticabile.

Infine, Fong et al. hanno scoperto che gli itaconimidi possiedono attività QSI, sopprimendo i sistemi QS Las, Rhl e PQS in *P. aeruginosa*. Gli itaconimidi sono risultati efficaci nell'eliminare le attività virulente, e hanno mostrato un'azione sinergica quando combinati con la tobramicina.

Capitolo 4 : Conclusioni

La resistenza agli antibiotici, la formazione di biofilm e il quorum sensing (QS) sono tre concetti interconnessi tra loro e che rappresentano sfide significative nella gestione delle infezioni batteriche.

In primo luogo, la resistenza agli antibiotici è una delle maggiori minacce alla salute globale. Essa si verifica quando i batteri sviluppano la capacità di sopravvivere all'esposizione a farmaci che dovrebbero uccidere o inibire la loro crescita. Questo problema è amplificato dall'uso eccessivo e inappropriato di antibiotici.

I batteri sviluppano resistenza attraverso vari meccanismi, come la mutazione genetica, l'acquisizione di geni di resistenza tramite plasmidi, e l'efflusso attivo di antibiotici dalla cellula batterica. Questi processi possono essere ulteriormente aggravati dalla formazione di biofilm e dal fenomeno del quorum sensing.

I biofilm sono comunità strutturali di batteri incapsulate in una matrice di polisaccaridi e altre biomolecole, che aderiscono a superfici sia biotiche che abiotiche. Questi sono altamente resistenti agli antibiotici e al sistema immunitario dell'ospite, rendendo le infezioni associate ai biofilm particolarmente difficili da trattare. La resistenza agli antibiotici all'interno dei biofilm è multifattoriale. La matrice extracellulare può limitare la penetrazione degli antibiotici, mentre i batteri all'interno del biofilm possono esprimere geni di resistenza o entrare in uno stato di crescita lenta, riducendo l'efficacia degli antibiotici che agiscono su cellule in rapida divisione.

Il quorum sensing è un meccanismo di comunicazione batterica che permette ai batteri di rilevare la densità della popolazione e coordinare il comportamento di gruppo, come la formazione di biofilm e la produzione dei fattori di virulenza. Il QS regola l'espressione di geni associati alla resistenza agli antibiotici e alla formazione di biofilm. Bloccando il QS, si potrebbe potenzialmente interferire con la capacità dei batteri di formare biofilm resistenti e di esprimere geni di virulenza aprendo la strada a nuove strategie terapeutiche.

I biofilm forniscono un ambiente protettivo che favorisce la resistenza, mentre il QS coordina questi processi, rendendo più difficile eradicare le infezioni.

Le infezioni biofilm-associate, regolamentate dal QS, rappresentano una delle maggiori sfide nella terapia delle malattie infettive, richiedendo lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che vanno oltre l'uso convenzionale degli antibiotici.

La comprensione dei processi molecolari che portano alla resistenza risulta essere essenziale, in quanto consente la creazione e lo sviluppo di nuovi trattamenti. La conoscenza e la comprensione dei dettagli dei meccanismi di resistenza consente lo sviluppo di strategie mirate per interferire o inibire questi meccanismi. Ciò può aiutare a migliorare l'efficacia degli antibiotici attualmente disponibili e a portare alla creazione di nuove terapie più efficaci.

Il collegamento tra il biofilm e il quorum sensing è fondamentale nella biologia dei batteri. Il quorum sensing è un meccanismo di comunicazione che consente ai batteri di rilevare e rispondere alla densità della popolazione attraverso il rilevamento di molecole segnale, chiamate autoinduttori. Questo processo è cruciale per la formazione e maturazione del biofilm, inteso come una comunità di batteri adesi a superfici e incapsulati in una matrice protetta.

Quando la concentrazione di autoinduttori raggiunge la soglia critica, i batteri coordinano l'espressione genica in modo sincrono, attivando i geni che regolano la produzione di componenti della matrice extracellulare resistenti ai trattamenti antibiotici e alle difese immunitarie dell'ospite.

Pertanto, il quorum sensing non solo facilita la formazione dei biofilm, ma contribuisce anche alla loro capacità di persistere in ambienti ostili, rappresentando una sfida significativa per il trattamento delle infezioni croniche. Interferire con il quorum sensing è una strategia promettente per prevenire la formazione di biofilm, in modo tale da migliorare l'efficacia degli interventi terapeutici.

Le ricerche future stanno orientando la loro attenzione verso lo sviluppo di terapie anti-QS, strategie di disgregazione di biofilm, l'uso di terapie di

combinazione per contrastare efficacemente la resistenza agli antibiotici e migliorare la gestione delle infezioni batteriche.

Gli inibitori della resistenza agli antibiotici sono composti progettati per interrompere o per inibire specifici meccanismi di resistenza agli antibiotici, avendo come obiettivo quello di ripristinare l'efficacia clinica di antibiotici, prima che vengano compromessi. Questi inibitori agiscono bloccando sia le vie molecolari che gli enzimi responsabili della resistenza permettendo così agli antibiotici di esercitare il loro effetto terapeutico originale contro i batteri resistenti.

Si tratta di una strategia promettente, poiché potrebbe permettere di ottimizzare l'uso degli antibiotici già disponibili in commercio, rendendoli più efficaci. Infatti, a livello clinico, tale strategia risulta essere molto efficace, in quanto gli inibitori degli enzimi β -lattamasi sono stati usati con successo dopo l'introduzione dell'acido clavulanico nei farmaci.

Le β -lattamasi sono degli enzimi che degradano gli antibiotici β -lattamici, come penicilline e cefalosporine. L'acido clavulanico, il sulbactam e il tazobactam essendo degli inibitori delle β -lattamasi, si legano alle β -lattamasi. Tale legame determina l'inibizione dell'attività, consentendo e permettendo agli antibiotici β -lattamici di essere efficaci e di agire efficacemente.

Gli antibiotici sono fondamentali per combattere una vasta gamma di infezioni; infatti, senza gli stessi, non sarebbe possibile eseguire molte operazioni chirurgiche, semplici o complesse che siano.

Tuttavia, un uso eccessivo e inappropriato di questi farmaci promuove lo sviluppo di batteri resistenti, riducendo l'efficacia degli antibiotici stessi e creando una delle più gravi minacce alla salute pubblica che le istituzioni devono affrontare.

Affrontare la resistenza agli antibiotici richiede un approccio multidisciplinare che combini nuovi trattamenti farmacologici.

La resistenza antimicrobica che si trasforma in un pericolo per la salute non è più un segreto. Nel 2014, Lord Jim O'Neill e il suo gruppo pubblicarono una revisione intitolata "Resistenza antimicrobica: affrontare una crisi per la salute e la ricchezza delle nazioni", commissionata dal governo del regno unito (figure 13 e 14).

Secondo tale revisione, entro il 2050 la resistenza antimicrobica (AMR) potrebbe causare 10 milioni di morti all'anno. Tale cifra di decessi, riportata nella revisione, è stata oggetto di ipotesi statistiche, non considerando i dati reali.

Tuttavia, è chiaro che se non verranno prese misure drastiche nel prossimo futuro, l'AMR sarà una delle cause di morte più comuni negli essere umani.

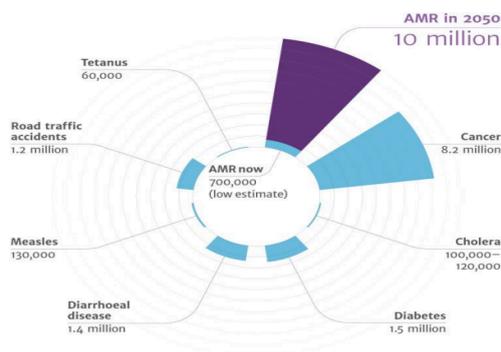


Figura 13 | Morti attribuibili alla resistenza antibiotica ogni anno rispetto ad altre principali cause di morte. Tratta da Jim O'Neil, *Review on antimicrobial Resistance (2024)*

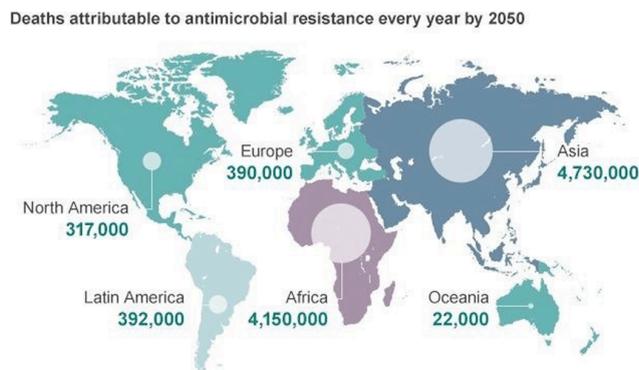


Figura 14 | Decessi attribuiti alla resistenza antimicrobica ogni anno entro il 2050. Tratta da Jim O'Neil, *Review on antimicrobial Resistance (2024)*

L'antibiotico-resistenza è un fenomeno che richiede un cambiamento culturale, che richiede l'intervento sia dei medici che dei pazienti affinché si riconosca la reale importanza di queste risorse terapeutiche.

Gli antibiotici, sin dal secondo dopoguerra, hanno avuto un impatto significativo sulla qualità e durata della vita media.

L'antibiotico-resistenza è un problema reale, in costante aumento e può mettere a repentaglio anni e decenni di studi e scoperte scientifiche e, cosa ancor più grave, la nostra salute.

BIBLIOGRAFIA

Abbas, H.A., Elsherbini, A.M., Shaldam, M.A. (2017). Repurposing metformin as a quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. *African Health sciences*, 17 (3), 808–819.

Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H.J. (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilm to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 55 (6), pp. 2655–2661

Curtis, M.M., Russell, R., Moreira, C.G., Adebesein, A.M., Wang, C., Williams, N.S., Taussig, R., Stewart, D., Zimmermann, P., Lu, B. et al. (2014). QseC inhibitors as an antivirulence approach for gram - negative pathogens. *mBio*, 5 (6). pp. 10–128.

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature reviews microbiology*, 21, pp. 280-295.

De la Fuente-Nunez, C., Cesaro, A., & Hancock, R. E.W. (2023). Antibiotic failure: Beyond antimicrobial resistance. *Drug resistance updates*, 71.

De la Fuente-Nunez, C., Reffuveille, F., Fernandez, L. & Hancock, R. E.W. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology*, 16 (5), pp. 580-589.

Fong, J., Mortensen, K.T., Norskov, A., Qvortrup, K., Yang, L., Abbronzatura, C.H., Nielsen, T.E., Givskov, M. (2018). Itaconimides as novel quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8.

Grezzana, L.G. (2021). *Il fracastoro. Bollettino degli istituti ospitalieri di Verona*. Lagrafica

Hegazy, W.A.H., Khayat, M.T., Ibrahim, T., Nassar, M.S., Bakhrebah, M.A., Abdulaal, W.H., Alhakamy, N.A., Bendary, V. (2020). Repurposing anti-diabetic drugs to cripple quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms* 8, (9).

Hetta, H.F., Ramadan, Y.N., Rashed, Z.I., Alharbi, A.A., Alsharef, S., Alkindy, T.T., Alkhamali, A., Albalawi, A.S., Battah, B., & Donadu, M.G. (2024) Quorum sensing inhibitors: an alternative strategy to win the battle against multidrug - resistant (MDR) bacteria. *Molecules*, 29 (15). pp. 34-66.

Ho Sui, S.J., Lo, R., Fernandes, A.R., Caulfield, M.D., Lerman, J.A., Xie, L., Bourne, P.E., Baillie, D.L., Brinkman, F.S. (2012) Raloxifene attenuates *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production and virulence. *International Journal of Antimicrobial agents*. 40 (3), pp. 243-251.

Imperi, F., Massai, F., Ramachandran Pillai, C., Longo, F., Zennaro, E., Rampioni, G., Visca, P., Leoni, L.(2013). New life for an old drug : the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 57 (2). pp. 996– 1005 .

Khayat, M.T., Abbas, H.A., Ibrahim, T., Elbaramawi, S.S., Khayyat, A.N., Alharbi, M., Hegazy, W.A.H., (2023) Synergistic benefits: exploring the anti-virulence effects of metformin/vildagliptin antidiabetic combination against *Pseudomonas aeruginosa* via controlling quorum sensing systems. *Biomedicines*, 11 (5). pp. 1105-1442.

Khayat, M.T., Abbas, H.A., Ibrahim, T., Khayyat, A.N., Alharbi, M., Darwish, K.M., Elhady, S.S., Khafagy, S., Safo, M.K., Hegazy, W.A.H. (2022). Anti-quorum sensing activities of gliptins against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Biomedicines*, 10 (5). pp. 1005-1169.

Liu, W., Lu, H., Chu, X., Lou, T., Zhang, N., Zhang, B., Chu, W. (2020). Tea polyphenols inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing - controlled virulence and enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection in *Caenorhabditis elegans* model. *Microbial pathogenesis*. (147). pp. 104-266.

O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The review on antimicrobial resistance*.

Rajendran, N., Subramaniam, S., Cristina, L.R., Muthuraman, M.S., Subramaniano, N.S., Pemia, B., Sivasubramanian, A. (2016). Antimicrobial flavonoids isolated from indian medicinal plant *Scutellaria oblonga* inhibit biofilms formed by common food pathogens. *Natural product research*. 30 (17). pp. 2002–2006

Singh, N., Romero, M., Travanut, A., Monteiro, PF., Jordana-Lluch, E., Hardie, KR., Williams, P., Alessandro, signor., Alexander, C. (2019) Dual bioresponsive antibiotic and quorum sensing inhibitor combination nanoparticles for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *in vitro* and ex-vivo. *Biomater. Sci* ,7, 4099–4111.

Singh, S.,Bhatia, S. (2018). Insilico identification of albendazole as quorum sensing inhibitor and its in vitro verification using CviR and LasB receptors based assay sistems. *Biolmpacts*, 8 (3). pp. 201–209.

Smyth, AR., Cifelli, PM., Ortori, California., Righetti, K., Lewis, S., Erskine, P., Olanda, ED, Givskov, M., Williams, P., CUNMara, M., et al. (2010) Garlic as an inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in cystic fibrosis-a pilot randomized controlled trial. *Pediatric Pulmonology*. 45 (4). pp. 356–362.

Sully, EK, Malachowa, N.,Elmore, BO, Alessandro, SM, Femling, JK., Grigio, BM., DeLeo, FR., Otto, M., Cheung, AL., Edwards, et al. (2014) Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in staphylococcus aureus

promotes host defense with minimal impact on resistance. *PloS Pathogens*. (10), pp. 100-174.

Van Delden, C., Kohler, T., Brunner-Ferber, F., François, B., Carlet, J., Pechère, J.-C. (2012). Azithromycin to prevent *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia by inhibition of quorum sensing: a randomized controlled trial. *Intensive care medicine* 38. pp. 1118-1125.

Venkatesan, N., Perumal, G., & Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm - associated bacteria. *Future microbiology*, 10 (11), pp. 1743-1750.

Vinothkannan, R., Muthu Tamizh, M., David Raj, C., Adline Princy. (2018). Fructose furoic acid ester: an effective quorum sensing inhibitors against uropathogenic *Escherichia Coli*. *Bioorganic Chemistry*, 79. pp. 310–318.

Yu, H., Sun, H., Yin, C., Lin, Z. (2019). Combination of sulfonamides, silver antimicrobial agents and quorum sensing inhibitors as a preferred approach for improving antimicrobial efficacy against *Bacillus subtilis*. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 181, pp. 43-48.

Zhu, H., Kumar, A., Ozkan, J., Bandara, R., Ding, A., Perera, I., Steinberg, P., Kumar, N., Lao, W., Griesser, SS., et al. (2008). Fimbricide-coated antimicrobial lenses: their in vitro and in vivo effects. *Optometri and Vision science*, 85 (5). pp. 292–300.