



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA QUALITÀ, PROGRAMMAZIONE E SUPPORTO STRATEGICO
SETTORE STRATEGIA PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche
SSD: BIO/06 – Anatomia comparata e Citologia

**IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MOLECOLE
BIOLOGICAMENTE ATTIVE CON ATTIVITA' ANTIMICROBICA,
ANTIBIOFILM E ANTITUMORALE IN *POSIDONIA OCEANICA* E
*PROCAMBARUS CLARKII***

IL DOTTORE
DILETTA PUNGINELLI

Diletta Punginelli

IL COORDINATORE
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI

Giovanna Pitarresi

IL TUTOR
PROF.SSA MIRELLA VAZZANA

IL CO TUTOR
PROF. DOMENICO SCHILLACI

Domenico Schillaci

CICLO XXXIV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2022



Identificazione e caratterizzazione di molecole biologicamente attive con attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale in Posidonia oceanica e Procambarus clarkii



Prefazione

Questa tesi è il risultato del mio Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari (XXXIV Ciclo). L'attività è stata svolta presso il Laboratorio di Immunobiologia marina e il Laboratorio di Microbiologia e Saggi microbiologici del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo nel periodo compreso tra Febbraio 2019 e Aprile 2022. La tesi si colloca nell'ambito della tematica della resistenza dei batteri agli antibiotici e dell'individuazione di nuove potenziali alternative farmacologiche per contrastare la resistenza microbica.

Il progetto di ricerca, del Dottorato, si è basato sullo studio e individuazione di peptidi antimicrobici in specie acquatiche, per lo sviluppo di nuove alternative agli antibiotici convenzionali. Molti peptidi antimicrobici sono già stati identificati in fonti terrestri e acquatiche (sia marine che di acqua dolce), mostrando una significativa azione antimicrobica nei confronti di alcuni ceppi batterici virulenti, e alcuni di essi sono già sottoposti alla fase I della sperimentazione clinica. Pertanto, questo ambito di studio offre delle notevoli opportunità per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche.

L'attività di ricerca è stata supervisionata dalla Prof.ssa Mirella Vazzana e dal Prof. Domenico Schillaci, entrambi del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo.

Parte degli esperimenti sono stati effettuati in collaborazione con il Prof. Claudio Luparello, della sezione di Biologia cellulare del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo, e con il Prof. Vincenzo Cunsolo del Dipartimento di Chimica organica dell'Università degli Studi di Catania.



Identificazione e caratterizzazione di molecole biologicamente attive con attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale in Posidonia oceanica e Procambarus clarkii



Scopo del lavoro

La resistenza agli antibiotici convenzionali da parte dei comuni batteri patogeni costituisce un problema allarmante, a livello mondiale, per la salute umana.

La maggior parte degli antibiotici utilizzati per il trattamento delle infezioni batteriche nosocomiali sono divenuti poco efficaci a causa dell'abuso di questi farmaci in medicina, agricoltura e negli allevamenti animali e questo eccessivo consumo ha contribuito alla selezione e diffusione di ceppi batterici altamente resistenti come *Staphylococcus aureus* (meticillina-resistente) o *Enterococcus faecium* (vancomicina-resistente). La comparsa di questi ceppi batterici resistenti ha evidenziato la necessità di individuare nuovi agenti antimicrobici e la maggior parte delle strategie attualmente sviluppate si basano sulla creazione di profarmaci e sul *design* di nuove molecole.

Una promettente alternativa agli antibiotici convenzionali è rappresentata dai peptidi antimicrobici. Le ricerche condotte negli ultimi anni hanno dimostrato che queste piccole molecole, componenti fondamentali dell'immunità innata di ogni organismo vivente, svolgono un ruolo significativo nell'inibire la crescita di diversi microrganismi patogeni e inoltre presentano una bassa probabilità di indurre resistenza nei batteri.

Le fonti naturali, sia terrestri che acquatiche, costituiscono una fonte inestimabile di peptidi antimicrobici. La maggior parte di queste molecole sono state isolate da piante come rosmarino ma anche da organismi come spugne, echinodermi, briozoi, ascidie, crostacei e anfibi, fornendo un ulteriore contributo alla ricerca di nuovi agenti antimicrobici.

La fanerogama marina *Posidonia oceanica* e il crostaceo di acqua dolce *Procambarus clarkii* vivono in ambienti caratterizzati da impatti antropici e dalla presenza di microrganismi patogeni, virus e parassiti. Pertanto, nel corso della loro evoluzione biologica hanno sviluppato un sistema difensivo efficace basato anche sulla produzione, come nel caso di *P. oceanica*, di metaboliti secondari con azione antimicrobica. Pertanto, lo studio e la caratterizzazione di peptidi antimicrobici da queste due differenti specie risultano importanti per lo sviluppo di nuove molecole con attività antimicrobica, in grado di contrastare la diffusione dei batteri patogeni.

L'obiettivo di questa tesi di Dottorato è stato di identificare e caratterizzare potenziali peptidi antimicrobici in *P. oceanica* e *P. clarkii*, attraverso:

- i) Lo studio delle proprietà antimicrobiche e antibiofilm degli estratti naturali arricchiti in peptidi ricavati da *P. oceanica* e *P. clarkii* sui principali ceppi batterici patogeni;



- ii) l'identificazione dei peptidi presenti negli estratti attraverso la spettrometria di massa e studio delle loro caratteristiche attraverso l'analisi bioinformatica;
- iii) La messa a punto di peptidi sintetici, basati sulle sequenze originali, come *scaffolds* per la creazione di nuovi peptidi antimicrobici.

Il capitolo I di questa tesi di Dottorato riguarda lo stato dell'arte sulla resistenza dei batteri agli antibiotici e sul meccanismo di azione dei peptidi antimicrobici e anticancro.

Il capitolo II descrive l'attività antimicrobica e antibiofilm di *P. oceanica* e di *P. clarkii*, e l'identificazione delle sequenze peptidiche mediante analisi di spettrometria di massa.

Il capitolo III tratta analisi bioinformatica di alcune sequenze peptidiche selezionate e relative agli estratti naturali di entrambe le specie, e sullo studio dell'attività antimicrobica dei peptidi sintetici ottenuti dalle sequenze originali sui comuni batteri patogeni. Inoltre, vengono riportate anche le sequenze peptidiche derivate, ottenute dalle corrispettive presenti negli estratti proteici naturali di entrambe le specie mediante analisi bioinformatica, e che possono costituire una nuova piattaforma per la sintesi di nuovi peptidi antimicrobici sintetici.



INDICE

Prefazione	Pag. 3
Scopo del lavoro	Pag. 5
CAPITOLO I: Introduzione	
1.1. La resistenza batterica agli antibiotici	Pag. 11
1.2. Il biofilm come forma di resistenza agli antibiotici	Pag. 15
1.3. Nuovi metodi per contrastare la resistenza antimicrobica e il biofilm	Pag. 19
1.4. I peptidi antimicrobici	Pag. 23
1.4.1. Ruolo biologico e classificazione	Pag. 23
1.4.2. Meccanismo di azione dei peptidi antimicrobici	Pag. 26
1.5. Funzioni dei peptidi antimicrobici	Pag. 28
1.5.1. Attività antimicrobica	Pag. 28
1.5.2. Attività antifungina	Pag. 29
1.5.3. Attività antivirale	Pag. 30
1.5.4. Attività immuno-modulatoria	Pag. 31
1.5.5. Attività antitumorale	Pag. 33
1.6. Le potenziali applicazioni dei peptidi antimicrobici	Pag. 36
1.7. I peptidi antimicrobici da specie acquatiche	Pag. 40
1.7.1. Le fanerogame marine come fonte di sostanze bioattive naturali	Pag. 41
1.7.2. La <i>Posidonia oceanica</i>	Pag. 44
1.7.3. Composizione fitochimica delle foglie e dei rizomi di <i>P. oceanica</i>	Pag. 45
1.7.4. Proprietà biologiche di <i>P. oceanica</i> : attività antimicrobica, antifungina e antivirale	Pag. 48
1.7.5. Proprietà antiossidanti e antitumorali di <i>P. oceanica</i>	Pag. 50
1.8. I crostacei come fonte di peptidi antimicrobici.	Pag. 53
1.8.1. I peptidi antimicrobici da crostacei: classificazione	Pag. 55
1.8.2. I peptidi lineari a singolo dominio α -elica	Pag. 56
1.8.3. I peptidi a singolo dominio contenenti residui di cisteina nei legami disolfuro	Pag. 57
1.8.4. I peptidi antimicrobici a dominio multiplo o chimerici	Pag. 58
1.8.5. I peptidi antimicrobici non convenzionali	Pag. 63
1.9. I gamberi di acqua dolce come fonte di peptidi antimicrobici: <i>Procambarus clarkii</i>	Pag. 65
1.9.1. I fattori anti-lipopolisaccaridici (ALFs)	Pag. 68
1.9.2. Le crustine	Pag. 68
1.9.3. I lisozimi	Pag. 69
1.9.4. Le arasine	Pag. 69
1.9.5. Le astacidine	Pag. 70



CAPITOLO II: Analisi della frazione proteica degli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*

2.1. Introduzione	Pag. 72
2.2. Materiali e metodi	Pag. 73
2.2.1. Attività di campionamento e preparazione degli estratti	Pag. 73
2.2.2. Estrazione della frazione proteica	Pag. 75
2.2.3. Determinazione della concentrazione proteica degli estratti: il metodo Bradford.	Pag. 76
2.2.4 Ceppi batterici e condizioni di crescita	Pag. 78
2.2.5 Saggi di attività antimicrobica: valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).	Pag. 79
2.2.6. Saggi di inibizione della formazione del biofilm	Pag. 80
2.3. Saggi di valutazione della vitalità cellulare e analisi di induzione dell'apoptosi su cellule di carcinoma epatico	Pag. 82
2.4. Analisi LC-MS/MS degli estratti naturali di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i>	Pag. 84
2.4.1. Ricerca bioinformatica	Pag. 85
2.5. Risultati e discussione	Pag. 86
2.5.1. L'attività antimicrobica e di inibizione della formazione del biofilm di <i>P. oceanica</i> .	Pag. 86
2.5.2. L'attività antimicrobica e di inibizione della formazione del biofilm di <i>P. clarkii</i>	Pag. 90
2.5.3. L'attività antitumorale di <i>P. oceanica</i>	Pag. 92
2.5.4. Identificazione e caratterizzazione di sequenze peptidiche negli estratti naturali di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i>	Pag. 95
2.6. L'attività antitumorale degli estratti naturali di <i>P. oceanica</i>	Pag. 96
2.6.1. Inibizione della vitalità/crescita delle cellule HepG2	Pag. 96
2.6.2 Analisi di induzione dell'apoptosi in seguito a trattamento con estratti naturali di <i>P. oceanica</i>	Pag. 98
2.7. Identificazione e caratterizzazione delle sequenze peptidiche negli estratti naturali di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i>	Pag. 101
2.8. Conclusioni	Pag.106



CAPITOLO III: Peptidi antimicrobici sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii* e analisi bioinformatica

3.1. Introduzione	Pag. 108
3.1.1. Descrizione di peptidi antimicrobici sintetici e di metodi computerizzati per la creazione <i>de novo</i> di nuovi peptidi	Pag. 108
3.1.2. Scopo del lavoro	Pag. 114
3.2. Materiali e metodi	Pag. 114
3.2.1. Analisi bioinformatica di alcune sequenze peptidiche identificate negli estratti di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i>	Pag. 114
3.2.2. Sintesi delle sequenze peptidiche selezionate	Pag. 115
3.2.3. Saggi microbiologici con i peptidi sintetici di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i>	Pag. 115
3.2.4. Inibizione della formazione del biofilm con i peptidi sintetici di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i>	Pag. 117
3.2.5. Saggi di valutazione della vitalità cellulare sulle cellule HepG2	Pag. 117
3.3. Risultati e discussione	Pag. 118
3.3.1. Le proprietà biologiche dei peptidi sintetici di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i> ricavate dall'analisi bioinformatica	Pag. 118
3.3.2. L'attività antimicrobica e antibiofilm dei peptidi sintetici di <i>P. oceanica</i> e <i>P. clarkii</i> .	Pag. 120
3.3.3. Analisi di valutazione della vitalità cellulare con i peptidi sintetici di <i>P. oceanica</i>	Pag. 121
3.4. Conclusioni	Pag. 125
Conclusioni generali	Pag. 126
Ringraziamenti	Pag. 129
Bibliografia	Pag. 130



Identificazione e caratterizzazione di molecole biologicamente attive con attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale in Posidonia oceanica e Procambarus clarkii



Capitolo I

Introduzione

1.1. La resistenza batterica agli antibiotici

Gli antibiotici sono considerati la più importante classe di farmaci da circa 70 anni e la più significativa invenzione del ventesimo secolo per la cura delle infezioni batteriche. Questi agenti bioattivi a basso peso molecolare sono stati utilizzati in vari settori della medicina, consentendo di salvare milioni di vite umane; inoltre, negli ultimi anni sono stati utilizzati anche in altri campi, inclusi l'allevamento animale e l'agricoltura (Ribeiro da Cunha et al., 2019; Gajdács et al., 2019). Tuttavia, le infezioni provocate dai batteri multi-resistenti agli antibiotici (MDR) continuano a rappresentare una seria minaccia per la salute umana a livello globale e il fenomeno della resistenza antimicrobica (AMR) costituisce una seria sfida per il sistema sanitario globale poiché il continuo abuso di antibiotici nel corso degli ultimi 20 anni sta causando il ritorno a un'era "pre-antibiotica", caratterizzata dall'assenza di farmaci specifici ed efficaci per contrastare le infezioni (Adedeji, 2016; Dodds, 2017).

Secondo il report dell'Organizzazione Mondiale della Sanità 2019, la resistenza antimicrobica causa attualmente la morte di circa 700.000 persone/anno nel mondo, inclusi 230.000 morti per tubercolosi ormai resistente ai farmaci (O'Neill, 2019; WHO, 2018); inoltre, è stato stimato che tale numero aumenterà raggiungendo i 10 milioni entro il 2050 (Uddin et al., 2021). Alcuni studi hanno anche dimostrato che la resistenza verso la seconda e terza generazione di antibiotici, che costituiscono l'ultima linea difensiva contro le comuni infezioni batteriche, è destinata a raddoppiare entro il 2030 (OECD, 2018).

L'impatto economico determinato dalla diffusione della resistenza antimicrobica potrebbe avere conseguenze catastrofiche sull'intero assetto sociale mondiale. A causa della drammatica proliferazione dei batteri patogeni resistenti, i costi del sistema sanitario aumenterebbero e la produzione di cibo sostenibile, di mangimi e bestiame sarebbe continuamente a rischio (WHO, 2019). Inoltre, la crescente resistenza batterica determina impatti negativi anche sull'ambiente e sugli ecosistemi naturali a causa dell'abuso e sversamento di agenti antimicrobici e microrganismi nel letame e nei rifiuti provenienti dalle strutture sanitarie, dall'industria farmaceutica, dagli allevamenti animali, dalla produzione di piante e dagli impianti di acquacoltura; oltre a queste problematiche, nell'incremento della resistenza antimicrobica influiscono anche i cambiamenti climatici (McFadden et al., 2018; UNEP, 2017).



La resistenza antimicrobica è riferita alla capacità di batteri e altri microrganismi di resistere agli effetti degli antibiotici a cui precedentemente erano suscettibili, consentendo ai microrganismi di sopravvivere e proliferare (Zaman et al., 2017). Questo fenomeno è stato osservato per la prima volta negli stafilococchi, streptococchi e gonococchi in seguito all'introduzione dell'antibiotico penicillina in terapia nel 1945 e alla comparsa del batterio *S. aureus* resistente a tale antibiotico nel 1950 (Dodds, 2017). Nel 1960, è stata introdotta la meticillina, un antibiotico semi-sintetico correlato alla penicillina, per contrastare la resistenza di *S. aureus* contro la penicillina, ma a distanza di pochi anni è stato isolato un ceppo resistente alla meticillina (Durand et al., 2019). Attualmente, circa il 70% dei batteri è resistente ad almeno un antibiotico (Economou e Gousia, 2015).

Numerosi fattori sono coinvolti nell'insorgenza della resistenza antimicrobica (AMR) tra i quali l'eccessivo utilizzo di antibiotici nella medicina umana e animale, nelle pratiche agricole (Silveira et al., 2009; van Boeckel et al., 2015), la mancanza di specifiche regolamentazioni inerenti l'uso degli antibiotici da banco, facilmente disponibili senza prescrizione medica (Ayukekbong et al., 2017), le scarse pratiche igienico-sanitarie che comportano l'introduzione di residui metabolici degli antibiotici nell'ambiente attraverso rifiuti umani e animali, la disponibilità di pochi antibiotici e la pressione selettiva dell'ambiente (Davies and Davies, 2010).

I meccanismi genetici e biochimici che conferiscono la resistenza agli antibiotici nei batteri sono stati ampiamente descritti in vari studi scientifici (Dever and Dermody, 1991; Morita et al., 2012; Blair et al., 2015; Lin et al., 2015; Lombardo et al., 2019) e comprendono il trasferimento genico orizzontale (HGT) e verticale (VGT), la degradazione enzimatica degli antibiotici, la modificazione del target del farmaco, alterazione della permeabilità di membrana, l'aumento dell'attività delle pompe di efflusso che eliminano in maniera attiva gli antibiotici (Laxminarayan e Brown, 2001; Normark and Normark, 2002; Alanis, 2005; Munita and Arias, 2016). Tra questi meccanismi, il trasferimento genico orizzontale rappresenta il principale processo di diffusione della resistenza antimicrobica attraverso l'acquisizione dei geni della resistenza (*args*), da parte di una cellula ricevente per mezzo di una cellula resistente donatrice (Miller et al., 2016; von Wintersdorff et al., 2016).

I geni *args* sono presenti sia a livello intracellulare che extracellulare nel DNA (iDNA e eDNA) (Zhang et al., 2013; Mao et al., 2014) e sono classificati in tre gruppi: i) *args* intracellulari (iARGs); ii) *args* extracellulari liberi (*args* liberi); iii) *eargs* associati o adsorbiti a particelle



(*eargs* associati poiché il rispettivo DNA dal quale derivano può essere adsorbito a cellule o particelle) (Lorenz and Wackernagel, 1990; Yuan et al., 2019). I geni *args* liberi sono in grado di passare attraverso un filtro di 0.22 μm mentre i geni iARGs e i geni *args* associati o adsorbiti a particelle non sono in grado di passare attraverso un filtro di 0.22 μm (Zhang et al., 2018). Inoltre, l'abbondanza e la diversità dei geni *iargs* e *eargs* variano notevolmente poiché i geni *iargs* sono predominanti negli ambienti ricchi di nutrienti e favorevoli alla crescita batterica, come i flussi di rifiuti, mentre i geni *eargs* sono presenti in elevate quantità nei suoli e nei sedimenti privi di nutrienti (Nielsen et al., 2007; Zhang et al., 2013; Barnes et al., 2014; Mao et al., 2014; Zhang et al., 2018; Hao et al., 2019; Yuan et al., 2019a, 2019b). Questi geni *args* caratteristici della resistenza nei batteri possono essere facilmente trasferiti attraverso differenti nicchie ecologiche, per esempio dall'uomo agli animali e viceversa, e da comparti ospedalieri alla comunità (Groisman and Ochman, 1996; Kümmerer, 2004; Phillips et al., 2004). Inoltre, alcuni studi hanno riportato che il trasferimento dei geni iARGs potrebbe avvenire attraverso coniugazione e trasduzione, mentre i geni *eargs* sono essenzialmente trasferiti mediante trasformazione naturale (Thomas and Nielsen, 2005; Miller et al., 2016; von Wintersdorff et al., 2016).

L'abuso di antibiotici e la loro eccessiva presenza negli ambienti naturali ha inoltre causato la proliferazione di diversi ceppi di microrganismi con nuove mutazioni e maggiormente resistenti all'azione dei farmaci (Martínez and Baquero, 2002; Baquero et al., 2008; Ochoa et al., 2009; Berendonk et al., 2015; Holmes et al., 2016; Lopatkin et al., 2016). L'acquisizione della resistenza deriva da geni *wild-type* in cui gli agenti antimicrobici fungono da fattore di selezione per i ceppi dotati di geni della resistenza (resistenza intrinseca) oppure è determinata da uno scambio di geni di resistenza attraverso il trasferimento genico orizzontale (HGT), la ricombinazione intracromosomica e la mutazione (resistenza acquisita). Come illustrato in Fig. 1, la successiva selezione determinata dagli antibiotici nei confronti dei batteri non solo favorisce la selezione dei geni della resistenza nei confronti degli antibiotici target per i batteri ma anche promuove la mutazione tra questi ceppi attraverso i danni ossidativi, lo sbilanciamento del *pool* di nucleotidi e varie risposte da stress che, stocasticamente, favoriscono la loro resistenza agli altri antibiotici nei confronti dei quali questi ceppi batterici avevano mai manifestato prima (Rodríguez-Rojas et al., 2013).

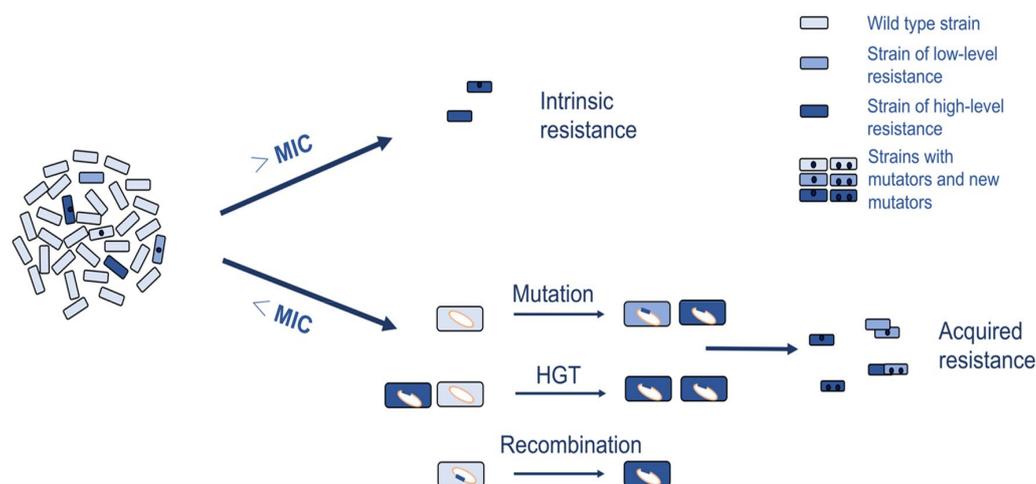


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'azione selettiva degli antibiotici nei confronti dei batteri e induzione della resistenza. Quando una comunità microbica è trattata con antibiotici a concentrazione letale, i ceppi con elevata resistenza saranno eliminati (resistenza intrinseca). In caso contrario, quando una comunità microbica è trattata con antibiotici di concentrazione inferiore alla minima concentrazione inibente (MIC), oltre ai ceppi batterici con elevata resistenza saranno eliminati anche i ceppi caratterizzati da bassa resistenza. Inoltre, antibiotici a concentrazione subletale possono promuovere la mutagenesi e la ricombinazione cromosomale, aggravando la problematica della resistenza agli antibiotici (HGT= trasferimento genico orizzontale) (Xu et al., 2021).

Rispetto ai batteri Gram-positivi, i batteri Gram-negativi sono considerati più resistenti agli antibiotici a causa della minore permeabilità della loro membrana esterna (Hall et al., 2017). Pertanto, è stato creato un particolare acronimo, ESKAPE, per indicare sei specie di batteri nosocomiali patogeni, sia Gram-positivi che Gram-negativi, che include rispettivamente *E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., i quali sono divenuti oggetto di attenti studi scientifici a partire dal 2008 (Rice, 2008). Per questi batteri patogeni è stata osservata una notevole resistenza a diverse classi di antibiotici come le penicilline, gli aminoglicosidi, le cefalosporine e i fluoroquinoloni e clindamicina (Richard et al., 1994; Gold and Moellering, 1996; Struelens et al., 1998); inoltre, gli enterococchi manifestano un'elevata adattabilità all'effetto di diversi antibiotici e possono facilmente acquisire i geni per la resistenza che favoriscono la loro sopravvivenza, attraverso un rapido trasferimento di geni tra ceppi differenti (Arias and Murray, 2012).

Nel corso degli anni è stato osservato che il biofilm batterico rappresenta un altro serio problema per la salute umana a livello mondiale poiché contribuisce alla diffusione del fenomeno della resistenza microbica agli antibiotici. La maggior parte dei batteri patogeni multi-resistenti produce biofilm che è caratterizzato da un'elevata patogenicità (Dunne, 2002; Gurung et al., 2013) e rende le infezioni batteriche più recalcitranti ai trattamenti con gli antibiotici.



1.2 Il biofilm come forma di resistenza agli antibiotici

I batteri possono essere suddivisi in batteri planctonici e batteri a vita sessile (biofilm).

Il biofilm è strettamente correlato con la resistenza antimicrobica e risulta più virulento rispetto alle specie batteriche planctoniche poiché il biofilm è responsabile di circa due terzi delle infezioni batteriche (Hall-Stoodley et al., 2004; Romling e Balsalobre, 2012; Kostakioti et al., 2013). La frequenza di malattie come la polmonite associata a fibrosi cistica, endocarditi, meningiti, infezioni del tratto urinario, periodontiti e osteoartriti sono spesso accompagnate dalla formazione di biofilm. Inoltre, anche le protesi applicate nei siti di lesione possono essere soggette a colonizzazione del biofilm. Pertanto, è fondamentale la ricerca e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche utili per combattere anche la resistenza antimicrobica legata alla formazione del biofilm (Xu et al., 2021).

Il biofilm è definito come un aggregato di microrganismi nel quale le cellule sono associate in una matrice extracellulare di sostanze polimeriche (EPS) che aderiscono l'una all'altro o a una superficie (Flemming et al., 2016). Tale matrice comprende DNA extracellulare (eDNA), esopolisaccaridi, proteine e lipidi e fornisce una barriera protettiva per i batteri incapsulati all'interno del biofilm contro gli antibiotici, limitando l'ingresso di questi farmaci, degradando la loro struttura o chelando i loro siti attivi attraverso specifici enzimi (Flemming e Wingender, 2010; Fong e Yildiz, 2015; Limoli et al., 2015).

La principale causa della difficile eradicazione delle infezioni da biofilm è determinata dalla recalcitranza di queste complesse strutture all'azione degli antibiotici. Questa caratteristica è ulteriormente favorita dall'eterogeneità del biofilm: al suo interno si creano gradienti di nutrienti e ossigeno che vengono sfruttati dalle cellule dello strato esterno e mantengono anche tassi metabolici differenti, favorendo così un'attività metabolica elevata e una crescita cellulare più rapida rispetto alle cellule presenti nello strato interno e rendendo più complesso lo sviluppo di potenti agenti antimicrobici (Werner et al., 2004; Stewart e Franklin, 2008). Altri aspetti significativi del biofilm sono: i) la resistenza alla distruzione fisica che rende difficile la sua completa eradicazione e aumenta il rischio di infezioni ricorrenti; ii) il meccanismo di fuga dalla *clearance* del sistema immunitario dell'ospite, basato su cellule persistenti in grado di eludere il sistema immunitario ed evitare gli effetti letali delle specie reattive dell'ossigeno, contribuendo alla persistenza del biofilm (Kim et al., 2011; Taylor et al., 2014; Campoccia et al., 2019). Pertanto, rispetto alle forme planctoniche, la resistenza del biofilm agli agenti antimicrobici è da 10 a 1000 volte più elevata (Davies, 2003).



Le molecole EPS determinano l'architettura del biofilm, attraverso un dinamico processo che dà origine all'organizzazione spaziale nella quale le cellule all'interno del biofilm sono disposte in *cluster* (Neu e Lawrence, 2014). Oltre all'organizzazione spaziale, la matrice conferisce al biofilm elevata biodiversità, complesse e dinamiche interazioni sinergistiche tra le cellule e favorisce il trasferimento genico orizzontale. La matrice, inoltre, determina diversi benefici funzionali del biofilm, tra i quali idratazione, cattura delle risorse, capacità digestiva e protezione da agenti antimicrobici (Flemming et al., 2016); inoltre, la sua formazione dipende dalla disponibilità di nutrienti, dalla sintesi e secrezione del materiale extracellulare, da sollecitazioni, dalla competizione sociale e dal *grazing* determinato dagli altri organismi (Flemming et al., 2016).

La formazione del biofilm è un processo complesso e avviene in quattro stadi (Fig. 2: i) adesione alla superficie; ii) colonizzazione; iii) maturazione e formazione dell'architettura del biofilm; iv) il distacco e la dispersione del biofilm. Tale processo richiede uno specifico tipo di segnale chimico, noto come *quorum sensing*, il quale si basa sul rilascio di molecole-segnaletto da parte dei batteri in risposta alle dimensioni della popolazione (Keller e Surette, 2006). Inoltre, il processo di formazione del biofilm richiede anche la trascrizione di diversi geni rispetto alle forme planctoniche degli stessi microrganismi (Donlan, 2002; Federle e Bassler, 2003). Un altro aspetto centrale della formazione del biofilm è la transizione dalla forma mobile a quella sessile. Infatti, la motilità dei batteri può essere suddivisa in due tipi: motilità mediata dai flagelli che è associata con tratti di nuoto e motilità mediata dai pili tipo IV che è coinvolta nel movimento delle contrazioni (Khan et al., 2019).

La prima fase del processo inizia con l'attacco delle cellule batteriche a una superficie, biotica o abiotica, attraverso le loro appendici (fimbrie, pili e flagelli) o attraverso altre forze di natura fisica. Fimbrie, pili e flagelli conferiscono forza nell'adesione alle superfici e, inoltre, l'idrofobicità svolge un ruolo centrale nel determinare l'adesione dei microrganismi poiché riduce le forze di repulsione tra i batteri e la superficie (Kumar e Anand, 1998). In questa prima fase, l'espressione dei pili tipo IV è sovra-regolata mentre l'espressione dei flagelli polari diminuisce consentendo cambiamenti nell'espressione dei geni per i flagelli poiché tali appendici sono fondamentali per l'attacco delle cellule planctoniche. In questa fase, inoltre, avviene anche la produzione dello strato di EPS che favorisce una maggiore adesione delle cellule batteriche (Barken et al., 2008).

Dopo l'attacco dei microrganismi alla superficie, inizia un processo di divisione e moltiplicazione delle cellule mediante particolari molecole-segnaletto all'interno dello strato EPS.



Questo processo porta alla formazione di diverse micro-colonie batteriche, costituite a loro volta da differenti micro-comunità; quest'ultime agiscono in coordinazione con altre per molteplici aspetti. La coordinazione svolge un ruolo fondamentale nello scambio di substrati, nella distribuzione di importanti prodotti metabolici e nell'escrezione dei prodotti di scarto del metabolismo (Jamal et al., 2018). Le micro-colonie gradualmente crescono dando origine a macro-colonie, determinando la maturazione del biofilm e la formazione di una complessa struttura eterogenea tridimensionale nella quale lo strato più esterno trattiene più nutrienti rispetto allo strato più interno (Xu et al., 2021). Infine, nell'ultimo stadio una parte del biofilm si disperde e questo processo di dispersione è favorito dalla produzione, da parte delle cellule microbiche, di diversi enzimi saccarolitici che favoriscono il rilascio delle cellule dalla superficie del biofilm e la diffusione verso una nuova area di colonizzazione (Jamal et al., 2018). Per esempio, gli enzimi *N*-acetil-eparosan liasi, liasi alginato e ialuronidasi prodotti rispettivamente da *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, e *Streptococcus equi*, favoriscono la lisi della matrice EPS e il distacco delle cellule (Sutherland, 1999).

I meccanismi di resistenza delle comunità microbiche del biofilm differiscono da quelli delle cellule planctoniche, basati su bassa permeabilità delle cellule, pompe di efflusso, enzimi modificati e mutazioni nei target (Nikaido, 2003; Welch, 2005; Kumar et al., 2013; Sharma et al., 2016). Nelle comunità microbiche del biofilm, la resistenza agli antibiotici è determinata dalla natura multicellulare del biofilm che causa l'incompleta penetrazione dell'antibiotico all'interno del biofilm (Shigeta et al., 1997; Stewart, 1998; Mah et al., 2001), un micro-ambiente chimico alterato all'interno del biofilm (de Beer et al., 1994; Zhang e Bishop, 1996; Prigent-Combaret et al., 1999) e una sub-popolazione di microrganismi nel biofilm (Goto et al., 1999; Cochran et al., 2000).

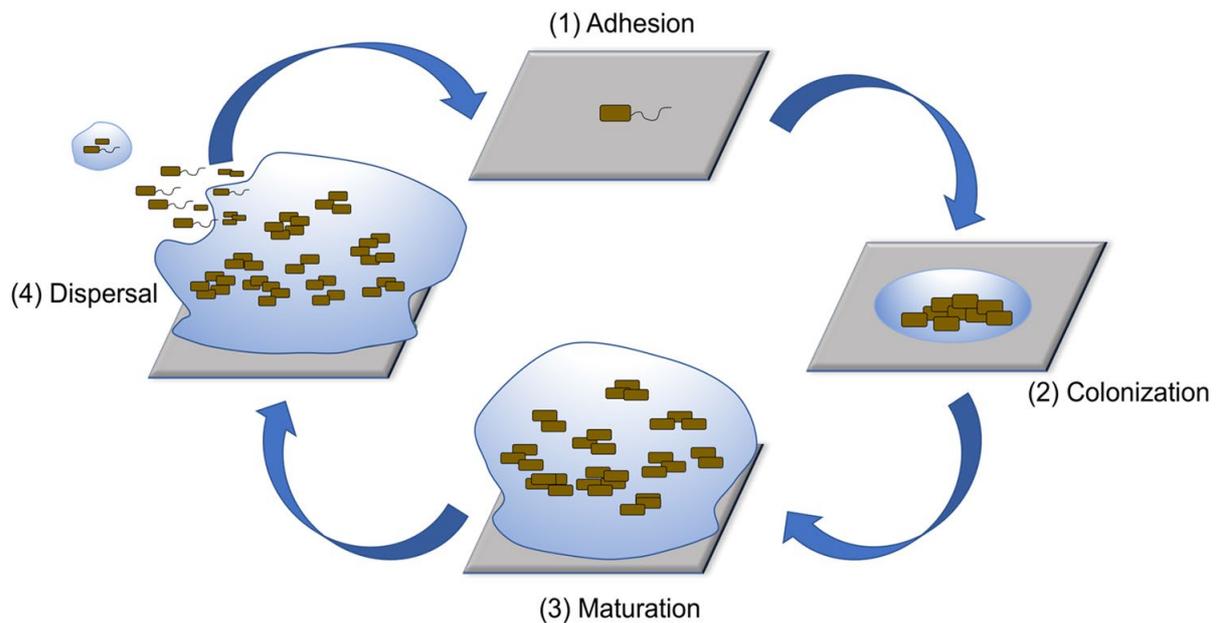


Figura 2. Stadi di formazione del biofilm. 1) I batteri planctonici aderiscono a una superficie e si trasformano dal fenotipo libero-natatorio al fenotipo sessile, durante il quale l'espressione dei pili di tipo IV è sovra-regolata mentre l'espressione dei flagelli polari è sotto-regolata. Inoltre viene prodotta la matrice di EPS. 2) I batteri colonizzano la superficie e le microcolonie si formano all'interno in 24 h. La produzione di EPS è continua. 3) La struttura del biofilm maturo si è formata poiché le microcolonie si sono trasformate in macrocolonie, completando l'architettura della matrice di EPS in 24-72 h. 4) Si realizza la transizione al fenotipo sessile-mobile e inizia la dispersione del biofilm attraverso la regolazione del sistema *quorum sensing* entro 24 h (Xu et al., 2021).

È stato osservato che attraverso l'interruzione di un passaggio del processo di formazione della struttura multicellulare del biofilm è possibile incrementare l'efficacia degli antibiotici e le difese immunitarie dell'ospite, consentendo un rapido trattamento dell'infezione persistente (Sharma et al., 2019). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che la fase stazionaria (caratterizzata da assenza o lenta crescita microbica) e lo stato di dormienza delle cellule batteriche rappresentano le principali strategie di sopravvivenza delle comunità microbiche del biofilm sotto gli stress degli antibiotici (Li et al., 2014). Infatti, il biofilm è caratterizzato da molte cellule in fase stazionaria e che manifestano una ridotta sensibilità agli antibiotici. Circa l'1% di queste cellule diventa tollerante agli antibiotici (Amato et al., 2014) e i biofilm più antichi, costituiti da comunità microbiche in fase stazionaria, mostrano una maggiore tolleranza agli antibiotici (Maisonneuve e Gerdes, 2014).



1.3. Nuovi metodi per contrastare la resistenza antimicrobica e il biofilm

Nell'ottica di limitare il fenomeno della resistenza antimicrobica alle terapie antibiotiche tradizionali, si evidenzia un'urgente necessità di identificare una nuova generazione di agenti antimicrobici ad ampio spettro, come alternative agli antibiotici convenzionali, e i quali presentino caratteristiche di biostabilità, biocompatibilità ed efficacia di lunga durata. Attualmente, sono stati individuati nuovi metodi in grado di contrastare la resistenza antimicrobica e le infezioni batteriche associate al biofilm e caratterizzati da un maggiore biocompatibilità, biostabilità ed efficacia a lungo termine (Xu et al., 2021) (Fig.3).

Tra queste metodiche innovative, emergono le nanoparticelle di metallo (NPs) (Fig. 3) le quali presentano eccellenti proprietà a nanoscala, in particolare un elevato rapporto area superficiale/volume, eccezionale attività fotoelettrochimica e risonanza plasmonica di superficie (SPR), insieme a una maggiore reattività superficiale delle particelle (Seil et al., 2012; Sirelkhatim et al., 2015; Wang et al., 2018; Alavi e Karimi, 2019).

Il meccanismo di interazione delle nanoparticelle di metallo con i batteri si basa su due aspetti fondamentali: 1) agglomerazione delle nanoparticelle di metallo nel periplasma o citoplasma al fine di destabilizzare l'attività cellulare o precipitazione sul lato esterno batterico con distruzione della struttura della membrana (Brayner et al., 2006; Zhang et al., 2007) e rilascio dei corrispondenti ioni, seguito dalla distruzione del sistema enzimatico; 2) incremento dei livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), produzione di molecole di ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) e radicali idrossido ($\text{HO}\cdot$) (Sawai et al., 1998; Yang et al., 2010; Tao et al., 2020). Tra le nanoparticelle di metallo si evidenziano, in particolare, le nanoparticelle di argento (AgNPs) le quali sono in grado di distruggere la struttura del peptidoglicano della parete cellulare batterica, di inattivare le proteasi respiratorie dei batteri, di danneggiare la struttura del DNA e infine di uccidere il batterio, determinando anche la disintegrazione del biofilm (Morones-Ramirez et al., 2013; Jia et al., 2016).

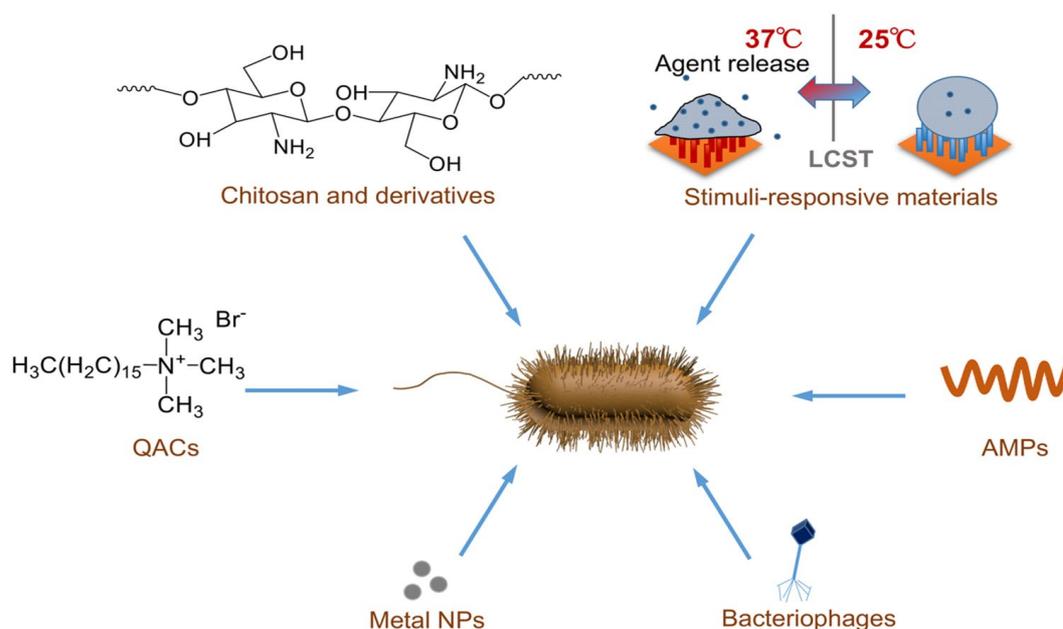


Figura 3. Rappresentazione schematica delle nuove strategie terapeutiche per contrastare la resistenza antimicrobica e le infezioni correlate al biofilm (Metal NPs= nanoparticelle di metallo; AMPs= peptidi antimicrobici; QACs= agenti antimicrobici ad ampio spettro) (Xu et al., 2021).

Tra le nanoparticelle di metallo sono inclusi anche i QACs (Fig. 3), ridenominati come agenti antimicrobici ad ampio spettro, i quali hanno ottenuto ampia applicazione in campo biomedico, come costituenti dei materiali. I più comuni QACs, utilizzati in laboratorio, comprendono il cloruro di benzalconio (BAC), la clorexidina (CHX), il cloruro di cetilpiridinio (CPC) e il cloruro di didecildimetilammonio (DDAC) (Xu et al., 2021). L'attività antimicrobica dei QACs può essere attribuita alla loro struttura anfifilica poiché i QACs si legano ai batteri attraverso le interazioni elettrostatiche e distruggono la membrana citoplasmatica mediante le catene idrofobiche (Jennings et al., 2015). Tuttavia, l'abuso di QACs può causare un aumento della resistenza attraverso la diffusione di plasmidi multi-resistenti nel biofilm. Infatti, è stato riscontrato che i QACs possono uccidere completamente i batteri planctonici ma sono ostacolati nel raggiungimento dei batteri all'interno del biofilm dallo strato di EPS, rendendoli circa 200 volte meno suscettibili ai batteri del biofilm (Mitchell et al., 2015). Pertanto, il miglioramento dell'attività antimicrobica dei QACs può essere ottenuto mediante incorporazione di agenti antimicrobici (Xu et al., 2021): nello studio condotto da Liu et al., (2019), è stata analizzata l'azione di micelle reticolate (CM), costituite da QACs, le quali potrebbero penetrare all'interno all'interno del biofilm sotto forma di nanoparticelle, mediante interazioni multi-carica, e



dissociarsi in oligomeri nelle lipasi coinvolte o nel microambiente acido (pH=5) a causa della presenza di legami di tiopropionato e, di conseguenza, distruggere la struttura del biofilm uccidendo il microrganismo presente all'interno (Liu et al., 2019).

Un'altra metodica importante per contrastare l'attività dei batteri e la formazione del biofilm è basata sull'utilizzo di polimeri cationici, come il chitosano e i suoi derivati, i quali sono considerati agenti batteriostatici o battericidi, a causa dell'interazione elettrostatica che consente il legame alla parete cellulare batterica, destabilizza e distrugge la membrana cellulare batterica, determinando la perdita dei componenti intracellulari, in particolare di elettroliti e proteine (Raafat et al., 2008).

Il chitosano è un polisaccaride policationico lineare, composto da N-acetilglucosamina (GlcNAc) e D-glucosamina (GlcN), entrambi legati da legame β -1,4 glicosidico, presente naturalmente in organismi come insetti, alghe, crostacei e funghi ed è ottenuto mediante deacetilazione enzimatica o attraverso la deacetilazione in soluzione alcalina (Hamed et al., 2016; Ahmed e Aljaeid, 2016). È stato dimostrato che il chitosano presenta numerose applicazioni biologiche grazie alle sue proprietà antimicrobiche, antiossidanti e anticancro (Hamed et al., 2016; Shariatinia, 2019). In particolare, le nanoparticelle di chitosano rappresentano agenti antimicrobici con un'attività antibatterica ad ampio spettro e agiscono mediante interazioni elettrostatiche e distruzione della membrana (Jiang et al., 2014). Inoltre, le nanoparticelle di chitosano sono caratterizzate da un basso peso molecolare e mostrano una maggiore capacità di diffusione all'interno del biofilm e, contemporaneamente, comportano una minore aggregazione nel biofilm (Chávez de Paz et al., 2011; Yen et al., 2012). La combinazione delle nanoparticelle di chitosano con agenti antimicrobici può favorire l'incremento dell'attività antibatterica di questo polisaccaride: Subhaswaraj et al., (2018) hanno osservato che l'aggregazione delle nanoparticelle di chitosano con cinnamaldeide ha consentito di inibire notevolmente la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* attraverso l'attività del *quorum sensing* e i cambiamenti nella motilità (Subhaswaraj et al., 2018).

Nell'ambito delle metodiche alternative utili per contrastare la resistenza batterica agli antibiotici si annoverano anche i materiali stimoli-risposta (Fig.3) che si riferiscono a composti, polimeri o complessi di risposta a pH, temperatura e luce (Xu et al., 2021). Un esempio rappresentativo di tali materiali è il poli (N-isopropilacrilammide) (PNIPAAm), un polimero termo-risposta rilasciato sulle superfici batteriche in costruzione e che è stato utilizzato come *anti-fouling* in passato (Schild, 1992; Cunliffe et al., 2000; Cunliffe et al., 2003; Ista et al., 2010;



Yu et al., 2013): quando la temperatura aumenta al di sopra della temperatura critica di soluzione (LCST), gli idrogeli collassano favorendo il rilascio degli agenti antimicrobici.

Il rilascio delle superfici batteriche può essere ottenuto anche mediante polimeri di risposta al pH. Questi polimeri sono formati da composti carbossilici anionici e da gruppi amminici quaternari la cui carica varia in relazione al pH dell'ambiente; pertanto, quando i polimeri sono inseriti in un microambiente acido dei batteri, avviene la protonazione dei gruppi carbossilici acidi che attira le membrane cellulari di carica negativa dei batteri. Come conseguenza di questo processo di adesione, il pH aumenta e la carica della superficie cambia da cationica a neutra o zwitterionica (Xu et al., 2021).

Anche i materiali di risposta allo stimolo luminoso (Fig. 3) presentano una buona applicazione come agenti antimicrobici, in particolare i materiali foto-termici che sono in grado di convertire la luce in calore e di provocare la lisi batterica. Quando questi materiali sono esposti alla radiazione infrarossa (700-1100 nm), avviene la loro decomposizione e gli agenti antimicrobici in essi presenti vengono rilasciati (Xu et al., 2021).

Infine, tra le nuove strategie terapeutiche per contrastare la resistenza antimicrobica e la formazione del biofilm si evidenziano anche i batteriofagi e i peptidi antimicrobici (AMPs) (Fig. 3).

I batteriofagi possono avere come target le cellule batteriche poiché si replicano all'interno di esse e conducono alla lisi della cellula ospite in seguito alla replicazione, senza comportare danni per le cellule umane sane e per la microflora (Deresinski, 2009; Gu et al., 2012; Fish et al., 2018; Song et al., 2018; Tkhilaishvili et al., 2019); inoltre, parte dei batteriofagi possono degradare enzimaticamente la matrice extracellulare del biofilm (Tkhilaishvili et al., 2019).

In generale, la terapia fagica è utilizzata in applicazioni locali di creme o gel sulla superficie della ferita; in alcuni casi, vengono adoperati approcci intravenosi che consentono una rapida diffusione attraverso la circolazione, sebbene, a causa della presenza del reticolo endoteliale, l'agglomerazione dei fagi è stata osservata soprattutto nel fegato e nella milza (Xu et al., 2021).



1.4 I peptidi antimicrobici (AMPs)

1.4.1 Ruolo biologico e classificazione

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono piccole proteine presenti in una grande varietà di piante e animali e sono componenti fondamentali dell'immunità innata di un organismo poiché rappresentano la prima linea difensiva contro i microrganismi (Mookherjee et al., 2020; Sarkar et al., 2021). Attualmente, i peptidi antimicrobici costituiscono oggetto di notevole attenzione da parte della comunità scientifica come potenziali alternative agli antibiotici convenzionali per il trattamento delle infezioni batteriche (Ebbensgaard et al., 2015; Yu et al., 2018). L'assenza o lo scarso sviluppo della resistenza antimicrobica nei confronti di questi peptidi potrebbe essere dovuta alla presenza di diversi meccanismi di azione degli stessi contro i batteri rispetto ai target usati dagli antibiotici (Papo e Shai, 2003; Brogden, 2005; Nicolas, 2009).

I peptidi antimicrobici sono caratterizzati da un ampio spettro di attività contro la maggior parte dei microrganismi, dai batteri Gram-positivi e Gram-negativi ai virus e parassiti. Inoltre, possiedono una significativa attività contro le cellule tumorali, mediano la chemotassi, l'apoptosi e hanno proprietà immunomodulatorie (Zhong et al., 2017). Vari studi hanno dimostrato che i peptidi antimicrobici sono efficaci contro molti batteri multi-resistenti e contro i funghi poiché sono in grado di distruggere le membrane a causa della carica elettrostatica negativa presente sulla superficie batterica e sono anche in grado di interferire con i processi metabolici tra i quali l'inibizione della parete cellulare, la biosintesi degli acidi nucleici o delle proteine, rendendo più difficoltoso lo sviluppo della resistenza da parte del microrganismo (Galdiero et al., 2019).

I peptidi antimicrobici sono stati descritti per la prima volta nel 1960 da Kiss e Michl nella rana maculata (Simmaco et al., 2009) e sono prodotti come metaboliti secondari.

In generale, i peptidi antimicrobici sono definiti come piccole molecole anfipatiche, costituite da un numero variabile 10 a 50 amminoacidi e presentano un peso molecolare compreso tra 1 e 10 kDa; sono ricchi in residui di arginina e lisina e sono dotate di carica positiva netta da +2 a +9 a pH fisiologico (Costa et al., 2011; Piotrowska et al., 2017; Ramesh et al., 2016; Roudi et al., 2017). Inoltre, i peptidi antimicrobici sono inoltre caratterizzati da una diversa struttura secondaria e un differente meccanismo di azione. Dal punto di vista chimico, la maggior parte dei peptidi antimicrobici presenti in natura sono cationici (CAMPs) e sono caratterizzati da una carica netta positiva da +2 a +9 (Lopez Cascales et al., 2018). Inoltre, possono essere presenti peptidi antimicrobici anionici (AAMPs), completamente idrofobici (Harris et al.,

2009; Lai et al., 2002; Steffen et al., 2006; Epanand e Vogel, 1999), anfipatici, con legami disolfuro (Krause et al., 2006) e ciclici (Dartois et al., 2005).

I peptidi antimicrobici sono comunemente classificati in base alla loro struttura secondaria: i) α -elica; ii) foglietto- β ; struttura $\alpha\beta$ mista; iii) struttura ad α elica estesa e avvolta (Fig. 4).

I peptidi antimicrobici ad α -elica si presentano spesso non strutturati in soluzione acquosa ma adottano una struttura anfipatica a elica a contatto con una membrana biologica (Yeaman e Yount, 2003; Pasupuleti et al., 2012). I peptidi antimicrobici più comuni con questa struttura sono la magainina (Zasloff, 1987), la protegrina (Fahrner et al., 1996), LL-37 (Scott et al., 2002), le cecropine, le temporine e la melittina. Questo gruppo di peptidi contiene residui di alanina, leucina e lisina che stabilizzano la struttura ad α -elica (Tornesello et al., 2020).

Le strutture a foglietto- β sono stabilizzate dai legami disolfuro (Powers e Hancock, 2003; Yount et al., 2006) e sono organizzate a creare una molecola anfipatica (Yeaman e Yount, 2003). Grazie alla struttura rigida, i peptidi a foglietto- β sono più ordinati in soluzione acquosa e non sono soggetti a drastici cambiamenti conformazionali, come i peptidi α -elica, in seguito all'interazione con la membrana (Yeaman e Yount, 2003). Questa classe di peptidi è ricca in prolina, glicina, triptofano, arginina o istidina, e contengono da due a dieci residui di cisteina che formano fino a cinque ponti disolfuro (Tornesello et al., 2020). I più comuni peptidi antimicrobici a foglietto β sono le defensine (Selsted et al., 1985a; Selsted et al., 1985b), la drosomicina (Fehlbaum et al., 1994), le tionine (Stec, 2006) e la plectasina (Mygind et al., 2005).

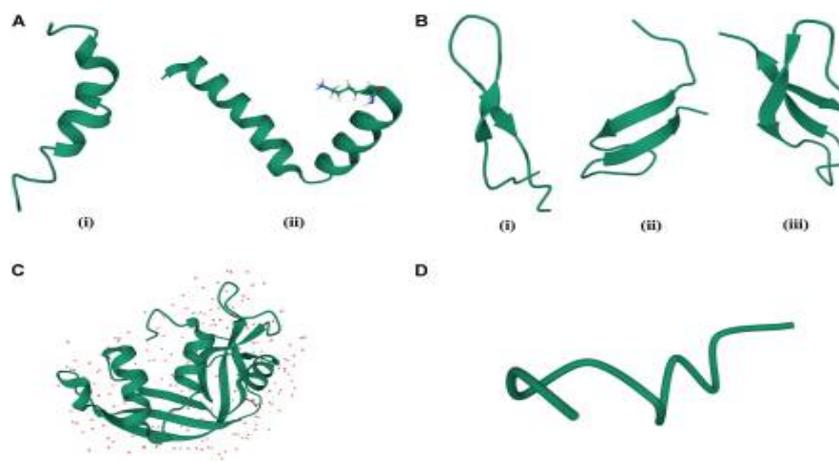


Figura 4. Classificazione dei peptidi antimicrobici in base alla loro struttura secondaria. A) AMPs ad α -elica: (i) magainina, (ii) cecropina; B) AMPs a foglietto β : (i) lactoferrina bovina, (ii) epidicina, (iii) defensina di coniglio; C) AMPs con struttura mista $\alpha\beta$: RNase 2; D) AMPs con struttura random: proteina priva di cisteina (Sarkar et al., 2021).

Infine, un piccolo gruppo di peptidi antimicrobici presenta una struttura casuale/estesa, la quale manca della struttura secondaria e contiene una elevata quantità di arginina, prolina, triptofano e/o residui di istidina oppure una struttura mista $\alpha\beta$; peptidi con struttura mista sono RNase 2 e RNase 3 (Takahashi et al., 2010; Nguyen et al., 2011).

Nel corso degli anni migliaia di peptidi antimicrobici sono stati isolati da diverse specie viventi (Mishra et al., 2018). Più di 3000 peptidi antimicrobici, sia sintetizzati artificialmente che ricavati da fonti naturali, sono riportati in database specializzati come APD3 (*Antimicrobial Peptide Database*) (Wang et al., 2016), CAMP (*Collection of Antimicrobial Peptides*) (Waghu e Thomas, 2020) e DrAMP2.0 (Kang et al., 2019). In particolare, il database APD, costantemente aggiornato, comprende circa 3180 peptidi antimicrobici identificati nei sei regni: 355 nei batteri, 5 negli Archea, 8 nei Protisti, 20 nei Funghi, 352 nelle Piante e 2356 negli Animali, inclusi anche alcuni peptidi sintetici (Fig. 5) (Di Somma et al., 2020).

Anche negli altri databases sono riportati vari peptidi isolati dalle piante come le tionine, le eveine e le snakine (Nawrot et al., 2014; Tam et al., 2015). Tra i peptidi riportati alcuni isolati dagli anfibi, come la japonicina 2, la nigrocina 2, la temporina, la dermaseptina, la magainina e la buforina II (Patocka et al., 2019; Casciaro et al., 2020) presentano un ampio spettro di azione nei confronti dei batteri, funghi, protozoi e virus, oltre ad un'azione antitumorale (Rabanal e Cajal, 2016). Altri peptidi antimicrobici significativi, riportati nei databases, sono stati isolati dagli insetti come la cecropina, la tanatina, la defensina, la drosomicina, l'epidecina (Mylonakis et al., 2016) e dai crostacei tra i quali la callinectina, le peneidine, le iastatine e le arasine (Zanjani et al., 2018). Anche i mammiferi producono importanti peptidi antimicrobici tra i quali le defensine, le istadine, l'indolicina (Wang, 2014; Dutta e Das, 2016).

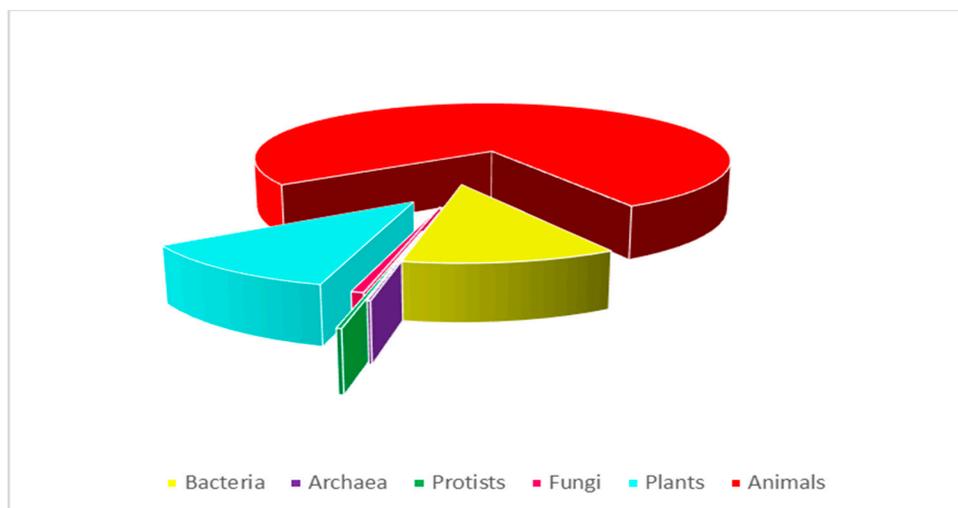


Figura 5. Fonti di peptidi antimicrobici presenti nel database APD (Di Somma et al., 2020).



1.4.2. Meccanismo di azione dei peptidi antimicrobici

La lisi della membrana batterica o la distruzione del processo di sintesi della membrana/parete cellulare è considerato uno dei principali meccanismi di azione dei peptidi antimicrobici.

Molti peptidi antimicrobici mostrano una rapida e diretta attività antibatterica poiché causano la distruzione dell'integrità fisica della membrana batterica e/o traslocano attraverso la membrana nel citoplasma batterico, al fine di agire contro specifici targets (Hancock e Sahl, 2006). La membrana batterica costituisce un fattore chiave per la diretta azione dei peptidi antimicrobici, sia quando rappresenta il target principale sia quando un altro target intracellulare viene raggiunto attraverso la traslocazione del peptide (Jenssen et al., 2006; Nguyen et al., 2011; Yeung et al., 2011; Malmsten, 2016).

Le forze elettrostatiche tra i peptidi antimicrobici cationici e la superficie batterica di carica negativa sono determinanti nelle interazioni tra i peptidi e la membrana batterica (Yeaman e Yount, 2003; Giuliani et al., 2007; Yeung et al., 2011; Ebenhan et al., 2014). Alcuni studi hanno dimostrato che la composizione e la struttura della parete cellulare dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi rappresenta la base per la suscettibilità dei differenti patogeni ai peptidi antimicrobici, come i fosfolipidi anionici, il lipide A della membrana esterna dei batteri Gram-negativi e gli acidi teicoico e teicuronico dei batteri Gram-positivi (Yount e Yeaman, 2013). Inoltre, sia le membrane citoplasmatiche dei batteri Gram-positivi che Gram-negativi sono ricche in fosfolipidi, fosfatidilglicerolo, cardiolipina, fosfatidilserina i quali sono costituiti da gruppi carichi negativamente e che si legano ai peptidi antimicrobici dotati di carica positiva (Yeaman e Yount, 2003; Ebenhan et al., 2014). Pertanto, la presenza degli acidi teicoici nella parete cellulare dei batteri Gram-positivi e dei lipopolisaccaridi (LPS) nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi fornisce una ulteriore carica elettronegativa alla superficie batterica (Lai e Gallo, 2009; Ebenhan et al., 2014).

Al fine di raggiungere la membrana citoplasmatica dei batteri Gram-negativi, i peptidi antimicrobici devono spostarsi attraverso la membrana esterna. Questa membrana agisce da barriera permeabile per diverse macromolecole, a causa della presenza di cationi divalenti come Ca^{2+} e Mg^{2+} che legano gruppi fosfato all'interno del core dei lipopolisaccaridi e forniscono stabilità allo strato esterno (Clifton et al., 2015). Secondo il modello del *self-promoted uptake*, i peptidi antimicrobici traslocano nella membrana esterna in seguito allo spostamento dei cationi divalenti determinato dall'affinità ai lipopolisaccaridi. A causa del maggiore ingombro, i peptidi antimicrobici provocano delle rotture transitorie e permeabilizzano la membrana esterna, consentendo il suo passaggio da parte del peptide (Mahlapuu et al., 2016).

A contatto con la membrana plasmatica, i peptidi antimicrobici formano una struttura secondaria anfipatica, indispensabile per l'interazione con la membrana cellulare (Ebenhan et al., 2014). In seguito, i domini carichi del peptide consentono l'interazione tra le teste idrofiliche dei fosfolipidi mentre i domini idrofobici del peptide favoriscono l'interazione con il core idrofobico del doppio strato lipidico, causando la permeabilizzazione e la lisi della membrana e permettendo al peptide di penetrare all'interno di essa (Ebenhan et al., 2014) e di formare diversi pori transmembrana (Dong et al., 2014).

Diversi modelli sono stati elaborati per descrivere il meccanismo di inserzione dei peptidi antimicrobici all'interno della membrana batterica (Takahashi et al., 2010) (Fig. 6).

Nel *barrel-stave model*, i peptidi si inseriscono perpendicolarmente all'interno del doppio strato mentre il reclutamento di nuovi peptidi avviene in seguito alla formazione di un poro transmembrana allineato con il peptide. In questo poro i peptidi sono allineati con il sito idrofobico, rivolto verso il core lipidico, mentre la regione idrofilica è orientata verso la regione interna del poro. Nel *toroidal model*, l'inserimento dei peptidi forza i fosfolipidi a piegarsi continuamente da una parte e dall'altra, portando alla formazione di un poro avvolto sia da peptidi che dalle teste dei fosfolipidi. Infine, nel *carpet model*, l'accumulo dei peptidi sulla superficie della membrana causa delle tensioni nel doppio strato che conducono alla distruzione della membrana e alla formazione di micelle, attraverso un'azione simile ai detergenti (Mahlapuu et al., 2016).

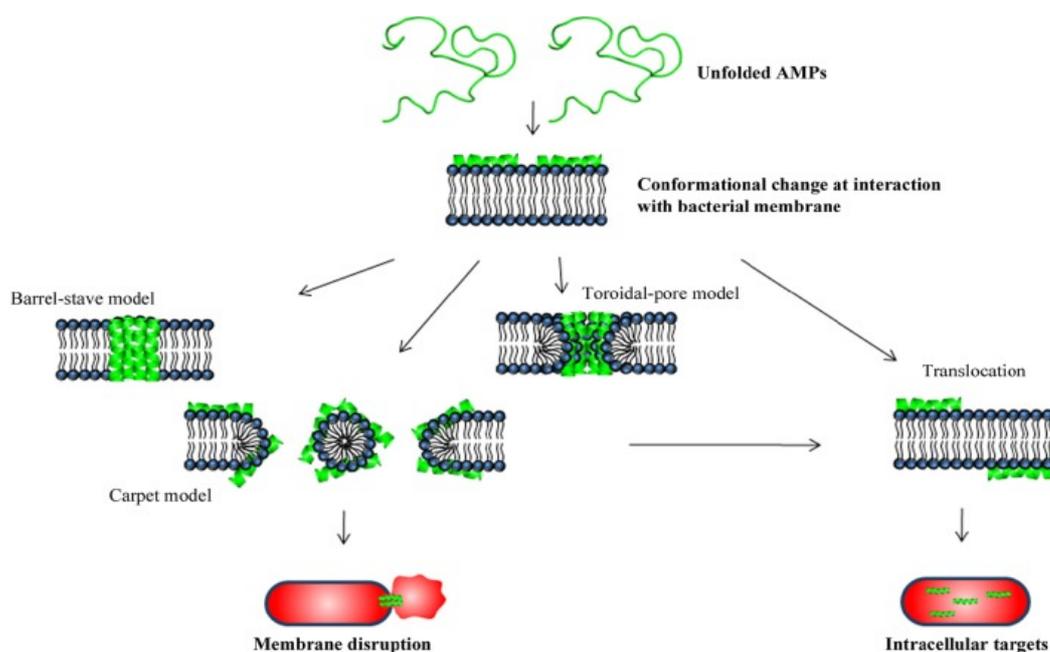


Figura 6. Meccanismi di inserzione e azione dei peptidi antimicrobici (Mahlapuu et al., 2016).



Pertanto, la permeabilizzazione della membrana rappresenta un processo cruciale nel meccanismo di azione dei peptidi antimicrobici poiché inizialmente causa una perdita di ioni e metaboliti, una depolarizzazione del potenziale transmembrana con conseguente malfunzionamento della membrana accompagnato da inibizione della respirazione, regolazione osmotica alterata, e infine una rottura della membrana con rapida lisi della cellula batterica (Yeaman e Yount, 2003; Brogden, 2005; Eckert, 2011). Inoltre, la permeabilizzazione della membrana è importante per la traslocazione di alcuni peptidi nel citoplasma dove agiscono su specifici target cellulari, come la sintesi del DNA/RNA e delle proteine, l'avvolgimento delle proteine, l'attività enzimatica e/o la sintesi della parete cellulare (Yeaman e Yount, 2003; Brogden, 2005; Yount et al., 2006; Nguyen et al., 2011).

1.5 Funzioni dei peptidi antimicrobici

In base al target dei patogeni, i peptidi antimicrobici sono classificati in antibatterici, antifungini, antivirali e antiparassitari. La maggior parte di essi, inoltre, presentano attività immunomodulatoria e antitumorale.

1.5.1. Attività antibatterica

L'attività antimicrobica rappresenta una delle principali funzioni dei peptidi antimicrobici. Come riportato in letteratura, molti peptidi antimicrobici mostrano una significativa attività nei confronti dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi, come la melittina, la magainina, la cecropina, e LL-37 (Lee et al., 1989; Giacometti et al., 2000; Giacometti et al., 2003; Majchrzykiweicz et al., 2010). I peptidi con attività antibatterica sono costituiti da 15-45 residui amminoacidici e sono caratterizzati da una carica netta positiva. In generale, i peptidi antibatterici agiscono distruggendo la membrana cellulare ma possono determinare la morte dei microrganismi inattivando alcuni processi cellulari come la replicazione del DNA e la sintesi delle proteine (Brogden, 2005). Un esempio significativo è rappresentato dalla mutacina -1140, un peptide costituito da 22 amminoacidi e prodotto da *Streptococcus mutans*, in grado di inibire la sintesi del peptidoglicano. Questo peptide, inoltre, presenta un ampio spettro di attività nei confronti di batteri patogeni clinici, tra i quali gli enterococchi resistenti alla vancomicina e *S. aureus* (Hillmann et al., 1998; Hasper et al., 2006). Un altro peptide con attività antibatterica è la lisostafina, che è in grado di spezzare il legame pentaglicinico e idrolizzare la parete cellulare degli stafilococchi; la bassa tossicità della lisostafina, inoltre, la rende un candidato ideale per



potenziali applicazioni terapeutiche (Chen et al., 2014). Infine, tra i peptidi antibatterici è inclusa la nisina, un peptide formato da 34 amminoacidi e prodotto da *Lactococcus lactis*, la cui attività antimicrobica è dovuta alla presenza dell'amminoacido lantionina, in grado di distruggere l'integrità fisica della membrana (Chan et al., 1996). Questo peptide è utilizzato nell'industria alimentare durante la produzione, per incrementare la cosiddetta *shelf-life* degli alimenti, contrastando la crescita dei batteri Gram-positivi responsabili del deterioramento dei cibi e delle conseguenti malattie (Moravej et al., 2018).

1.5.2 Attività antifungina

Le infezioni fungine rappresentano un serio problema per la salute dell'umanità a livello mondiale. Diverse infezioni invasive causate da specie fungine come *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum* sono responsabili dei decessi di circa 1.5 milioni di persone annualmente (Kim, 2016). Solo un limitato numero di farmaci antifungini è disponibile per il trattamento di queste infezioni e la resistenza dei funghi ai farmaci continua drammaticamente ad aumentare; un esempio significativo è rappresentato dalla resistenza all'azolo a causa dell'ampio utilizzo di questo antibiotico in agricoltura (Verweij et al., 2016; Revie et al., 2018). Inoltre, l'aumento dell'incidenza delle infezioni fungine è legato anche all'elevato numero di pazienti immunocompromessi e questo *trend* negativo ha focalizzato l'attenzione sulla ricerca e sviluppo di nuovi composti antifungini per prevenire la resistenza nell'ambiente (Mookherjee et al., 2020).

Diversi peptidi antimicrobici, con proprietà antifungine, sono stati isolati da piante e vertebrati (Vriens et al., 2014) e il loro meccanismo di azione nei confronti delle specie fungine varia da effetti sulle funzioni mitocondriali di *C. albicans*, per mezzo dell'istatina 5, a effetti sulla membrana di questo fungo ad opera della catelicidina e dei peptidi mimetici (Ordonez et al., 2014; Puri e Edgerton, 2014; Menzel et al., 2017). In generale, l'azione dei peptidi antifungini è diretta contro i target intracellulari o contro la parete cellulare, determinando la distruzione dell'integrità della membrana delle cellule fungine e alterando la permeabilità attraverso la formazione di pori nella struttura della membrana (van der Weerden et al., 2013).

Tra i peptidi antifungini si evidenzia l'echinocandina, un peptide in grado di inibire l'enzima 1,3-glucano sintasi, essenziale per il mantenimento dell'integrità della parete cellulare nei funghi, in particolare in *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* e nelle specie di *Pneumocystis*. Infatti, quando l'attività di questo enzima è inibita, la parete cellulare è destabilizzata, il setto



microporale è compromesso e la cellula è più suscettibile alle variazioni di pressione osmotica (Moravej et al., 2018).

Alcuni peptidi antifungini interagiscono con il DNA genomico di *C. albicans* e inducono l'arresto del ciclo cellulare durante la fase S (Li et al., 2016) mentre in alcuni peptidi l'azione antifungina si basa sull'induzione dell'apoptosi attraverso la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Maurya et al., 2011).

1.5.3 Attività antivirale

Oltre alle proprietà antimicrobiche, alcuni peptidi antimicrobici hanno mostrato una potenziale attività verso un ampio spettro di virus, inclusi i virus a RNA e DNA, i calicivirus felini e gli echovirus (Bastian e Schäfer, 2001; Horne et al., 2005; Jenssen et al., 2006; Pietrantoni et al., 2006).

I peptidi antivirali inibiscono la proliferazione di un virus agendo su diversi stadi del ciclo vitale, in particolare ingresso, attacco, replicazione, trascrizione, traslazione, maturazione e rilascio (Thakur et al., 2012). L'azione antivirale si esplica attraverso tre distinti meccanismi: i) inibizione dell'attacco del virus e della fusione alla membrana cellulare; ii) distruzione della membrana virale di alcun virus target; iii) interazione con la polimerasi virale ed inibizione della proliferazione del virus (Skalickova et al., 2015).

Tra i peptidi che inibiscono l'adesione del virus alla cellula ospite si evidenzia il peptide FluPep, un antivirale derivato dal peptide Tkip, che è in grado di bloccare l'emoagglutinina, responsabile della fusione virale nel virus dell'influenza. Infatti, il peptide compete con l'acido sialico nel legame con l'emoagglutinina e blocca il suo sito recettore, convertendo il virus primario in un virione dell'influenza, incapace di attaccare la membrana cellulare dell'ospite (Ahmed et al., 2009). Inoltre, l'ingresso del virus all'interno della cellula è contrastato inibendo la conformazione dell'emoagglutinina e determinando l'apertura dell'endosoma e il rilascio del genoma virale (Moravej et al., 2018).

Un'altra classe di peptidi antivirali è rappresentata dai peptidi antilipopolisaccaridici (ALPs), in particolare di peptidi antilipopolisaccaridici sintetici (SALPs) i quali sono considerati dei potenti antivirali poiché si legano a porzioni di eparan solfato presenti sulla superficie della cellula ospite e che servono come molecole di attacco per la maggior parte dei virus con involucro (Moravej et al., 2018). È stato dimostrato che alcuni SALPs sono in grado di inibire la replicazione del virus dell'influenza in vari sottotipi (H7, H1e H3) poiché il loro meccanismo funzionale si basa sul legame all'acido N-acetilneuraminico, un componente fondamentale del



recettore del virus dell'influenza, impedendo l'attacco del virus alla cellula ospite sia *in vivo* che *in vitro*. Pertanto, i SALPs possono essere considerati una nuova classe di potenziali peptidi antivirali in grado di contrastare l'adesione dei virus alle cellule ospiti (Moravej et al., 2018). Diversi peptidi con attività antivirale mostrano un'azione diretta contro l'involucro virale. L'esempio più significativo sono la catelicidina e il peptide LL-37, due peptidi che distruggono l'involucro dei virus; in particolare LL-37 presenta lo stesso meccanismo di azione sul virus dell'influenza senza influenzare l'aggregazione o la capacità di legame del virus alle cellule (Horne et al., 2005). Altri peptidi con attività simile comprendono alcune defensine, come la lactoferrina, in grado di paralizzare l'adesione del virus herpes simplex (HSV) alla superficie della cellula ospite, attaccando le glicoproteine virali come eparan solfato. In alcuni studi è stato osservato che questo peptide ad α -elica previene le infezioni di HSV attraverso il legame alle molecole di eparan e bloccando le interazioni con i recettori del virus (Yasin et al., 2000; Andersen et al., 2003; Jenssen et al., 2004). Inoltre, altri peptidi ad α -elica (magainine, la dermaseptina e la melittina) (Yasin et al., 2000; Belaid et al., 2002; Matanic e Castilla, 2004) e peptidi a foglietto β (tachiplesina e le protegrine) (Lehrer et al., 1985; Daher et al., 1986; Sinha et al., 2003) hanno mostrato una potente attività anti-HSV.

1.5.4 Attività immunomodulatoria

Recentemente alcuni studi hanno dimostrato che i peptidi antimicrobici agiscono non soltanto da antibiotici, ma modulano le infiammazioni e neutralizzano le tossine patogeniche (Kosikowska e Lesner, 2016). Le ampie funzioni immunomodulatorie svolte dai peptidi antimicrobici comprendono la stimolazione della chemotassi, la modulazione della differenziazione delle cellule immunitarie e l'inizio dell'immunità adattativa, oltre al contributo alla *clearance* batterica dell'ospite (Fig. 7) (Mahlapuu et al., 2016). L'attività immunomodulatoria include anche la soppressione dei recettori Toll (TLR) e/o la produzione mediata da citochine di citochine pro-infiammatorie e attività anti-endotossica, insieme alla prevenzione dell'eccessiva risposta pro-infiammatoria, inclusa la sepsi (Fig. 7) (Håversen et al., 2002; Davidson et al., 2004; Mookherjee et al., 2006; Lai e Gallo, 2009; van der Does et al., 2010; Yeung et al., 2011).

Le proprietà immunomodulatorie dei peptidi antimicrobici dipendono dagli stimoli ambientali e dal tipo di tessuto, dall'interazione con i diversi recettori cellulari e dalla concentrazione dei peptidi. Il meccanismo alla base della capacità dei peptidi antimicrobici di modulare selettivamente le risposte immunitarie è molto complesso poiché coinvolge il reclutamento

intracellulare dei peptidi, il quale potrebbe essere mediato o meno dai recettori associati alla proteina G della membrana (GPCRs), l'interazione con molte proteine intracellulari o recettori (per esempio, GAPDH e p62), alterazione di diversi *pathway* segnale (fattore nucleare NF- κ B, p38, la proteina chinasi attivatrice della mitogenesi MAPK, MKP1 e la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) e numerosi fattori di trascrizione i quali, a loro volta, sembrerebbero dipendere da ulteriori fattori come la concentrazione del peptide, la cinetica di risposta e stimoli ambientali (Steinstraesser et al., 2011; Choi et al., 2012; Hancock et al., 2016; van der Does et al., 2019). Alcuni peptidi antimicrobici svolgono la loro attività immunomodulatoria in seguito al legame con proteine. Un esempio significativo sono i dipeptidi muramyl (MDP e GDMP), potenti adiuvanti e immuno-stimolatori rilasciati dalla parete cellulare dei batteri invasori, che possono esercitare attività immunitaria mediante il legame specifico alla proteina YB-1, membro di una classe specializzata di proteine con un ciclo svolto tra nucleo, citosol, membrana e ambiente extracellulare (Laman et al., 2015).

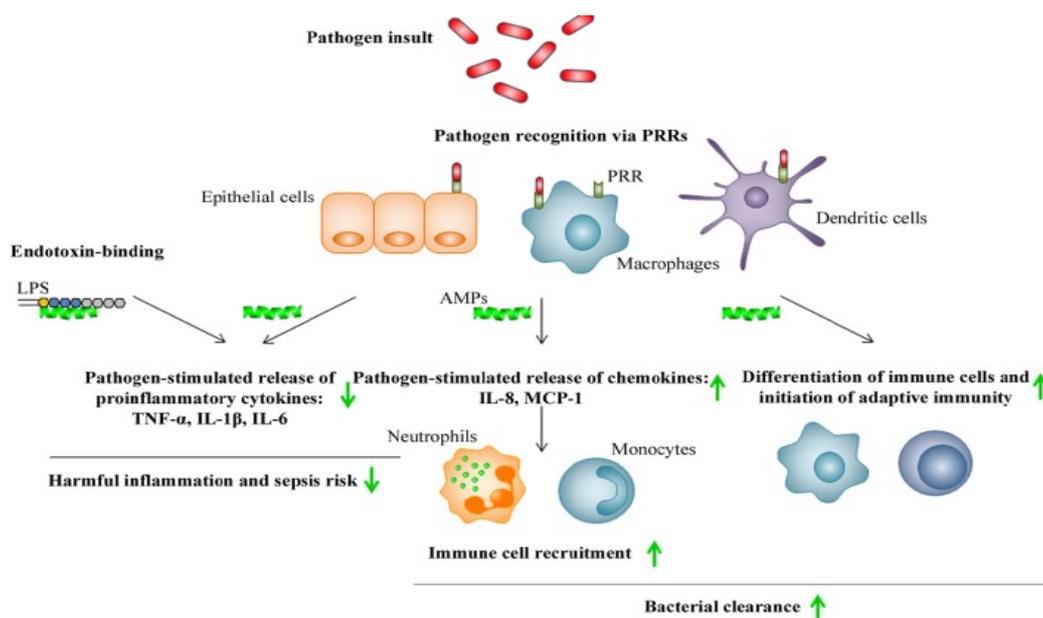


Figura 7. Illustrazione schematica dell'attività immunomodulatoria dei peptidi antimicrobici (Mahlapuu et al., 2016). Il riconoscimento dei batteri patogeni, attraverso i recettori deputati al riconoscimento dei patogeni (PRRs), come TLRs prodotti dalle cellule epiteliali, i macrofagi e le cellule dendritiche, conduce all'uccisione dei microrganismi e al rilascio delle citochine e chemochine pro-infiammatorie da parte di queste cellule che, di conseguenza, stimolano il reclutamento di altre cellule immunitarie al sito di infezione. L'introduzione del microrganismo patogeno determina anche la maturazione delle cellule dendritiche e il conseguente inizio dell'immunità adattativa. I peptidi antimicrobici promuovono, indirettamente, la *clearance* batterica attraverso la stimolazione della chemotassi e della differenziazione delle cellule immunitarie mentre prevengono le infiammazioni e la sepsi inibendo il rilascio delle citochine infiammatorie (Mahlapuu et al., 2016).



1.5.5 Attività antitumorale

Molti peptidi antimicrobici sono in grado di agire anche come peptidi anticancro (ACPs) poiché possiedono l'abilità di attraversare la membrana e di distruggere sia le cellule batteriche che cancerose. Attualmente, il cancro è considerato la seconda causa di morte a livello mondiale, per l'elevato tasso di incidenza e mortalità (Torre et al., 2015; Arnold et al., 2015): negli ultimi venti anni questa malattia ha provocato circa 1.75 milioni di morti in Europa (Ferlay et al., 2013). Il cancro è causato da una abnormale e incontrollata crescita cellulare, che è in grado di invadere anche i tessuti e gli organi circostanti determinando la formazione di masse tumorali, neovascolarizzazione (angiogenesi) e metastasi (Thundimadatil, 2012). Le forme tumorali più diffuse sono i tumori al polmone, al colon-retto, alla prostata e al seno (Domalon et al., 2016) che vengono trattate mediante chemioterapia, un trattamento caratterizzato da una forte tossicità per le cellule (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). Pertanto, negli ultimi anni si è affermata la necessità di nuovi farmaci antitumorali per limitare la crescita delle cellule tumorali con i minimi effetti negativi, poiché alcune neoplasie manifestano una significativa resistenza alla chemioterapia convenzionale a causa dello sviluppo di forme tumorali multi-resistenti (Zahreddine e Borden, 2013). Inoltre, è stato osservato che i soggetti affetti da infezioni batteriche croniche risultano più suscettibili alle malattie determinate dai batteri a causa dell'indebolimento del sistema immunitario che non è in grado di contrastare sia i batteri patogeni che la proliferazione incontrollata delle cellule cancerose (Rolston, 2001). Questo indebolimento del sistema immunitario è, in generale, dovuto ai trattamenti per la cura del cancro, come la chemioterapia e la radioterapia, che determinano un continuo stato di infiammazione nell'individuo e lo rendono più sensibile alle infezioni patogene (Fishman, 2011; Xiao et al., 2015).

Nell'ultimo decennio, alcuni studi hanno dimostrato che alcuni peptidi antimicrobici presentano una significativa attività antitumorale e la maggior parte di essi è caratterizzata da proprietà significative come breve tempo di interazione (che riduce la probabilità di sviluppare la resistenza), bassa tossicità, modalità di azione, specificità, buona solubilità e buona penetrazione nel tumore; queste caratteristiche rendono i peptidi anticancro potenziali candidati come future terapie chemioterapiche nella cura del cancro (Riedl et al., 2011; Figueredo et al., 2014; Wu et al., 2014; Gaspar et al., 2015; Domalaon et al., 2016).

In generale, un peptide antimicrobico con buona attività antitumorale dovrebbe soddisfare tre importanti condizioni: i) elevata carica netta positiva. Questo fattore è molto importante



poiché contribuisce a determinare le attrazioni elettrostatiche tra i componenti carichi negativamente (per esempio, la fosfatidilserina) delle cellule tumorali e i peptidi antimicrobici carichi positivamente (Harris et al., 2019); 2) elevata flessibilità strutturale. La flessibilità dei peptidi antimicrobici consente i cambiamenti conformazionali nei differenti ambienti (acquoso e ambienti che mimano la membrana) permettendo ai peptidi di attraversare il doppio strato lipidico delle cellule tumorali; 3) elevata oligomerizzazione. I peptidi antimicrobici dovrebbero essere facilmente raggruppati sulla superficie della cellula tumorale, formando un poro sulla membrana cellulare tumorale (Kao et al., 2012).

Il riconoscimento specifico delle cellule tumorali è favorito dalla presenza di molecole di fosfatidilserina carica negativamente sulla loro superficie, causata da elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ipossia che modificano il microambiente del tumore e inducono la deregolazione dei fosfolipidi della membrana (Baxter et al., 2017). Pertanto, le cellule tumorali perdono l'asimmetria della distribuzione dei fosfolipidi tra lo strato esterno e interno del plasma della membrana ed espongono le molecole di fosfatidilserina sullo strato esterno delle cellule tumorali (Felicio et al., 2017).

Diversi fattori contribuiscono ad incrementare la carica netta negativa sulla membrana delle cellule cancerose, rispetto alle cellule normali, come la maggiore espressione di fosfatidilserina, aumento dei livelli di molecole di fosfatidiletanolamina zwitterioniche, glicosilazione dei glicolipidi deregolati e delle glicoproteine di membrana, con ripetute regioni di O-glicosilazione ed elevata espressione di proteoglicani eparan solfato (Tornesello et al., 2020). Questi fenomeni si verificano sia nell'endotelio vascolare che epiteliale dei tessuti tumorali e sono associati alla progressione e alla sopravvivenza del tumore; in particolare, i tumori alla prostata, al seno, al polmone, al pancreas, i carcinomi della pelle e il tumore al colon-retto sono caratterizzati da un'elevata espressione delle mucine e dei proteoglicani di membrana (Baxter et al., 2017; Raman e Kuberan, 2010). Pertanto, queste condizioni favoriscono un incremento delle interazioni elettrostatiche tra i peptidi anticancro e la superficie delle cellule cancerose. Altre caratteristiche significative, come il basso contenuto di colesterolo, la presenza di microvilli sulla superficie delle cellule tumorali potrebbero favorire la suscettibilità dei peptidi anticancro e promuovere l'attività citotossica selettiva. Inoltre, un aumento del numero dei microvilli sulle cellule tumorali incrementa l'estensione dell'area di contatto, rispetto alle cellule sane, e quindi l'attrazione dei peptidi anticancro alle cellule cancerose (Chan et al., 1998).

I peptidi anticancro presentano proprietà chimico-fisiche simili ai peptidi antimicrobici. Come nei peptidi antimicrobici, anche nei peptidi anticancro la struttura svolge un ruolo fondamentale nel determinare la loro attività poiché la maggior parte di essi adottano una conformazione ad α -elica o a foglietto β in seguito alle interazioni con la membrana (Hoskin e Ramamoorthy, 2008). Tra i peptidi anticancro con struttura ad α -elica, e definiti quindi α -ACPs, sono incluse la cecropina, la magainina, la melittina e la buforina II mentre la lactoferrina B, HNP-1/3, e la gamesina sono classificati come β -ACPs (Papo e Shai, 2005).

I peptidi anticancro agiscono essenzialmente sui target della membrana cellulare, determinando la lisi di tale struttura (necrosi) e la lisi della membrana mitocondriale (apoptosi); inoltre, i peptidi anticancro presentano anche attività su target differenti dalla membrana (Wu et al., 2014) (Fig. 8).

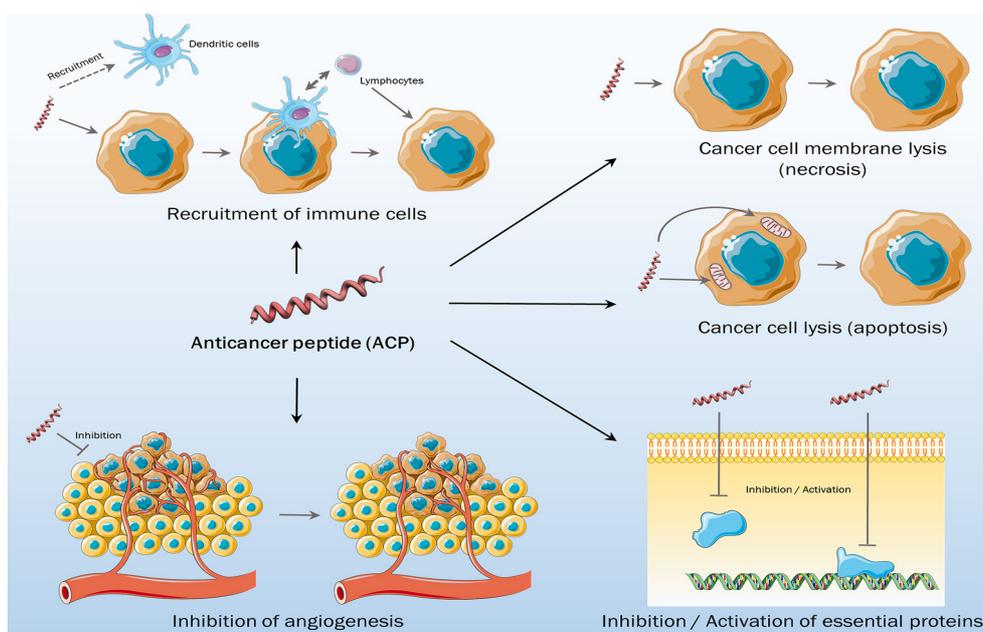


Figura 8. I differenti meccanismi di azione dei peptidi anticancro (Felicio et al., 2017)

Il meccanismo di azione più comune dei peptidi anticancro si basa sulle interazioni elettrostatiche che favoriscono la distruzione della membrana, e quindi la necrosi: gli esempi più rappresentativi di tale modalità di azione sono Polibia-MP1, un peptide naturale, e il peptide sintetico BTM-P1 (Segura et al., 2007; Wang et al., 2009) i quali mostrano un'elevata selettività nei confronti della membrana delle cellule cancerose e sviluppano una bassa resistenza rispetto ai farmaci antitumorali convenzionali. Un altro meccanismo di azione di questa classe di peptidi consiste nell'attività diretta contro la membrana mitocondriale, la quale determina l'attivazione



dei segnali di apoptosi: questo fenomeno è stato osservato nella lactoferrina B e in altri peptidi a foglietto β (Furlong et al., 2006; Paredes-Gamero et al., 2012).

Oltre all'attività a livello di membrana, i peptidi anticancro possono esercitare anche altri meccanismi, come l'azione diretta sulle proteine cellulari, inibizione dell'angiogenesi reclutamento di cellule immunitarie per attaccare le cellule cancerose (Wu et al., 2014): per esempio, il peptide HNP-1 è in grado di reclutare e attivare le cellule dendritiche in termini di attività immunomodulatoria (Wang et al., 2009), ma può anche inibire l'angiogenesi, indispensabile per la crescita e per lo sviluppo del tumore (Xu et al., 2008).

Negli ultimi anni sono stati isolati numerosi peptidi anticancro da fonti naturali come gli animali, le piante e i batteri. In particolare, sono stati identificati diversi peptidi anticancro ricavati da specie marine, come cianobatteri, spugne, tunicati, ascidie, molluschi e pesci (Kang et al., 2018); questi peptidi presentano una bassa tossicità per le cellule umane e un meccanismo di azione, differente rispetto ai trattamenti convenzionali, e basato su apoptosi, distruzione del bilancio tubulina-microtubuli e inibizione dell'angiogenesi (Kang et al., 2018).

1.6 Le potenziali applicazioni dei peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici possono essere utilizzati in vari ambiti. In campo medico è stato osservato che la combinazione dei peptidi antimicrobici con gli antibiotici convenzionali determinerebbe un aumento dell'attività degli antibiotici sui target intracellulari, come nel caso della deoxinibomicina, tetraciclina, kanamicina e rifampicina nei confronti dei batteri multi-resistenti (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) (Hollmann et al., 2018).

Alcuni peptidi antimicrobici possono essere utilizzati come adiuvanti in terapie cliniche, come la lucifensina e la lucifensina II prodotte dalle larve sterili degli insetti *Lucilia sericata* e *Lucilia caprina* e che possono contribuire alla guarigione delle ferite nei pazienti caratterizzati da malattie (diabete e disfunzioni cardiovascolari) (Čeřovský e Bém, 2014). Un altro esempio significativo è rappresentato dal peptide pexiganan, un distruttore di membrana composto da 22 amminoacidi e analogo del peptide magainina, che è stato testato clinicamente per sostituire l'antibiotico oxofloxacina nel trattamento dell'ulcera diabetica a partire dal 1996 e che potrebbe evitare la resistenza batterica; attualmente, questo peptide è sottoposto alla fase clinica III (Greber et al., 2017; Wang et al., 2019).



Alcuni peptidi antimicrobici possono essere utilizzati in ambito alimentare per la conservazione dei cibi poiché i preservativi adoperati nell'industria sono spesso tossici. Pertanto, negli ultimi anni sono stati svolti numerosi studi che hanno focalizzato l'attenzione sull'applicazione dei peptidi antimicrobici come un approccio alternativo per contrastare la crescita dei microrganismi patogeni e mantenere le qualità degli alimenti (Wang et al., 2019). Un esempio significativo è costituito dalla nisina, un peptide policiclico di 34 residui amminoacidici derivato da *Lactococcus lactis*, e che è utilizzato nei processi di conservazione del formaggio, della carne e delle bevande (Delves-Broughton et al., 1996). Inoltre, sono stati anche studiati nuovi metodi di applicazione dei peptidi antimicrobici, finalizzati a preservare la l'attività biologica di queste molecole: per esempio, la pleurocidina, un peptide antimicrobico costituito da 25 amminoacidi e derivato dalle secrezioni mucose della pelle della passera invernale, è stata incorporata all'interno delle fibre ultrafini di PVA attraverso la tecnologia di elettrofilatura e ha mostrato una notevole efficacia nell'inibire la crescita di *E.coli* nel sidro di mele (Wang e Lee, 2015).

Importanti progressi basati sull'applicazione dei peptidi antimicrobici sono stati conseguiti anche in campo animale. Alcuni studi hanno dimostrato che l'aggiunta di peptidi antimicrobici alla dieta può avere effetti benefici, su peso corporeo, su guadagno medio giornaliero, sulla digeribilità dei nutrienti e la morfologia dell'intestino, oltre che sulla microflora intestinale e fecale (Xiao e Shao, 2015). Inoltre, alcuni peptidi antimicrobici consentono di migliorare la *performance* degli animali, incrementando la digeribilità dei nutrienti e supportando le funzioni intestinali.

Negli ultimi anni sono state sviluppate numerose tecniche finalizzate all'immobilizzazione dei peptidi antimicrobici su superfici solide, al fine di prevenire la formazione del *biofilm* nei primi stadi (Tab. 1). Queste tecniche basate su superfici biocide altamente funzionali sono state valutate su ampio spettro di microrganismi patogeni, sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi, oltre ai virus, ai parassiti e alle alghe, rivelando una significativa attività antimicrobica (Nicolas et al., 2021).

L'immobilizzazione può essere ottenuta attraverso differenti strategie, sia mediante metodi fisici (adsorbimento, strato dopo strato) che metodi chimici (legami covalenti, monostrati auto-assemblanti). Recentemente, gli studi sono stati focalizzati su approcci covalenti di immobilizzazione per i rivestimenti delle superfici, realizzati riducendo sia i livelli di tossicità che la diffusione dei peptidi antimicrobici (Costa et al., 2011; Silva et al., 2016; Nie et al., 2017). Per l'immobilizzazione dei peptidi antimicrobici sono state utilizzate una grande varietà

di superfici, tra le quali i polimeri, il titanio, l'oro, l'acciaio inossidabile e il vetro (Silva et al., 2016) e il

successo dell'immobilizzazione dipende da diversi fattori, correlati con la superficie, tra i quali la densità di superficie, l'orientamento, la distanza alla superficie o la mobilità laterale (Bagheri et al., 2009; Alves e Pereira, 2014; Yu et al., 2015).

Tabella 1. Tecniche di immobilizzazione di peptidi antimicrobici su superfici solide e target batterici (Nicolas et al., 2021)

AMP	Substratum	Immobilization strategy	Studied microorganisms	Reference
Magainin I	Gold surface	Self-assembled monolayer	<i>L. ivanovii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	Humblot et al., (2009)
LL-37	Titanium surface	Site-specific conjugation via amine-reactive NHS and thiol-reactive maleimide moieties	<i>E. coli</i>	Gabriel et al., (2006)
HHC36	Titanium surface	CuAAC click chemistry: Titanium silanized with APTS and peptide modified with PEG	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Chen et al., (2018)
Tet-213	Titanium slide	Tethering on copolymer brushes of N,N-dimethylacrylamide/N-(3-aminopropyl)-methacrylamide hydrochloride	<i>P. aeruginosa</i>	Gao et al., (2011)
Tet-213, 1010cys, Tet-20, Tet-21, Tet-26, HH2, MXX226	Titanium slide	Covalently grafted hydrophilic polymer brushes conjugated with peptides	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Gao et al., (2011)
Magainin I	Silicon wafer	Tethering on copolymer brushes of 2-(2-methoxyethoxy)ethylmethacrylate/hydroxyl-terminated oligo (ethylene glycol) Poly (MOE2MA-co-HOEGMA)	<i>L. ivanovii</i> , <i>B. cereus</i>	Glinel et al., (2009)
CW11	Polydimethylsiloxane	Cross-linking of peptides to allyglycidyl ether modified PDMS surface (PDMS-AGE-PEG) via Sulfhydryl Chemistry	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Lim et al., (2013)
RK1 and RK2	Silicone urinary catheter and Polydimethylsiloxane (PDMS)	Cross-linking of peptides to allyglycidyl ether modified PDMS surface (PDMS-AGE-PEG)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	Li et al., (2014)
Temporin-SHa	Titanium surface	Covalent immobilization on Si-O-Ti groups	<i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i>	Masurier et al., (2018)
122 variant peptides of 2 starting sequences: Bac2A and Indolicin	Cellulose support	Cellulose-amino-hydroxypropyl ether (CAPE) linker chemistry; or directly synthesized onto a bifunctional resin; or directly bound to the microtiter plate via biotin-streptavidin interaction	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i>	Hilpert et al., (2009)
TBKKG6A and lasioglossin-III	Cellulose support	Cysteine-cellulose conjugate coupled to obtaining thioester peptides either on the C-terminal or the N-terminal part of the molecules	<i>E. coli</i>	Sperandeo et al., (2020)



Identificazione e caratterizzazione di molecole biologicamente attive con attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale in Posidonia oceanica e Procambarus clarkii

Antibacterial hybrid peptide	Silicon catheter	Covalenti immobilization on silanol groups	<i>E. coli, P. aeruginosa, S. aureus</i>	Pinese et al., (2016)
Bioactive peptides	Silicone dressing	Covalent immobilization on silanol groups	Studies of peptides bioactivity	Pinese et al., (2017)
Protamine, a mixture of Protamine and Melittin and Melimine	Commercial contact lens (Etaflcon-A)	Physical adsorption and covalent attachment via EDC	<i>P. aeruginosa, S. aureus</i>	Willcox et al., (2008)
hLF1-11	Titanium surface silanized with CPTES or APTES	Peptide physical adsorption and covalent binding with CPTES or APTES	<i>S. sanguinis, L. salivarius</i>	Godoy-Gallardo et al., (2014)
Dhvar 5	Titanium and gold substrates	Physical adsorption and covalent binding with chitosan fil, EDC-NHS chemistry and introduction of amino acid spacers	<i>S. aureus</i>	Costa et al., (2015)

Cont. Tabella 1

AMP	Substratum	Immobilization strategy	Studied microorganisms	Reference
Defensin from <i>Anopheles gambiae</i> mosquitoes	Multilayer plectrolyte films of PEI-(PSS-PAH) ₂ –(PGA-PLL) _n	Layer-by-layer	<i>M. luteus, E. coli</i>	Etienne et al., (2004)
Gramicidin A complexed with a non-denaturing anionic amphiphilic polysaccharide	Multilayer plectrolyte films of PEI and PLL	Layer-by-layer	<i>E. faecalis</i>	Guyomard et al., (2008)
Ponericin G1	Silicone substrate	Layer-by-layer	<i>S. aureus</i>	Shukla et al., (2010)
Magainin II	Stainless steel	Modification of peptide with dopamine, direct grafting via catechol groups	<i>C. farmer, V. natriegens</i>	Cao et al., (2020)
HHC-36	PU substrates	Via APTES-Br SAM	<i>E. coli, S. aureus</i>	Zhang et al., (2019)
MSI-78A	Au	SAMS EG4 thiols-biotin-neutravidin-maleimide	<i>H. pilori</i>	Parreira et al., (2019)
MSI-78	CaF ₂	Silica layer + maleimide	<i>E. coli</i>	Xiao et al., (2018)



1.7 I peptidi antimicrobici da specie acquatiche

L'ambiente acquatico costituisce circa il 70% degli ambienti presenti sulla Terra ed è associato a una grande diversità chimica che rappresenta una fonte significativa per la scoperta di nuove molecole con finalità terapeutiche (Falanga et al., 2016). Negli ultimi anni, diversi peptidi biologicamente attivi, provenienti da fonti acquatiche e con potenziale attività farmacologica, sono stati utilizzati come agenti terapeutici (Raja et al., 2013). Rispetto all'ambiente terrestre, gli organismi acquatici devono fronteggiare serie minacce per la propria sopravvivenza sia in ambiente marino che di acqua dolce, poiché l'ambiente acquatico è maggiormente esposto a una grande varietà di inquinanti chimici, ambientali e di specie microbiche che influenzano significativamente la vita e la biodiversità (Sable et al., 2017). Pertanto, per sopravvivere in tali ambienti, gli organismi acquatici producono numerose proteine, peptidi e altri composti per migliorare il proprio sistema immunitario e contrastare gli agenti patogeni.

Attualmente, i peptidi antimicrobici di origine acquatica sono oggetto di attenzione da parte della comunità scientifica per le proprietà antimicrobiche, antifungine, antivirali, antiparassitiche, anticoagulanti e antidiabetiche (Velayutham et al., 2022). I peptidi antimicrobici di origine acquatica presentano configurazioni differenti rispetto agli analoghi terrestri a causa delle diversificazioni dell'ambiente (Velayutham et al., 2022). Le caratteristiche dei peptidi di origine acquatica si basano sulla loro attività e funzione che dipendono dalle proprietà chimico-fisiche e dalla composizione amminoacidica. In particolare, questi peptidi sono stati classificati in varie classi in base alle loro funzioni e applicazioni terapeutiche che includono l'attività antimicrobica (Raju et al., 2021), antidiabetica (Zhu et al., 2010), antiinfiammatoria (Gao et al., 2021), antiipertensiva (Ngo et al., 2014), immunomodulatoria (Vo et al., 2014), antiossidante (Sannasimuthu et al., 2020) e anticancro (Prabha et al., 2020).

La maggior parte dei peptidi e dei metaboliti secondari sono stati identificati in fonti marine poiché esse rappresentano la più ampia porzione dell'ambiente acquatico (Sable et al., 2017); inoltre, l'ambiente marino comprende numerose specie appartenenti a differenti taxa, tra i quali Porifera, Cnidaria, Mollusca, Chordata, Echinodermata, Arthropoda etc. (Cheung et al., 2015; Sable et al., 2017).

Tra i peptidi antimicrobici marini di notevole importanza, isolati da vari organismi, sono inclusi: la pleurocidina (Cole et al., 1997; Cho et al., 2012), le stieline A e B (Lee et al., 1997a; Lehrer et al., 2003), la papillosina e l'alocintina (Galinièr et al., 2009), la dicintaurina (Lee et al., 2001), le clavanine A, B, C, D (Lee et al., 1997b; van Kan et al., 2001), l'edistidina



(Tasiemski et al., 2007), le arasine (Stensvåg et al., 2008; Paulsen et al., 2013), la callinectina (Khoo et al., 1999; Noga et al., 2011), astacidina 2 (Lee et al., 2003; Jiravanichpaisal et al., 2007), la collagencina (Ennaas et al., 2016), aurelina (Ovchinnikova et al., 2006; Lee et al., 2007), epcidine (Shike et al., 2002), damicornina (Vidal-Dupiol et al., 2011), tachiplesina I (Nakamura et al., 1988; Kawano et al., 1990), peneidine (Destoumieux et al., 2000a, 2000b), le strongilocine (Li et al., 2008a), le crustine (Relf et al., 1999; Imjongjirak et al., 2009; Cui et al., 2012; Yu et al., 2016) e le stilicine (Rolland et al., 2010). Di notevole importanza sono anche il peptide antimicrobico, denominato *paracentrin 1*, identificato nel riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Schillaci et al., 2010, 2014) e i peptidi oloturoidina 1 e 2 individuati in *Holothuria tubulosa* (Schillaci et al., 2013; Cusimano et al., 2019).

1.7.1. Le fanerogame marine come fonte di sostanze bioattive naturali

Le fanerogame marine sono un gruppo di angiosperme che crescono esclusivamente nell'ambiente marino e formano estese praterie sommerse. Esse sono classificate in quattro categorie principali delle monocotiledoni, ordine Alismatales: *Cymodoceaceae*, *Hydrocharitaceae*, *Posidoniaceae* e *Zosteraceae*. Nel Mar Mediterraneo sono presenti cinque specie di fanerogame marine: *P. oceanica* (L.) Delile, *Cymodocea nodosa* (Ucria), *Zostera marina* L., *Zostera noltii* Hornemann e *Alophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson (specie non indigena) (Procaccini et al., 2003).

Le fanerogame marine sono considerate gli ecosistemi costieri più significativi del pianeta in termini di servizi ecologici offerti (den Hartog, 2006) e sono spesso confuse con le alghe, sebbene siano piante vascolari marine, derivate dalle analoghe terrestri, che hanno colonizzato gli habitat marini. Infatti, le fanerogame marine presentano caratteristiche del metabolismo primario e secondario che sono simili all'ordine delle Alismatales presente negli ecosistemi terrestri e di acqua dolce (Papenbrock, 2012).

La maggior parte degli studi presenti in letteratura sono focalizzati sulle funzioni dei metaboliti secondari derivati dalle fanerogame marine. Tale attività è stata valutata in alcune specie di fanerogame marine tra le quali *C. nodosa*, *H. ovalis*, *H. pinifolia*, *S. isoetifolium*, *Cymodocea serrulata*, *Thalassia hemprichii*, *Z. marina* e *P. oceanica*, utilizzando diversi solventi per l'ottenimento degli estratti crudi e analizzando le proprietà antibatteriche di tali estratti su ceppi batterici e fungini patogeni multi-resistenti agli antibiotici.

Kontiza et al., (2008) hanno esaminato l'attività antimicrobica di diversi metaboliti secondari di *C. nodosa*, in particolare il nodosolo il quale ha rivelato una spiccata attività antibatterica e



hanno individuato quattro nuovi metaboliti secondari con attività antimicrobica da *C. nodosa* (Kontiza et al., 2008), appartenenti alla classe strutturale dei diarileptanoidi, un gruppo di composti finora identificato soltanto negli organismi marini (Kontiza et al., 2005). Tali composti hanno rivelato una significativa attività antimicrobica verso alcuni batteri patogeni multi-resistenti e batteri resistenti alla meticillina, in particolare *S. aureus*, oltre a diverse specie di micobatteri tra i quali *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium fortuitum* (Kontiza et al., 2008).

L'attività antibatterica è stata riscontrata anche in *H. ovalis* e *H. pinifolia*, due fanerogame marine presenti nella costa sud-est dell'India. Umamaheshwari et al., (2009) hanno dimostrato che gli estratti crudi contenenti i metaboliti secondari ricavati dalle due fanerogame marine con diversi solventi organici (etere dietile, acetone e metanolo) presentano attività antimicrobica differente nei confronti di *Acinetobacter* spp., *Salmonella typhi*, *Micrococcus* sp., *Shigella sonii*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus* sp., *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Salmonella paratyphi*-B. In particolare, è stato riscontrato che la fanerogama marina *H. pinifolia* presenta proprietà antimicrobiche più significative nei confronti dei ceppi batterici considerati (Umamaheshwari et al., 2009). Recentemente, uno studio significativo condotto su *H. pinifolia* ha dimostrato che gli estratti ricavati da questa fanerogama sono in grado di inibire la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* mediante reprimendo i fattori di virulenza del *quorum sensing* (QS) (Danaraj et al., 2020). In particolare, è stato osservato che gli estratti in metanolo di *H. pinifolia* presentano una promettente attività anti-biofilm in *P. aeruginosa*, inibendo l'adesione alla superficie dei pozzetti della piastra di circa il 93%. Danaraj et al., (2020) hanno inoltre dimostrato che l'acido 4-metossibenzoico presente nell'estratto metanolico di *H. pinifolia* agisce significativamente sui componenti della matrice del biofilm, in particolare dello strato di esopolisaccaridi (EPS): alla concentrazione di 62.5 µg/ml, l'acido 4-metossibenzoico riduce il contenuto della matrice del biofilm di *P. aeruginosa* fino a 83%. Yuvaraj et al., (2012) hanno studiato l'attività antimicrobica degli estratti di *H. ovalis* anche nei confronti di *A. baumannii*, *B. cereus*, *E. coli* e quattro specie di *Vibrio*, *V. anguillarum*, *V. fischeri*, *V. parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, evidenziando una maggiore azione antibatterica verso *B. cereus* e *A. baumannii*.

Ravikumar et al., (2010) hanno analizzato l'attività antibatterica di *S. isoetifolium* e *C. serrulata*, associata alla comunità microbica epifitica ed endofitica delle foglie. Gli studiosi hanno osservato che le sostanze bioattive prodotte da tali comunità microbiche isolate dalle due fanerogame marine è in grado di inibire la crescita di cinque batteri patogeni resistenti agli



antibiotici (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Klebsiella* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus aeruginosa*): in particolare, la comunità microbica endofitica delle foglie ha mostrato una elevata attività di inibizione nei confronti dei batteri patogeni selezionati, con una maggiore efficacia verso *P. aeruginosa* (MIC= 500 µg/ml) (Ravikumar et al., 2010). In queste due fanerogame marine è stata inoltre riscontrata anche una significativa attività antibiofilm, utile per contrastare il fenomeno del *fouling*. Mayavu et al., (2009) hanno analizzato le proprietà antimicrobiche di diversi metaboliti secondari prodotti da *S. isoetifolium* e *C. serrulata* nei confronti di batteri marini che producono biofilm, tra i quali *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus* e *V. parahaemolyticus*. I metaboliti secondari, estratti mediante diversi solventi (etanolo, metanolo, acetone e dicloroetano) hanno mostrato una differente attività antibatterica: in particolare, l'estratto di etanolo e metanolo di *C. serrulata* e *S. isoetifolium* hanno evidenziato un ampio spettro di azione antimicrobica nei confronti dei ceppi batterici considerati (Mayavu et al., 2009). Gnanambal et al., (2015) hanno individuato un composto attivo nell'estratto in acetone di *C. serrulata*, denominato fenil thioketone, il quale presenta una moderata attività antimicrobica nei confronti di un ampio range di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, in particolare verso *E. coli* alla concentrazione di 10 µg. Inoltre, Sathyanathan et al., (2016) hanno esaminato l'attività antibatterica di *S. isoetifolium*, individuando un pigmento fotosintetico accessorio noto come feofitina a, il quale ha mostrato una efficace azione antimicrobica verso batteri patogeni umani, tra i quali *S. thyphi*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, mediante legame alla proteina umuC di questi batteri.

Emmanuel Joshua Jebasingh et al., (2016) hanno studiato l'attività antibatterica e antifungina della fanerogama *Thalassia hemprichii*, saggiando le proprietà di sei differenti estratti crudi su un ampio spettro di batteri patogeni e specie fungine. È stato osservato che l'estratto crudo in acetone ha mostrato una significativa attività antimicrobica nei confronti dei ceppi batterici (*S. thyphi*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes*) e fungini (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Pecillium expansum*, *Fusarium acuminatum*) considerati. L'estratto crudo in etere dietile ha presentato un'elevata attività antibatterica verso *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, e *P. mirabilis* mentre l'estratto crudo in metanolo ha rivelato una notevole capacità di inibizione nei confronti di *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*. Inoltre, l'attività antifungina degli estratti crudi di *T. hemprichii* ha presentato una buona risposta nei confronti dei ceppi fungini patogeni: l'estratto crudo in etanolo ha contrastato la crescita delle specie fungine considerate mentre l'estratto crudo in

etere dietile ha manifestato una maggiore azione antimicrobica verso *F. acuminatum* e *P. expansum*. In contrasto, l'estratto crudo in acetone ha mostrato una maggiore inibizione verso *F. acuminatum* e *A. terreus* (Emmanuel Joshua Jebasingh et al., 2016). Inoltre, in *T. hemprichii* Hawas (2014) ha esaminato le proprietà antimicrobiche dei flavonoidi presenti in questa fanerogama marina, evidenziando una significativa attività di inibizione verso *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

1.7.2. La *Posidonia oceanica*

P. oceanica (L.) Delile, un membro della famiglia Posidoniaceae, rappresenta la fanerogama marina più importante esistente nel Mar Mediterraneo, dal punto di vista ecologico, per la sua ampia distribuzione e abbondanza (Fig. 9) (Gobert et al., 2006).

P. oceanica è una fanerogama marina a crescita lenta (>10 cm/anno), organizzata in radici, rizomi e foglie (Fig. 10). In condizioni ambientali favorevoli, *P. oceanica* colonizza vaste aree formando dense praterie che si estendono dalla superficie fino 40 metri di profondità (in acque molto trasparenti, le praterie possono estendersi fino a 48 metri di profondità), e che costituiscono circa 1.5% della superficie del Mar Mediterraneo (Pasqualini et al., 1998; Boudouresque et al., 2012; Bonhomme et al., 2015).



Figura 9. Una prateria di *P. oceanica*.

Le praterie di *P. oceanica* presentano una struttura complessa e ospitano una elevata biodiversità e produzione primaria. Per tale motivo, negli ultimi venti anni la *P. oceanica* è stata

uno dei principali obiettivi di protezione dell'ambiente marino del Mar Mediterraneo, poiché è stata inclusa nella Direttiva Habitat (92/43/CEE) tra gli habitat di interesse prioritario (Pergent, 1991; Boudouresque, 2004; Boudouresque et al., 2012) ed è, inoltre, tutelata dalla Convenzione di Berna e di Barcellona, e da altre legislazioni nazionali (Vasarri et al., 2021).

P. oceanica, oltre a svolgere un ruolo ecologico centrale nel Mar Mediterraneo, è stata utilizzata in passato per diversi scopi di ricerca, tra i quali gli studi in campo farmaceutico. Infatti, è stato dimostrato che *P. oceanica* presenta diverse proprietà benefiche per la salute umana, legate alla produzione di composti fitoterapici e che hanno favorito l'interesse della comunità scientifica (Barletta et al., 2015; Cornara et al., 2018; Leri et al., 2018; Piazzini et al., 2019; Vasarri et al., 2019, 2020).

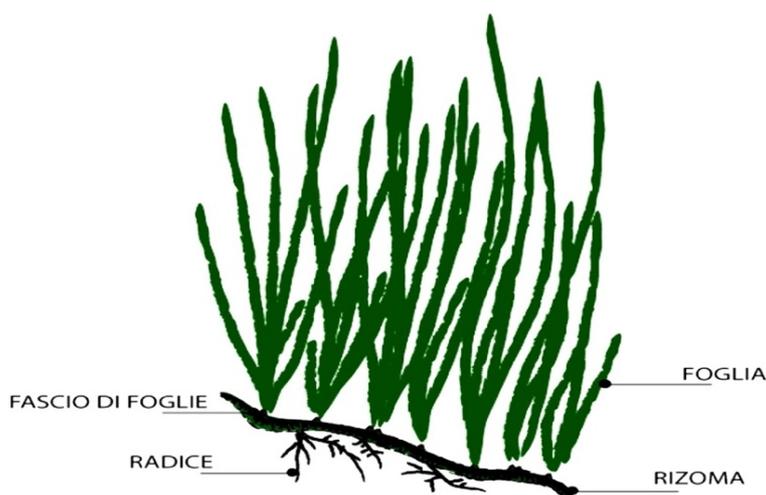


Figura 10. Struttura della *P. oceanica*.

1.7.3. Composizione fitochimica delle foglie e dei rizomi di *P. oceanica*

Numerosi studi hanno dimostrato che *P. oceanica* costituisce una ricca fonte di metaboliti secondari, rappresentati dai composti fenolici, indispensabili nei meccanismi di protezione della pianta da stress fotosintetici, forme reattive dell'ossigeno, pressioni antropiche, predatori e patogeni (Agostini et al., 1998).

L'acido cicorico è considerato il principale componente delle foglie di *P. oceanica*, seguito da altri composti abbondanti tra i quali gli acidi caftarico, gentistico, clorogenico, caffeico, ferulico, cinnamico, gallico e p-cumarico (Agostini et al., 1998; Haznedaroglu e Zeybek, 2007; Cornara et al., 2018; Barletta et al., 2015). Inoltre, nelle foglie di *P. oceanica* sono stati identificati altri composti, tra i quali la quercetina, la miricetina, il campferolo e l'isoarmnetina e che sono considerati i più significativi metaboliti secondari appartenenti alla classe dei flavonoidi: questi composti sono stati ritrovati nello strato dietile di una soluzione cloridrica

utilizzata per l'estrazione dalle foglie di *P. oceanica* (Cannac et al., 2006; Heglmeier e Zidorn, 2010). Altri composti fenolici sono stati individuati negli estratti delle foglie di *P. oceanica* e comprendono floroglucinolo, pirocatecolo, pirogallolo, aldeide vanillina, 4-idrossibenzaldeide, 3,4-diidrossibenzaldeide, acido benzoico, acido p-idrossibenzoico, acido p-anisico, acido siringico, proantocianidine e i calconi (floretilina e floridzin) (Agostini et al., 1998; Cannac et al., 2006; Haznedaroglu e Zeybek, 2007; Heglmeier e Zidorn, 2010) (Tab. 2).

P. oceanica presenta anche una frazione lipidica significativa, caratterizzata dalla presenza di acidi grassi a catena lunga. Questa frazione lipidica è composta essenzialmente dagli acidi palmitico, oleico e linoleico, fitosteroidi, campesterolo, stigmasterolo e β -sitosterolo (Tab.2) (Viso et al., 1993). Inoltre, nel 2013 è stato individuato un sesquiterpene, il posidozinolo, isolato dagli estratti in cloroformio delle foglie di *P. oceanica* (Hammami et al., 2013).

Pochi studi hanno, invece, analizzato la composizione fitochimica dei rizomi di *P. oceanica* nei quali è stato riscontrato un elevato contenuto di amminoacidi, in particolare di amminoacidi ricchi in arginina (Ravikumar et al., 2010; Emmanuel Joshua Jebasingh et al., 2016); inoltre sono presenti anche acidi grassi a catena lunga (Viso et al., 1993).

Tabella 2. Struttura e formula molecolare dei principali composti individuati nelle foglie di *P. oceanica* (Vasari et al., 2021)

Compound	Molecular Formula	Structure
Chicoric Acid	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	
Caftaric Acid	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	
Gentisic Acid	C ₇ H ₆ O ₄	
Chlorogenic Acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	
Caffeic Acid	C ₉ H ₈ O ₄	
Ferulic Acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	



Identificazione e caratterizzazione di molecole biologicamente attive con attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale in *Posidonia oceanica* e *Procambarus clarkii*

Compound	Molecular Formula	Structure
Cinnamic Acid	$C_9H_8O_2$	
Gallic Acid	$C_7H_6O_5$	
<i>p</i> -Coumaric Acid	$C_9H_8O_3$	
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	
Myricetin	$C_{15}H_{10}O_8$	
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	
Isorhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$	
Phloroglucinol	$C_6H_6O_3$	
Pyrocatechol	$C_6H_6O_2$	
Pyrogallol	$C_6H_3(OH)_3$	
Vanillin	$C_8H_8O_3$	
4-Hydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_2$	
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_3$	
Benzoic acid	C_6H_5COOH	
4-Hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$	
<i>p</i> -Anisic acid	$C_8H_8O_3$	
Vanillic acid	$C_8H_8O_4$	
Syringic acid	$C_9H_{10}O_5$	

Cont. Tabella 2

Compound	Molecular Formula	Structure
Phloretin	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	
Phlorizin	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	
Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	
Palmitoleic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	
Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	
Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	
Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	
Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	
β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	
Posidozinol	C ₁₆ H ₃₂	

1.7.4. Le proprietà biologiche di *P. oceanica*: attività antimicrobica, antifungina e antivirale

Diversi studi hanno dimostrato che i metaboliti secondari di *P. oceanica* presentano importanti proprietà biologiche dovute all'azione sinergica dei vari composti fitochimici; tali benefici potrebbero essere sfruttati nel campo della medicina naturale e nell'ottica di promuovere le proprietà e i benefici di *P. oceanica* (Vasarri et al., 2021).

L'attività antimicrobica di *P. oceanica* fu descritta per la prima volta da Bernard e Pesando nel 1989, i quali avevano attribuito proprietà antimicrobiche e antifungine all'estratto dei rizomi di *P. oceanica* (Bernard e Pesando, 1989). Ulteriori studi, effettuati successivamente, hanno evidenziato che gli estratti di *P. oceanica* presentano una significativa attività antimicrobica nei



confronti dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi, con efficacia notevole in particolare verso *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Berfard e Alnour, 2014). *P. oceanica* presenta anche un'attività antivirale che è stata osservata nel 2018 da Farid et al., i quali avevano riscontrato che gli estratti di *P. oceanica* inibivano del 45% le infezioni del virus H5N1 (Farid et al., 2018).

Recentemente, l'attenzione della comunità scientifica si è focalizzata sull'identificazione di composti naturali, con azione antimicrobica e antiossidante, e che possono essere utilizzati come alternative agli additivi chimici per potenziali applicazioni nel campo delle scienze alimentari (Baptista et al., 2020; Kourkoutas e Proestos, 2020). Infatti, è stato dimostrato che i microrganismi possono avere un impatto negativo sulla qualità del cibo, sulla sicurezza e conservazione poiché i processi ossidativi possono determinare un peggioramento della qualità del cibo, con conseguenze negative sulla salute umana. Pertanto, *P. oceanica*, in quanto agente antimicrobico e antiossidante, è stata oggetto di studi finalizzati alla preservazione del cibo attraverso la riduzione e l'eliminazione dei batteri patogeni negli alimenti (Piva et al., 2017; Benito-González et al., 2019). Nel 2017, un estratto di foglie di *P. oceanica* si è rivelato efficace nel ridurre il deterioramento nelle pesche fresche, causato soprattutto dalla comunità microbica *Pseudomonas* (Piva et al., 2017). Pertanto, questo crescente interesse nell'applicazione degli estratti di *P. oceanica* nella conservazione degli alimenti ha contribuito allo sviluppo di nuovi metodi alternativi per migliorare l'estrazione dei composti fitochimici dalle foglie di *P. oceanica*, evitando l'utilizzo di solventi tossici (Vasarri et al., 2021).

Recentemente, è stato adoperato un metodo innovativo, basato sull'estrazione della frazione mediante acqua, e che ha consentito di mantenere inalterate le proprietà biologiche delle foglie brune di *P. oceanica*, incluse l'attività antiossidante e antifungina nei confronti di alcuni ceppi fungini caratteristici degli alimenti (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*, *Bacillus cinerea*, *Geotrichum candidum* e *Aspergillus niger*), e l'attività antivirale nei confronti dei calicivirus felini e norovirus murini (Benito-González et al., 2019).

Uno studio metagenomico significativo svolto recentemente ha evidenziato che anche la comunità microbica associata alle "banquettes" di *P. oceanica*, rappresentata essenzialmente da *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Cyanobacteria*, costituisce una potenziale fonte di molecole bioattive, in particolare di peptidi non ribosomici ed enzimi carboidrati attivi (Rubio-Portillo et al., 2021). In particolare, è stato osservato che questi enzimi sono simili a composti ritrovati nel suolo e sono state identificate anche nuove proteine appartenenti ai cellulosomi e enzimi degradatori della cellulosa e della lignina (Cocozza et al., 2011).



1.7.5. Proprietà antiossidanti e antitumorali di *P. oceanica*

Il trattamento delle malattie con medicinali di origine vegetale è una pratica molto antica, diffusa in tutto il mondo, e le varie conoscenze derivano da continui tentativi di contrastare le malattie e durante i quali l'uomo ha imparato a ricavare rimedi dalla natura (Vasarri et al., 2021). La scienza moderna ha riconosciuto l'azione attiva di molte piante medicinali, includendo molti farmaci ricavati dalle piante e che sono stati utilizzati per millenni dalle civiltà (Petrovska, 2012).

L'utilizzo della fanerogama marina *P. oceanica* come pianta medicinale risale alle civiltà del Mar Mediterraneo, le quali utilizzavano la fanerogama per il trattamento di numerose patologie connesse alla salute dell'uomo: tra questi rimedi è annoverato il decotto delle foglie di *P. oceanica*, sviluppato dalla popolazione dell'Anatolia come rimedio naturale per la cura del diabete e l'ipertensione (Gokce e Haznedaroglu, 2008). Infatti, Gokce et al., (2008) avevano osservato che la somministrazione orale di un estratto di *P. oceanica* in topi diabetici indotti con alloxano consentiva di ristabilire l'attività degli enzimi antiossidanti e ridurre il processo di perossidazione dei lipidi, oltre al livello di glucosio nel sangue (Gokce e Haznedaroglu, 2008). Pertanto, la complessa composizione fitochimica di *P. oceanica* costituisce un *reservoir* di nuove molecole con potenziali applicazioni in campo farmacologico. Recenti studi hanno dimostrato che *P. oceanica* agisce attraverso differenti meccanismi di azione, stabilisce interazioni molecolari e innesca diversi *pathways* di segnalazione (Fig. 11) (Vasarri et al., 2021). L'elevato contenuto di composti fenolici e dei suoi derivati presente nelle foglie di *P. oceanica* rappresenta una ricca fonte di molecole antiossidanti. Infatti, *P. oceanica* è in grado di stimolare l'attività dei propri enzimi antiossidanti come meccanismo di difesa contro le pressioni ambientali, tra i quali frequenti e intensi stress indotti dal cambiamento climatico o condizioni di stress causate dalla competizione con macroalghe invasive, considerate la principale causa della regressione delle praterie di *P. oceanica* nel Mar Mediterraneo (Sureda et al., 2008; Holmer et al., 2009; Tutar et al., 2017).

Pertanto, la *P. oceanica* potrebbe essere utilizzata nella prevenzione del danno cellulare e delle malattie causate dallo stress ossidativo, grazie al potere antiossidante dell'estratto di foglie ricco in acido cicorico. Infatti, è stato osservato che questo composto ha effetti significativi sulla proliferazione dei fibroblasti del derma umano e sulla produzione di collagene; inoltre, presenta proprietà anti-melanogeniche nelle cellule del melanoma umano MeWo e proprietà lipolitiche nei preadipociti sottocutanei umani (Cornara et al., 2018).

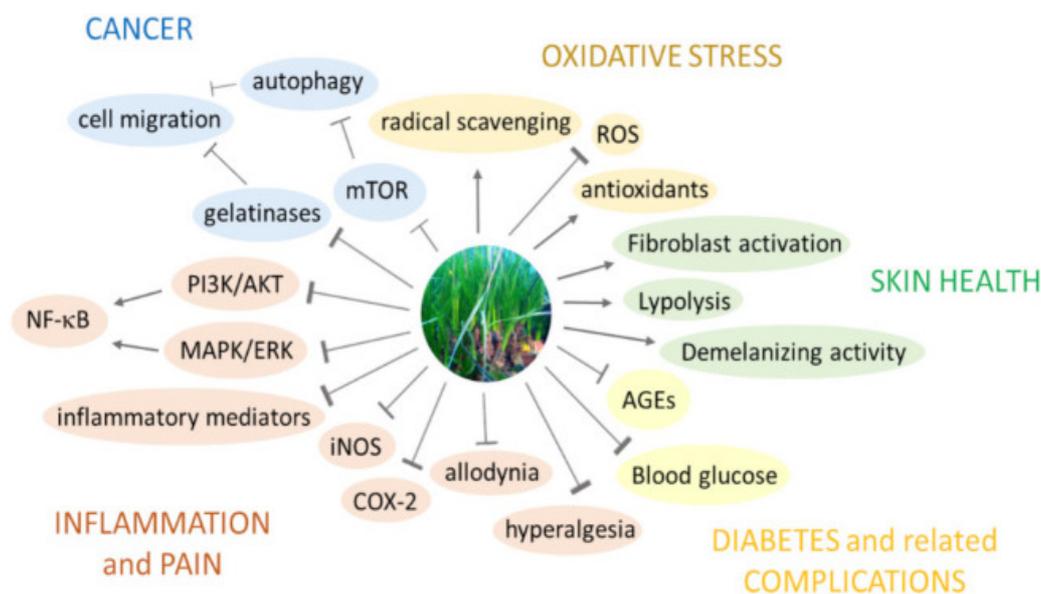


Figura 11. Rappresentazione schematica delle modalità di azione di *P. oceanica* e potenziali target terapeutici (Vasarri et al., 2021).

L'attività antiossidante di *P. oceanica* potrebbe essere anche associata alla prevenzione della formazione delle rughe della pelle, del decadimento dovuto all'età, dell'iperpigmentazione e della cellulite, processi nei quali lo stress ossidativo svolge un ruolo cruciale (Vasarri et al., 2021). Lo stress ossidativo è causato dal non corretto bilanciamento tra la produzione delle specie reattive dell'ossigeno e la loro eliminazione attraverso meccanismi protettivi: questo processo determina danni ossidativi e provoca anche una condizione di infiammazione nell'organismo (Forrester et al., 2018). In queste condizioni di infiammazione, la produzione incontrollata delle specie reattive dell'ossigeno è strettamente correlata con l'istolesività dell'infiammazione. Pertanto, è stato osservato che gli estratti delle foglie di *P. oceanica* sono in grado di sopprimere l'espressione dei livelli degli enzimi associati all'infiammazione, definiti ossido-nitrico sintasi inducibile (iNOS) e cicloossigenasi 2 (COX-2) (Vasarri et al., 2019). Un recente studio ha dimostrato che il contenuto fenolico ottenuto da foglie di *P. oceanica* seccate a 60 °C per 48 ore, macinate quattro volte ed estratte con etanolo al 70%, ha presentato un potere antiossidante più elevato rispetto agli estratti di foglie lievemente verdi e foglie brune (Messina et al., 2021).

Inoltre, la capacità di questo estratto fenolico (Gd-E4) è stata valutata *in vitro* anche sulle cellule dei fibroblasti HS-68, in seguito a trattamento con i raggi UV. Il pre-trattamento di queste cellule con l'estratto ricco in fenoli ha determinato una significativa protezione contro lo stress ossidante e la mortalità associata all'esposizione agli UV (Messina et al., 2021).



Oltre a svolgere attività antiossidante, *P. oceanica* esercita anche un'azione antinfiammatoria attraverso l'inibizione dell'attività del fattore di trascrizione nucleare NF-kB che regola i geni coinvolti nell'infiammazione e formazione dei tumori (Liu et al., 2017). Vasarri et al., (2019) hanno dimostrato che *P. oceanica* è in grado di inibire l'attivazione del fattore NF-kB indotta dai lipopolisaccaridi prevenendo la fosforilazione e la traslocazione nucleare della subunità p65 di NF-kB (Vasarri et al., 2019). Infatti, nel *pathway* di segnalazione NF-kB, IκB è una proteina inibitoria che si lega al complesso citosolico inattivo NF-kB. Seguendo gli stimoli pro-infiammatori, la chinasi IκB (IKK) fosforila la proteina IκB degradandola e consentendo al fattore NF-kB di traslocare all'interno del nucleo. Pertanto, è stato osservato che *P. oceanica* previene la traslocazione nucleare di NF-kB ripristinando i livelli di base di IκB; inoltre, l'attività antiinfiammatoria di *P. oceanica* si manifesta anche in seguito alla modulazione delle vie di segnalazione a monte del *pathway* NF-kB, tra le quali la proteina chinasi attivatrice della mitogenesi (MAPK)/chinasi regolatrice dei segnali extracellulari (ERK), e il fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K)/proteina chinasi B (AKT). In particolare, è stato dimostrato che *P. oceanica* inibisce l'attivazione indotta dai lipopolisaccaridi di ERK e AKT (Vasarri et al., 2019).

Un'altra importante evidenza dell'attività antiinfiammatoria e analgesica degli estratti delle foglie di *P. oceanica* è emersa in una somministrazione orale acuta dell'estratto, dose-dipendente, che ha inibito sia l'ipersensibilità indotta dall'infiammazione dopo l'iniezione intraplantare di carragenina che il dolore dell'infiammazione provocato dall'iniezione intraplantare di interleuchina 1β (IL-1β) (Micheli et al., 2021).

Ulteriori studi sulle proprietà biologiche di *P. oceanica* svolti *in vitro* hanno dimostrato la capacità degli estratti delle foglie di questa fanerogama di svolgere anche un'azione antitumorale, inibendo la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali, come le cellule HT1080 del fibrosarcoma umano (Barletta et al., 2015) e le cellule SHSY5Y del neuroblastoma (Piazzini et al., 2019). Questa funzione è correlata con la capacità di inibire l'espressione e l'attività degli enzimi proteolitici delle metalloproteasi 2 e 9 i quali svolgono un ruolo fondamentale nel processo delle metastasi tumorali, degradando la matrice extracellulare (Barletta et al., 2015). In particolare, il meccanismo molecolare associato con gli effetti anti-migratori nelle cellule cancerogene coinvolge l'attivazione dell'autofagia, un processo evolutivo che media la degradazione del materiale citoplasmatico (Khandia et al., 2019). Nel 2018, Leri et al. hanno dimostrato che l'attivazione dell'autofagia determinata da *P. oceanica* è dovuta alla concomitante e inversa modulazione dei *pathways* di segnalazione delle proteine



ERK e AKT e che culmina nell'inibizione del target mammifero della rapamicina (mTOR), il centro regolatore dell'autofagia (Cornara et al., 2018).

Pertanto, la capacità degli estratti di *P. oceanica* di agire contro la migrazione delle cellule, attraverso un meccanismo non-tossico, è considerata una promettente fonte di nuove molecole che possono difendere da neoplasmi e da altri processi pato-fisiologici come la neurodegenerazione, l'infiammazione l'invecchiamento cutaneo (Barletta et al., 2015; Leri et al., 2018).

1.8 I crostacei come fonte di peptidi antimicrobici

I crostacei rappresentano un ampio, antico e diversificato gruppo di invertebrati che comprende numerose specie commerciali importanti, come i gamberi sia marini che di acqua dolce, i granchi e le aragoste. Insieme agli insetti, essi costituiscono il gruppo più abbondante presente sulla Terra (Rosa e Barraco, 2010).

I crostacei sono essenzialmente organismi marini ma comprendono anche alcune specie di acqua dolce, terrestri e semi-terrestri. Nel corso della loro lunga esistenza, i crostacei hanno affrontato diverse sfide per il mantenimento della propria integrità poichè gli habitat naturali nei quali vivono sono, nello stesso tempo, habitat di altri organismi come i virus, i batteri, i funghi e parassiti. Pertanto, la loro straordinaria evoluzione conferma le efficienti strategie sviluppate da questi organismi per sopravvivere in ambienti ostili e ricchi di microrganismi (Rosa e Barraco, 2010).

In condizioni normali, i crostacei mantengono uno stato di salute e le infezioni sotto controllo. Esternamente, questi organismi sono ricoperti da un rigido esoscheletro che agisce come una efficiente barriera fisico-chimica contro i danni meccanici e l'invasione di microrganismi. Inoltre il tratto intestinale, un altro importante passaggio per l'intrusione dei microrganismi, è ulteriormente protetto da una membrana chitinososa (Rosa e Barraco, 2010); questo rivestimento cuticolare, insieme alla presenza di un ambiente acido ricco in enzimi digestivi, è in grado di inattivare e degradare la maggior parte dei virus e dei batteri (Jiravanichpaisal et al., 2006). Quando la cuticola è distrutta, i batteri patogeni e i microrganismi opportunistici possono penetrare all'interno dell'emocele e attivare le difese immunitarie interne dei crostacei (Rosa e Barraco, 2010).

I crostacei sono privi del complesso e specifico sistema immunitario dei vertebrati, basato su linfociti, immunoglobuline e memoria immunologica. A differenza dei vertebrati che possiedono sia immunità innata che adattativa, le difese interne dei crostacei si basano solo

sull'immunità innata, meno specifica ma più rapida ed efficiente contro i microrganismi (Rosa e Barraco, 2010). L'immunità innata dei crostacei è essenzialmente correlata al loro sangue o emolinfa e comprende sia le risposte cellulari che umorali. L'emolinfa dei crostacei è costituita essenzialmente da cellule, acqua, sali inorganici dissolti e proteine tra le quali l'emocianina, la proteina di trasporto dell'ossigeno (Söderhäll, 2016), e altre sostanze biologicamente attive come le lectine e peptidi antimicrobici (Miyata et al., 1989). Le cellule presenti nell'emolinfa sono invece definiti emociti (Johnson, 1980) e sono in grado di fagocitare i microrganismi ed eliminare composti solubili antimicrobici e citotossici dall'emolinfa (Mitta et al., 1999) (Fig. 12). Pertanto, l'immunità cellulare nei crostacei è mediata dagli emociti attraverso la loro attività di fagocitosi e/o intrappolamento dei microrganismi in aggregati o noduli (Jiravanichpaisal et al., 2006), mentre l'immunità umorale è determinata dagli agenti antimicrobici e include i *patterns* di proteine/recettori di ricognizione (PAMPs) che riconoscono i *patterns* molecolari associati ai patogeni, la produzione di ossigeno tossico e di metaboliti dell'azoto, un complesso di cascate enzimatiche che determinano la melanizzazione, proteine della coagulazione e peptidi antimicrobici (Rosa e Barraco, 2010).

Diversi peptidi antimicrobici sono stati isolati dagli emociti di differenti crostacei i quali hanno mostrato una significativa attività di eliminazione dei microrganismi patogeni (Fredrick e Ravichandran, 2012). La maggior parte di questi peptidi sono stati individuati nei gamberi marini ma un consistente numero di essi è stato identificato e caratterizzato nei decapodi, tra i quali i granchi e le aragoste marine, nei crostacei di acqua dolce e nei gamberi, e in alcune specie terrestri come gli isopodi (Rosa e Barraco, 2010).

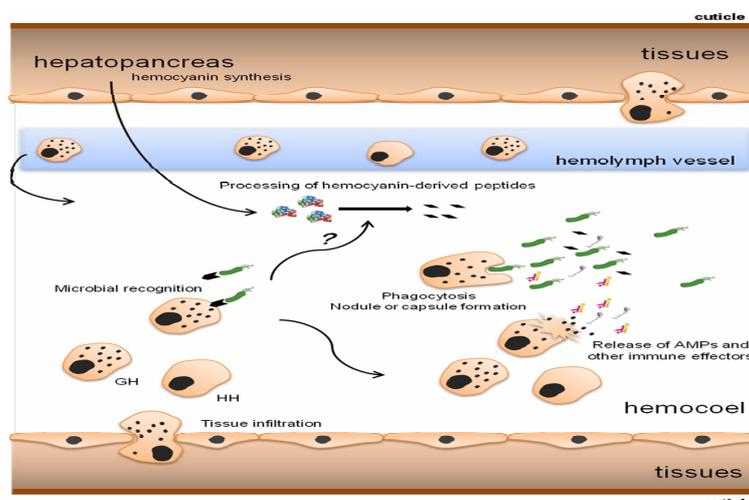


Figura 12. Rappresentazione schematica delle risposte umorali e cellulari nei crostacei dopo una invasione microbica (HH= emociti ialini; GH= emociti granulati) (Rosa e Barraco, 2010).

1.8.1. I peptidi antimicrobici dei crostacei: classificazione

I primi studi sull'isolamento e caratterizzazione dei peptidi antimicrobici nei crostacei sono stati condotti nei primi anni '90. I primi peptidi isolati, in particolare le crustine e le peneidine, sono stati ottenuti dall'emolinfa di un granchio e di un gambero attraverso un approccio biochimico (Rosa e Barraco, 2010).

Attualmente, circa 15 famiglie di peptidi antimicrobici sono stati individuate nei crostacei (Tab. 3) e la maggior parte di essi presenta caratteristiche comuni ai peptidi già noti.

In base alla composizione amminoacidica i peptidi antimicrobici isolati dai crostacei sono classificati in quattro principali gruppi: i) peptidi lineari a singolo dominio ad α -elica e ricchi in certi amminoacidi; ii) peptidi a singolo dominio e contenenti residui di cisteina organizzati in legami disolfuro; iii) peptidi antimicrobici multidominio o chimerici; iv) peptidi antimicrobici non convenzionali, i quali comprendono proteine multifunzionali o frammenti derivati da proteine che presentano attività antimicrobica (Rosa e Barraco, 2010).

Tabella 3. Principali caratteristiche dei peptidi antimicrobici isolati dai crostacei (Rosa e Barraco, 2010).

AMPs	Molecular mass (kDa)	Charge	Crustacean Order	First descriptions
Single-domain linear α-helical AMPs and peptides enriched in certain amino acids				
Bac-like	6.5	cationic	Decapoda (crab)	Schnapp <i>et al.</i> , 1996
Callinectin	3.7	cationic	Decapoda (crab)	Khoo <i>et al.</i> , 1999
Astacidin 2	1.8	cationic	Decapoda (crayfish)	Jiravanichpaisal <i>et al.</i> , 2007a
Armadillidin	5.2	cationic	Isopoda (woodlouse)	Herbinière <i>et al.</i> , 2005
Homarin	4-6	cationic	Decapoda (lobster)	Battison <i>et al.</i> , 2008
Single-domain peptides containing cysteine residues engaged in disulfide bonds				
Defensin	6.7-7.1	cationic	Decapoda (lobster)	Pisuttharachai <i>et al.</i> , 2009b
Anti-LPS factor	7-11	cationic	Decapoda (various)	Gross <i>et al.</i> , 2001 Supungul <i>et al.</i> , 2002
Scygonadin	10.8-11.4	anionic	Decapoda (crab)	Huang <i>et al.</i> , 2006
Multi-domain or chimeric AMPs				
Penaeidin	5.5-6.6	cationic	Decapoda (penaeid shrimp)	Destoumieux <i>et al.</i> , 1997
Crustin	7-14	cationic	Decapoda Amphipoda	Relf <i>et al.</i> , 1999
Hyastatin	11.7	cationic	Decapoda (crab)	Sperstad <i>et al.</i> , 2009b
Arasin	4.3-4.8	cationic	Decapoda (crab)	Stensvåg <i>et al.</i> , 2008
Stylicin	8.9	anionic	Decapoda (penaeid shrimp)	Rolland <i>et al.</i> , 2010
Unconventional AMPs				
Histones and derived fragments	11-15	cationic	Decapoda (penaeid shrimp)	Patat <i>et al.</i> , 2004
Hemocyanin-derived peptides	2.7-8.3 (shrimp) 1.9 (crayfish)	anionic (shrimp) cationic (crayfish)	Decapoda (shrimp, crayfish)	Destoumieux-Garzón <i>et al.</i> , 2001 Lee <i>et al.</i> , 2003



1.8.2. I peptidi lineari a singolo dominio ad α -elica

I peptidi a singolo dominio ad α -elica comprendono un ampio gruppo di peptidi privi dei residui di cisteina all'interno del legame disolfuro. Nei crostacei sono stati identificati cinque peptidi lineari: omarina, armadillidina e tre peptidi ricchi in prolina arginina (Bac-like, callinectina e astacidina 2) (Rosa e Barraco, 2010).

Il primo peptide antimicrobico caratterizzato nei crostacei è stato un piccolo peptide di 6,5 kDa, ricco in prolina/arginina, isolato dagli emociti di *Carcinus maenas* (Schnapp et al., 1996). A causa della notevole similarità con bactenecina-7, un peptide antimicrobico individuato nei neutrofili bovini (Frank et al., 1990), questo peptide è stato definito Bac-like e ha mostrato attività sia nei confronti di batteri Gram-positivi (*Micrococcus luteus*) che Gram-negativi (*Psychrobacter immobilis*); inoltre questo peptide mostrava un'elevata similarità di sequenza con il dominio ricco in prolina delle peneidine (Rosa e Barraco, 2010).

Un altro peptide ricco in prolina, e denominato callinectina, è stato isolato dagli emociti del granchio blu *Callinectes sapidus* (Khoo et al., 1999), il quale è stato saggiato solo su *E. coli* D31e, pertanto, la carenza di dati scientifici non ha consentito di definire lo spettro di azione antimicrobica di questo peptide. Infine, un altro peptide antimicrobico appartenente al gruppo ricco in prolina è stato individuato negli emociti del gambero di acqua dolce *Pacifastacus leniusculus* e denominato astacidina 2 (Jiravanichpaisal et al., 2007). Questo peptide, composto da 14 amminoacidi, ha mostrato una forte attività antimicrobica contro i batteri Gram-positivi (*Bacillus* sp., *S. aureus* e *M. luteus*) e Gram-negativi (*S. flexneri*, *Proteus vulgaris*, *E. coli* e *P. aeruginosa*); un peptide omologo è stato identificato anche in *Procambarus clarkii* (Shi et al., 2009). In particolare, astacidina 2 è sintetizzata come pre-propeptide ed è processato all'estremità sia ammino che carbonio terminale. Questo peptide cationico di 1,8 kDa è altamente espresso negli emociti e inoltre ha presentato similarità con il peptide metalnikowina-1, identificato nell'insetto *Palomena prasina* (Chernysh et al., 1996).

Tra i peptidi lineari è incluso anche il peptide ricco in glicina, denominato armadillidina, ottenuto dagli emociti dell'isopode terrestre *Armadillidium vulgare* (Herbinière et al., 2005) e l'omarina, isolata dagli emociti dell'aragosta americana *Homarus americanus* (Battiston et al., 2008). Armadillidina è un peptide cationico, caratterizzato da un elevato contenuto di glicina (circa 47%) e il quale ha mostrato una significativa attività antimicrobica verso il batterio Gram-positivo *Bacillus megaterium*. L'omarina è, invece, un piccolo peptide lineare con evidenti similarità, nella composizione amminoacidica, con le temporine, un gruppo di piccoli peptidi antimicrobici anfipatici ad α -elica isolati dagli anfibi che presentano attività antimicrobica



verso i batteri Gram-positivi (Simmaco et al., 1996). E' stato in particolare osservato che i peptidi sintetici di omarina (sCAP-1.1. e sCAP-1.4) hanno rivelato una significativa azione antimicrobica contro *Vibrio* sp., isolato dal tratto intestinale dell'aragosta, e anche un'attività anti-protozoaria (Battiston et al., 2008).

1.8.3. I peptidi a singolo dominio contenenti residui di cisteina nei legami disolfuro

Questo gruppo di peptidi antimicrobici è caratterizzato dalla presenza di coppie di residui di cisteina che sono in grado di formare dei ponti disolfuro intramolecolari. Nei crostacei decapodi sono stati individuati tre peptidi antimicrobici contenenti cisteina: le defensine, i fattori anti-lipopolisaccaridici e le scigonadine (Rosa e Barraco, 2010).

Le defensine costituiscono il gruppo di peptidi antimicrobici maggiormente studiato e presente nelle piante, negli invertebrati e nei vertebrati animali (Bulet et al., 2004). Nei crostacei, le defensine sono state individuate nell'aragosta giapponese *Panulirus japonicus*, nel quale sono state identificate due differenti isoforme PJD1 e PJD2 (Pisuttharachai et al., 2009). Le defensine identificate in questo crostaceo hanno mostrato similarità con le β -defensine individuate nei vertebrati (Taylor et al., 2008).

I fattori anti-lipopolisaccaridici (ALFs) sono stati isolati per la prima volta dalle cellule dell'emolinfa di due chelicerati artropodi marini, il granchio a ferro di cavallo *Limulus polyphemus* e *Tachypleus tridentatus* (Tanaka et al., 1982). I fattori anti-lipopolisaccaridici sono stati identificati inizialmente in queste due specie come potenti inibitori della coagulazione dell'emolinfa mediata dai lipopolisaccaridi.

Nei crostacei, fattori anti-lipopolisaccaridici simili a *L. polyphemus* sono stati identificati negli emociti del gambero *Litopenaeus setiferus* (Gross et al., 2001) e in *Penaeus monodon* (Supungul et al., 2002). In particolare, i geni codificanti i fattori anti-lipopolisaccaridici sono stati identificati nei crostacei decapodi (Tassanakjorn et al., 2013) e nei gamberi di acqua dolce (Liu et al., 2006; Rosa et al., 2008; Lu et al., 2009), nelle aragoste (Beale et al., 2008) e nei granchi (Imjongjirak et al., 2007; Li et al., 2008; Yedery e Reddy, 2009a; Yue et al., 2010).

In generale, i fattori anti-lipopolisaccaridici individuati nei crostacei decapodi fanno parte di una famiglia di peptidi antimicrobici isolati dai crostacei, composti da diversi sottogruppi e varianti che sono generate da geni differenti oppure da giunzioni alternative di mRNA (Tharntada et al., 2008); inoltre, queste sequenze sono codificate come precursori di molecole, composte da una sequenza leader seguita da un ampio peptide maturo (circa 11 kDa) contenente una regione altamente idrofobica ammino-terminale e due caratteristici residui di cisteina (Rosa



e Barraco, 2010). In base alla sequenza amminoacidica, la famiglia dei fattori anti-lipopolisaccaridici è stata classificata in tre principali gruppi: ALF Cluster I, II e III (Zhao e Wang, 2008).

I fattori anti-lipopolisaccaridici hanno mostrato una notevole attività antimicrobica (MIC < 6,25 μ M) contro un ampio spettro di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, incluse diverse specie opportunistiche di *Vibrio*, funghi e virus umani (Somboonwivat et al., 2005; Carriel-Gomes et al., 2007; Yedery e Reddy, 2009a). Inoltre, è stato anche osservato che il fattore anti-lipopolisaccaridico rALFPm3 esercita una forte azione antibatterica nei confronti di un elevato numero di ceppi batterici e patogeni dei gamberi (Somboonwivat et al., 2005); in particolare, è stato dimostrato che rALFPm3 è in grado di legare sia il lipopolisaccaride (LPS) carico negativamente che l'acido lipoteicoico, considerati i principali componenti della parete cellulare dei batteri Gram-negativi e Gram-positivi, rispettivamente (Somboonwivat et al., 2008).

Infine, nel gruppo dei peptidi a singolo dominio e contenenti residui di cisteina nei legami disolfuro sono incluse anche le scigonadine. La scigonadina è un ampio peptide antimicrobico anionico di 10,8 kDa che è stato purificato dal plasma seminale del granchio di fango *Scylla serrata* (Huang et al., 2006) e ha mostrato attività antimicrobica soltanto verso il batterio Gram-positivo *M. luteus* (Huang et al., 2006). Successivamente, è stata identificata un'altra scigonadina di 11,4 kDa, denominata SSAP, la quale è stata purificata dagli emociti granulari della stessa specie di granchio (Yedery e Reddy, 2009b). Entrambe le scigonadine contengono residui di cisteina, caratteristici dei fattori anti-lipopolisaccaridici, sebbene la relazione filogenetica tra i peptidi individuati in *S. serrata* e i fattori anti-lipopolisaccaridici non è stata ancora dimostrata (Rosa e Barraco, 2010). La scigonadina SSAP ha mostrato attività antimicrobica nei confronti dei batteri Gram-positivi, in particolare *M. luteus*, *Streptococcus pyogenes* e *S. aureus*, ma non nei confronti dei lieviti e dei funghi filamentosi (Yedery e Reddy, 2009b; Peng et al., 2010).

1.8.4. I peptidi antimicrobici a dominio multiplo o chimerici

Questo gruppo di peptidi antimicrobici individuati nei crostacei presenta due distinti domini. Ciascun dominio è caratterizzato da aspetti tipici del singolo dominio classico, come peptidi ricchi in prolina/arginina o cisteina (Rosa e Barraco, 2010).

I peptidi antimicrobici a dominio multiplo non sono diffusi in tutti i regni viventi e, oltre ai crostacei, sono stati individuati negli insetti e negli aracnidi (Wicker et al., 1990; Saito et al.,



1995). L'aspetto chimerico di questi peptidi è fondamentale per stabilire la cationicità e l'anfipaticità: un dominio cationico può essere coinvolto nelle interazioni elettrostatiche con le pareti cellulari microbiche cariche negativamente, mentre un dominio idrofobico può essere responsabile della destabilizzazione della membrana (Rosa e Barraco, 2010).

I peptidi antimicrobici a dominio multiplo identificati nei crostacei comprendono le peneidine, le crustine, le iastatine, le arasine e le stilicine.

Le peneidine costituiscono il gruppo di peptidi antimicrobici maggiormente studiato nei crostacei (Bachère et al., 2000; Destoumieux et al., 2000a; Bachère et al., 2004; Cuthbertson et al., 2008; Tassanakajon et al., 2010). Esse sono considerate peptidi cationici chimerici composti da un dominio ammino-terminale non strutturato ricco in prolina/arginina e da una regione carbonilica contenente sei residui di cisteina che sono organizzati in tre ponti disolfuro intramolecolari (Destoumieux et al., 1997; Yang et al., 2003; Cuthbertson et al., 2006). In particolare, il dominio ammino-terminale presenta caratteristiche simili ai peptidi ricchi in prolina/arginina, tra i quali il peptide *Bac-like* (Schnapp et al., 1996).

Le peneidine sono state inizialmente isolate dall'emolinfa del gambero bianco dell'Oceano Pacifico *Litopenaeus vannamei* (Destoumieux et al., 1997) e sono ubiquitarie in tutta la famiglia Penaeidae. I precursori delle peneidine presentano un peptide segnale altamente conservato, seguito da un peptide maturo cationico di 5,48-6,62 kDa. La produzione delle peneidine è limitata agli emociti granulari che possono essere liberi nell'emolinfa o infiltrati nei tessuti dei gamberi (Bachère et al., 2004).

Le peneidine sono classificate in quattro distinti sottogruppi in base alla sequenza amminoacidica e alla posizione di alcuni residui sia nella regione ammino che carbonilica terminale: PEN2, PEN3, PEN4 e PEN5 (Cuthbertson et al., 2002; Gueguen et al., 2006; Kang et al., 2007); ciascun sottogruppo possiede, inoltre, una caratteristica firma amminoacidica e aspetti biochimici comuni (Rosa e Barraco, 2010).

L'attività antimicrobica delle peneidine è stata ampiamente studiata, utilizzando peptidi nativi purificati dall'emolinfa dei gamberi. Questi peptidi hanno mostrato una efficace azione antimicrobica contro i batteri Gram-positivi (*Aerococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*) con valori MIC di 0.3-2.5 μ M e contro i funghi filamentosi (*Fusarium*, *Nectria*, *Alternaria*, *Neurospora*, *Botrytis*, *Penicillium*) mentre l'azione antimicrobica si è rivelata inefficace contro i batteri Gram-negativi (Rosa e Barraco, 2010).

Le crustine sono definite peptidi antimicrobici cationici a dominio multiplo contenenti un dominio delle proteine acide del siero del latte (*WAP domain*) all'estremità carbonilica

terminale (Smith et al., 2008). In particolare, tutti i precursori delle crustine possiedono una sequenza leader all'estremità ammino-terminale e una regione carbonilica-terminale contenente il dominio WAP. In generale, con il termine "WAP" si indica una famiglia di proteine presente nella frazione del siero del latte dei mammiferi e che contiene otto residui conservati di cisteina in un'organizzazione preservata e che formano quattro singoli cori disolfuro (4DSC) (Rosa e Barraco, 2010). Questo particolare motivo molecolare svolge un'attività di proteasi inibitoria, oltre ad altre importanti funzioni biologiche (Ranganathan et al., 1999): è stato infatti dimostrato che gli inibitori della proteasi esercitano un ruolo significativo nell'immunità dei crostacei, inibendo la proteasi microbica o regolando la cascata di proteasi immunitarie (Cerenius e Söderhäll, 2004).

La prima crustina è stata isolata dagli emociti granulari del granchio *Carcinus maenas* e presentava una specifica attività verso i batteri Gram-positivi marini (Relf et al., 1999).

Circa 50 crustine e sequenze simili alle crustine sono state identificate in numerose specie di crostacei, inclusi i gamberi di acqua dolce, i granchi e le aragoste e i crostacei non decapodi, tra i quali gli anfipodi (Smith et al., 2008).

In base alle caratteristiche strutturali, le crustine sono classificate in tre gruppi: tipo I, tipo II e tipo III. Le crustine di tipo I comprendono i membri correlati alla carcinina e possiedono una regione ricca in cisteina di lunghezza variabile, compresa tra la sequenza leader e il dominio WAP (Fig. 13). Questo tipo di crustina è presente soprattutto nei granchi (Relf et al., 1999; Imjongjirak et al., 2009; Sperstad et al., 2009; Mu et al., 2010; Yue et al., 2010), nelle aragoste (Stoss et al., 2004; Hauton et al., 2006; Christie et al., 2007; Pisuttharachai et al., 2009), nei crostacei di acqua dolce (Jiravanichpaisal et al., 2007; Shi et al., 2009), nei gamberi (Sun et al., 2010) e nei gamberi di acqua dolce (Dai et al., 2009).

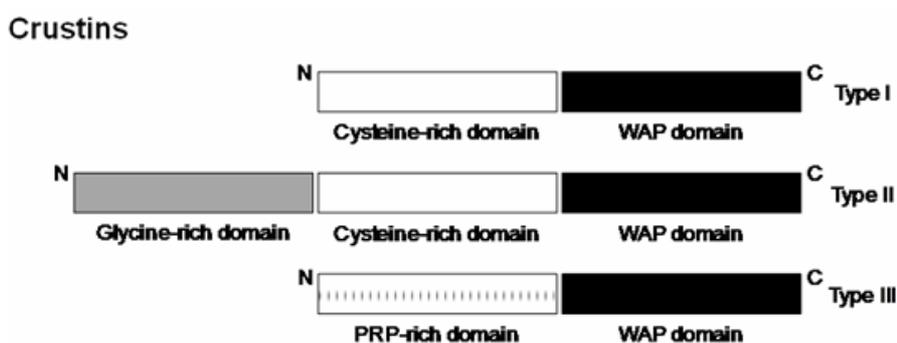


Figura 13. Rappresentazione schematica dei tre tipi di crustina (Rosa e Barraco, 2010).

Le crustine di tipo II sono caratterizzate dalla presenza di regioni idrofobiche contenenti maggiore quantità di residui di glicina e cisteina e un dominio WAP individuato nella crustina di tipo I (Fig. 14) (Rosa e Barraco, 2010). Questo gruppo di peptidi è stato riscontrato frequentemente nei gamberi peneidi (Bartlett et al., 2002; Rattanachai et al., 2004; Supungul et al., 2004; de Lorgeril et al., 2005, Rosa et al., 2007; Zhang et al., 2007; Antony et al., 2010) e nei crostacei di acqua dolce (Jiravanichpaisal et al., 2007).

Infine, le crustine di tipo III possiedono una regione ricca in prolina/arginina situata tra la sequenza leader e il dominio WAP, ma non presentano il caratteristico dominio ricco in cisteina tipico delle crustine di tipo I e II, né il motivo di glicina. Questi peptidi sono generalmente definiti proteine di dominio singolo del siero di latte (SWD), proteine simili alle chelonianine o proteine anti-leucoproteasi che sono state riscontrate nei gamberi e nei crostacei di acqua dolce (Jiménez-Vega et al., 2004; Amparyup et al., 2008; Jia et al., 2008; Du et al., 2010).

Diversi studi hanno dimostrato che le crustine presentano una significativa attività antimicrobica verso i batteri Gram-positivi, in particolare verso i generi *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Bacillus* (Relf et al., 1999; Zhang et al., 2007; Supungul et al., 2008; Imjongjirak et al., 2009; Sperstad et al., 2009).

Un altro importante peptide antimicrobico chimerico individuato nei crostacei è la iastatina. Questo peptide antimicrobico a dominio multiplo, di 11,7 kDa, è stato isolato dagli emociti del piccolo granchio *Hyas araneus* (Sperstad et al., 2009) ed è costituito da un dominio ammino-terminale ricco in glicina, da una piccola porzione ricca in prolina/arginina e da una regione carbonio-terminale contenente sei residui di cisteina (Fig. 14) (Rosa e Barraco, 2010).

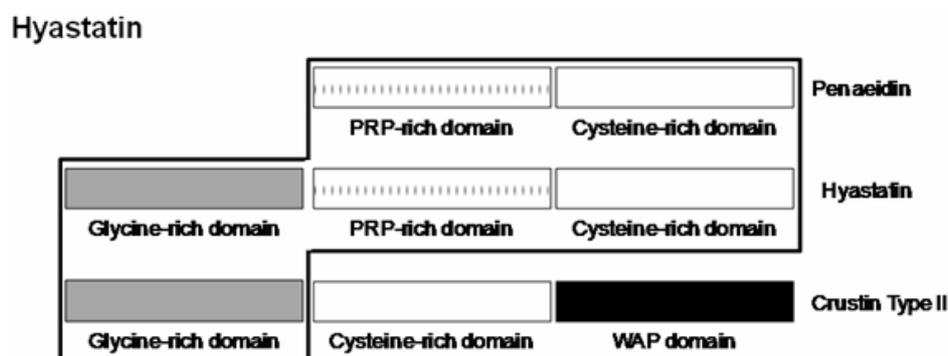


Figura 14. Rappresentazione schematica della iastatina (Rosa e Barraco, 2010).

Il dominio ricco in glicina è formato da circa il 27% di residui di glicina e presenta una organizzazione simile alla crustina di tipo II mentre i domini contenenti prolina/arginina e cisteina sono simili ai rispettivi domini presenti nelle peneidine. In particolare, è stato riscontrato che l'organizzazione dei sei residui di cisteina nella iastatina è simile al *pattern* della cisteina individuato nei peneidi (Gueguen et al., 2006); inoltre, la iastatina è in grado di legarsi alla chitina in maniera simile alle peneidine (Destoumieux et al., 2000a).

L'attività antimicrobica della iastatina è stata valutata su un ristretto numero di microrganismi, sebbene abbia mostrato uno spettro di azione molto ampio. Infatti, è stato osservato che la iastatina è in grado di inibire la crescita dei lieviti, dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi; inoltre questo i peptidi iastatina differiscono dalle peneidine poiché presentano una attività antimicrobica più limitata ai batteri Gram-positivi (Rosa e Barraco, 2010). E' stato anche osservato che l'attività antimicrobica della iastatina è correlata con il dominio ricco in cisteina piuttosto che con il dominio ricco in prolina/arginina, diversamente da quanto riscontrato per le peneidine (Cuthbertson et al., 2004; Sperstad et al., 2009) mentre la capacità della iastatina di legare la chitina è dovuta alla presenza della regione ammino-terminale, nella quale sono presenti i domini ricchi in prolina/arginina e cisteina rispetto al dominio ricco in cisteina delle peneidine (Sperstad et al., 2009).

Altri peptidi antimicrobici simili alla iastatina sono le arasine, peptidi chimerici che sono stati isolati dagli emociti di *H. araneus* (Stensvåg et al., 2008). Questi peptidi sono caratterizzati da una lunga sequenza di 25 amminoacidi, seguita da una regione ammino-terminale ricca in prolina e da una porzione carbonio-terminale contenente quattro residui di cisteina organizzati in due legami disolfuro (Fig. 15) (Rosa e Barraco, 2010). La regione ammino-terminale presenta un motivo molto simile alla batenecina-7 e ad altri peptidi antimicrobici dei crostacei ricchi in prolina/arginina come *Bac-like* e astacidina 2 (Schnapp et al., 1996; Jiravanichpaisal et al., 2007) mentre i quattro residui di cisteina della regione carbonio-terminale presentano un'organizzazione simile alle protegrine dei vertebrati (Capone et al., 2010).

Arasins

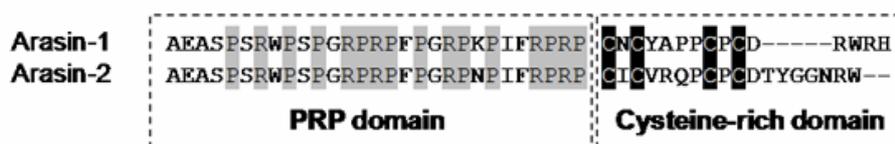


Figura 15. Rappresentazione schematica delle arasine (Rosa e Barraco, 2010).



Come tutti gli altri peptidi antimicrobici dei crostacei, i trascritti di arasina 1 e 2 sono stati determinati negli emociti (Stensvåg et al., 2008). L'attività dell'arasina 1 è stata valutata su poche specie di microrganismi, rivelando una efficace azione contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi; l'arasina 2, invece, identificata attraverso il sequenziamento della libreria cDNA degli emociti e il suo spettro di attività antimicrobica non è stato ancora pienamente determinato, ad eccezione di due peptidi simili all'arasina e individuati nel crostaceo di acqua dolce *P. clarkii* (Chai et al., 2017).

Infine, tra i peptidi chimerici identificati nei crostacei sono inclusi anche le stilicine. Le stilicine sono peptidi antimicrobici anionici, costituiti da 82 amminoacidi e sono caratterizzati da una regione ammino-terminale ricca in prolina e da una porzione carbonio-terminale contenente 13 residui di cisteina (Rolland et al., 2010). Questo gruppo di peptidi antimicrobici presenta omologia con la criptidina dei topi ed è stato individuato per la prima volta nel gambero *Litopenaeus stylirostris*.

1.8.5. I peptidi antimicrobici non convenzionali

Questo gruppo di peptidi antimicrobici individuati nei crostacei è costituito da proteine multifunzionali che svolgono altre funzioni significative e da frammenti di proteine che presentano attività antimicrobica e sono generate dal processamento di proteine più grandi (Rosa e Barraco, 2010).

Questi peptidi, definiti non convenzionali da Smith et al. (2010), possiedono alcune caratteristiche molecolari importanti, tipiche della classica struttura dei peptidi antimicrobici, come la carica, l'idrofobicità e/o anfipaticità (Brogden et al., 2005) e sono stati isolati da diverse specie di invertebrati e vertebrati. Essi comprendono proteine intere, come gli istoni, proteine ribosomali e proteine del latte dei mammiferi, e frammenti di peptide derivati da grandi precursori con proprietà antimicrobiche non evidenti come l'emoglobina, la lactoferina e l'emocianina (Bulet et al., 2004).

Nei crostacei, l'attività antimicrobica è stata osservata negli istoni e nei frammenti di istoni, oltre ai peptidi derivati dall'emocianina trasportatrice dell'ossigeno.

Gli istoni sono i principali componenti proteici della cromatina e sono coinvolti nell'impacchettamento del DNA e nella regolazione dell'espressione genica. Essi sono proteine cationiche, altamente conservate in tutte le cellule eucariotiche, che potrebbero essere coinvolti nei meccanismi di difesa antimicrobica (Cho et al., 2009).



L'attività antimicrobica è stata studiata per diversi tipi di istoni (H1, H2A, H2B, H3 e H4) presenti in diverse specie di vertebrati e invertebrati (Kashima, 1991; Park et al., 1998; Richards et al., 2001) e le cui proprietà antimicrobiche sono determinate dall'elevato contenuto di residui cationici e dalla struttura secondaria anfipatica (Rosa e Barraco, 2010). Le proprietà antimicrobiche degli istoni sono basate essenzialmente sulla capacità di destabilizzare la membrana batterica e non sulla capacità di formare pori stabili (Fernandes et al., 2002).

Nei crostacei, gli istoni e i frammenti derivati da istoni con attività antimicrobica sono stati identificati nel gambero *L. vannamei* (Patat et al., 2004): utilizzando un approccio biochimico, sono stati individuati elevati livelli delle proteine dei quattro cori istonici (H2A, H2B, H3 e H4) negli emociti circolanti. È stato osservato che l'istone H2A e il suo frammento ammino-terminale hanno presentato similarità con i peptidi antimicrobici buforina I e la parasina, mostrando anche una significativa attività antimicrobica nei confronti di *M. luteus* e due ceppi di *Bacillus* (Rosa e Barraco, 2010).

Tra i peptidi antimicrobici non convenzionali identificati nei crostacei sono inclusi anche i peptidi derivati dall'emocianina. Nei crostacei, l'emocianina costituisce la proteina più abbondante presente nell'emolinfa poiché rappresenta più del 95% delle proteine totali presenti nel plasma (Rosa e Barraco, 2010). L'emocianina è una proteina trasportatrice dell'ossigeno, prodotta nel pancreas e rilasciata nel plasma; oltre a svolgere il ruolo di proteina *carrier* dell'ossigeno, l'emocianina svolge numerose funzioni tra le quali l'osmoregolazione, deposito di proteine ed è inoltre coinvolta in alcune reazioni immunitarie (Decker e Jaenicke, 2004).

Nei crostacei alcuni peptidi antimicrobici derivati dall'estremità carbonio-terminale dell'emocianina sono stati isolati e caratterizzati dal plasma di *L. vannamei* (PvHCt) e *L. stylirostris* (PshCt1, PshCt2) (Destoumieux-Garzón et al., 2001) e del gambero di acqua dolce *P. leniusculus* (astacidina 1) (Lee et al., 2003). I tre peptidi isolati dall'emocianina dei gamberi sono molecole anioniche con massa molecolare di 2,7 kDa (PvHCt), 7,9 kDa (PshCt1) e 8,3 kDa (PshCt2) e hanno mostrato una significativa attività antifungina verso diversi ceppi filamentosi (MIC di 3,15-12,5 μ M) (Destoumieux-Garzón et al., 2001) mentre astacidina 1, identificata nel crostaceo di acqua e rilasciata dall'estremità carbonio-terminale da una proteasi simile alla cisteina, ha rivelato un'efficace attività verso batteri Gram-positivi (*Bacillus* sp. e *M. luteus*) e Gram-negativi (*S. flexneri* e *E. coli*) (Lee et al., 2003).

1.9. I gamberi di acqua dolce come fonte di peptidi antimicrobici: *Procambarus clarkii*

Tra i crostacei, i gamberi di acqua dolce costituiscono un diversificato gruppo di crostacei e svolgono un ruolo centrale negli ecosistemi di acqua dolce.

Questo gruppo di organismi acquatici è stato considerato come modello di studio in numerosi studi biologici in altri ambiti scientifici come la fisiologia, l'ecologia, l'immunologia e la neurobiologia per oltre 130 anni (Huxley, 1880; Crandall e De Grave, 2017; Cerenius e Söderhäll, 2018).

I gamberi di acqua dolce sono distribuiti alle latitudini temperate mentre sono assenti nell'Africa continentale e nel sub-continente Indiano (Scholtz, 2002); inoltre, questi organismi vivono in differenti habitat tra i quali corsi d'acqua, laghi, caverne e cunicoli terrestri (Richman et al., 2015). Alcuni studi condotti su queste specie hanno anche dimostrato che i gamberi di acqua dolce svolgono un ruolo significativo nella determinazione della struttura e del funzionamento degli ecosistemi, oltre a rappresentare importanti specie economiche in Madagascar, Europa, Cina e nello stato della Louisiana (Jones et al., 2006; Thies e Porche, 2007).

Nel corso degli ultimi dieci anni numerosi peptidi antimicrobici sono stati isolati dalle varie specie di gamberi di acqua dolce, come *Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii* e *Cherax quadricarinatus* (Donpuđa et al., 2010; Yu et al., 2016; Liu et al., 2016), i quali presentano una differente composizione amminoacidica e lunghezza, oltre a una specifica attività biologica.

Il crostaceo rosso di acqua dolce *P. clarkii* (Fig. 16) rappresenta oggi la specie predominante tra i macro-invertebrati presenti in Europa (Gherardi, 2006). Si tratta di un organismo nativo del Messico nord-orientale e del centro-sud degli Stati Uniti, la cui diffusione si è estesa, nel corso del tempo, alla parte occidentale del Texas, all'Alabama orientale e alla parte settentrionale dal Tennessee all'Illinois (Hobbs 1972). Questa specie è stata intensamente allevata a partire dal 1950 negli USA ed è stata introdotta con successo anche alle Hawaii, nel Messico occidentale, in Costa Rica, in Repubblica Dominicana, in Belize, in Brasile, in Ecuador, in Venezuela, in Giappone, in Cina, a Taiwan, nelle Filippine, in Uganda, in Kenya, in Zambia, in Repubblica Sudafricana e in Europa (Huner, 2002). Pertanto, come risultato di questa notevole espansione, *P. clarkii* è divenuta una specie cosmopolita presente in tutti gli habitats, ad eccezione dell'Australia e dell'Antartide (Huner, 1977; Huner e Avault, 1979).

La prima introduzione di *P. clarkii* in Europa risale agli inizi degli anni '70 ed è documentata da diversi autori (Gutiérrez-Yurrita et al., 1999).

Come riportato in letteratura, nel giugno 1973 un carico di organismi di *P. clarkii* (100 kg) fu importato da New Orleans (USA) in una fattoria in provincia di Badajoz (Spagna) (Habsburgo-Lorena, 1986) e l'anno successivo un altro carico di organismi (400 kg) è stato rilasciato in uno stagno delle anguille in Guadalquivir (Siviglia) (Gutiérrez-Yurrita et al., 1999).



Figura 16. Un'immagine di *P. clarkii*.

In seguito a questi eventi, *P. clarkii* è divenuto un organismo naturalizzato in questi nuovi habitat: in assenza di reti nei siti, questa specie si è diffusa, colonizzando fossi e canali (Gherardi et al., 2011). Inoltre, a causa dell'elevato prezzo, la diffusione di questa specie è stata favorita anche dai pescatori che avevano distribuito gli organismi all'interno del Guadalquivir e del Doñana National Park, fino a determinarne l'espansione in tutta la penisola Iberica, incluse le Azzorre e le Baleari (Fig. 17) (Gherardi et al., 2011).

P. clarkii è una specie ampiamente studiata dal punto di vista ecologico poiché considerata invasiva. Questo crostaceo presenta le caratteristiche di una specie a selezione-r, compresa una precoce maturità e una piccola dimensione del corpo (10 g) (Paglianti e Gherardi, 2004), un rapido tasso di crescita (50 g in tre-cinque mesi) (Paglianti e Gherardi, 2004) un elevato numero di discendenti e un ciclo vitale breve (Lindqvist e Huner, 1999). Inoltre, *P. clarkii* presenta un ciclo vitale molto plastico, che consente a questa specie di invadere ambienti differenti; pertanto, il potenziale invasivo di questo organismo è molto elevato ed è ulteriormente favorito dalla sua abilità di dispersione (Gutiérrez-Yurrita e Montes, 1999; Gutiérrez-Yurrita et al., 1999; Gherardi et al., 1999; Gherardi e Barbaresi, 2000).

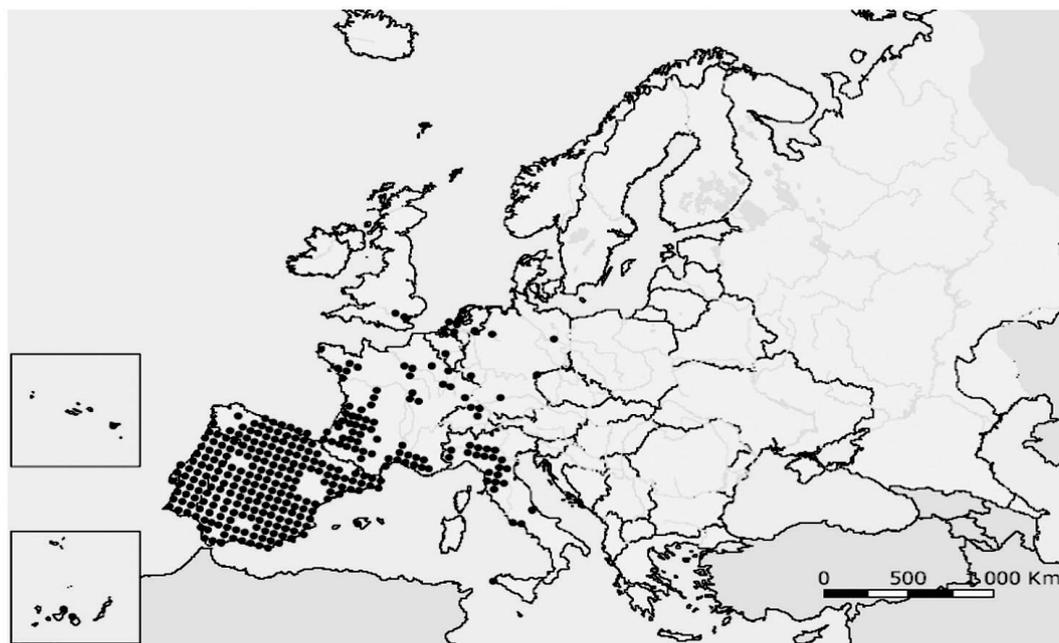


Figura 17. Distribuzione di *P. clarkii* in Europa, indicata dai puntini neri (Souty-Grosset e al., 2006)

P. clarkii è un crostaceo altamente tollerante ed è in grado di vivere in ambienti estremi ed inquinati (Gherardi e Barbaresi, 2000). La capacità di questo organismo di adattarsi ad habitat poco favorevoli è correlata con la sua attività di escavazione (Huner e Barr, 1984): questa intensa attività di escavazione determina un incremento della torbidità dell'acqua e una riduzione della produzione primaria e, nello stesso tempo, causa una perforazione della sponda che conduce al collasso, spesso con danni ai campi agricoli (Correia e Ferreira, 1995; Rodríguez et al., 2003; Huner, 2002).

Come tutti i crostacei di acqua dolce, anche *P. clarkii* è considerato una fonte significativa di molecole bioattive con importanza farmacologica, le quali sono prodotte dopo stimolazione immunitaria e sono accumulate nei granuli all'interno degli emociti (Destoumieux et al., 1997; Relf et al., 1999; Gross et al., 2001; Sotelo-Mundo et al., 2003; Sricharoen et al., 2005; Smith e Dyrinda, 2015). Alcune di queste molecole bioattive isolate da questo crostaceo sono peptidi antimicrobici, raggruppati secondo la classificazione già illustrata per i crostacei.

1.9.1. I fattori anti-lipopolisaccaridici (ALFs)

Attualmente, diversi fattori anti-lipopolisaccaridici sono stati isolati da alcune specie di gamberi di acqua dolce, in particolare da *P. clarkii* e sono coinvolti nel sistema difensivo contro il virus della sindrome dello spot bianco (WSSV) (Huang et al., 2017) e contro i batteri patogeni Gram-positivi (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*), Gram-negativi (*Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*) e i funghi (*Pichia pastoris* e *Candida albicans*) (Sun et al., 2011; Zhu et al., 2019). Un altro importante fattore anti-lipopolisaccaridico (*CqALF*), con una significativa attività antimicrobica, è stato individuato anche in *C. quadricarinatus*, rivelandosi efficace nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, in particolare *S. aureus* e *Shigella flexneri* (Lin et al., 2016).

1.9.2. Le crustine

Negli ultimi dieci diversi tipi di crustine sono state isolate da varie specie di gamberi di acqua dolce. In particolare, in *P. clarkii* è stata identificata una crustina di tipo I che mostrava ampia attività antimicrobica nei confronti dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi (*S. aureus*, *V. anguillarum*, *A. hydrophila*, *B. subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *M. luteus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) (Liu et al., 2016). Recentemente, una nuova isoforma di crustina appartenente al tipo I, nominata *Pc-crustin 4*, è stata isolata in *P. clarkii* e ha mostrato attività di inibizione della crescita dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi (*S. aureus* e *Edwardsiella ictaluri*) (Du et al., 2019). Inoltre, in *P. clarkii* è stata individuata una particolare crustina di tipo III, nominata *Pc-SWD*, la quale appartiene ai peptidi contenenti un singolo dominio WAP (Du et al., 2010); si tratta di un gruppo di peptidi, già individuato nei gamberi e che presenta attività antimicrobica e inibitoria della proteinasi (Sallenave, 2000, 2002). Questi peptidi sono stati raggruppati nel gruppo delle crustine di tipo III da Smith et al. (2008) per la loro similarità con le crustine, sebbene siano deficitarie del dominio ricco in glicina delle crustine di tipo II e del dominio ricco in cisteina presente sia nelle crustine di tipo I che II (Smith et al., 2008).

Un'altra crustina di tipo I, *CqCrS*, è stata individuata nel gambero di acqua dolce *C. quadricarinatus* ed è caratterizzata da attività antimicrobica e di legame nei confronti dei diversi batteri (Yu et al., 2016) mentre dagli emociti di *P. leniusculus* sono stati isolati due geni, *PcCrustin1* e *PcCrustin2*, i quali sono in grado di inibire la crescita del batterio Gram-positivo *M. luteus* M111 quando sono espresse (Jiravanichpaisal et al., 2007; Donpudsa et al., 2010).



1.9.3 I lisozimi

I lisozimi costituiscono una componente importante dell'immunità innata e sono ampiamente distribuiti nei vertebrati e invertebrati, nelle piante e nei microrganismi. Queste molecole presentano un'attività antimicrobica ampia nei confronti della maggior parte dei batteri e dei virus e sono inoltre coinvolti in diversi processi fisiologici come la digestione, l'infiammazione, l'immuno-modulazione e i *pathways* anti-tumorali (Prager e Jolles, 1996; Regel et al., 1998; Guani-Guerra et al., 2010; Tassanakajon et al., 2013).

I lisozimi presentano attività muramidasi basata sull'idrolisi del legame glicosidico β -1,4 del peptidoglicano dei batteri e sull'uccisione dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Chai et al., 2017). In generale, i lisozimi sono classificati in quattro gruppi, in relazione alle differenze nella sequenza amminoacidica, alle proprietà chimiche e biologiche (Hancock e Scott, 2000; Callewaert e Michiels, 2010): lisozimi convenzionali (di tipo c), lisozimi tipo g, lisozimi di invertebrato di tipo i e lisozimi di tipo ch. I primi due gruppi sono caratteristici dei vertebrati mentre il terzo gruppo di lisozimi è stato individuato solo negli invertebrati; inoltre molti lisozimi di tipo c sono stati studiati nei crostacei marini (Sotelo-Mundo et al., 2003; Bu et al., 2008; Mai e Hu, 2009; Kaizu et al., 2011; Khartik et al., 2014).

Nei gamberi di acqua dolce le conoscenze riguardo alla presenza dei lisozimi sono scarse. Attualmente, i lisozimi sono stati caratterizzati in *P. clarkii*, in particolare *Pclys-1*, *Pclys-i3* e *PcLyzc* i quali hanno mostrato una significativa attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-positivi (*S. aureus*, *M. luteus*, *B. thurigiensis* e *B. subtilis*) e Gram-negativi (*P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *V. anguillarum* ed *E. coli*) (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2018; Liao et al., 2018). Pertanto la caratterizzazione di queste molecole come nuovi potenziali peptidi antimicrobici potrebbero contribuire all'individuazione di farmaci alternativi agli antibiotici convenzionali per il trattamento delle infezioni batteriche.

1.9.4 Le arasine

Nei gamberi di acqua dolce la presenza delle arasine non è stata oggetto di studi scientifici sebbene peptidi antimicrobici, con sequenze simili alle arasine, sono stati identificati nel crostaceo di acqua dolce *P. clarkii*, e denominati *Pc-arasin1* e *Pc-arasin2* (Chai et al., 2017). Le arasine isolate da *P. clarkii* sono peptidi antimicrobici cationici i quali hanno presentato un ampio spettro di attività nei confronti di tre batteri Gram-positivi (*S. aureus*, *M. luteus* e *B. subtilis*) e di tre batteri Gram-negativi (*A. hydrophila*, *E. coli* e *V. anguillarum*) (Chai et al., 2017). Inoltre, è stato anche osservato che l'attività antimicrobica di queste molecole è simile



all'attività manifestata dall'arasina 1 e dalla simil-arasina *Sp* isolate da *H. araneus* e *S. paramamosain* (Stensvåg et al., 2008; Imjongjirak et al., 2011).

1.9.5. Le astacidine

Le astacidine rappresentano un particolare gruppo di peptidi antimicrobici ricchi in prolina e arginina. Diverse astacidine sono state identificate nei gamberi di acqua dolce: astacidina 1, un peptide contenente 16 residui amminoacidici, è stata isolata dal plasma di *P. leniusculus* e ha mostrato attività antimicrobica nei confronti dei batteri Gram-positivi (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus* Cowan 1, *S. aureus*, *JC-1*, *M. luteus*) e Gram-negativi (*S. flexneri*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) (Lee et al., 2003).

Successivamente, diversi peptidi sintetici sono stati ottenuti da astacidina 1, tra i quali SP-1, SP-2, SP-3 e SP-4 e che hanno mostrato una debole attività antimicrobica. Tra questi peptidi, soltanto il peptide SP-1 ha manifestato un'attività antibatterica simile all'originale astacidina nei confronti dei batteri Gram-positivi come *B. megaterium*, *B. subtilis* e *M. luteus* mentre l'attività si è rivelata poco significativa verso i batteri Gram-negativi.

Un altro peptide, costituito da 14 amminoacidi e definito astacidina 2, è stato isolato dall'emolinfa del gambero di acqua dolce *P. leniusculus* e ha mostrato un'ampia attività antimicrobica verso i batteri Gram-positivi (*S. aureus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*) e Gram-negativi (*S. flexneri*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) (Jiravanichpaisal et al., 2007).

Peptidi con attività simile all'astacidina sono stati osservati anche in *P. clarkii*, in particolare il peptide *PcAst* il quale ha mostrato similarità con astacidina 2 di *P. leniusculus*, con notevole azione antimicrobica nei confronti dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi e scarsa verso *B. subtilis* e *M. luteus* (Shi et al., 2014). Inoltre, è stato osservato che il peptide sintetico ottenuto da *PcAst*, e denominato *SPcAst* è in grado di legarsi ai componenti della parete cellulare batterica come il peptidoglicano, il lipopolisaccaride e acido lipoteicoico, sebbene siano state riscontrate delle differenze nell'attività antimicrobica probabilmente dovute alla diversa origine dei due peptidi: astacidina 2 è un peptide antimicrobico naturale isolato dall'emolinfa (Jiravanichpaisal et al., 2007) mentre *SPcAst* è un peptide sintetico che non possiede le modifiche post-traslazionali (Shi et al., 2014).

Recentemente, quattro nuovi peptidi antimicrobici ricchi in prolina sono stati individuati nel trascrittoma di *P. clarkii* (Rončević et al., 2020) e denominati *PcAst-1a*, *PcAst-1b/c*, *PcAst-2* e *PcAst-3*. Questi peptidi sono strettamente correlati con astacidina 1 e sono codificati da numerosi geni astacidina. In particolare, è stato osservato che tre peptidi sintetici *PcAst* (*PcAst*



1a-1b/1c *PcAst-2*) hanno mostrato notevoli proprietà antimicrobiche nei confronti di *S. aureus*, *E. coli* e *A. baumannii* (Rončević et al., 2020) in relazione ai differenti terreni di coltura: è stato osservato che l'attività antimicrobica di *PcAst-1a-1b/1c* e *PcAst-2* è bassa nel terreno di coltura MH ($< 32 \mu\text{M}$) mentre in un terreno costituito soltanto dal 20% di MH l'attività antimicrobica varia da scarsa ($\geq 32 \mu\text{M}$ per *PcAst-1a*) a selettivamente attiva (*PcAst-2* nei confronti di *A. baumannii*) fino a potente nei confronti di un ampio spettro di batteri Gram-positivi e Gram-negativi (*PcAst-1b/c*) (Rončević et al., 2020).



Capitolo II

Analisi della frazione proteica degli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*

2.1. Introduzione

L'obiettivo dell'attività di ricerca descritta in questo capitolo è stato quello di caratterizzare i potenziali peptidi antimicrobici, anche con attività antitumorale, presenti negli estratti naturali proteici ricavati dalla fanerogama marina *P. oceanica* e dal crostaceo di acqua dolce *P. clarkii*, attraverso:

- (i) saggi microbiologici per valutare la Minima Concentrazione Inibente (MIC)
- (ii) saggi di inibizione della formazione del biofilm
- (iii) saggi di valutazione dell'attività antitumorale

La maggior parte degli studi effettuati su *P. oceanica* hanno esaminato il potenziale antimicrobico dei metaboliti secondari mentre nessuno studio ha attualmente indagato la presenza di eventuali peptidi antimicrobici, con attività antibiofilm. L'attività antitumorale di questa fanerogama marine è stata invece affrontata in pochissimi studi e i risultati ottenuti in tali indagini meritano una particolare attenzione (Barletta et al., 2015; Cornara et al., 2018).

Per il crostaceo di acqua dolce *P. clarkii*, sono stati svolti numerosi studi che hanno dimostrato l'esistenza di peptidi antimicrobici ricavabili dall'emolinfa e dagli emociti di tale organismo, ma in nessun studio è stata analizzata la potenziale attività antibiofilm delle molecole bioattive ricavate da questo organismo.

Le analisi finalizzate alla valutazione dell'attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale degli estratti naturali ricavati dalle due specie acquatiche sono state svolte in collaborazione con il Prof. Domenico Schillaci e con il Prof. Claudio Luparello, entrambi del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo.

2.2. Materiali e metodi

2.2.1. Attività di campionamento e preparazione degli estratti naturali

I campioni di *P. oceanica* e di *P. clarkii* sono stati raccolti tra aprile e giugno 2019, rispettivamente presso Isola delle Femmine (Pa) (Fig. 18) e la diga Rosamarina del Comune di Caccamo (Pa) (Fig. 19).

Per *P. oceanica*, sono state raccolte manualmente dieci piante spiaggiate in seguito a mareggiata, dotate ancora di foglie verdi e di rizomi; inoltre, sono state raccolte anche diverse foglie brune. I campioni sono stati posti all'interno di un contenitore refrigerato a 4°C e trasportati in laboratorio, dove sono stati accuratamente sciacquati con acqua dolce per eliminare i residui sabbiosi. Inoltre, le foglie verdi sono state separate dai rizomi e sono state pulite manualmente al fine di eliminare gli epifiti. Infine, il materiale fogliare e i rizomi sono stati poi racchiusi all'interno di un sacchetto e posto a -80°C.

Per il campionamento degli organismi di *P. clarkii*, sono stati raccolti 42 individui mediante due nasse (Fig. 20) poste in due differenti punti della diga Rosamarina. I crostacei sono stati posti all'interno di un contenitore con acqua dolce e trasportati presso lo stabulario del Dipartimento STEBICEF, sezione di Biologia Animale, all'interno del quale sono stati allestiti quattro acquari di acqua dolce, dotato di pompa per il ricircolo dell'acqua.



Figura 18. Isola delle Femmine (Pa), sito di campionamento di *P. oceanica*.



Figura 19. La diga Rosamarina (Pa), sito di campionamento di *P. clarkii*.



Figura 20. Campionamento di *P. clarkii* mediante nasse.

Successivamente, le foglie (verdi e brune) e i rizomi di *P. oceanica* sono state polverizzate in un mortaio mediante aggiunta graduale di azoto liquido al fine di ottenere delle polveri fini (Fig. 21). Le polveri sono state pesate, raccolte in tubi falcon e infine conservate a -20°C per future analisi.

Il prelievo dell'emolinfa dagli organismi di *P. clarkii* è stato effettuato utilizzando 200 μl di anticoagulante (0,14 M NaCl, 0,1 M glucosio, 30 mM citrato trisodico, 26 mM acido citrico e 10 mM EDTA, pH 4,6). I campioni di emolinfa sono stati in seguito centrifugati a 2200 rpm

per 10 minuti a 4°C, mediante una centrifuga EPPENDORF CENTRIFUGE 5804 R, per separare la frazione degli emociti.

La frazione cellulare ottenuta è stata separata dal surnatante ed entrambi i campioni sono stati conservati a -20°C.

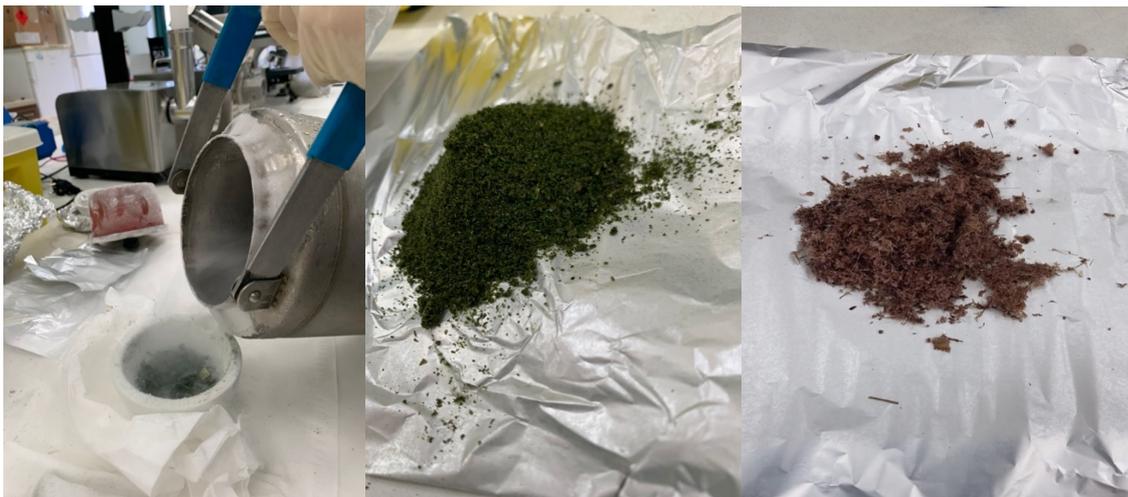


Figura 21. La polverizzazione con azoto liquido delle foglie verdi e dei rizomi di *P. oceanica*.

2.2.2. Estrazione della frazione proteica

Per l'estrazione della frazione proteica sia dai campioni di *P. oceanica* (foglie verdi, foglie brune e rizomi) che di *P. clarkii* (emociti), è stato applicato un protocollo comune.

Per i campioni di *P. oceanica*, l'estrazione della frazione proteica è stata effettuata pesando 1 g di polvere di foglie e rizomi su un'apposita bilancia mentre per i campioni di *P. clarkii* è stata stimata visualmente la quantità di parte cellulare formatasi sul fondo della provetta. A entrambi i tipi di campione è stato aggiunto una quantità di acido acetico (20 mM) in rapporto 3:1 ed un cocktail di antiproteasi in rapporto 1:200.

Successivamente, i campioni di *P. oceanica* sono stati anche omogeneizzati con un omogeneizzatore elettrico per 5 minuti e successivamente sono stati frantumati in un *potter* di vetro per circa 3 minuti al fine di favorire una maggiore rottura delle cellule vegetali; i campioni di *P. clarkii* contenenti gli emociti sono stati, invece, direttamente frantumati nel *potter* di vetro per circa 1 minuto.

Le provette contenenti gli estratti acidi di *P. oceanica* e *P. clarkii* sono state poi bilanciate e centrifugate a 15500 rpm per 20 minuti a 4°C (Beckman).

Terminata la centrifugazione, i surnatanti (lisati cellulari) sono stati recuperati con una pipetta Gilson e trasferiti all'interno di tubi falcon e conservati a -80°C.

Il passaggio successivo del processo di estrazione è stata la liofilizzazione dei surnatanti ottenuti. La liofilizzazione è un processo di essiccamento mediante il quale la rimozione dell'acqua da un campione avviene per diretta conversione del ghiaccio in vapore; pertanto, gli estratti sono stati liofilizzati con un liofilizzatore (CHRIST ALPHA LD plus) (Fig. 22) per due-tre giorni.

Infine, i liofilizzati sono stati risospeso nel minor volume di acqua distillata ed è stata effettuata la misurazione della concentrazione proteica totale dei campioni utilizzando il metodo Bradford seguito dalla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro.



Figura 22. Il liofilizzatore CHRIST ALPHA LD plus.

2.2.3. Determinazione della concentrazione proteica: il metodo Bradford

La concentrazione proteica degli estratti acidi di *P. oceanica* e *P. clarkii* è stata determinata mediante il metodo Bradford. Questo metodo si basa sul legame che si crea tra le proteine e il colorante Blu Brillante Coomassie G-250 (Fig. 23). Nelle condizioni di pH definite dal metodo, il colorante è presente in forma cationica e ha una assorbanza specifica a 465 nm. Quando il colorante si lega a una proteina, si stabilizza la forma anionica protonata del

colorante, la quale presenta un massimo di assorbanza a 595 nm, la lunghezza d'onda valutata (Fig. 24). Si tratta di una procedura altamente riproducibile e rapida, e il legame colorante-proteina mantiene una buona stabilità per circa un'ora.

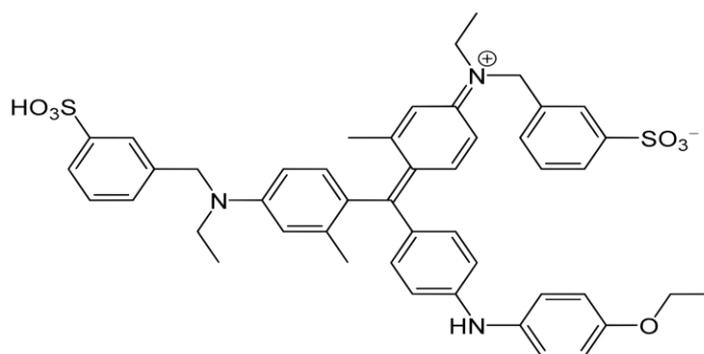


Figura 23. Struttura chimica del Blu Brillante Coomassie.

L'attacco del colorante avviene con una forma macromolecolare che possiede alcuni gruppi reattivi. Le interazioni avvengono essenzialmente con l'arginina piuttosto che con i gruppi amminici primari; gli altri residui basici (tra i quali istidina e lisina) e aromatici (tirosina, fenilalanina e triptofano) danno una risposta meno accentuata in termini di variazione colorimetrica. Il legame tra il colorante e la proteina è attribuibile alle forze di Van der Waals e alle interazioni idrofobiche (Compton e Jones, 1985). Un vantaggio significativo di questo metodo è che è relativamente insensibile alla maggior parte dei reagenti nei quali le proteine vengono comunemente solubilizzate, a cationi come sodio o potassio e a carboidrati come il saccarosio.

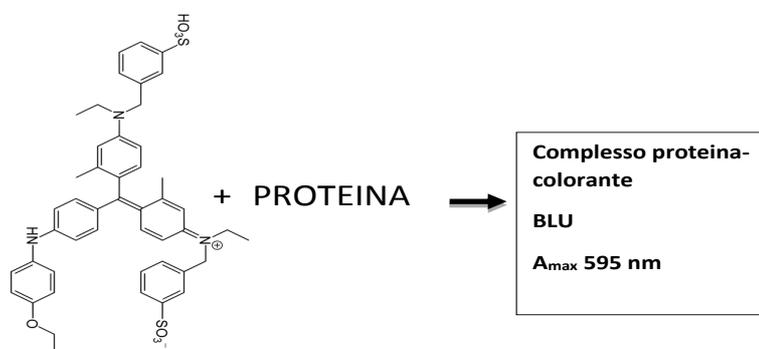


Figura 24. Reazione tra il Blu di Coomassie e la proteina.



Il valore di assorbanza ricavato dallo spettrofotometro in seguito alla lettura dell'estratto acido miscelato con il colorante viene riportato nella curva Bradford dalla quale si deduce la concentrazione proteica complessiva dell'estratto.

2.2.4. Ceppi batterici e condizioni di crescita

Per lo svolgimento dei saggi microbiologici, è stata utilizzata un'ampia gamma di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, oltre a un ceppo fungino, la maggior parte dei quali sono ceppi della collezione American Type Culture Collection (ATCC) mentre alcuni (*Listeria monocytogenes*) sono isolati veterinari. Tali ceppi possono essere distinti in tre principali gruppi: batteri multi-resistenti agli antibiotici (MDR), batteri di interesse dermatologico e batteri di interesse alimentare, oltre ai funghi.

I microrganismi utilizzati sono di seguito riportati:

1) Batteri multi-resistenti agli antibiotici (MDR):

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

2) Batteri di interesse dermatologico:

- *Propionobacterium acnes* ATCC 11827
- *Staphylococcus hominis* ATCC 27844
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813

3) Batteri di interesse alimentare:

- *Listeria monocytogenes* 101
- *Listeria monocytogenes* 103
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19114
- *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

4) Funghi:

- *Candida albicans* ATCC 10231



I ceppi batterici multi-resistenti considerati nello svolgimento dei saggi microbiologici di questa tesi presentano un'elevata resistenza ai più comuni antibiotici utilizzati per il trattamento delle infezioni batteriche, tra i quali la meticillina, la vancomicina, carbapenemi, gli aminoglicosidi e i chinoloni.

I batteri di interesse dermatologico e di interesse alimentare non sono classificati come multi-resistenti sebbene in letteratura si riscontrino diversi studi svolti negli ultimi venti anni e nei quali è stata evidenziata una notevole resistenza di questi ceppi batterici ad alcune classi di antibiotici, in particolare alla penicillina, ampicillina, tetraciclina, gentamicina, eritromicina, rifampicina, clindamicina, ciprofloxacina e fluorochinoloni.

Per i funghi, in particolare per *C. albicans*, gli antibiotici per i quali è stata riscontrata resistenza in studi riportati in letteratura comprendono soprattutto gli azoli, seguiti da polieni, echinocandine e analoghi pirimidinici.

Per la preparazione degli inoculi batterici, sono stati utilizzati tubi contenenti il terreno di crescita TSA, ottenuto miscelando il terreno Tryptic Soy Broth (TSB) con Agar al 2% solidificato: i ceppi sono stati strisciati con ansa sterile e incubati a 37°C per 24 h per favorire la loro crescita.

Per lo svolgimento dei saggi di minima concentrazione inibente (MIC), sono stati utilizzati il terreno di coltura Mueller Hinton (MH), Mueller Hinton 2 (MH2) e Sabouraud (per il ceppo fungino *C. albicans*) mentre per l'esecuzione dei saggi di inibizione della formazione del biofilm sono stati adoperati una miscela di TSB con glucosio al 2% per tutti i ceppi batterici considerati e Sabouraud con glucosio al 2% per il fungo *C. albicans*.

2.2.5. Saggi di attività antimicrobica: valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

I saggi MIC sono stati effettuati utilizzando una piastra a 96 pozzetti e realizzando una serie di diluizioni seriali 1:2 degli estratti acidi liofilizzati di *P. oceanica* e *P. clarkii* negli opportuni terreni di coltura, in modo da ottenere le seguenti concentrazioni espresse in percentuale v/v: 50%, 25%, 12,5%, 6,2%, 3,1% e 1,5% v/v. I saggi sono stati svolti in tre repliche.

Per eseguire il saggio microbiologico, sono stati dapprima preparati i ceppi batterici in tubi contenenti terreno di coltura TSA o Sabouraud (per *C. albicans* ATCC 10231), e incubati a 37°C. In seguito, sono state effettuate delle diluizioni dei ceppi batterici con 5 ml di NaCl 0,9%. Mediante un'ansa sterile monouso, è stata poi prelevato un certo numero di colonie di ogni



ceppo da una coltura di 24h cresciuta in un terreno solido TSA è stemperata nella corrispondente provetta contenente NaCl 0,9% in modo da ottenere una sospensione batterica la cui torbidità è pari a uno standard McFarland 0,5.

Tale sospensione è stata ulteriormente diluita 1:20 in soluzione fisiologica e infine sono stati dispensati 10 µl di ceppi batterici nei pozzetti contenenti le varie concentrazioni dei campioni da saggiare. Inoltre, sono stati inseriti anche un controllo crescita positivo (terreno con batteri), un controllo negativo (solo terreno) e diversi controlli rappresentati dal singolo estratto alle varie concentrazioni testate allo scopo di controllarne l'assorbanza in assenza di inoculo microbico. Infine, le piastre sono state chiuse con parafilm e incubate a 37°C per 24 ore. Successivamente è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei valori di assorbanza a 570 nm. L'assenza di torbidità nei pozzetti della piastra è valutata a partire dall'ultimo pozzetto della diluizione in serie, la cui densità ottica è pari alla metà o inferiore alla media dei pozzetti del controllo crescita positivo.

Per la valutazione dell'attività battericida o fungicida, attraverso il saggio di Minima Concentrazione Battericida (MBC) o Minima Concentrazione Fungicida (MFC) (per il fungo *C. albicans* ATCC 10231), sono state utilizzate delle piastre Petri contenenti terreno di coltura solido TSA e nelle quali sono stati inoculati e spatolati 100 µl prelevati dai pozzetti della piastra utilizzata per la MIC e a partire dal pozzetto nel quale è stata osservata inibizione della crescita batterica. Al termine di questo procedimento, le piastre Petri sono state incubate a 37°C per 24 h al fine di valutarne la crescita microbica.

2.2.6. Saggi di inibizione della formazione del biofilm

I saggi microbiologici per valutare *in vitro* l'inibizione della formazione del biofilm da parte degli estratti acidi di polvere di foglie (verdi e brune) e di rizomi di *P. oceanica*, di emociti e di emolinfa di *P. clarkii* utilizzando il micro-metodo con colorazione con crystal-violetto.

In particolare, il saggio ha consentito di determinare la capacità delle molecole biologicamente attive presenti negli estratti di *P. oceanica* e di *P. clarkii* di interferire con la formazione del biofilm da parte dei batteri patogeni.

Gli esperimenti sono stati effettuati a concentrazioni sub-MIC degli estratti considerati, utilizzando piastre sterili da 96 pozzetti alle quali era stato aggiunto terreno di coltura liquido TSB arricchito con glucosio al 2%, e stimando la capacità dei ceppi batterici di formare un biofilm adeso al fondo del pozzetto. In seguito è stata confrontata la crescita batterica in presenza delle potenziali sostanze antimicrobiche con la crescita ottenuta nei pozzetti di



controllo non trattati (controllo crescita positivo). Questo metodo ha la durata complessiva di quattro giorni e i saggi sono stati svolti in tre repliche.

La capacità di inibire la formazione del biofilm da parte degli estratti di *P. oceanica* e *P. clarkii* è espressa in termini di percentuale di inibizione.

Il protocollo per la realizzazione del saggio microbiologico è riportato di seguito:

GIORNO 1: Si inocula il batterio in una provetta contenente il terreno di coltura solido TSA e si lascia incubare per 24 h a 37°C.

GIORNO 2: Si preleva una piccola aliquota di batteri o del fungo *C. albicans* con un'ansa sterile dalla provetta di TSA o Sabouraud incubata il giorno precedente e si trasferisce in una provetta contenente 5ml di TSB al 2% di glucosio o di Sabouraud al 2% di glucosio (ovvero, 4,5 ml di TSB o Sabouraud e 0.5 ml di glucosio di una soluzione di glucosio al 20%). Si tratta di un passaggio da agar-coltura a brodocoltura. Successivamente si incuba la provetta contenente la brodocoltura per 24 h a 37°C.

GIORNO 3: Si allestisce la piastra a 96 pozzetti. Si riempiono otto pozzetti per ceppo con 200 µl di TSB al 2% di glucosio o di Sabouraud alla stessa percentuale di glucosio come controllo positivo, ai quali viene aggiunta la sospensione batterica e tre pozzetti di 200 µl di TSB o Sabouraud al 2% di glucosio come controllo negativo del terreno. Inoltre, tre pozzetti per ceppo batterico sono riempiti con diverse concentrazioni di TSB o Sabouraud al 2% di glucosio e tenendo conto delle varie percentuali di concentrazione degli estratti di *P. oceanica* e *P. clarkii* (5%, 2%, 1% e 0.5% v/v).

Sotto cappa vengono aggiunti in tutti i pozzetti, ad eccezione del controllo negativo, 2,5 µl di sospensione batterica proveniente dalla brodocoltura preparata il giorno precedente. Successivamente la piastra viene chiusa con parafilm e incubata per 24 h a 37°C.

GIORNO 4: Si svuota la piastra e si effettuano due lavaggi con NaCl 0,9% (200 µl). Si svuota nuovamente e si pone la piastra sottosopra ad asciugare per 10 minuti a 37°C. Successivamente, allo scopo di colorare la biomassa adesa alla superficie, si aggiungono 200 µl di crystal-violetto (preparato con 47,8 ml di NaCl 0,9% e 2,2 ml di crystal-violetto) in tutti i pozzetti, compresi il controllo positivo e negativo. La piastra viene poi incubata per 30 minuti a 37°C.



Trascorso questo tempo, si rimuove il colorante dalla piastra e si procede con due lavaggi con acqua di rubinetto. In seguito a questi lavaggi, si aggiunge in tutti i pozzetti 200 μ l di etanolo per solubilizzare il colorante, quindi si effettua la lettura dell'assorbanza a 600 nm con l'apparecchio *Glomax Plus Detection*.

Si procede poi con il calcolo della percentuale di inibizione della formazione del biofilm attraverso la seguente formula:

$$\% I = \frac{D. O. \text{ controllo crescita} - D. O. \text{ campione}}{D. O. \text{ controllo crescita}}$$

2.3. Saggi di valutazione della vitalità cellulare e analisi di induzione dell'apoptosi su cellule di carcinoma epatico

Per la preparazione delle colture cellulari, sono state utilizzate le cellule di carcinoma epatico HepG2 le quali sono state coltivate in terreno DMEM addizionato con 10% di siero bovino fetale (FBS), 1% di glutammina 2mM, 1% di amminoacidi e 0,5% di antibiotici (penicillina e streptomina) in un incubatore a 37°C e 5% di CO₂. Le cellule, presenti in monostrato, venivano staccate dalla fiasca con tripsina-EDTA (0,5% Tripsina, 0,2% EDTA), contate e piastrate nuovamente alla densità necessaria per il trattamento.

L'analisi del comportamento di crescita della linea cellulare, in condizioni controllo ed in presenza delle diverse preparazioni, è stata effettuata mediante conta cellulare al microscopio dopo colorazione con Trypan Blue. Gli obiettivi fondamentali dell'analisi erano la valutazione della vitalità cellulare, la rilevazione di eventuali e probabili alterazioni morfo-funzionali delle cellule trattate e la individuazione dei valori di IC₅₀ da prendere in considerazione per i successivi saggi biologici e biomolecolari. A tale scopo le cellule della linea HepG2 sono state seminate ad una densità pari a 5550 cellule/ pozzetto in una piastra da 96 pozzetti. Dopo una incubazione di 24 h sono state trattate con differenti concentrazioni degli estratti di foglie verdi, foglie brune e rizomi per 24 h. In seguito ai trattamenti le cellule di ciascun pozzetto sono state tripsinizzate, colorate con Trypan Blue (0,4%) e quindi contate al microscopio, escludendo dal totale le cellule che presentavano colorazione celeste, dovuto all'accumulo intracellulare di Trypan Blue a causa di perdita di integrità del plasmalemma. In base ai valori ottenuti sono stati determinati i valori di IC₅₀ alle 24 h, usando il programma CompuSyn.

Per chiarire se l'effetto citotossico fosse correlato ad un'eventuale insorgenza di apoptosi è stata valutata l'esposizione della fosfatidilserina, principale marcatore di apoptosi precoce, sul

versante extracellulare della membrana plasmatica mediante l'utilizzo del detection kit Annexin V- FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D). A tal scopo le cellule HepG2 sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 88.000 cellule/ pozzetto. Dopo un'incubazione overnight sono state trattate con gli estratti di foglie verdi e rizomi. Dopo 14 e 24 h dall'inizio dei trattamenti le cellule in sospensione e adese sono state raccolte e trattate con 5 µl di Annessina V-FITC e 10 µl di PI a 25°C per 15 minuti e quindi analizzate al citofluorimetro.

2.4. Analisi LC-MS/MS degli estratti naturali di *P. oceanica* e di *P. clarkii*

Gli estratti acidi ottenuti dalla polvere di foglie verdi, foglie brune e di rizomi di *P. oceanica*, e gli estratti ricavati dagli emociti e dall'emolinfa del crostaceo di acqua dolce *P. clarkii* sono stati sottoposti ad analisi LC-MS/MS al fine di ottenere un quadro completo inerente le presenze di potenziali peptidi antimicrobici nella frazione proteica di tali estratti.

Gli estratti acidi sono analizzati in forma liofilizzata in una quantità minima il cui peso è riportato in seguito, insieme alla concentrazione proteica complessiva (Tab. 4).

Tabella 4. Concentrazioni proteiche degli estratti acidi di *P. oceanica* e *P. clarkii*

Estratto	Concentrazione proteica (µg/ml)	Peso (mg)
Polvere di foglie verdi <i>P. oceanica</i>	30	1.10
Polvere di foglie brune <i>P. oceanica</i>	60	1,86
Polvere di rizomi <i>P. oceanica</i>	26	1.40
Estratto di emociti di <i>P. clarkii</i>	22	0,36
Estratto di emolinfa di <i>P. clarkii</i>	1400	1,48

Tali quantità dei vari campioni sono state ridisciolte in una soluzione di acido formico al 5% al fine di ottenere una concentrazione di 2 mg/ml. La concentrazione dei campioni è stata determinata mediante un saggio fluorimetrico utilizzando il Kit Qubit Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Milan, Italy) (Tabella 5).



Tabella 5. Concentrazioni dei vari estratti determinati con il Kit Qubit Protein Assay.

Estratto	Concentrazione ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Polvere di foglie verdi <i>P. oceanica</i>	0,17
Polvere di foglie brune <i>P. oceanica</i>	0,18
Polvere di rizomi <i>P. oceanica</i>	0,13
Estratto acido di emociti di <i>P. clarkii</i>	0,71
Estratto di emolinfa di <i>P. clarkii</i>	0,60

Le soluzioni ottenute sono state ulteriormente diluite al fine di iniettare i campioni con concentrazione di 25 ng/ μl .

I dati di spettrometria di massa sono stati acquisiti utilizzando lo spettrometro Thermo Fisher Scientific Orbitrap Fusion tribrid (Q-OT-qIT) (Thermo Fisher Scientific Bremen, Germany).

L'analisi cromatografica è stata effettuata utilizzando il Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 RLSC nano system (Sunnyvale, CA), caricando 1 μl di miscela peptidica su una colonna C18 Acclaim Nano Trap (1000 μm i.d. x 2 cm, dimensione di particelle: 5 μm , 100 Å). Dopo aver lavato la pre-colonna, con il solvente A (H_2O + 0,1 % FA) a 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ per 3 minuti, la miscela peptidica eluita ha raggiunto la colonna d'analisi (PepMap RSLC C18 Easy-Spray; 75 μm i.d. x 50 cm, dimensione particelle: 2 μm , 100 Å). L'eluizione è stata eseguita a una velocità di flusso di 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ mediante un gradiente lineare del solvente B (ACN + 0,1% FA) in A: 5% di B per 3 minuti, seguito da un incremento di B dal 5% al 65% in 85 minuti, successivamente dal 65% al 95% in 5 minuti e mantenuto al 95% per 5 minuti. Successivamente, l'eluente è passato dal 95% al 5% di B in 10 minuti e mantenuto al 5% di B per ulteriori 15 minuti, allo scopo di re-equilibrare la colonna prima di un'ulteriore analisi.

I peptidi eluiti dalla colonna sono stati convertiti in ioni gassosi mediante ionizzazione electrospray, utilizzando un voltaggio di 1,75 kV e introdotti nello spettrometro di massa attraverso un tubo riscaldato a 275°C. La scansione dei peptidi precursori (Full scan) è stata effettuata da 200 m/z a 1600 m/z, con una risoluzione di 120 K (200 m/z).

L'analisi MS/MS è stata condotta mediante la tecnica di frammentazione HCD. Per la frammentazione sono stati selezionati solo ioni precursori aventi carica compresa tra 1 e 4 e con un'intensità del segnale maggiore di $1 \cdot 10^3$.



2.4.1. Ricerca bioinformatica

I dati sperimentali ottenuti attraverso l'analisi LC-MS/MS sono stati processati utilizzando il software PEAKS X (v. 10.0, Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, ON Canada). La ricerca è stata effettuata utilizzando come database tutte le sequenze di *Viridiplantae* contenute in SwissProt (40656 sequenze proteiche, aggiornato a dicembre 2020) per i campioni di origine vegetale e utilizzando come database tutte le sequenze di *Crustacea* contenute in SwissProt (442 sequenze proteiche, aggiornato a marzo 2020) per i campioni di origine animale. È stato inoltre utilizzato il common *Repository of Adventitious Proteins* (c-RAP) come database dei contaminanti.

I parametri utilizzati per eseguire le ricerche nel database sono stati i seguenti:

- No – enzyme
- Modifiche post-traduzionali variabili: ossidazione metionina; Pyro-Glu all'N-terminale del peptide
- Tolleranza del peptide precursore: 10 ppm
- Tolleranza ioni frammento MS/MS: 0,6 Da
- FDR 1%
- Lunghezza del peptide > n. 6 amminoacidi

Inoltre, al fine di verificare la specificità dei peptidi identificati è stata effettuata una ricerca al BLAST e sono stati controllati tutti gli allineamenti con un'identità del 100%. I peptidi *de novo* identificati sono stati sottoposti a un BLAST utilizzando un database dell'intero UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>) al fine di verificare se tali peptidi sono riconducibili a proteine presenti nel database.



2.5. Risultati e discussione

2.5.1. L'attività antimicrobica degli estratti naturali di *P. oceanica*

I saggi MIC effettuati con gli estratti di rizomi, foglie verdi e brune di *P. oceanica* hanno mostrato una notevole attività antimicrobica nei confronti dei ceppi batterici selezionati e in relazione ai diversi terreni di coltura utilizzati.

I risultati complessivi ottenuti nei saggi sono espressi come valore medio delle repliche effettuate e sono riportati nelle Tabelle 6-11.

E' stato osservato che in terreno di coltura MH, l'estratto di foglie verdi di *P. oceanica* ha mostrato un'azione antimicrobica efficace nei confronti alcuni batteri antibiotico-resistenti, in particolare verso *P. aeruginosa* ATCC 15442 (MIC= 4,1 µg/ml) *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 ed *E. faecalis* ATCC 29212 per i quali è stato riscontrato un valore MIC pari a 6 µg/ml. Proprietà antimicrobiche efficaci dell'estratto sono state osservate anche per un ceppo di interesse dermatologico, *S. agalactiae* ATCC 13813 e per due ceppi batterici di interesse alimentare (*L. monocytogenes* 103 e *L. monocytogenes* ATCC 19114) per i quali sono stati osservati valori MIC pari 6 µg/ml. Una interessante azione antimicrobica è stata osservata anche nei confronti del ceppo fungino *C. albicans* ATCC 10231 in terreno di coltura Sabouraud, con un valore MIC pari a 7,1 µg/ml. Di contro, l'azione battericida dell'estratto proteico di foglie verdi di *P. oceanica* è stata indicativa solamente per *S. aureus* ATCC 25923, con un valore pari a 12 µg/ml mentre per gli altri ceppi batterici considerati l'azione battericida non è stata significativa (Tab. 6).

In terreno di coltura MH2, l'attività antimicrobica dell'estratto proteico di foglie verdi è stata più efficace nei confronti dei batteri antibiotico-resistenti, in particolare *P. aeruginosa* ATCC 15442 (MIC= 3µg/ml), *E. coli* ATCC 25922 (MIC= 3,2 µg/ml) ed *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC= 4,1 µg/ml), oltre che sui ceppi batterici di interesse dermatologico (*S. agalactiae* ATCC 13813, *S. hominis* ATCC 27844 e *S. epidermidis* ATCC 12228), e su un ceppo di interesse alimentare (*L. monocytogenes* ATCC 7644) con valori MIC pari a 4,1 e 4,8 µg/ml, rispettivamente. Una buona attività antimicrobica dell'estratto è stata riscontrata anche per gli altri ceppi batterici considerati mentre l'attività battericida dell'estratto proteico di foglie verdi, in terreno di coltura MH2, è stata significativa solamente per *S. epidermidis* ATCC 12228 e per *S. aureus* ATCC 25923, con valori pari a 8,2 e 12 µg/ml, rispettivamente (Tab. 7).



L'estratto proteico di rizomi di *P. oceanica* ha rivelato un'azione antimicrobica più efficace nei confronti dei ceppi batterici considerati rispetto all'estratto di foglie verdi. In terreno di coltura MH, l'azione antimicrobica di tale estratto è stata maggiore su due batteri antibiotico-resistenti (*P. aeruginosa* ATCC 15442 ed *E. coli* ATCC 25922) e su un ceppo batterico di interesse dermatologico (*P. acnes* ATCC 11827) con valori MIC pari a 2.5 µg/ml, oltre che sul fungo *C. albicans* ATCC 10231 (MIC= 3,5 µg/ml). Proprietà antimicrobiche buone dell'estratto proteico di rizomi di *P. oceanica* sono state riscontrate anche per il batterio antibiotico-resistente *E. faecalis* ATCC 29212 e per il ceppo di interesse dermatologico *S. agalactiae* ATCC, con valori MIC pari a 5 µg/ml. Per tutti gli altri ceppi batterici saggiati è stata osservata un'azione antimicrobica discreta dell'estratto mentre l'attività battericida è risultata significativa soltanto per *P. aeruginosa* ATCC 15442, *C. albicans* ATCC 10231 e *S. aureus* ATCC 25923, con valori pari rispettivamente a 6,6 µg/ml, 8,3 µg/ml, 9 µg/ml e 14,2 µg/ml (Tab. 8).

Rispetto agli estratti proteici di foglie verdi e rizomi, l'estratto proteico di foglie brune di *P. oceanica* ha rivelato un'attività antimicrobica considerevole in terreno di coltura MH nei confronti ceppi batterici antibiotico-resistenti (*S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922 ed *E. faecalis* ATCC 29212) e verso il fungo *C. albicans* ATCC 10231 in terreno di coltura Sabouraud, con valori MIC pari a 6 µg/ml, mentre l'azione battericida dell'estratto non è stata rappresentativa per tutti i ceppi saggiati. Di contro, in terreno di coltura MH2 l'attività antimicrobica dell'estratto è stata uguale per tutti i ceppi batterici considerati, con un valore MIC pari a 6 µg/ml mentre l'attività battericida dell'estratto non è stata indicativa per tutti i ceppi considerati.

Tabella 6. Valori MIC, MBC e MFC in terreno di coltura MH e Sabouraud per l'estratto di foglie verdi di *P. oceanica*.

Ceppo batterico e fungino	MIC (µg/ml)	MBC/MFC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6	12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	4,1	>12
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	>12
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	8,2	>12
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	9,7	>12
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	9,7	>12
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	6	>12
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6	>12
<i>L. monocytogenes</i> 101	9,7	>12
<i>L. monocytogenes</i> 103	6	>12
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19114	6	>12



<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	8,6	>12
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	7,1	>12

Tabella 7. Valori MIC e MBC in terreno di coltura MH2 per l'estratto di foglie verdi di *P. oceanica*.

Ceppo batterico	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8,6	12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	3	>12
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,2	>12
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	5,4	>12
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	4,1	>12
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4,8	8.2
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	4,1	>12
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,1	>12
<i>L. monocytogenes</i> 101	6	>12
<i>L. monocytogenes</i> 103	6	>12
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	9,7	>12
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	4,8	>12

Tabella 8. Valori MIC, MBC e MFC in MH e Sabouraud per l'estratto di rizomi di *P. oceanica*.

Ceppo batterico e fungino	MIC (µg/ml)	MBC/MFC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9,1	14.2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	2,5	6,6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,5	>14,2
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	2,5	>14,2
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	8,3	>14,2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	9,1	>14,2
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	5	8,3
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5	>14,2
<i>L. monocytogenes</i> 101	10,8	>14,2
<i>L. monocytogenes</i> 103	10,8	14,2
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	10,8	>14,2
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	14,2	>14,2
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3,5	9

Tabella 9. Valori MIC e MBC in terreno di coltura MH2 per l'estratto di rizomi di *P. oceanica*.

Ceppo batterico	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8,3	14,2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	2,5	5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,3	14,2
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	2,5	>14,2
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	8,3	14,2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	8,3	14,2
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	2,5	5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2,5	14,2
<i>L. monocytogenes</i> 101	10,8	14,2
<i>L. monocytogenes</i> 103	10,8	14,2
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	14,2	14,2
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	14,2	>14,2

Tabella 10. Valori MIC, MBC e MFC in terreno di coltura MH e Sabouraud per l'estratto di foglie brune di *P. oceanica*.

Ceppo batterico e fungino	MIC (µg/ml)	MBC/MFC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6	>6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	6	>6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	>6
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	>6	>6
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	6	>6
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	>6	>6
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	>6	>6
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6	>6
<i>L. monocytogenes</i> 101	>6	>6
<i>L. monocytogenes</i> 103	>6	>6
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	>6	>6
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	>6	>6
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6	>6

Tabella 11. Valori MIC in terreno di coltura MH2 per l'estratto di foglie brune di *P. oceanica*.

Ceppo batterico	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6	>6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	6	>6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	>6
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	6	>6
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	6	>6
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	6	>6
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	6	>6
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6	>6
<i>L. monocytogenes</i> 101	6	>6
<i>L. monocytogenes</i> 103	6	>6
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	6	>6
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	6	>6

2.5.2. Inibizione della formazione del biofilm con gli estratti naturali di *P. oceanica*

I saggi di inibizione della formazione del biofilm con gli estratti di *P. oceanica* sono stati effettuati su *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *C. albicans* ATCC 10231, utilizzando concentrazioni sub-MIC degli estratti naturali.

L'estratto di foglie verdi di *P. oceanica* ha mostrato una notevole capacità di inibizione della formazione del biofilm su *S. aureus* ATCC 25923 e su *C. albicans* ATCC 10231, contrastando la formazione del biofilm adeso alla superficie dei pozzetti della piastra fino al 62,7%, alla concentrazione 5% v/v dell'estratto, per *S. aureus* ATCC 25923 e fino a 88% per *C. albicans* ATCC 1023, e corrispondente a un valore di 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 12). Non è stata invece osservato alcun effetto significativo dell'estratto sull'inibizione della formazione del biofilm di *P. aeruginosa* ATCC 15442. Poiché sono state ottenute percentuali di inibizione maggiori di 50% per *S. aureus* ATCC 25923, è stato inoltre calcolato per questo ceppo il valore di IC_{50} il quale è risultato pari a 0,75 $\mu\text{g/ml}$.

Rispetto all'estratto di foglie verdi, l'estratto di rizomi ha presentato una maggiore attività di inibizione della formazione del biofilm su *C. albicans* ATCC 10231, con percentuali di inibizione del biofilm adeso ai pozzetti fino al 94,5%, alla concentrazione 5% v/v dell'estratto



e corrispondente a un valore di 1,3 µg/ml. Inoltre, per *C. albicans* ATCC 10231 è stato calcolato anche il valore di IC₅₀ pari a 0,82 µg/ml.

Una buona azione di inibizione della formazione del biofilm su *S. aureus* ATCC 25923, con percentuale di inibizione fino al 91%, solo alla concentrazione 5% v/v corrispondente a un valore di 1,3 µg/ml (Tab. 13). Per le altre percentuali di inibizione considerate, non è stato riscontrato alcun effetto indicativo e pertanto non è stato possibile determinare il valore di IC₅₀. Non è stato osservata alcuna azione di inibizione della formazione del biofilm di *P. aeruginosa* ATCC 15442 da parte dell'estratto di rizomi considerato.

Di contro, l'estratto proteico di foglie brune non ha esercitato alcuna rilevante azione di inibizione della formazione del biofilm sui ceppi batterici considerati.

Tabella 12. Percentuali di inibizione della formazione del biofilm di *S. aureus* ATCC 25923 e *C. albicans* ATCC 10231 in seguito a trattamento con l'estratto proteico di foglie verdi di *P. oceanica*.

Concentrazione estratto (% v/v)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (% inibizione)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 (% inibizione)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (µg/ml)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 (µg/ml)
5	62,7	88	1,5	1,5
2	43,7	80	0,6	0,6
1	36,6	69	0,3	0,3

Tabella 13. Percentuali di inibizione della formazione del biofilm di *S. aureus* ATCC 25923 e *C. albicans* ATCC 10231 in seguito a trattamento con l'estratto proteico di rizomi di *P. oceanica*.

Concentrazione estratto (% v/v)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (% inibizione)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 (% inibizione)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (µg/ml)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 (µg/ml)
5	91	94,5	1,3	1,3
2	n.s.	93,3	n.s.	0,52
1	n.s.	33,7	n.s.	0,26



2.5.3. L'attività antimicrobica degli estratti naturali di *P. clarkii*

I saggi MIC svolti con l'estratto di emociti ed emolinfa del crostaceo di acqua dolce *P. clarkii* hanno mostrato, in generale, un'attività antimicrobica rilevante nei confronti della maggior parte dei ceppi batterici selezionati.

I risultati dei saggi MIC e MBC sono espressi come valore medio delle repliche svolte e sono riportati nelle Tabelle 14-17.

L'estratto proteico di emociti di *P. clarkii* ha mostrato una buona azione antimicrobica in entrambi i terreni di coltura utilizzati. In particolare, in terreno di coltura MH, è stata riscontrata un'azione antimicrobica interessante su tutti i ceppi di interesse dermatologico (*P. acnes* ATCC 11827, *S. hominis* ATCC 27844, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. agalactiae* ATCC 13813), sui ceppi di interesse alimentare (*L. monocytogenes* 101, *L. monocytogenes* 103, *L. monocytogenes* ATCC 19114 e *L. monocytogenes* ATCC 7644), su un batterio antibiotico-resistente (*E. faecalis* ATCC 29212), oltre che sul fungo *C. albicans* ATCC 10231 in terreno di coltura Sabouraud, con valori MIC pari a 11 µg/ml per i ceppi considerati.

Un'attività antimicrobica discreta dell'estratto proteico di emociti è stata osservata invece per i batteri antibiotico-resistenti *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 15442, con valori MIC pari rispettivamente a 16,1 µg/ml e 20,3 µg/ml. Di contro, l'attività battericida di tale estratto non è stata considerevole su tutti i ceppi saggiati (Tab. 14).

In terreno di coltura MH2, l'azione antimicrobica dell'estratto proteico di emociti è stata simile a quella osservata in terreno MH. In particolare, sono state osservate proprietà antimicrobiche più efficaci verso due batteri antibiotico-resistenti (*E. coli* ATCC 25922 ed *E. faecalis* ATCC 29212), dei ceppi di interesse dermatologico (*P. acnes* ATCC 11827, *S. hominis* ATCC 27844, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. agalactiae* ATCC 13813), dei ceppi di interesse alimentare (*L. monocytogenes* 101, *L. monocytogenes* 103, *L. monocytogenes* ATCC 19114 e *L. monocytogenes* ATCC 7644) con valori MIC pari a 11 µg/ml. Una discreta attività antimicrobica dell'estratto è stata osservata per *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 (MIC= 18 µg/ml) (Tab.15).

Rispetto all'estratto di emociti, l'estratto proteico di emolinfa di *P. clarkii* ha presentato una attività antimicrobica differente nei confronti dei ceppi batterici considerati. In particolare, in terreno di coltura Sabouraud, è stata osservata una ragguardevole azione antimicrobica sul fungo *C. albicans* ATCC 10231 (MIC= 175 µg/ml) e su un ceppo di interesse alimentare, *L. monocytogenes* 103 (MIC= 787,5 µg/ml) in terreno MH. L'attività antimicrobica dell'estratto



è stata buona su un batterio antibiotico-resistente (*S. aureus* ATCC 25923) e su un ceppo di interesse alimentare (*L. monocytogenes* 101) mentre l'azione antibatterica è stata discreta sugli altri ceppi saggiati. Di contro, l'estratto proteico di emolinfa non ha mostrato alcuna indicativa azione battericida (Tab.16).

In terreno di coltura MH2, l'estratto proteico di emolinfa ha mostrato una importante azione antimicrobica su *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC= 568,7 µg/ml) e su due ceppi di interesse alimentare (*L. monocytogenes* 101 e *L. monocytogenes* 103), con un valore MIC pari a 962,5 µg/ml. Proprietà antimicrobiche discrete dell'estratto sono state osservate invece osservate per gli altri ceppi batterici saggiati. Di contro, l'attività battericida dell'estratto proteico di emolinfa non è stata notevole sui ceppi considerati (Tab.17).

Tabella 14. Valori MIC, MBC e MFC in terreno di coltura MH e Sabouraud per l'estratto di emociti di *P. clarkii*.

Ceppo batterico e fungino	MIC (µg/ml)	MBC/MFC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16,1	>18
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	20,3	>18
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18	>18
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	11	>11
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	11	>11
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	11	>11
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	11	>11
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> 101	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> 103	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	11	>11
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	11	>11

Tabella 15. Valori MIC e MBC in terreno di coltura MH2 per l'estratto di emociti di *P. clarkii*.

Ceppo batterico	MIC (µg/ml)	MBC(µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18	>18
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	18	>18
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11	>11
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	11	>11
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	11	>11
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	11	>11
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	11	>11
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> 101	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> 103	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	11	>11
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	11	>11

Tabella 16. Valori MIC, MBC e MFC in terreno di coltura MH e Sabouraud per l'estratto di emolinfa di *P. clarkii*.

Ceppo batterico e fungino	MIC (µg/ml)	MBC/MFC (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1050	>1225
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	1225	>1225
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1225	>1225
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	1225	>1225
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	1225	>1225
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1050	>1225
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	1225	>1225
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1225	>1225
<i>L. monocytogenes</i> 101	1050	>1225
<i>L. monocytogenes</i> 103	787,5	>1225
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	1050	>1225
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	1225	>1225
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	175	>1750

Tabella 17. Valori MIC e MBC in terreno di coltura MH2 per l'estratto di emolinfa di *P. clarkii*.

Ceppo batterico	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	568,7	>1225
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	1225	>1225
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1225	>1225
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	1225	>1225
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	1225	>1225
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1225	>1225
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	1225	>1225
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	568,7	>1225
<i>L. monocytogenes</i> 101	962,5	>1225
<i>L. monocytogenes</i> 103	962,5	>1225
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	1050	>1225
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	1225	>1225

2.5.4. Inibizione della formazione del biofilm con gli estratti naturali di *P. clarkii*

Contrariamente agli estratti di *P. oceanica*, l'estratto di emociti ed emolinfa di *P. clarkii* ha invece presentato un'attività di inibizione della formazione del biofilm differente, in seguito allo svolgimento dei saggi a concentrazioni sub-MIC.

In particolare, l'estratto di emociti ha mostrato una maggiore capacità di inibizione della formazione del biofilm di *P. aeruginosa* ATCC 15442, contrastando la creazione fino al 57,2% alla concentrazione 5% v/v, e corrispondente a un valore di 1,1 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 18); inoltre, è stato valutato anche il valore di IC_{50} pari a 10,9 $\mu\text{g/ml}$. Di contro, l'estratto proteico naturale di emociti non ha presentato alcun effetto di inibizione della formazione del biofilm per *S. aureus* ATCC 25923.

L'estratto di emolinfa di *P. clarkii* ha invece mostrato una considerevole attività di inibizione della formazione del biofilm di *S. aureus* ATCC 25923, limitando la formazione fino al 46% alla concentrazione 5% v/v, corrispondente a un valore di 70 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 18); tuttavia, i valori di screening ottenuti sono risultati inferiori a 50% e non hanno consentito di calcolare il valore di IC_{50} . Per *P. aeruginosa* ATCC 15442 non è stata invece evidenziata alcuna inibizione della formazione del biofilm da parte dell'estratto considerato.

Tabella 18. Percentuali di inibizione della formazione del biofilm di *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *S. aureus* ATCC 25923 in seguito a trattamento con gli estratti proteici di *P. clarkii*.

Concentrazione estratto (% v/v)	Estratto proteico di emociti		Estratto proteico di emolinfa	
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 (% inibizione)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (% inibizione)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 ($\mu\text{g/ml}$)
5	57,2	1,1	46	70
2	55,6	0,44	28	28
1	43,7	0,22	30	14

2.6. L'attività antitumorale degli estratti naturali di *P. oceanica*

2.6.1. Inibizione della vitalità/crescita delle cellule HepG2

In un primo set di esperimenti è stato analizzato il comportamento di crescita della linea cellulare HepG2 in presenza delle diverse preparazioni ottenute da foglie verdi, foglie brune e rizomi di *P. oceanica*, mediante colorazione con Trypan Blue e successiva conta cellulare. Come mostrato nelle Figure 25 e 26, le cellule, esposte per 24 h agli estratti di foglie verdi e rizomi a concentrazioni crescenti, andavano incontro ad una riduzione dose-dipendente della vitalità e della proliferazione cellulare. Dall'analisi dei dati ottenuti tramite il programma CompuSyn è stato possibile estrapolare i valori di IC_{50} relativi agli estratti di foglie verdi e rizomi da utilizzare per i successivi e più approfonditi saggi cellulari e molecolari, pari a 83 $\mu\text{g/ml}$ e 11,5 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente. Per quanto riguarda gli estratti da foglie brune, come mostrato in Figura 27, questi non esercitavano alcun effetto sul tasso di sopravvivenza e sul comportamento proliferativo delle cellule di epatocarcinoma, e pertanto non sono stati sottoposti ad ulteriori indagini.

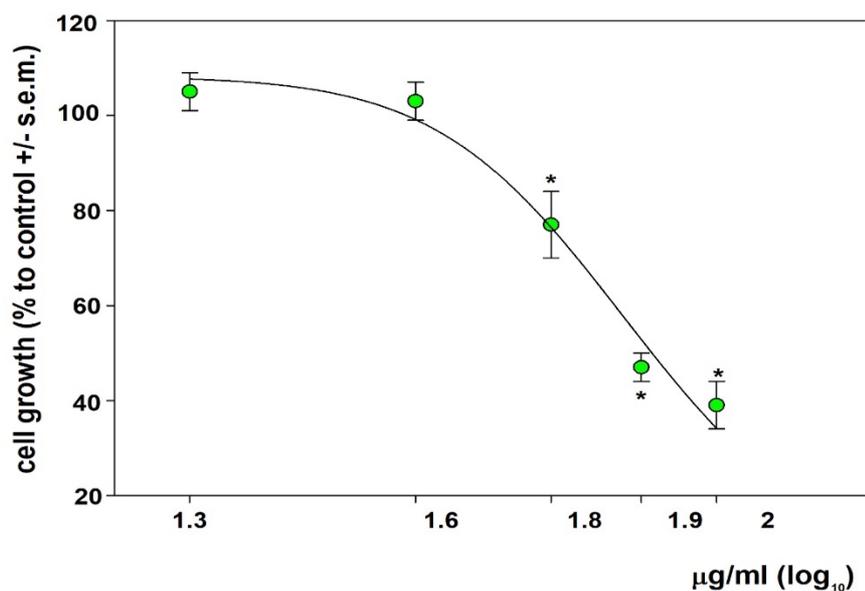


Figura 25. Curva dose-effetto ottenuta dai dati della conta cellulare in seguito a trattamento delle cellule HepG2 per 24h con estratti acquosi di foglie di *P.oceanica*. * $p < 0.05$ (campioni trattati rispetto ai controlli).

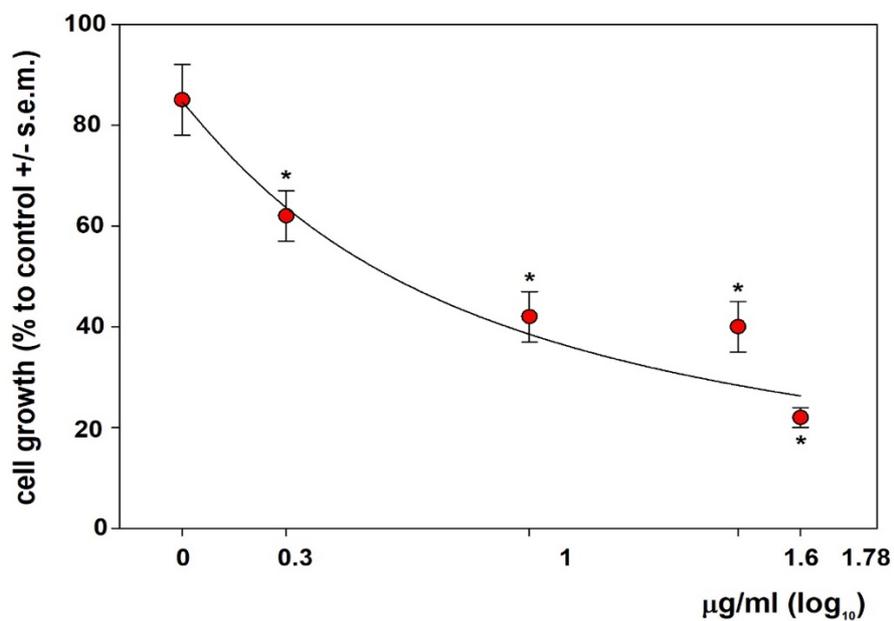


Figura 26. Curva dose-effetto ottenuta dai dati relativi alla conta cellulare in seguito a trattamento delle cellule HepG2 per 24 h con estratti acquosi di rizomi di *P. oceanica*. * $p < 0.05$ (campioni trattati rispetto ai controlli).

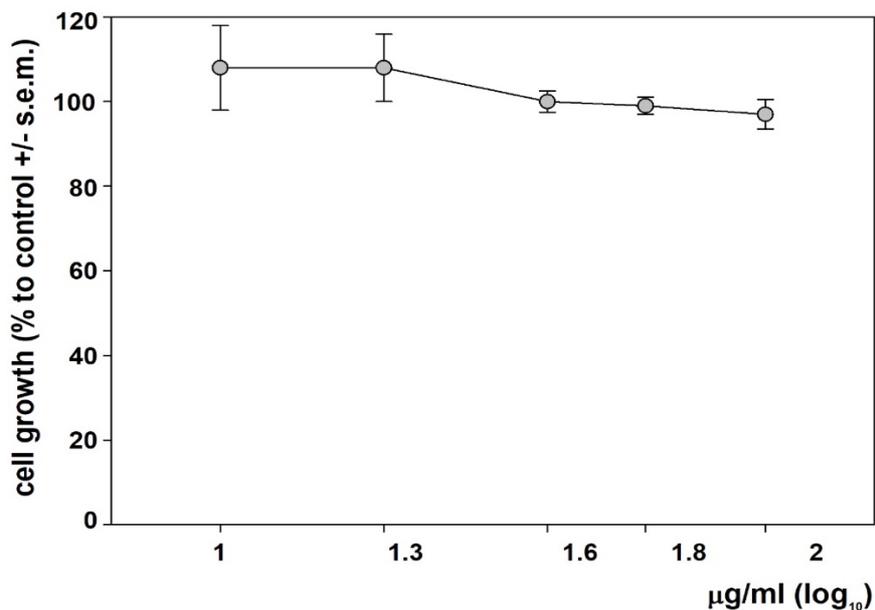


Figura 27. Curva dose-effetto ottenuta dai dati relativi alla conta cellulare in seguito a trattamento delle cellule HepG2 per 24h con estratti acquosi di foglie brune di *P. oceanica*.

2.6.2. Analisi di induzione dell'apoptosi in seguito a trattamento con estratti naturali di *P. oceanica*

Allo scopo di chiarire se l'effetto citotossico fosse, almeno in parte, correlato all'eventuale insorgenza di apoptosi, è stata valutata l'esposizione della fosfatidilserina, principale marcatore di apoptosi precoce, sul versante extracellulare della membrana plasmatica incubando le cellule HepG2 con il reagente Annessina V/FITC insieme al PI, dopo 14 e 24 h di trattamenti con estratti di foglie e rizomi di *P. oceanica*. Come mostrato in Figura 28, l'analisi citofluorimetrica mostrava che precocemente rispetto ai saggi precedenti, cioè dopo 14 h dall'inizio dei trattamenti con gli estratti di foglie verdi e rizomi di *P. oceanica* alle concentrazioni pari ai valori di IC₅₀, la percentuale di cellule vitali (Annessina⁻ PI⁻) scendeva dall'89,29% nel controllo al 72,9% nelle cellule trattate con gli estratti di foglie e al 71,83% nelle cellule trattate con gli estratti di rizomi. La percentuale di cellule in apoptosi precoce (Annessina⁺ PI⁻) invece aumentava notevolmente dal 9,57% nel controllo al 25,4% nelle cellule trattate con estratti di foglie e al 25,67% nelle cellule trattate con gli estratti di rizomi. In tale lasso di tempo, poche cellule si trovavano in uno stadio di apoptosi tardiva (Annessina⁺ PI⁺).

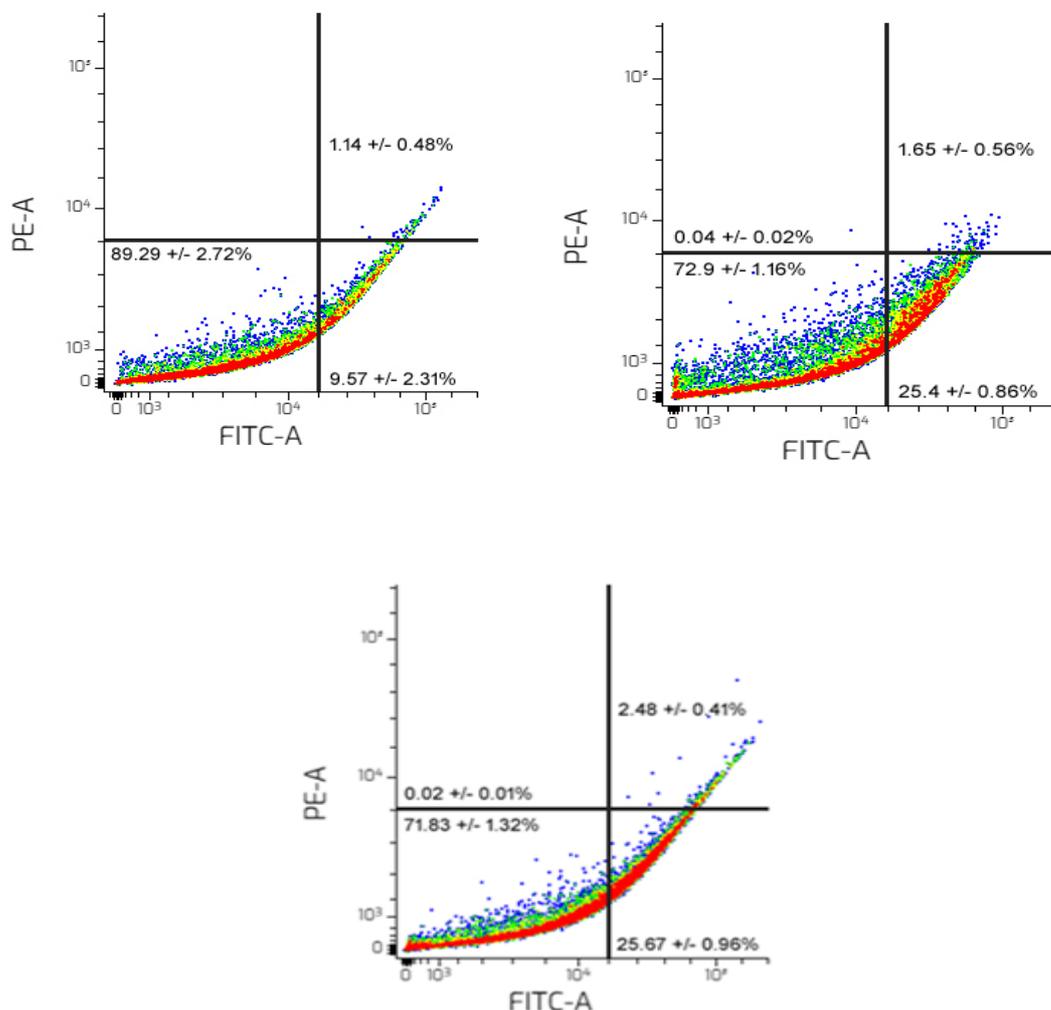


Figura 28. Analisi citofluorimetriche per la determinazione dell'apoptosi in cellule HepG2 controllo (in alto a sinistra) e trattate per 14 h con estratti di foglie (in alto a destra) e rizomi (in basso) di *P. oceanica* a concentrazioni pari ai valori di IC₅₀. I dot plot mostrano un risultato rappresentativo degli esperimenti e le percentuali indicate si riferiscono alla media ± s.e.m di tre misurazioni indipendenti. I quadranti indicano le percentuali delle cellule vitali Annessina⁻ PI⁻ (in basso a sinistra), in apoptosi precoce Annessina⁺ PI⁻ (in basso a destra), in apoptosi tardiva Annessina⁺ PI⁺ (in alto a destra), e necrotiche Annessina⁻ PI⁺ (in alto a sinistra).

Infatti, come mostrato nei plot, tale percentuale si manteneva piuttosto costante e molto limitata (1,14% per i controlli, 1,65% per le cellule trattate con estratti di foglie e 2,65% per le cellule trattate con gli estratti di rizomi).

A conferma di quanto suggerito dai saggi precedenti relativi alla distribuzione del ciclo cellulare, 24 h dopo l'inizio dei trattamenti, come mostrato in Figura 29, la percentuale di

cellule vitali (Annessina⁻ PI⁻) si riduceva dall'83,78% nei controlli, al 6% nelle cellule trattate con estratti di foglie e all'8,37% nelle cellule trattate con estratti di rizomi.

Di contro, la percentuale di cellule in apoptosi tardiva (Annessina⁺ PI⁺) aumentava dal 14,16% nel controllo al 91,88% nelle cellule trattate con estratti di foglie e all'89,17% nelle cellule trattate con estratti di rizomi. La percentuale di cellule trattate in apoptosi precoce (Annessina⁺ PI⁻), come ci si aspettava, appariva avere ormai valori molto bassi e comparabili con quelli delle cellule controllo (1,19% per il controllo, 1,45% per le cellule trattate con estratti di foglie e 1,32% per le cellule trattate con gli estratti di rizomi). Non sono state riscontrate differenze significative tra le popolazioni di cellule necrotiche (Annessina⁻ PI⁺) nelle tre condizioni sperimentali, sia a 14 h che a 24 h dall'inizio dei trattamenti.

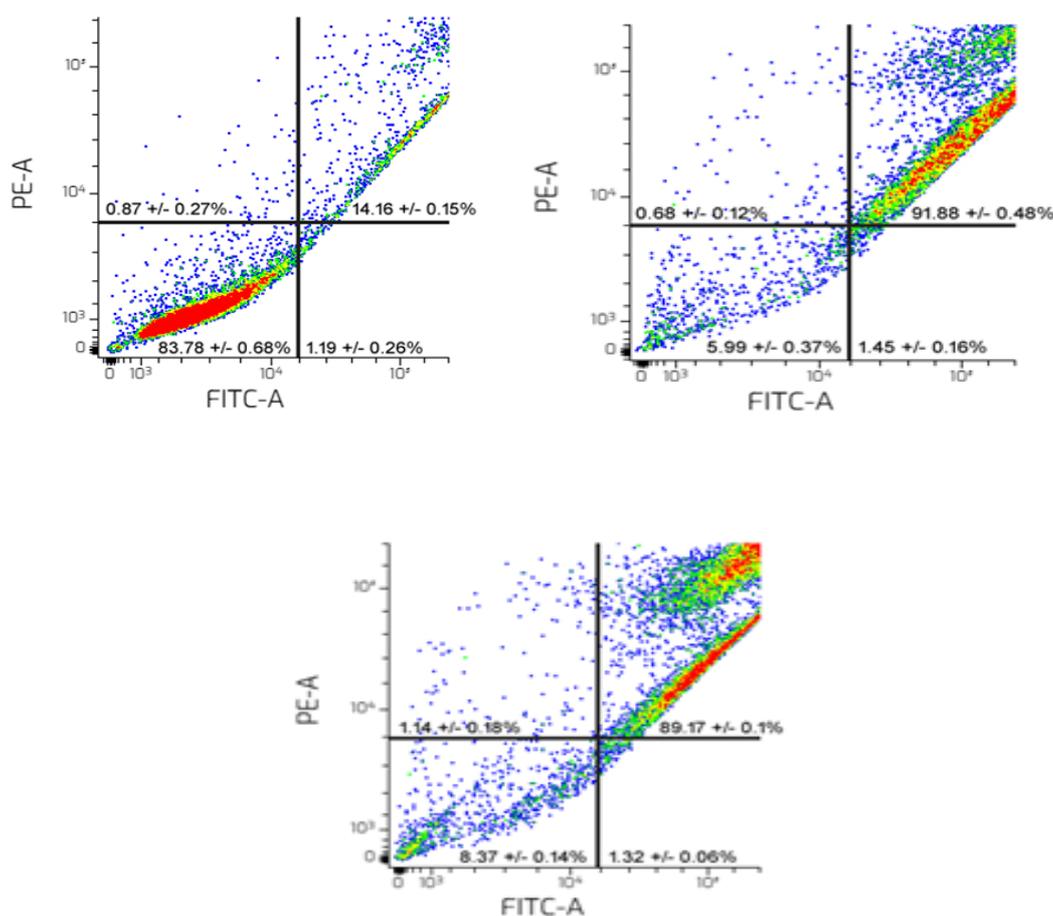


Figura 29. Analisi citofluorimetriche per la determinazione dell'apoptosi in cellule HepG2 controllo (in alto a sinistra) e cellule trattate per 24 h con estratti di foglie (in alto a destra) e rizomi (in basso) di *P. oceanica* a concentrazioni pari ai valori di IC₅₀. I plots mostrano i risultati degli esperimenti e le percentuali riferite alle cellule vitali (in basso a sinistra), alle cellule in apoptosi tardiva (in alto a destra), alle cellule in apoptosi precoce (in basso a destra) e alle cellule necrotiche (in alto a sinistra).

2.7. Identificazione e caratterizzazione delle sequenze peptidiche negli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*

L'analisi spettrofotometrica eseguita sugli estratti acidi di foglie verdi, foglie brune e rizomi di *P. oceanica*, e sugli estratti di emolinfa ed emociti di *P. clarkii* ha consentito l'individuazione di 28 sequenze peptidiche, di cui:

- 4 sequenze peptidiche dall'estratto acido di foglie verdi;
- 2 sequenze peptidiche dall'estratto acido di foglie brune;
- 5 sequenze peptidiche dall'estratto acido dei rizomi;
- 10 sequenze peptidiche dall'estratto acido di parte cellulare di *P. clarkii*;
- 4 sequenze peptidiche dall'estratto di emolinfa di *P. clarkii*.

Le sequenze peptidiche individuate sono riportate in Tabella 19.

L'analisi spettrometrica degli estratti naturali di foglie verdi e rizomi di *P. oceanica* ha evidenziato la presenza di un numero significativo di sequenze peptidiche rispetto agli estratti di foglie brune, nei quali sono state individuate solamente due sequenze. Inoltre, l'analisi di spettrometria di massa ha consentito di individuare numerose sequenze peptidiche nell'estratto di emociti di *P. clarkii* rispetto all'estratto di emolinfa.

Tabella 19. Sequenze peptidiche individuate attraverso l'analisi LC-MS/MS.

Estratto	Sequenza peptidica	Massa
Estratto acido di foglie verdi <i>P. oceanica</i>	MDSGGLLLR	960,5062
	EETFHGVL	930,446
	NVVELNVAPGDK	1253,6616
	VNVEKVVAPAN	1138,6345
Estratto acido di foglie brune <i>P. oceanica</i>	LLVFLHCT	944,5153
	TTLLEAGGLD	988,5077
Estratto acido di rizomi <i>P. oceanica</i>	IVASVGSA	702,3912
	LSVEVEQ	802,4272
	GEFALCSAKT	1025,4851
	VVSALPVVEPTST	1297,7129
	DCDDDCCCGDN	1176,2463
Estratto acido parte cellulare <i>P. clarkii</i>	M(+15.99)FLHGHAV	926,4432
	E(-18.01)GLDDDERL	1042,4568
	SSGYGGYGGGRF	1163,4495



	LNVQAQMLLQ	1156,6274
	NNWTGADCKAATLK	1491,7141
	SHGDSALSSTF	1107,4832
	YGGYFGNR	932,4140
	ETEASLTAALPRW	1443,7358
	LVDSNGALLDELPVAR	1680,9045
	KLLLDNSAEDLEELASHK	2024,0425
Estratto di emolinfa <i>P. clarkii</i>	AADSFGETFAATL	1299,5981
	FDTLSSHLVATD	1304,6248
	ETAPLSGVCF	1022,4742
	FSLVNAVDQTT	1193,5928

Su queste sequenze è stata effettuata una ricerca al database BLAST e al database UniProt al fine di individuare eventuali somiglianze con altre sequenze depositate. La maggior parte delle sequenze ha mostrato, attraverso allineamenti, una identità pari al 100% con altre sequenze proteiche, la maggior parte delle quali sono riconducibili a proteine batteriche.

Inoltre, è stata anche effettuata una ricerca al database APD3 (*The Antimicrobial Peptide Database*) per individuare eventuali similarità con altri peptidi antimicrobici già depositati.

Le caratteristiche di queste sequenze peptidiche selezionate e la loro similarità con altri peptidi antimicrobici depositati nel database APD3 sono riportati nella Tabella 20.

Inoltre, per queste sequenze selezionate è stata svolta anche una ricerca nel database “HLP: *a webserver for predicting half-life of peptides in intestine like-environment*” al fine di individuare ulteriori parametri chimico-fisici fondamentali, caratteristici dei peptidi antimicrobici. Tali parametri descrittivi sono elencati nelle Tabella 21-26.

La maggior parte delle sequenze peptidiche studiate presenta carica netta negativa, ad eccezione di tre sequenze individuate nell’estratto di emociti di *P. clarkii*, le quali sono caratterizzate da una carica netta positiva. Inoltre, tutte le sequenze peptidiche analizzate presentano una stabilità elevata, una potenziale capacità di interazione con la membrana batterica e una similarità con altri peptidi antimicrobici, già depositati nel database APD3, e riconducibili a batteri, rane e insetti.



Tabella 20. Similarità di alcune sequenze peptidiche con altri AMPs secondo il database APD3.

Estratto	Sequenza identificata	Potenziale capacità di interazione con la membrana	Similarità con altri AMPs descritti
Foglie verdi <i>P. oceanica</i>	EETFHGVL	Si	38,46% PG-SPII (anfibi)
	NVVELNAPGDK	Si	46,51% acidocina LCHV (batteriocina da <i>Lactobacillus acidophilus</i>)
	VNVEKVVAPN	Si	36,6% CoB1 (feromone da <i>E. faecalis</i>)
Rizomi <i>P. oceanica</i>	GEFALCSAKT	Si	40% EP-5 (Anellidi, invertebrati)
	DCDDDDCCGDN	Si	45,45 % frazione SAAP (peptide correlato a surfattanti anionici dal ruminante <i>Ovis aries</i>)
Foglie brune <i>P. oceanica</i>	LLVFLHCT	Si	44,44% Gageostatina C (lipopeptide da batteri marini, in particolare <i>Bacillus subtilis</i>)
	TTLLEAGGLD	Si	41,86% Frenatina 1 (rane, anfibi)
Parte cellulare <i>P. clarkii</i>	SSGYGGYGGGRF	Si	50% Crinicepsina
	LNVQAQMLLQ	Si	38,46% Temporina 1Ee (rane, anfibi)
	NNWTGADCKAATLK	Si	42,85% Panurgina (insetti)
	YGGYFGNR	Si	Crinicepsina-1 (insetti)
	KLLDNSAEDLEELASHK	Si	Hb 98 (residuo di emoglobina di mammifero)
Emolinfa <i>P. clarkii</i>	AADSFGETFAATL	Si	38,46% Andricina (anfibi)
	FSLVNAVDQTT	Si	38,46% VmCT2 (scorpioni, artropodi)

Tab. 21. Parametri chimico-fisici delle sequenze peptidiche selezionate delle foglie verdi di *P. oceanica*.

Sequenza peptidica	EETFHGVL	NVVELNAPGDK	VNVEKVVAPN
Peso molecolare teoretico	931,015	1254,405	1139,316
Carica netta	-1,75	-1	0
Punto isoelettrico	5,385	5,723	5,993
Wimley-White whole-residue (kcal/mol)	2,74	5,36	4,92
Indice di Boman (kcal/mol)	0,99	1,21	0,53
Emivita (s)	1,519	3,481	0,404
Stabilità	alta	alta	normale

Tabella 22. Parametri chimico-fisici delle sequenze peptidiche selezionate delle foglie brune di *P. oceanica*.

Sequenza peptidica	LLVFLHCT	TTLLEAGGLD
Peso molecolare teoretico	945,196	989,093
Carica netta	+0,25	-2
Punto isoelettrico	5,960	5,319
Wimley-White whole-residue (kcal/mol)	-2,67	2,04
Indice di Boman (kcal/mol)	-1,97	0,22
Emivita (s)	0,594	0,594
Stabilità	normale	normale

Tabella 23. Parametri chimico fisici delle sequenze peptidiche selezionate di rizomi di *P. oceanica*.

Sequenza peptidica	GEFALCSAKT	DCDDDCCCGDN
Peso molecolare teoretico	1026,176	1177,96
Carica netta	0	-5
Punto isoelettrico	5,878	4,130
Wimley-White whole-residue (kcal/mol)	1,7	5,62
Indice di Boman (kcal/mol)	0,45	4,01
Emivita (s)	1,242	2,172
Stabilità	alta	alta

Tabella 24. Parametri chimico-fisici delle sequenze selezionate degli emociti di *P. clarkii*.

Sequenza peptidica	SSGYGGYGGGRF	LNVQAQMLLQ	NNWTGADCKAATLK
Peso molecolare teoretico	1164,2	1157,403	1492,669
Carica netta	+1	0	+1
Punto isoelettrico	6,228	5,800	6,091
Wimley-White whole-residue (kcal/mol)	-1,88	0,49	2,2
Indice di Boman (kcal/mol)	1,11	-0,02	1,66
Emivita (s)	1,098	3,187	0,733
Stabilità	alta	alta	normale

Tabella 25. Parametri chimico-fisici delle sequenze selezionate degli emociti di *P. clarkii*.

Sequenza peptidica	YGGYFGNR	KLLLDNSAEDLEELASHK
Peso molecolare teoretico	932,992	2025,24
Carica netta	+1	-2,75
Punto isoelettrico	6,360	5,608
Wimley-White whole-residue (kcal/mol)	-1,75	8,89



Identificazione e caratterizzazione di molecole biologicamente attive con attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale in *Posidonia oceanica* e *Procambarus clarkii*

Indice di Boman (kcal/mol)	2	2,15
Emivita (s)	2,198	0,173
Stabilità	alta	normale

Tabella 26. Parametri chimico-fisici delle sequenze selezionate dell'emolinfa di *P. clarkii*.

Sequenza peptidica	AADSFGETFAATL	FSLVNAVDQTT
Peso molecolare teorico	1300,39	1194,309
Carica netta	-2	-1
Punto isoelettrico	5,377	5,474
Wimley-White whole-residue (kcal/mol)	1,53	1,26
Indice di Boman (kcal/mol)	0,38	1,05
Emivita (s)	3,016	0,304
Stabilità	alta	normale



2.8. Conclusioni

I dati microbiologici ottenuti consentono di affermare che gli estratti proteici naturali ricavati dalla fanerogama marina *P. oceanica* e dal crostaceo di acqua dolce *P. clarkii* presentano una considerevole attività antimicrobica nei confronti di alcuni ceppi batterici patogeni.

Sia gli estratti di foglie verdi e brune che di rizomi di *P. oceanica* hanno mostrato una maggiore attività antibatterica verso i ceppi multi-resistenti *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, verso il ceppo dermatologico *S. agalactiae* ATCC 13813 e verso il fungo *C. albicans* ATCC 10231, mentre gli estratti naturali ricavati dal crostaceo *P. clarkii* hanno mostrato proprietà antimicrobiche rilevanti nei confronti dei ceppi dermatologici *P. acnes* ATCC 11827, *S. hominis* ATCC 27844, *S. epidermidis* ATCC 12228 e verso alcuni ceppi di interesse alimentare di *Listeria*, tra cui *L. monocytogenes* 101, *L. monocytogenes* 103 e *L. monocytogenes* ATCC 19114. Inoltre, entrambi gli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii* sono in grado di inibire efficacemente la formazione del biofilm di *S. aureus* ATCC 25923.

Sebbene non siano riportati in letteratura studi basati sull'individuazione di peptidi antimicrobici in *P. oceanica*, l'attività antibatterica riscontrata negli estratti naturali proteici di questa fanerogama marina è analoga all'attività osservata negli estratti lipidici e acquosi dei rizomi di *P. oceanica* da Bernard e Pesando (1989) su diversi ceppi batterici e fungini, e da Berfad et al., (2014) i quali avevano riscontrato una notevole attività antimicrobica degli estratti, in relazione ai diversi solventi utilizzati, nei confronti di *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Inoltre, le proprietà antimicrobiche evidenziate nella frazione proteica degli estratti naturali di *P. oceanica* sono comparabili all'attività riscontrata nella frazione polipeptidica della pianta mediterranea *Charybdis pancratium* (Steinh.) Speta contro *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Cunsolo et al., 2020).

L'attività antibiofilm degli estratti naturali di *P. oceanica* evidenziata nei saggi effettuati non era stata analizzata in precedenza in letteratura nonostante sia stata osservata un'attività simile negli estratti di oli essenziali di rosmarino *Boswellia* spp. (Schillaci et al., 2008).

L'attività antimicrobica evidenziata negli estratti proteici naturali di *P. clarkii* ha presentato aspetti comuni con alcuni studi presenti in letteratura nei quali sono stati descritti diversi gruppi di peptidi antimicrobici isolati dal crostaceo di acqua dolce, sebbene le proprietà antimicrobiche siano state valutate su ceppi batterici differenti (Liu et al., 2016; Chai et al., 2017; Liao et al., 2018; Liu et al., 2018; Du et al., 2019).



Molto interessante è risultata l'attività antitumorale osservata negli estratti naturali di *P. oceanica* nei confronti delle cellule di epatocarcinoma HepG2. In particolare, nelle cellule trattate con l'estratto di foglie verdi della fanerogama marina, dopo 24 h, è stata riscontrata una diminuzione della proliferazione e della vitalità delle cellule e un aumento della percentuale di cellule apoptotiche. Questi aspetti significativi sono in accordo con quanto osservato da Barletta et al., (2015) i quali avevano evidenziato nelle cellule altamente invasive di fibrosarcoma umano HT1080 un'indicativa capacità degli estratti idrofilici di *P. oceanica* di ridurre fortemente sia l'espressione dei geni e delle proteine della gelatina MMP-2 e MMP-9 che di inibire, in modo dose-dipendente, l'attività gelanolitica *in vitro*, oltre a limitare fortemente la migrazione delle cellule HT1080.

Infine, l'analisi di spettrometria di massa ha evidenziato la presenza negli estratti naturali ricavati da *P. oceanica* e da *P. clarkii* di numerose sequenze peptidiche, la maggior parte delle quali presentano similarità con altri peptidi antimicrobici già studiati, e riconducibili a batteri, rane e insetti.

Pertanto, i dati microbiologici e antitumorali suggeriscono la presenza di una rappresentativa frazione polipeptidica con attività antimicrobica e antibiofilm negli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*, e anche antitumorale in *P. oceanica*. Le proprietà bioattive di tali estratti potrebbero essere determinate dalla presenza di diverse sequenze peptidiche, identificate dall'analisi di spettrometria di massa. Queste frazioni polipeptidiche presenti negli estratti naturali della fanerogama marina *P. oceanica* e nel crostaceo di acqua dolce *P. clarkii* potrebbero costituire una potenziale fonte di nuovi peptidi antimicrobici e anticancro, con utili applicazioni in campo farmacologico.



Capitolo III

Peptidi antimicrobici sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii* e analisi bioinformatica

3.1. Introduzione

3.1.1. Descrizione dei peptidi antimicrobici sintetici e dei metodi computerizzati per la creazione di nuovi peptidi

Numerosi peptidi antimicrobici sono stati isolati da diverse fonti naturali, inclusi i microrganismi, le piante, gli insetti, i crostacei, gli animali etc. Tuttavia, un gruppo ristretto di essi è stato sintetizzato per il mercato, a causa di alcuni aspetti negativi che caratterizzano i peptidi naturali (Sarkar et al., 2021). I principali inconvenienti dei peptidi antimicrobici naturali riguardano:

- 1) lunghe sequenze amminoacidiche che sono spesso costose;
- 2) presenza di legami disolfuro che rendono la sintesi di peptidi antimicrobici complessa;
- 3) citotossicità nei confronti delle cellule ospiti;
- 4) breve periodo di stabilità che rende i peptidi antimicrobici più suscettibili alla degradazione della proteasi;
- 5) inattività a concentrazioni saline fisiologiche;
- 6) mancanza di appropriate strategie per l'indirizzamento dei peptidi antimicrobici nei siti di infezione.

Queste problematiche hanno condotto a un notevole interesse per lo sviluppo di peptidi antimicrobici sintetici i quali potrebbero mantenere o incrementare la potenziale attività antimicrobica eludendo gli svantaggi degli analoghi naturali (Sarkar et al., 2021).

Recentemente, diversi approcci sono stati adottati per la creazione dei peptidi sintetici:

- 1) Sintesi basata su modelli: questo processo è focalizzato sulla sintesi *de novo* dei peptidi sintetici, basandosi sulle sequenze dei peptidi naturali al fine di migliorare la loro attività, citotossicità, stabilità proteolitica e tolleranza salina. Questo metodo comprende l'eliminazione di sequenze, la mutazione di specifici residui amminoacidici, l'arricchimento della sequenza primaria con alcuni tipi di residui, alterazione della carica netta, idrofobicità, struttura secondaria dei peptidi creati, fusione di differenti sequenze peptidiche, incorporazione di residui amminoacidici non naturali, di residui amminoacidici D, di frammenti peptidomimetici, ciclizzazione, lipidazione etc. Questo metodo è considerato molto conveniente e comune per il *design* di peptidi sintetici.



- 2) Modellistica biofisica rigorosa: in questo processo, i peptidi sintetici sono creati dapprima mediante un modello e sono poi studiati in un ambiente di membrana idrofobico per ottenere un'idea atomistica dei peptidi creati e della loro attività.
- 3) Screening virtuale: il processo consiste nello screening virtuale del database dei peptidi già esistenti al fine di identificare potenziali sequenze peptidiche. Questo screening potrebbe essere basato sugli elementi della sequenza primaria o sugli elementi della struttura secondaria.

L'eliminazione della sequenza consente di introdurre una fattibilità economica e facilità nella sintesi senza compromettere il potenziale antimicrobico. I miglioramenti nel potenziale antimicrobico sono ottenuti attraverso mutazione/arricchimento con alcuni residui amminoacidici, con l'incremento della carica netta positiva/idrofobicità del peptide, con l'ottimizzazione del bilancio idrofilico/lipofilo etc. (Sarkar et al., 2021). La resistenza dei peptidi antimicrobici alla proteasi è ottenuta mediante introduzione di modificazioni chimiche come la ciclizzazione, la protezione terminale (Jenssen et al., 2006) e l'incorporazione di residui D-amminoacidici (Vunnam et al., 1998; Chen et al., 2006; Jung et al., 2007) o di residui amminoacidici non naturali (Lu et al., 2020) o di frammenti peptidomimetici.

Diversi strumenti computerizzati sono stati sviluppati per predire e produrre sequenze di peptidi antimicrobici ottimizzate (Fig. 30). Tra questi strumenti, si evidenziano i metodi empirici e di intelligenza artificiale (*machine learning*), oltre agli approcci stocastici, il cui obiettivo è l'ottimizzazione dei peptidi attraverso un processo casuale (Porto et al., 2012). In particolare, il metodo basato sull'intelligenza artificiale è considerato uno strumento semplice e utile per un efficiente screening ed ottimizzazione di un piccolo numero di sequenze che potrebbero essere successivamente valutate sperimentalmente (Cardoso et al., 2020). Nell'ambito di questo metodo, particolare attenzione è stata rivolta modello quantitativo di relazione struttura-attività (QSAR) (Mitchell, 2014) il quale utilizza particolari descrittori fisico-chimici per predire l'attività biologica dei peptidi dalla loro sequenza amminoacidica (Hilpert et al., 2008). Oltre a questo metodo, è stato sviluppato anche un approccio computerizzato *de novo*, il quale genera delle sequenze di peptidi antimicrobici senza un modello di sequenza, ma utilizzando la frequenza degli amminoacidi e le preferenze di posizione, garantendo alcune caratteristiche come il peso, l'anfipaticità e la struttura (Porto et al., 2012).

Questo strumento ha permesso la creazione di numerose sequenze caratterizzate da un'ampia diversità nella composizione amminoacidica, nella struttura tridimensionale e nel meccanismo di azione (Hiss et al., 2010). Sulla base del modello *de novo*, sono stati creati diversi strumenti, tra i quali i modelli linguistici. Secondo questo modello, i peptidi antimicrobici possono essere creati utilizzando un linguaggio formale basato su vocabolario (per esempio, i residui amminoacidici) e regole (*patterns* amminoacidici). Inoltre, utilizzando un modello di “grammatica”, è stato proposto che i peptidi antimicrobici potrebbero agire in maniera specifica mediante il riconoscimento dei target intracellulari o agendo direttamente sulla membrana batterica (Cardoso et al., 2020).

Oltre alle metodologie computerizzate citate, sono stati generati anche diversi algoritmi come alternative per la creazione di nuovi peptidi. Questi metodi basati su algoritmi genetici hanno consentito di produrre numerose mutazioni e delezioni in una sequenza target al fine di migliorare l'attività (Kliger, 2010; Fjell et al., 2011).

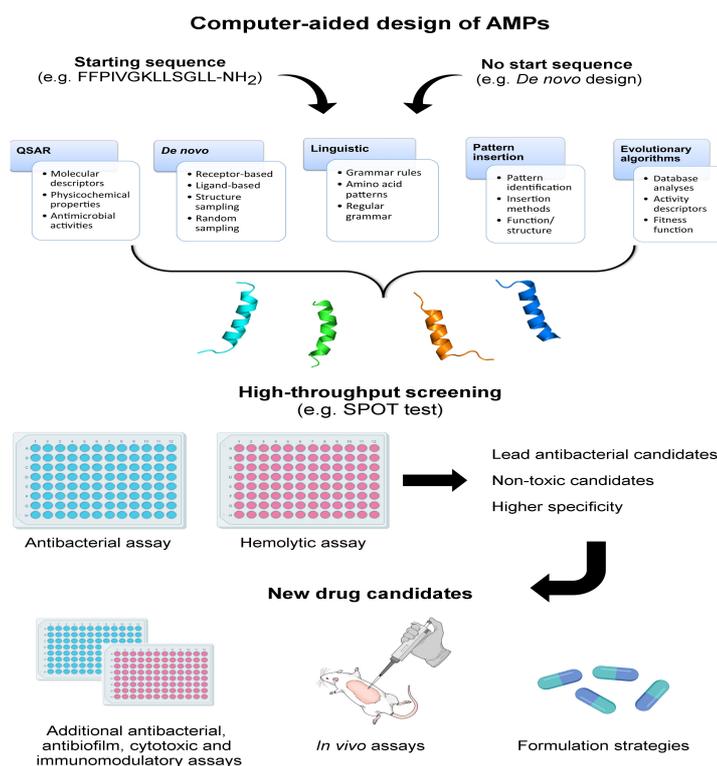


Figura 30. Rappresentazione schematica della creazione di peptidi antimicrobici mediante i differenti metodi computerizzati (Cardoso et al., 2020).



Di notevole interesse sono gli algoritmi basati sul modello dell'intelligenza artificiale tra i quali il supporto macchina vettoriale (SVM), il *fuzzy-K nearest neighbor* (FKNN), il *random forest* (RF) e il network neurale (NN) (LeCun et al., 2015).

Il supporto macchina vettoriale (SVM) è un algoritmo sviluppato per massimizzare una particolare funzione matematica relativa a una determinata raccolta di dati (Noble, 2006). Questo algoritmo è stato utilizzato come strumento di predizione che considera la composizione amminoacidica del peptide, le proprietà chimico-fisiche e le caratteristiche strutturali come principali parametri per classificare i peptidi antimicrobici con elevata accuratezza (per esempio, iAMPpred – Tab. 27) (Meher et al., 2017). Inoltre, questo algoritmo è stato anche utilizzato per mappare l'attività della membrana in sequenze peptidiche inesplorate (Lee et al., 2016).

Il metodo FKNN, derivato dal precedente *K-nearest neighbor* (KNN) è stato successivamente perfezionato per predire l'attività antimicrobica. Xiao et al., (2013) hanno migliorato il metodo FKNN per la classificazione dei peptidi antimicrobici, seguito da un regolare processo di apprendimento multi-livello. Questo metodo, pertanto, consente non soltanto di identificare le potenziali sequenze dei peptidi antimicrobici ma anche di classificarle secondo cinque differenti funzioni (Xiao et al., 2013).

Infine, l'algoritmo NN comprende diversi stimatori di funzioni universali che sono stati utilizzati per identificare *patterns* nelle sequenze e per costruire relazioni struttura-funzione. In particolare, questo modello consiste di numerosi processori semplici connessi, detti neuroni, ciascuno dei quali produce una sequenza di attivazione a valore reale (Schmidhuber et al., 2015). Nella creazione di peptidi antimicrobici sintetici, il metodo NN è stato applicato in algoritmi evolutivi e genetici (Schneider et al., 1998; Fjell et al., 2011), nella generazione casuale di sequenze (Cherkasov et al., 2009) di candidati peptidi antimicrobici, basati su un modello iniziale di sequenza (finalizzato all'ottimizzazione per una determinata funzione) o sulla sintesi *de novo*.

Per la creazione di peptidi sintetici, Souza et al., (2020) hanno elaborato uno schema basato su quattro step fondamentali (Fig. 31). Il primo step consiste nella scelta casuale di una sequenza peptidica dal database NCBI. Nel secondo e terzo step, vengono analizzati, attraverso vari databases, i principali parametri chimico-fisici della sequenza e parametri biologici che consentono di predire la potenziale attività del peptide in esame. Infine, nel quarto step viene definita la potenziale struttura tridimensionale del peptide.



Tabella 27. Riassunto di alcuni database di peptidi antimicrobici e strumenti computerizzati per la creazione e predizione delle sequenze peptidiche (Cardoso et al., 2020).

AMP databases	Description	Link
Antimicrobial Peptide Database (APD)	Comprehensive database for AMPs, including searching tools, calculation and prediction, peptide design, 3D structures, and classification	http://aps.unmc.edu/AP/main.php
Collection of Anti-Microbial Peptides (CaAMP _{R3})	Created to expand and accelerate antimicrobial peptide family-based studies. Includes AMPs prediction tools (SVM, ANN, DA, and RF), sequence alignment, pattern creation, and HMMs-based search	http://www.camp.bicnirrh.res.in
Yet Another Database of Antimicrobial Peptides (YADAMP)	The main difference between YADAMP and other web databases of AMPs is the explicit presence of antimicrobial activity against the most common bacterial strains. Includes segment search, structure information, peptide mapping, and sequence similarity	http://www.yadamp.unisa.it
Biofilm-active AMPs database (BaAMPs)	First database dedicated to AMPs specifically tested against microbial biofilms. Includes peptide list, experiment list, sequence alignment, and physicochemical descriptors calculator	http://www.baamps.it
AMP prediction and design		
iAMPpred	SVM for predicting AMPs and non-AMPs. Three different categories of features has been used, including compositional, structural, and physicochemical features	http://cabgrid.res.in:8080/amppred/
iAMP-L2	A two-level multi-label classifier for identifying antimicrobial peptides and their functional types	http://www.jci-bioinfo.cn/iAMP-2L
AMPep	Sequence-based prediction of antimicrobial peptides using distribution patterns of amino acid properties and RF	https://omictools.com/ampep-tool
Mutator	A computational tool for predicting how single or double amino acid substitutions could improve the therapeutic index of helical AMPs	http://split4.pmfst.hr/mutator/
AntiBP2	Predicts the antibacterial peptides in a protein sequence. Prediction can be done by using SVM-based method using composition of peptide sequences and overall accuracy of this server is ~92.14%	http://crdd.osdd.net/raghava/antibp2/
ClassAMP	Uses RF and SVM to predict the propensity of a protein sequence to have antibacterial, antifungal, or antiviral activity	http://www.bicnirrh.res.in/classamp/
AMPA	Web tool for assessing the antimicrobial domains of proteins, with a focus on the design on new antimicrobial drugs	http://tcoffee.org.cat/apps/ampa/do
DBAASP	Provides users with information on detailed structure (chemical, 3D) and activity for those peptides, for which antimicrobial activity against particular target species have been evaluated experimentally	https://dbaasp.org/home
Joker	An algorithm to design antimicrobial peptides using their language	https://github.com/williamfp7/Joker

AMP: antimicrobial peptide; SVM: support vector machine; RF: random forest; DA: discriminant analysis; ANN: artificial neural network; HMM: hidden Markov models.

Le sequenze peptidiche identificate negli estratti naturali della fanerogama marina *P. oceanica* e nel crostaceo di acqua dolce *P. clarkii* potrebbero costituire dei potenziali *scaffolds* per la creazione di alcuni peptidi sintetici, selezionati attraverso l'analisi bioinformatica, basata su vari databases, dei principali parametri chimico-fisici e biologici.

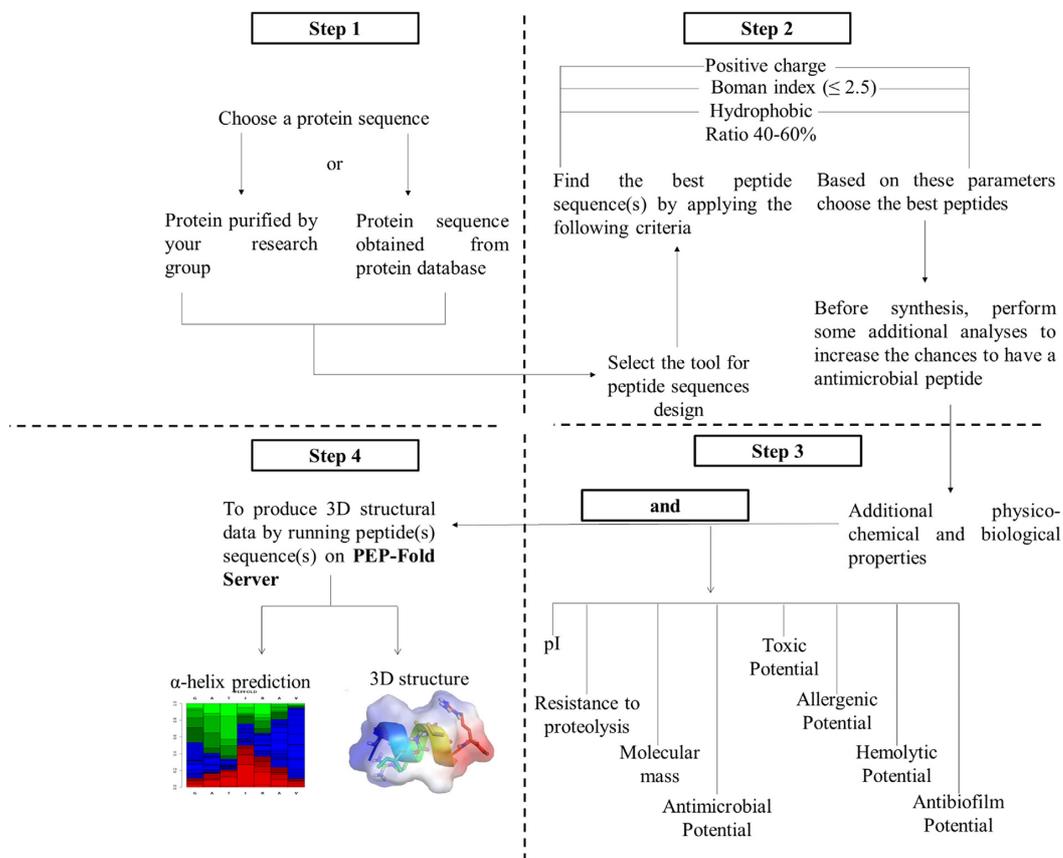


Figura 31. Rappresentazione schematica dei principali step per il *design* dei peptidi antimicrobici sintetici (Souza et al., 2020).



3.1.2. Scopo del lavoro

I saggi microbiologici svolti durante il mio periodo di Dottorato di ricerca hanno consentito di caratterizzare l'attività antimicrobica e antibiofilm di alcune sequenze peptidiche identificate negli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*. In particolare, sono state scelte complessivamente sette sequenze dotate di una lunghezza amminoacidica breve, oltre alla similarità con peptidi antimicrobici già noti in letteratura. Su queste sequenze selezionate, è stata effettuata un'analisi bioinformatica più approfondita al fine di definire le proprietà biologiche. Le sequenze sono state successivamente sintetizzate dall'azienda GenScript Biotech e sono state poi effettuati dei saggi microbiologici in vitro per verificarne le proprietà predette.

Per l'analisi della potenziale attività antimicrobica e antibiofilm dei peptidi sintetici prodotti, sono stati svolti saggi su quattro ceppi batterici antibiotico-resistenti (*S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212) e sul fungo *C. albicans* ATCC 10231.

3.2. Materiali e metodi

3.2.1. Analisi bioinformatica di alcune sequenze peptidiche identificate negli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*

Le sequenze peptidiche scelte per la sintesi sono state indicate come Peptide#1 (FSLVNAVQTT), Peptide#2 (SSGYGGYGGRF), Peptide#3 (NNWTGADCKAATLKT), Peptide#4 (YGGYFGNR), Peptide#5 (EETFHGV), Peptide#6 (NVVELNAPGDK), Peptide#7 (GEFALCSATK). Le prime quattro sequenze sono state identificate negli estratti naturali del crostaceo *P. clarkii*, mentre Peptide#5, Peptide#6 e Peptide#7 sono stati individuati negli estratti di foglie verdi e di rizomi di *P. oceanica*.

Queste sequenze sono state sottoposte a un'analisi bioinformatica più approfondita, utilizzando diversi databases per predire le potenziali proprietà biologiche, utili per la sintesi delle sequenze. I databases utilizzati sono riportati di seguito:

- CellPPD (*Designing of Cell Penetrating Peptides*), un metodo sviluppato *in silico* per predire e creare in maniera efficiente peptidi in grado di penetrare all'interno della cellula (Gautam et al., 2013, 2015);



- dPABBs (*Design Peptides Against Bacterial Biofilms*), un webserver che consente di sviluppare una strategia di predizione per l'identificazione e ottimizzazione di peptidi con attività antibiofilm (Sharma et al., 2016);
- *Predicted Antigenic Peptides Tool*, uno strumento che permette di predire segmenti, all'interno di una sequenza proteica, che potrebbero essere antigenici e determinare una risposta anticorpale (Kolaskar e Togaonkar, 1990);
- HemoPI (*Hemolytic Peptide Identification Server*), uno strumento che consente di predire la potenziale attività emolitica o emotossica di un peptide (Chaudhary et al., 2016);
- ToxinPred (*Designing and Prediction of Toxic Peptides*), un metodo sviluppato *in silico* per predire e creare peptide tossici/non tossici (Gupta et al., 2013, 2015);
- iAMPpred (*Improved Prediction of Antimicrobial Peptides*), un webserver che consente di predire la potenziale attività antimicrobica, antifungina e antivirale di un peptide (Meher et al., 2017);
- PeptideCutter Server, uno strumento che consente di predire i potenziali siti di taglio da parte della proteasi o di altri agenti chimici all'interno di una sequenza proteica (Gasteiger et al., 2005);
- HLP (*A webserver for predicting half-life of peptides in intestine like environment*), un server sviluppato per predire il tempo di emivita di un peptide antimicrobico in ambiente simile all'intestino (Sharma et al., 2014).

3.2.2. Sintesi delle sequenze peptidiche selezionate

Le sequenze peptidiche selezionate sono state inviate all'azienda GenScript Biotech (Olanda) per la sintesi. Per ciascuna sequenza sono state prodotte cinque aliquote di 5 mg, solubili in acqua e una in idrossido di ammonio.

3.2.3. Saggi microbiologici con i peptidi sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii*

Per lo svolgimento dei saggi MIC, finalizzati a valutare *in vitro* la potenziale attività antimicrobica dei peptidi sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii*, predetta dall'analisi bioinformatica, è stata utilizzata una piastra a 96 pozzetti, effettuando attraverso una serie di diluizioni seriali 1:2 dei campioni ottenuti con gli opportuni terreni di coltura (Mueller Hinton



e Mueller Hinton 2) in modo da ottenere le seguenti concentrazioni espresse a 200 µg, 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,2 µg, 3,1 µg, 1,5 µg e 0,7 µg.

I saggi sono stati effettuati in due repliche.

Per eseguire il saggio microbiologico, sono stati dapprima preparati i ceppi batterici *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922 ed *E. faecalis* ATCC 29212 in tubi contenenti terreno di coltura TSA, mentre il ceppo fungino *C. albicans* ATCC 10231 è stato preparato in tubo con terreno di coltura Sabourad con Agar %. Successivamente, gli strisci sono stati incubati a 37°C.

In seguito, sono state effettuate delle diluizioni dei ceppi batterici in tubi contenenti 5 ml di NaCl 0,9% e mediante un'ansa sterile monouso è stata poi prelevato un certo numero di colonie di ogni ceppo da una coltura di 24h, cresciuta in un terreno solido TSA o Sabouraud con Agar 2%, e stemperata nella corrispondente provetta contenente NaCl 0,9% in modo da ottenere una sospensione batterica la cui torbidità è pari a uno standard McFarland 0,5. Tale sospensione è stata ulteriormente diluita 1:20 in soluzione fisiologica e infine sono stati dispensati 10 µl di ceppi batterici nei pozzetti contenenti le varie concentrazioni dei campioni da saggiare. Inoltre, sono stati inseriti anche un controllo crescita positivo (terreno con batteri), un controllo negativo (solo terreno) e diversi controlli rappresentati dal singolo estratto alle varie concentrazioni testate allo scopo di controllarne l'assorbanza in assenza di inoculo microbico. Infine, le piastre sono state chiuse con parafilm e incubate a 37°C per 24 ore. Successivamente è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei valori di assorbanza a 570 nm.

L'assenza di crescita batterica nei pozzetti della piastra è stata valutata considerando l'ultimo pozzetto della diluizione seriale, la cui densità ottica è pari alla metà della media della densità ottica relativa ai pozzetti controllo crescita.

Per la valutazione dell'attività battericida o fungicida, attraverso il saggio di Minima Concentrazione Battericida (MBC) o Minima Concentrazione Fungicida (MFC) (per il fungo *C. albicans* ATCC 10231), sono state utilizzate delle piastre Petri contenenti terreno di coltura solido TSA e nelle quali sono stati inoculati e spatolati 100 µl prelevati da ciascun pozzetto della piastra utilizzata per la MIC e nei quali era stata osservata inibizione della crescita batterica. Al termine di questo procedimento, le piastre Petri sono state incubate a 37 °C per 24 h.



3.2.4. Inibizione della formazione del biofilm con i peptidi sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii*

I saggi di inibizione della formazione del biofilm con i peptidi sintetici ottenuti da *P. oceanica* e *P. clarkii* sono stati effettuati sui quattro ceppi batterici patogeni *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 e sul ceppo fungino *C. albicans* ATCC 10231.

Per lo svolgimento dei saggi, è stato seguito lo stesso protocollo descritto nel Capitolo II per gli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*, utilizzando in questo caso le seguenti concentrazioni sub-MIC: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml e 6,2 µg/ml.

I saggi sono stati svolti in due repliche.

3.2.5. Saggi di valutazione della vitalità cellulare su cellule HepG2

Le cellule della linea HepG2 sono state seminate ad una densità pari a 5550 cellule/ pozzetto in una piastra da 96 pozzetti. Dopo una incubazione di 24 h sono state trattate con differenti concentrazioni (10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml) dei peptidi sintetici ottenuti dagli estratti naturali di *P. oceanica* per 24 h. In seguito ai trattamenti le cellule di ciascun pozzetto sono state tripsinizzate, colorate con Trypan Blue (0,4%) e quindi contate al microscopio, escludendo dal totale le cellule che presentavano colorazione celeste, dovuto all'accumulo intracellulare di Trypan Blue a causa di perdita di integrità del plasmalemma.

3.3. Risultati e discussione

3.3.1. Le proprietà biologiche dei peptidi sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii* ricavate dall'analisi bioinformatica

I risultati dell'analisi bioinformatica sulle sequenze peptidiche selezionate di *P. oceanica* e *P. clarkii* sono riportate in Tabella 28 e 29.

L'analisi ha dimostrato che le sequenze peptidiche non sono in grado di penetrare all'interno della cellula batterica, non presentano attività antibiofilm ad eccezione del Peptide#5.

Per alcune sequenze, in particolare per il Peptide#2 e il Peptide#3 la predizione dell'attività antimicrobica è risultata alta rispetto ai Peptide#1, Peptide#4, Peptide#5 e Peptide#7 per i quali la predizione dell'attività antimicrobica è caratterizzata da una probabilità media. Infine, per il Peptide#6 la predizione dell'attività antimicrobica è molto bassa.

Inoltre, queste sequenze peptidiche hanno un basso potenziale emolitico e nessun potenziale allergico, escluso il Peptide#3 per il quale è stato evidenziato la presenza di un antigene. Infine, tutti i peptidi analizzati presentano una stabilità normale e una emivita di 0,594 s.

Tabella 28. Proprietà biologiche dei peptidi sintetici di *P. clarkii*, ottenute con l'analisi bioinformatica.

Proprietà	Peptide#1	Peptide#2	Peptide#3	Peptide#4
Sequenza	FSLVNADQTT	SSGYGGYGGRF	NNWTGADCKAATLKT	YGGYFGNR
Capacità di Entrare nella cellula ⁽¹⁾	No	No	No	No
Attività antibiofilm ⁽²⁾	No	No	No	No
Potenziale Allergico ⁽³⁾	No	No	Yes	No
Potenziale Emolitico ⁽⁴⁾	0,49	0,49	0,50	0,49
Potenziale Tossico ⁽⁵⁾	No	No	No	No
Potenziale Antimicrobico ⁽⁶⁾	59%	68,9%	86,4%	49,3%
Potenziale Antifungino ⁽⁶⁾	48%	71,5%	88,2%	65,2%
Siti di taglio ⁽⁷⁾				
Tripsina (alto pH)	No	Si	Si	Si
Pepsina (pH=1,3)	Si	Si	Si	Si
Pepsina (pH>2)	Si	Si	Si	Si
Emivita (s) ⁽⁸⁾	0,304	1,098	0,733	2,198
Stabilità ⁽⁸⁾	Normale	Alta	Normale	Alta



Tabella 29. Proprietà biologiche dei peptidi sintetici di *P. oceanica*, ottenute con l'analisi bioinformatica.

Proprietà	Peptide#5	Peptide#6	Peptide#7
Sequenza	EETFHGVL	NVVELNAPGDK	GEFALCSATK
Capacità di Entrare nella cellula ⁽¹⁾	No	No	No
Attività antibiofilm ⁽²⁾	Si	No	No
Potenziale Allergico ⁽³⁾	No	No	No
Potenziale Emolitico ⁽⁴⁾	0,49	0,49	0,48
Potenziale Tossico ⁽⁵⁾	No	No	No
Potenziale Antimicrobico ⁽⁶⁾	30,5%	5,7%	43,1%
Potenziale Antifungino ⁽⁶⁾	5,9%	4,4%	48,8%
Siti di taglio ⁽⁷⁾			
Tripsina (alto pH)	No	Si	Si
Pepsina (pH=1.3)	Si	Si	Si
Pepsina (pH>2)	Si	Si	Si
Emivita (s) ⁽⁸⁾	1,519	3,481	1,242
Stabilità ⁽⁸⁾	Alta	Alta	Alta

(1): CellIPPD database (http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/multi_pep.php).

(2): dPABBs database (<http://ab-openlab.csir.res.in/abp/antibio!lm/protein.php>)

(3): Antigenic Prediction database (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)

(4): HemopI database (<http://crdd.osdd.net/raghava/hemopi/submitfreq.php?ran>)

(5): ToxinPred database (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/design.php>)

(6): iAMPpred database (<http://cabgrid.res.in:8080/amppred/>)

(7): Peptide Cutter server (http://web.expasy.org/peptide_cutter/)

(8): Half Life Prediction server (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/help.html>)

3.3.2. L'attività antimicrobica e antibiofilm dei peptidi sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii*

I saggi MIC con i peptidi sintetici ottenuti da *P. oceanica* e *P. clarkii* svolti sui ceppi batterici *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 e e sul ceppo fungino *C. albicans* ATCC 10231 hanno dimostrato che, contrariamente a quanto predetto dal webserver iAMPpred, nessuno dei peptidi caratterizzati da una probabile attività antibatterica elevata ha presentato indicativi effetti antimicrobici sui ceppi considerati. L'assenza di attività antimicrobica *in vitro* per il Peptide#6 potrebbe, invece, confermare la predizione dell'analisi bioinformatica.

I saggi di inibizione della formazione del biofilm con i peptidi sintetici di *P. oceanica* e di *P. clarkii*, effettuati a concentrazioni sub-MIC, hanno dimostrato che, in accordo con le predizioni del database dPABBs, nessuno dei peptidi sintetici considerati è attivo contro la formazione del biofilm dei ceppi batterici considerati. A differenza della predizione del database dPABBs, una notevole attività è stata invece riscontrata con il Peptide#6, individuato nell'estratto naturale di foglie verdi di *P. oceanica*, il quale si è rivelato attivo nell'inibire la formazione del biofilm di *E. coli* ATCC 25922, fino a una percentuale di inibizione pari a 58,05% alla concentrazione di 50 µg/ml (Tab. 30), con un valore di IC₅₀=49,8 µg/ml. Inoltre, è stata osservata una lieve inibizione della formazione del biofilm da parte del Peptide#6 in *S. aureus* ATCC 25923, con percentuale di inibizione fino a 30,3% alla concentrazione di 50 µg/ml; tuttavia, le percentuali di inibizione ottenute per *S. aureus* ATCC 25923 sono risultate inferiori al 50% e non hanno consentito di determinare il valore di IC₅₀. Di contro, il Peptide#6 non ha mostrato alcun effetto di inibizione della formazione del biofilm in *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *E. faecalis* ATCC 29212.

Tabella 30. Percentuali di inibizione della formazione del biofilm del Peptide#6, calcolate come valore medio delle repliche effettuate, su due ceppi batterici.

Concentrazione Peptide#6 (µg/ml)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (%inibizione)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (% inibizione)
50	58,05	30,3
25	42,8	24,2
12.5	34,85	n.s.

3.3.3. Analisi di valutazione della vitalità cellulare con i peptidi sintetici di *P. oceanica*

Nei saggi di valutazione di vitalità cellulare effettuati è stato analizzato il comportamento della linea cellulare HepG2 in presenza delle diverse concentrazioni di Peptide#7, identificato nell'estratto proteico di rizomi di *P. oceanica*, mediante colorazione con Trypan Blue e successiva conta cellulare. Come mostrato in Fig. 32, le cellule esposte per 24 h a concentrazioni crescenti di Peptide#7 andavano incontro ad una riduzione dose-dipendente della vitalità e della proliferazione cellulare. Per i Peptidi #5 e # 6, individuati nell'estratto di foglie verdi, non è stata invece osservato alcun effetto significativo sul tasso di proliferazione delle cellule HepG2 e pertanto non sono stati sottoposti a ulteriori indagini.

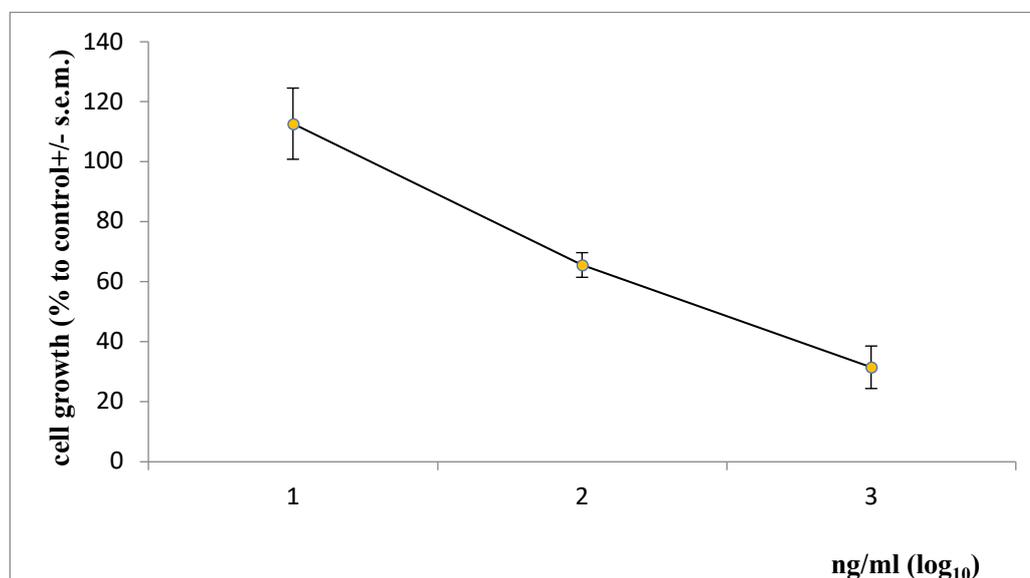


Figura 32. Curva dose-effetto ottenuta dai dati della conta cellulare in seguito a trattamento delle cellule HepG2 per 24 h con il Peptide#7 di *P. oceanica*.

3.3.4 Modificazione della composizione amminoacidica dei peptidi sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii* mediante analisi bioinformatica e nuove sequenze peptidiche derivate

I saggi microbiologici di MIC e di inibizione della formazione del biofilm effettuati con i peptidi sintetici di *P. oceanica* e *P. clarkii* non hanno fornito risultati soddisfacenti in termini di potenziale attività antimicrobica, antifungina e antibiofilm (ad eccezione del Peptide#6). Pertanto, alla luce dei risultati ottenuti, in contrasto con le previsioni bioinformatiche, le sequenze peptidiche sintetizzate sono state nuovamente analizzate mediante i vari databases al

fine di ottenere nuove sequenze più efficaci, apportando delle modificazioni alla composizione amminoacidica e migliorando alcuni parametri chimico-fisici e biologici.

In particolare, attraverso il database *Antimicrobial Peptide Database* (APD3) è stato possibile modificare il contenuto amminoacidico delle sequenze, attraverso la sostituzione di alcuni amminoacidi idrofilici con i corrispettivi idrofobici e incrementando, di conseguenza, il rapporto idrofobico e la carica netta (Tab. 31). Per le sequenze peptidiche considerate è stato così ottenuto un rapporto idrofobico con valori compresi tra 45-50%, una carica netta positiva e un indice di Boman pari o inferiore a 2,25 kcal/mol.

Attraverso gli altri databases, già adoperati per l'analisi bioinformatica delle sequenze peptidiche originarie identificate negli estratti proteici naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*, sono state valutate nuovamente le proprietà biologiche delle sequenze derivate (Tab. 32 e 33).

Tabella 31. Sequenze peptidiche di *P. oceanica* e *P. clarkii* modificate mediante il database APD3.

Sequenza peptidica originaria	Fonte della sequenza	Sequenza peptidica modificata	Rapporto idrofobico (%)	Carica netta	Indice di Boman (kcal/mol)
YGGYFGNR	Emociti <i>P. clarkii</i>	IIIRKGRW	50	+3	2,17
NNWTGADCKAATLK	Emociti <i>P. clarkii</i>	NWWTGARCKAATLK	50	+3	1,46
FSLVNAVQTT	Emolinfia <i>P. clarkii</i>	FHLVWRAGGTF	55	+1.25	0,11
GEFALCSATK	Rizomi <i>P. oceanica</i>	GEFALCKATK	50	+1	0,67
EETFHGVL	Foglie verdi <i>P. oceanica</i>	RKTFWGVL	50	+2	0,97
NVVELNAPGDK	Foglie verdi <i>P. oceanica</i>	WVVRLNAPGKK	45	+3	1,32

Da questa ulteriore valutazione bioinformatica è emerso che per le sequenze peptidiche derivate dalle rispettive sequenze originarie, le predizioni dei databases hanno rivelato una potenziale attività antibiofilm per tutte le sequenze considerate e assenza di potenziale attività tossica e allergica. Inoltre, tali sequenze derivate presenterebbero un'attività antimicrobica e antifungina maggiore rispetto alle sequenze di partenza.

Queste nuove sequenze ottenute, in seguito alla sintesi, necessitano dello svolgimento di saggi *in vitro* per verificare l'esattezza delle predizioni dell'analisi bioinformatica.



Tabella 32. Parametri biologici determinati attraverso analisi bioinformatica delle sequenze peptidiche derivate dalle sequenze originarie di *P. clarkii*.

Proprietà	Peptide#1	Peptide#2	Peptide#3
Sequenza	IIIRKGRW	NWWTGARCKAATLKT	FHLVWRAGGTF
Attività antibiofilm	Si	Si	Si
Potenziale attività tossica	No	No	No
Potenziale attività allergica	No	No	No
Potenziale attività emolitica	0,49	0,48	0,48
Potenziale attività antimicrobica (%)	82	91	41
Potenziale attività antifungina (%)	69	61	14
Siti di taglio:			
Pepsina (pH=1.3)	No	Si	Si
Pepsina (pH>2)	Si	Si	Si
Tripsina	Si	Si	Si
Peso molecolare calcolato (Da)	1041,31	1634,87	1290,49
Punto isoelettrico	12,01	10,06	9,76
Emivita (s)	0,594	0,594	0,594
Stabilità	normale	normale	normale

Tabella 33. Parametri biologici determinati attraverso analisi bioinformatica delle sequenze peptidiche derivate dalle sequenze peptidiche originarie di *P. oceanica*.

Proprietà	Peptide#4	Peptide#5	Peptide#6
Sequenza	GEFALCKATK	RKTFWGVL	WVRLNAPGKK
Attività antibiofilm	Si	Si	Si
Potenziale attività tossica	No	No	No
Potenziale attività allergica	No	No	No
Potenziale attività emolitica	0,50	0,51	0,48
Potenziale attività antimicrobica (%)	86	45	75
Potenziale attività antifungina (%)	87	19	31
Siti di taglio:			
Pepsina (pH=1.3)	Si	Si	Si
Pepsina (pH>2)	Si	Si	Si
Tripsina	Si	Si	Si



Identificazione e caratterizzazione di molecole biologicamente attive con attività antimicrobica, antibiofilm e antitumorale in Posidonia oceanica e Procambarus clarkii

Peso molecolare calcolato (Da)	1067,27	1006,22	1267,54
Punto isolettrico	8,20	11,0	11,7
Emivita (s)	0,594	0,594	0,589
Stabilità	Normale	Normale	Normale



3.4. Conclusioni

I dati ottenuti dall'analisi bioinformatica delle sequenze peptidiche individuate negli estratti naturali della fanerogama marina *P. oceanica* e nel crostaceo di acqua dolce *P. clarkii* consentono di affermare che tali sequenze potrebbero essere caratterizzate da buone proprietà biologiche e chimico-fisiche, sebbene i saggi microbiologici *in vitro* non hanno evidenziato la presenza di alcun effetto antimicrobico e antibiofilm predetto per tutte le sequenze peptidiche considerate sui principali ceppi batterici patogeni. Pertanto questi risultati ottenuti sono in accordo con lo studio svolto da Souza et al., (2020), nel quale è stato riscontrato assenza di attività antimicrobica *in vitro* di due peptidi sintetici creati mediante analisi bioinformatica.

Un dato interessante è invece l'attività di inibizione della formazione del biofilm osservata nel Peptide#6 identificato nell'estratto naturale di foglie verdi di *P. oceanica*, il quale, contrariamente alla predizione del relativo database che aveva evidenziato un'assenza di attività antibiofilm, si è rivelato efficace invece contro la formazione del biofilm di *E. coli* ATCC 25922. Inoltre, il Peptide#7 identificato nell'estratto proteico naturale di rizomi di *P. oceanica*, ha presentato un significativo effetto sulla vitalità e sul tasso di proliferazione delle cellule di carcinoma epatico HepG2.

L'analisi bioinformatica condotta su queste sette sequenze peptidiche identificate negli estratti proteici di *P. oceanica* e *P. clarkii* ha mostrato dei risultati contrastanti rispetto alle predizioni effettuate dai vari databases e soprattutto in contrasto con alcuni studi scientifici recenti presenti in letteratura, caratterizzati da dati *in vitro* coerenti con le previsioni bioinformatiche (Hansen et al., 2020; Qutb et al., 2020).

La successiva caratterizzazione bioinformatica delle sequenze peptidiche derivate dalle sequenze originarie di *P. oceanica* e *P. clarkii* ha consentito di migliorare le proprietà biologiche e chimico-fisiche delle sequenze originarie, con opportune modificazioni alla composizione amminoacidica. Tuttavia, anche per queste nuove sequenze potrebbero emergere delle incogruenze rispetto ai risultati forniti dai databases e pertanto potrebbero essere necessarie diverse verifiche *in vitro* per valutare l'esattezza delle predizioni.

Pertanto, le sequenze peptidiche derivate dalle sequenze originarie potrebbero rappresentare dei nuovi *scaffolds* per la creazione di nuovi peptidi sintetici migliori, con maggiori applicazioni in ambito terapeutico.



Conclusioni generali

Questa tesi di Dottorato si inserisce nell'ambito della tematica della resistenza dei batteri agli antibiotici e della ricerca di nuove potenziali fonti naturali di molecole biologicamente attive, in particolare di peptidi antimicrobici, che possano essere utilizzati in sinergia con gli antibiotici convenzionali al fine di contrastare la diffusa resistenza di alcuni batteri patogeni nel trattamento delle infezioni. In questa prospettiva, i peptidi antimicrobici potrebbero offrire notevoli opportunità, raggiungibili combinando competenze provenienti da settori come la biologia e la chimica, e che concorrono a migliorare la *performance* di tali molecole.

Durante il mio Dottorato di ricerca ho affrontato l'urgente problema della resistenza agli antibiotici di un ampio spettro di batteri patogeni Gram-positivi e Gram-negativi e di un fungo, valutando la potenziale attività antimicrobica e antibiofilm della frazione proteica ricavata sia dagli estratti di foglie verdi, brune e rizomi della fanerogama marina *P. oceanica* presente nel Mar Mediterraneo sia dall'emolinfa e dagli emociti del crostaceo di acqua dolce *P. clarkii*. Pertanto, partendo da due specie differenti, poiché appartenenti a due habitat diversi, ho verificato e dimostrato la potenziale attività antimicrobica e antibiofilm della frazione proteica presente negli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*, oltre all'attività antitumorale osservata negli estratti di foglie verdi e rizomi di *P. oceanica*.

Il quadro che risulta dall'analisi dell'attività antimicrobica e antibiofilm degli estratti è complesso e variabile tra le due specie. I dati microbiologici ottenuti suggeriscono che gli estratti naturali ricavati dalle due differenti specie presentano una buona attività antimicrobica e antibiofilm nonostante sia stata osservata un'azione antibatterica più specifica degli estratti verso alcuni ceppi batterici differenti. In particolare, gli estratti di foglie verdi, foglie brune e rizomi di *P. oceanica* hanno mostrato una maggiore azione antimicrobica verso i ceppi più virulenti *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. agalactiae* ATCC 13813 e verso il fungo *C. albicans* ATCC 10231, mentre gli estratti naturali ricavati dal crostaceo *P. clarkii* hanno mostrato proprietà antimicrobiche maggiori nei confronti dei ceppi dermatologici *P. acnes* ATCC 11827, *S. hominis* ATCC 27844, *S. epidermidis* ATCC 12228 e verso alcuni ceppi di *Listeria*, tra cui *L. monocytogenes* 101, *L. monocytogenes* 103 e *L. monocytogenes* 19114. Inoltre, entrambi gli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii* hanno mostrato una buona azione di inibizione della formazione del biofilm di *S. aureus* ATCC 25923.

I dati ottenuti hanno consentito di ricavare preziose informazioni riguardanti l'azione antimicrobica, antibiofilm e in parte antitumorale degli estratti naturali saggiati sui principali



target batterici considerati, attraverso lo svolgimento di saggi MIC, di inibizione della formazione del biofilm e saggi di vitalità cellulare e induzione di apoptosi, rivelando promettenti potenzialità per l'individuazione di nuovi peptidi antimicrobici e anticancro.

L'identificazione delle sequenze peptidiche negli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*, svolta in collaborazione con i chimici mediante analisi di spettrometria di massa, ha successivamente permesso la sintesi di tali sequenze e la loro caratterizzazione attraverso l'analisi bioinformatica, suggerendo da un lato sia la presenza di potenziali peptidi con attività antimicrobica e antitumorale sia la possibile utilità dei vari server per la caratterizzazione chimico-fisica e biologica di tali molecole e per la creazione di peptidi sintetici.

I saggi microbiologici *in vitro* non hanno fornito risultati significativi sull'attività antimicrobica e antibiofilm dei peptidi sintetici, ad eccezione del Peptide#6, evidenziando alcuni limiti dell'analisi bioinformatica determinati talvolta dall'assenza di riscontro delle potenziali predizioni positive nei saggi *in vitro*, rispetto agli esiti positivi di alcuni studi individuabili in letteratura. L'assenza dell'attività predetta dai databases potrebbe indurre a ipotizzare che le proprietà antimicrobiche osservate negli estratti proteici naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii*, attribuite alle sequenze peptidiche identificate e sintetizzate, potrebbero essere invece determinate da un'azione sinergistica di tali sequenze con altre molecole biologiche eventualmente presenti negli estratti.

L'analisi dell'attività antitumorale degli estratti naturali di *P. oceanica* e del peptide sintetico identificato nell'estratto proteico di rizomi (Peptide#7), condotta in collaborazione con i genetisti, ha contribuito a suggerire che la frazione proteica presente nell'estratto di foglie verdi e il Peptide#7 esercitano un significativo effetto citotossico sulle cellule di epatocarcinoma HepG2, evidenziando anche come tale potenzialità possa essere sfruttata "in campo".

Questa ulteriore applicazione terapeutica necessita di ulteriori approfondimenti al fine di valutare l'indice terapeutico degli estratti proteici naturali e del peptide sintetico attraverso un confronto delle loro concentrazioni efficaci (sia antimicrobiche che antitumorali) con le concentrazioni alle quali potrebbero presentare attività citotossica su diverse linee di cellule sane.

Pertanto, ho voluto applicare le conoscenze acquisite attraverso lo studio di nuove fonti naturali per l'individuazione di nuovi potenziali peptidi antimicrobici per limitare il fenomeno della resistenza agli antibiotici. La creazione di peptidi sintetici, partendo da sequenze individuate negli estratti naturali e migliorate attraverso l'analisi bioinformatica, potrebbe essere



considerato un metodo promettente per favorire la ricerca e lo sviluppo di nuovi peptidi antimicrobici con proprietà biologiche migliori.

Gli *scaffolds* di sequenze peptidiche individuate negli estratti naturali di *P. oceanica* e *P. clarkii* si prestano per ulteriori analisi bioinformatiche più approfondite, condotte attraverso webserver e databases differenti, al fine di migliorare le proprietà biologiche e chimico-fisiche dei peptidi antimicrobici, favorendo una maggiore applicazione in campo farmacologico.



Ringraziamenti

Si ringraziano la Prof.ssa Mirella Vazzana e il Prof. Domenico Schillaci per il lavoro di supervisione svolto e per il supporto scientifico fornito.

Si ringrazia la Dott.ssa Manuela Mauro della Sezione di Biologia animale del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Palermo per il supporto fornito nella preparazione dei campioni.

Si ringrazia il Prof. Claudio Luparello e la Dott.ssa Giulia Abruscato della Sezione di Biologia cellulare del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Palermo per i saggi di attività antitumorale svolti.

Si ringrazia il Prof. Vincenzo Cunsolo del Dipartimento di Chimica organica dell'Università degli Studi di Catania per le analisi di spettrometria di massa dei campioni.

Si ringrazia la Dott.ssa Valentina Catania del Dipartimento di Scienze della Terra e del Mare (DiSTeM) dell'Università degli Studi di Palermo per il contributo scientifico e il prezioso supporto fornito in laboratorio.



Bibliografia

- Adedeji, W. A. (2016). The treasure called antibiotics. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*, 14(2), 56.
- Agostini, S., Desjobert, J. M., & Pergent, G. (1998). Distribution of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Phytochemistry*, 48(4), 611-617.
- Ahmed, C. M., Dabelic, R., Waiboci, L. W., Jager, L. D., Heron, L. L., & Johnson, H. M. (2009). SOCS-1 mimetics protect mice against lethal poxvirus infection: identification of a novel endogenous antiviral system. *Journal of virology*, 83(3), 1402-1415.
- Ahmed, T. A., & Aljaeid, B. M. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug design, development and therapy*, 10, 483.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of medical research*, 36(6), 697-705.
- Alavi, M., & Karimi, N. (2019). Biosynthesis of Ag and Cu NPs by secondary metabolites of usnic acid and thymol with biological macromolecules aggregation and antibacterial activities against multi drug resistant (MDR) bacteria. *International journal of biological macromolecules*, 128, 893-901.
- Alves, D., & Olívia Pereira, M. (2014). Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling*, 30(4), 483-499.
- Amato, S. M., & Brynildsen, M. P. (2014). Nutrient transitions are a source of persisters in *Escherichia coli* biofilms. *PloS one*, 9(3), e93110.
- Amparyup, P., Donpuksa, S., & Tassanakajon, A. (2008). Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(12), 1497-1509.
- Andersen, J. H., Jenssen, H., & Gutteberg, T. J. (2003). Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral research*, 58(3), 209-215.
- Antony, S. P., Bright Singh, I. S., & Philip, R. (2010). Molecular characterization of a crustin-like, putative antimicrobial peptide, Fi-crustin, from the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(1), 216.
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278.
- Arnold, M., Soerjomataram, I., Ferlay, J., & Forman, D. (2015). Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut*, 64(3), 381-387.
- Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M., & Atabe, A. N. (2017). The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), 1-8.
- Bachère, E., Destoumieux, D., & Bulet, P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*, 191(1-3), 71-88.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., & Romestand, B. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological reviews*, 198(1), 149-168.



Bagheri, M., Beyermann, M., & Dathe, M. (2009). Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(3), 1132-1141.

Baptista, R. C., Horita, C. N., & Sant'Ana, A. S. (2020). Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. *Food Research International*, 127, 108762.

Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19(3), 260-265.

Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., ... & Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology*, 10(9), 2331-2343.

Barletta, E., Ramazzotti, M., Fratianni, F., Pessani, D., & Degl'Innocenti, D. (2015). Hydrophilic extract from *Posidonia oceanica* inhibits activity and expression of gelatinases and prevents HT1080 human fibrosarcoma cell line invasion. *Cell Adhesion & Migration*, 9(6), 422-431.

Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, 48(3), 1819-1827.

Bartlett, T. C., Cuthbertson, B. J., Shepard, E. F., Chapman, R. W., Gross, P. S., & Warr, G. W. (2002). Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Marine Biotechnology*, 4(3), 278-293.

Bastian, A., & Schäfer, H. (2001). Human α -defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regulatory peptides*, 101(1-3), 157-161.

Battison, A. L., Summerfield, R., & Patrzykat, A. (2008). Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1-2), 181-187.

Baxter, A. A., Lay, F. T., Poon, I. K., Kvangsakul, M., & Hulett, M. D. (2017). Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(20), 3809-3825.

Beale, K. M., Towle, D. W., Jayasundara, N., Smith, C. M., Shields, J. D., Small, H. J., & Greenwood, S. J. (2008). Anti-lipopolysaccharide factors in the American lobster *Homarus americanus*: Molecular characterization and transcriptional response to *Vibrio fluvialis* challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 3(4), 263-269.

Belaid, A., Aouni, M., Khelifa, R., Trabelsi, A., Jemmali, M., & Hani, K. (2002). In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of medical virology*, 66(2), 229-234.

Benito-González, I., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A., Ballester, A. R., Falcó, I., González-Candelas, L., ... & Martínez-Sanz, M. (2019). In-depth characterization of bioactive extracts from *Posidonia oceanica* waste biomass. *Marine drugs*, 17(7), 409.

Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., ... & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature reviews microbiology*, 13(5), 310-317.

Berfad, M. A., & Alnour, T. M. (2014). Phytochemical analysis and Antibacterial activity of the 5 different extract from the seagrasses *Posidonia oceanica*. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 15(24), 15-18.

Bernard, P., & Pesando, D. (1989). Antibacterial and antifungal activity of extracts from the rhizomes of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile.



- Blair, J., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42-51.
- Bonhomme, D., Boudouresque, C. F., Astruch, P., Bonhomme, J., Bonhomme, P., Goujard, A., & Thibaut, T. (2015). Typology of the reef formations of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*, and the discovery of extensive reefs in the Gulf of Hyères (Pro-vence, Mediterranean). *Sci. Rep. Port-Cros Natl. Park*, 29, 41-73.
- Boudouresque, C. F. (2004). Marine biodiversity in the Mediterranean: status of species, populations and communities. *Travaux scientifiques du Parc national de Port-Cros*, 20, 97-146.
- Boudouresque, C. F., Bernard, G., Bonhomme, P., Charbonnel, E., Diviacco, G., Meinesz, A., ... & Tunesi, L. (2012). *Protection and conservation of Posidonia oceanica meadows* (p. 202). RAMOGE and RAC/SPA.
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., & Fiévet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano letters*, 6(4), 866-870.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature reviews microbiology*, 3(3), 238-250.
- Bu, X., Du, X., Zhou, W., Zhao, X., & Wang, J. (2008). Molecular cloning, recombinant expression, and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese journal of biotechnology*, 24(5), 723-732.
- Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 198(1), 169-184.
- Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of biosciences*, 35(1), 127-160.
- Campoccia, D., Mirzaei, R., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2019). Hijacking of immune defences by biofilms: a multifront strategy. *Biofouling*, 35(10), 1055-1074.
- Cannac, M., Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Pergent, G., & Pasqualini, V. (2006). Effects of fish farming on flavonoids in *Posidonia oceanica*. *Science of the Total Environment*, 370(1), 91-98.
- Cao, P., Du, C., He, X., Zhang, C., & Yuan, C. (2020). Modification of a derived antimicrobial peptide on steel surface for marine bacterial resistance. *Applied Surface Science*, 510, 145512.
- Capone, R., Mustata, M., Jang, H., Arce, F. T., Nussinov, R., & Lal, R. (2010). Antimicrobial protegrin-1 forms ion channels: molecular dynamic simulation, atomic force microscopy, and electrical conductance studies. *Biophysical journal*, 98(11), 2644-2652.
- Cardoso, M. H., Orozco, R. Q., Rezende, S. B., Rodrigues, G., Oshiro, K. G., Cândido, E. S., & Franco, O. L. (2020). Computer-aided design of antimicrobial peptides: are we generating effective drug candidates?. *Frontiers in microbiology*, 3097.
- Carriel-Gomes, M. C., Kratz, J. M., Barracco, M. A., Bachère, E., Barardi, C. R. M., & Simões, C. M. O. (2007). In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(4), 469-472.
- Casciaro, B., Cappiello, F., Loffredo, M. R., Ghirga, F., & Mangoni, M. L. (2020). The Potential of frog skin peptides for anti-Infective therapies: the Case of Esculentin-1a (1-21) NH₂. *Current Medicinal Chemistry*, 27(9), 1405-1419.
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*, 198(1), 116-126.



Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2018). Crayfish immunity—Recent findings. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 94-98.

Čeřovský, V., & Bém, R. (2014). Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals*, 7(3), 251-264.

Chai, L. Q., Li, W. W., & Wang, X. W. (2017). Identification and characterization of two arasin-like peptides in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 70, 673-681.

Chan, S. C., Yau, W. L., Wang, W., Smith, D. K., Sheu, F. S., & Chen, H. M. (1998). Microscopic observations of the different morphological changes caused by anti-bacterial peptides on *Klebsiella pneumoniae* and HL-60 leukemia cells. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 4(7), 413-425.

Chan, W. C., Leyland, M., Clark, J., Dodd, H. M., Lian, L. Y., Gasson, M. J., ... & Roberts, G. C. K. (1996). Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin. *FEBS letters*, 390(2), 129-132.

Chaudhary, K., Kumar, R., Singh, S., Tuknait, A., Gautam, A., Mathur, D., ... & Raghava, G. P. (2016). A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.

Chávez de Paz, L. E., Resin, A., Howard, K. A., Sutherland, D. S., & Wejse, P. L. (2011). Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3892-3895.

Chen, C., Fan, H., Huang, Y., Peng, F., Fan, H., Yuan, S., & Tong, Y. (2014). Recombinant lysostaphin protects mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *BioMed research international*, 2014.

Chen, J., Zhu, Y., Xiong, M., Hu, G., Zhan, J., Li, T., ... & Wang, Y. (2018). Antimicrobial titanium surface via click-immobilization of peptide and its in vitro/vivo activity. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(2), 1034-1044.

Chen, Y., Vasil, A. I., Rehaume, L., Mant, C. T., Burns, J. L., Vasil, M. L., ... & Hodges, R. S. (2006). Comparison of biophysical and biologic properties of α -helical enantiomeric antimicrobial peptides. *Chemical biology & drug design*, 67(2), 162-173.

Cherkasov, A., Hilpert, K., Jenssen, H., Fjell, C. D., Waldbrook, M., Mullaly, S. C., ... & Hancock, R. E. (2009). Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. *ACS chemical biology*, 4(1), 65-74.

Chernysh, S., Cociancich, S., Briand, J. P., Hetru, C., & Bulet, P. (1996). The inducible antibacterial peptides of the Hemipteran insect *Palomena prasina*: Identification of a unique family of prolinerich peptides and of a novel insect defensin. *Journal of Insect Physiology*, 42(1), 81-89.

Cheung, R. C. F., Ng, T. B., & Wong, J. H. (2015). Marine peptides: Bioactivities and applications. *Marine drugs*, 13(7), 4006-4043.

Cho, J. H., Sung, B. H., & Kim, S. C. (2009). Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1564-1569.

Cho, J., Choi, H., & Lee, D. G. (2012). Influence of the N-and C-terminal regions of antimicrobial peptide pleurocidin on antibacterial activity. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(10), 1367-1374.

Choi, K. Y., Chow, L. N., & Mookherjee, N. (2012). Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *Journal of innate immunity*, 4(4), 361-370.

Christie, A. E., Rus, S., Goiney, C. C., Smith, C. M., Towle, D. W., & Dickinson, P. S. (2007). Identification and characterization of a cDNA encoding a crustin-like, putative antibacterial protein from the American lobster *Homarus americanus*. *Molecular immunology*, 44(13), 3333-3337.



- Clifton, L. A., Skoda, M. W., Le Brun, A. P., Ciesielski, F., Kuzmenko, I., Holt, S. A., & Lakey, J. H. (2015). Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir*, 31(1), 404-412.
- Cochran, W. L., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (2000). Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of applied microbiology*, 88(1), 22-30.
- Cocoza, C., Parente, A., Zaccone, C., Mininni, C., Santamaria, P., & Miano, T. (2011). Chemical, physical and spectroscopic characterization of *Posidonia oceanica* (L.) Del. residues and their possible recycle. *biomass and bioenergy*, 35(2), 799-807.
- Cole, A. M., Weis, P., & Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 12008-12013.
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, 151(2), 369-374.
- Cornara, L., Pastorino, G., Borghesi, B., Salis, A., Clericuzio, M., Marchetti, C., ... & Burlando, B. (2018). *Posidonia oceanica* (L.) delile ethanolic extract modulates cell activities with skin health applications. *Marine Drugs*, 16(1), 21.
- Correia, A. M., & Ferreira, Ó. (1995). Burrowing behavior of the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Portugal. *Journal of Crustacean Biology*, 15(2), 248-257.
- Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P., & Martins, M. C. L. (2011). Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta biomaterialia*, 7(4), 1431-1440.
- Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P., & Martins, M. C. L. (2011). Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta biomaterialia*, 7(4), 1431-1440.
- Crandall, K. A., & De Grave, S. (2017). An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *Journal of Crustacean Biology*, 37(5), 615-653.
- Cui, Z., Song, C., Liu, Y., Wang, S., Li, Q., & Li, X. (2012). Crustins from eyestalk cDNA library of swimming crab *Portunus trituberculatus*: Molecular characterization, genomic organization and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 937-945.
- Cunliffe, D., Smart, C. A., Tsibouklis, J., Young, S., Alexander, C., & Vulfson, E. N. (2000). Bacterial adsorption to thermoresponsive polymer surfaces. *Biotechnology Letters*, 22(2), 141-145.
- Cunliffe, D., de las Heras Alarcón, C., Peters, V., Smith, J. R., & Alexander, C. (2003). Thermoresponsive surface-grafted poly (N- isopropylacrylamide) copolymers: effect of phase transitions on protein and bacterial attachment. *Langmuir*, 19(7), 2888-2899.
- Cunsolo, V., Schicchi, R., Chiaramonte, M., Inguglia, L., Arizza, V., Cusimano, M. G., ... & Vitale, M. (2020). Identification of new antimicrobial peptides from Mediterranean medical plant *Charybdis pancratium* (Steinh.) Speta. *Antibiotics*, 9(11), 747.
- Cusimano, M. G., Spinello, A., Barone, G., Schillaci, D., Cascioferro, S., Magistrato, A., ... & Vitale, M. (2019). A Synthetic derivative of antimicrobial peptide Holothuroidin 2 from Mediterranean Sea Cucumber (*Holothuria tubulosa*) in the control of *Listeria monocytogenes*. *Marine drugs*, 17(3), 159.
- Cuthbertson, B. J., Shepard, E. F., Chapman, R. W., & Gross, P. S. (2002). Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics*, 54(6), 442-445.
- Cuthbertson, B. J., Büllsbach, E. E., & Gross, P. S. (2006). Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi. *Chemical biology & drug design*, 68(2), 120-127.
- Cuthbertson, B. J., BüLLESBACH, E. E., Fievet, J., BACHÈRE, E., & Gross, P. S. (2004). A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochemical Journal*, 381(1), 79-86.



Cuthbertson, B. J., Deterding, L. J., Williams, J. G., Tomer, K. B., Etienne, K., Blackshear, P. J., ... & Gross, P. S. (2008). Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3), 167-181.

Daher, K. A., Selsted, M. E., & Lehrer, R. (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of virology*, 60(3), 1068-1074.

Dai, Z. M., Zhu, X. J., & Yang, W. J. (2009). Full-length normalization subtractive hybridization: a novel method for generating differentially expressed cDNAs. *Molecular biotechnology*, 43(3), 257-263.

Danaraj, J., Mariasingarayan, Y., Ayyappan, S., & Karuppiyah, V. (2020). Seagrass *Halodule pinifolia* active constituent 4-methoxybenzoic acid (4-MBA) inhibits quorum sensing mediated virulence production of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104392.

Dartois, V., Sanchez-Quesada, J., Cabezas, E., Chi, E., Dubbelde, C., Dunn, C., ... & Parr Jr, T. R. (2005). Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3302-3310.

Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S., Bowdish, D. M., MacDonald, K. L., Ma, R. C., ... & Speert, D. P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1146-1156.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.

De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., & Lewandowski, Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and bioengineering*, 43(11), 1131-1138.

de Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M. G., Gueguen, Y., & Bachere, E. (2005). Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiological Genomics*, 21(2), 174-183.

Decker, H., & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and comparative immunology*, 28(7-8), 673-687.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., & Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(2), 193-202.

Den Hartog, C. (2006). Seagrass taxonomy and biogeography. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*.

Deresinski, S. (2009). Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas. *Clinical infectious diseases*, 48(8), 1096-1101.

Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., & Bachère, E. (2001). Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47070-47077.

Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., & Bachere, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28398-28406.

Destoumieux, D., Munoz, M., & Bulet, P. (2000a). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(8), 1260-1271.

Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., & Bachère, E. (2000b). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of cell science*, 113(3), 461-469.



- Dever, L. A., & Dermody, T. S. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Archives of internal medicine*, 151(5), 886-895.
- Di Somma, A., Moretta, A., Canè, C., Cirillo, A., & Duilio, A. (2020). Antimicrobial and antibiofilm peptides. *Biomolecules*, 10(4), 652.
- Dodds, D. R. (2017). Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochemical pharmacology*, 134, 139-146.
- Domalaon, R., Findlay, B., Ogunsina, M., Arthur, G., & Schweizer, F. (2016). Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids: evaluation and mechanistic insights against epithelial cancer cells. *Peptides*, 84, 58-67.
- Dong, N., Zhu, X., Chou, S., Shan, A., Li, W., & Jiang, J. (2014). Antimicrobial potency and selectivity of simplified symmetric-end peptides. *Biomaterials*, 35(27), 8028-8039.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Donpudsa, S., Rimphanitchayakit, V., Tassanakajon, A., Söderhäll, I., & Söderhäll, K. (2010). Characterization of two crustin antimicrobial peptides from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of invertebrate pathology*, 104(3), 234-238.
- Du, Z. Q., Li, B., Shen, X. L., Wang, K., Du, J., Yu, X. D., & Yuan, J. J. (2019). A new antimicrobial peptide isoform, Pc-crustin 4 involved in antibacterial innate immune response in fresh water crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 861-870.
- Du, Z. Q., Li, X. C., Wang, Z. H., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2010). A single WAP domain (SWD)-containing protein with antipathogenic relevance in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & shellfish immunology*, 28(1), 134-142.
- Dunne Jr, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155-166.
- Durand, G. A., Raoult, D., & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 53(4), 371-382.
- Dutta, P., & Das, S. (2016). Mammalian antimicrobial peptides: promising therapeutic targets against infection and chronic inflammation. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(1), 99-129.
- Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Aarestrup, F. M., & Hansen, E. B. (2015). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. *PloS one*, 10(12), e0144611.
- Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R., & Sathekge, M. M. (2014). Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed research international*, 2014.
- Eckert, R. (2011). Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Future microbiology*, 6(6), 635-651.
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and drug resistance*, 8, 49.
- Emmanuel Joshua Jebasingh, S., Lakshmikandan, M., Sivaraman, K., & Uthiralingam, M. (2016). Assessment of antibacterial, antifungal property and purification of bioactive compounds from seagrass, *Thalassia hemprichii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(4), 905-910.
- Ennaas, N., Hammami, R., Gomaa, A., Bédard, F., Biron, É., Subirade, M., ... & Fliss, I. (2016). Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: Activity, structure and interaction dynamics with membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 473(2), 642-647.
- Epand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1-2), 11-28.



- Etienne, O., Picart, C., Taddei, C., Haikel, Y., Dimarcq, J. L., Schaaf, P., ... & Egles, C. (2004). Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(10), 3662-3669.
- Fahrner, R. L., Dieckmann, T., Harwig, S. S., Lehrer, R. I., Eisenberg, D., & Feigon, J. (1996). Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chemistry & biology*, 3(7), 543-550.
- Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G., ... & Galdiero, S. (2016). Marine antimicrobial peptides: nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 785.
- Farid, M. M., Marzouk, M. M., Hussein, S. R., Elkhateeb, A., & Abdel-Hameed, E. S. (2018). Comparative study of *Posidonia oceanica* L.: LC/ESI/MS analysis, cytotoxic activity and chemosystematic significance. *J. Mater. Environ. Sci.*, 9, 1676-1682.
- Federle, M. J., & Bassler, B. L. (2003). Interspecies communication in bacteria. *The Journal of clinical investigation*, 112(9), 1291-1299.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1994). Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 33159-33163.
- Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Frontiers in chemistry*, 5, 5.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer*, 49(6), 1374-1403.
- Fernandes, J. M., Kemp, G. D., Molle, M. G., & Smith, V. J. (2002). Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemical Journal*, 368(2), 611-620.
- Figueiredo, J. C., Hsu, L., Hutter, C. M., Lin, Y., Campbell, P. T., Baron, J. A., ... & GECCO. (2014). Genome-wide diet-gene interaction analyses for risk of colorectal cancer. *PLoS genetics*, 10(4), e1004228.
- Fish, R., Kutter, E., Wheat, G., Blasdel, B., Kutateladze, M., & Kuhl, S. (2018). Compassionate use of bacteriophage therapy for foot ulcer treatment as an effective step for moving toward clinical trials. In *Bacteriophage Therapy* (pp. 159-170). Humana Press, New York, NY.
- Fishman, J. A. (2011). Infections in immunocompromised hosts and organ transplant recipients: essentials. *Liver transplantation*, 17(S3 S3), S34-S37.
- Fjell, C. D., Jenssen, H., Cheung, W. A., Hancock, R. E., & Cherkasov, A. (2011). Optimization of antibacterial peptides by genetic algorithms and cheminformatics. *Chemical biology & drug design*, 77(1), 48-56.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Fong, J. N., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm matrix proteins. *Microbiology spectrum*, 3(2), 3-2.
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation research*, 122(6), 877-902.
- Frank, R. W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M., & Romeo, D. (1990). Amino acid sequences of two proline-rich bactericins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 265(31), 18871-18874.



Fredrick, W. S., & Ravichandran, S. (2012). Hemolymph proteins in marine crustaceans. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 496-502.

Furlong, S. J., Mader, J. S., & Hoskin, D. W. (2006). Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen. *Oncology reports*, 15(5), 1385-1390.

Gabriel, M., Nazmi, K., Veerman, E. C., Nieuw Amerongen, A. V., & Zentner, A. (2006). Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjugate chemistry*, 17(2), 548-550.

Gajdács, M., & Albericio, F. (2019). Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics*, 8(3), 129.

Galdiero, E., Lombardi, L., Falanga, A., Libralato, G., Guida, M., & Carotenuto, R. (2019). Biofilms: Novel strategies based on antimicrobial peptides. *Pharmaceutics*, 11(7), 322.

Galinier, R., Roger, E., Sautiere, P. E., Aumelas, A., Banaigs, B., & Mitta, G. (2009). Halocytin and papillosin, two new antimicrobial peptides isolated from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia papillosa*. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 15(1), 48-55.

Gao, G., Yu, K., Kindrachuk, J., Brooks, D. E., Hancock, R. E., & Kizhakkedathu, J. N. (2011). Antibacterial surfaces based on polymer brushes: investigation on the influence of brush properties on antimicrobial peptide immobilization and antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, 12(10), 3715-3727.

Gao, R., Shu, W., Shen, Y., Sun, Q., Jin, W., Li, D., ... & Yuan, L. (2021). Peptide fraction from Sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via MAPK and NF- κ B pathways. *Food Science and Human Wellness*, 10(1), 103-111.

Gaspar, V. M., Costa, E. C., Queiroz, J. A., Pichon, C., Sousa, F., & Correia, I. J. (2015). Folate-targeted multifunctional amino acid-chitosan nanoparticles for improved cancer therapy. *Pharmaceutical research*, 32(2), 562-577.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. *The proteomics protocols handbook*, 571-607.

Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., & Raghava, G. P. S. (2015). Computer-aided virtual screening and designing of cell-penetrating peptides. In *Cell-penetrating peptides* (pp. 59-69). Humana Press, New York, NY.

Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, A., Kapoor, P., Tyagi, A., & Raghava, G. P. (2013). In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. *Journal of translational medicine*, 11(1), 1-12.

Gherardi, F. (2006). Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 39(3), 175-191.

Gherardi, F., & Barbaresi, S. (2000). Invasive crayfish: activity patterns of *Procambarus clarkii* in the rice fields of the Lower Guadalquivir (Spain). *Archiv für Hydrobiologie*, 153-168.

Gherardi, F., Aquiloni, L., Diéguez-Uribeondo, J., & Tricarico, E. (2011). Managing invasive crayfish: is there a hope?. *Aquatic Sciences*, 73(2), 185-200.

Gherardi, F., Baldaccini, G.N., Barbaresi, S., Ercolini, P., De Luise, G., Mazzoni, D., Mori, M. (1999). The situation in Italy. In: Gherardi F, Holdich DM, editors. Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation? Rotterdam: A.A. Balkema. pp 107-128.

Giacometti, A., Cirioni, O., Del Prete, M. S., Barchiesi, F., Paggi, A. M., Petrelli, E., & Scalise, G. (2000). Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(5), 807-810.



Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., D'Amato, G., Silvestri, C., Del Prete, M. S., ... & Scalise, G. (2003). Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A–melittin peptide CA (1–7) M (2–9) NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides*, 24(9), 1315-1318.

Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1-33.

Glinel, K., Jonas, A. M., Jouenne, T., Leprince, J., Galas, L., & Huck, W. T. (2009). Antibacterial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide. *Bioconjugate chemistry*, 20(1), 71-77.

Gnanambal, K. M. E., Patterson, J., & Patterson, E. J. (2015). Isolation of a novel antibacterial phenyl thioketone from the seagrass, *Cymodocea serrulata*. *Phytotherapy Research*, 29(4), 554-560.

Gobert, S., Cambridge, M. T., Velimirov, B., Pergent, G., Lepoint, G., Bouquegneau, J. M., ... & Walker, D. I. (2007). Biology of posidonia. In *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (pp. 387-408). Springer, Dordrecht.

Godoy-Gallardo, M., Mas-Moruno, C., Fernández-Calderón, M. C., Pérez-Giraldo, C., Manero, J. M., Albericio, F., ... & Rodríguez, D. (2014). Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta biomaterialia*, 10(8), 3522-3534.

Gokce, G., & Haznedaroglu, M. Z. (2008). Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of *Posidonia oceanica* extract. *Journal of ethnopharmacology*, 115(1), 122-130.

Gold, H. S., & Moellering Jr, R. C. (1996). Antimicrobial-drug resistance. *New England journal of medicine*, 335(19), 1445-1453.

Goto, T., Nakame, Y., Nishida, M., & Ohi, Y. (1999). Bacterial biofilms and catheters in experimental urinary tract infection. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 227-231.

Greber, K.E., & Dawgul, M. (2017). Antimicrobial peptides under clinical trials. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(5), 620-628.

Groisman, E. A., & Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*, 87(5), 791-794.

Gross, P. S., Bartlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W., & Warr, G. W. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(7), 565-577.

Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., ... & Feng, X. (2012). A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PloS one*, 7(3), e31698.

Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., & Terán, L. M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical immunology*, 135(1), 1-11.

Gueguen, Y., Garnier, J., Robert, L., Lefranc, M. P., Mougenot, I., De Lorgeril, J., ... & Bachere, E. (2006). PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(3), 283-288.

Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., & Raghava, G. P. (2015). Peptide toxicity prediction. In *Computational peptidology* (pp. 143-157). Humana Press, New York, NY.

Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium, & Raghava, G. P. (2013). In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS one*, 8(9), e73957.

Gurung, J., Khyriem, A. B., Banik, A., Lyngdoh, W. V., Choudhury, B., & Bhattacharyya, P. (2013). Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and



Pseudomonas aeruginosa from intensive care unit. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 17(4), 214.

Gutiérrez-Yurrita, P. J., & Montes, C. (1999). Bioenergetics and phenology of reproduction of the introduced red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in Doñana National Park, Spain, and implications for species management. *Freshwater Biology*, 42(3), 561-574.

Gutierrez, P., Martínez, J. M., Bravo-Utrera, M. A., & Montes, C. (1999). The status of crayfish populations in Spain and Portugal. *Crayfish in Europe as alien species—How to make the best of a bad situation*, 161-192.

Guyomard, A., Dé, E., Jouenne, T., Malandain, J. J., Muller, G., & Glinel, K. (2008). Incorporation of a hydrophobic antibacterial peptide into amphiphilic polyelectrolyte multilayers: a bioinspired approach to prepare biocidal thin coatings. *Advanced Functional Materials*, 18(5), 758-765.

Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 620-627.

Habsburgo-Lorena, A. S. (1986). The status of the *Procambarus clarkii* population in Spain. *Freshwater Crayfish*, 6(1), 131-3.

Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 276-301.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.

Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in food science & technology*, 48, 40-50.

Hammami, S., Salem, A. B., Ashour, M. L., Cheriaa, J., Graziano, G., & Mighri, Z. (2013). A novel methylated sesquiterpene from seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Natural Product Research*, 27(14), 1265-1270.

Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557.

Hancock, R. E., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 97(16), 8856-8861.

Hancock, R. E., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*, 16(5), 321-334.

Hansen, I. K., Lövdahl, T., Simonovic, D., Hansen, K. Ø., Andersen, A. J., Devold, H., ... & Haug, T. (2020). Antimicrobial activity of small synthetic peptides based on the marine peptide turgencin A: Prediction of antimicrobial peptide sequences in a natural peptide and strategy for optimization of potency. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5460.

Hao, H., Shi, D. Y., Yang, D., Yang, Z. W., Qiu, Z. G., Liu, W. L., ... & Jin, M. (2019). Profiling of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in tap water. *Journal of hazardous materials*, 365, 340-345.

Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein and Peptide Science*, 10(6), 585-606.

Harris, J. C., Scully, M. A., & Day, E. S. (2019). Cancer cell membrane-coated nanoparticles for cancer management. *Cancers*, 11(12), 1836.

Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., ... & Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313(5793), 1636-1637.



- Hauton, C., Brockton, V., & Smith, V. J. (2006). Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. *Molecular immunology*, 43(9), 1490-1496.
- Håversen, L., Ohlsson, B. G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. Å., & Mattsby-Baltzer, I. (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B. *Cellular immunology*, 220(2), 83-95.
- Hawas, U. W. (2014). A new 8-hydroxy flavone O-xyloside sulfate and antibacterial activity from the Egyptian seagrass *Thalassia hemprichii*. *Chemistry of natural compounds*, 50(4), 629-632.
- Haznedaroglu, M. Z., & Zeybek, U. (2007). HPLC Determination of Chicoric Acid in Leaves of *Posidonia oceanica*. *Pharmaceutical biology*, 45(10), 745-748.
- Heglmeier, A., & Zidorn, C. (2010). Secondary metabolites of *Posidonia oceanica* (Posidoniaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(5), 964-970.
- Herbinière, J., Braquart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J. M., Frère, J., Van Dorsselaer, A., & Martin, G. (2005). Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Developmental & Comparative Immunology*, 29(6), 489-499.
- Hillman, J. D., Novák, J., Sagura, E., Gutierrez, J. A., Brooks, T. A., Crowley, P. J., ... & Bleiweis, A. S. (1998). Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity*, 66(6), 2743-2749.
- Hilpert, K., Elliott, M., Jenssen, H., Kindrachuk, J., Fjell, C. D., Körner, J., ... & Hancock, R. E. (2009). Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity. *Chemistry & biology*, 16(1), 58-69.
- Hilpert, K., Fjell, C. D., & Cherkasov, A. (2008). Short linear cationic antimicrobial peptides: screening, optimizing, and prediction. In *Peptide-Based Drug Design* (pp. 127-159). Humana Press.
- Hiss, J.A., Hartenfeller, M., & Schneider, G. (2010). Concepts and applications of “natural computing” techniques in de novo drug and peptide design. *Current pharmaceutical design*, 16(15), 1656-1665.
- Hobbs Jr, H. H. (1972). Crayfishes (Astacidae) of North and Middle America, Identification Manual 9. Biota of Freshwater Ecosystems. *US Envir. Protect. Agency*, 173.
- Hollmann, A., Martinez, M., Maturana, P., Semorile, L. C., & Maffia, P. C. (2018). Antimicrobial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. *Frontiers in chemistry*, 6, 204.
- Holmer, M., Marbà, N., Lamote, M., & Duarte, C. M. (2009). Deterioration of sediment quality in seagrass meadows (*Posidonia oceanica*) invaded by macroalgae (*Caulerpa* sp.). *Estuaries and coasts*, 32(3), 456-466.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176-187.
- Horne, W. S., Wiethoff, C. M., Cui, C., Wilcoxon, K. M., Amorin, M., Ghadiri, M. R., & Nemerow, G. R. (2005). Antiviral cyclic d, l- α -peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(17), 5145-5153.
- Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(2), 357-375.
- Huang, W. S., Wang, K. J., Yang, M., Cai, J. J., Li, S. J., & Wang, G. Z. (2006). Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forskål, 1775). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 339(1), 37-42.



Huang, Y., Li, T., Jin, M., Yin, S., Hui, K. M., & Ren, Q. (2017). Newly identified PcToll4 regulates antimicrobial peptide expression in intestine of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene*, 610, 140-147.

Humblot, V., Yala, J. F., Thebault, P., Boukerma, K., Héquet, A., Berjeaud, J. M., & Pradier, C. M. (2009). The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials*, 30(21), 3503-3512.

Huner, J. V. (1977). Introductions of the Louisiana red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard): an update. *Freshwater Crayfish*, 3, 193-202.

Huner, J. V. (2002). *Procambarus*. *Biology of freshwater crayfish*, 541-584.

Huner, J. V., & Barr, J. E. (1984). Red Swamp Crawfish: Biology and Exploitation Baton Rouge. LA: Louisiana Sea Grant College Program. *Center for Wetland Resources, Louisiana State University*.

Huner, J. V., Avault, Jr J.W. (1979). Introductions of *Procambarus* spp. *Freshwater Crayfish*, 4, 191-194.

Huxley, T. H. (1880). *The crayfish: an introduction to the study of zoology* (No. 28). C. Kegan Paul.

Imjongjirak, C., Amparyup, P., & Tassanakajon, A. (2011). Two novel antimicrobial peptides, arasin-likeSp and GRPSp, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(2), 706-712.

Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A., & Sittipraneed, S. (2007). Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. *Molecular immunology*, 44(12), 3195-3203.

Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A., & Sittipraneed, S. (2009). Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. *Molecular Biology Reports*, 36(5), 841-850.

Ista, L. K., Mendez, S., & Lopez, G. P. (2010). Attachment and detachment of bacteria on surfaces with tunable and switchable wettability. *Biofouling*, 26(1), 111-118.

Jennings, M. C., Minbiole, K. P., & Wuest, W. M. (2015). Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *ACS infectious diseases*, 1(7), 288-303.

Jia, Z., Xiu, P., Li, M., Xu, X., Shi, Y., Cheng, Y., ... & Liu, Z. (2016). Bioinspired anchoring AgNPs onto nanoporous TiO₂ orthopedic coatings: Trap-killing of bacteria, surface-regulated osteoblast functions and host responses. *Biomaterials*, 75, 203-222.

Jiang, F., Deng, Y., Yeh, C. K., & Sun, Y. (2014). Quaternized chitosans bind onto preexisting biofilms and eradicate pre-attached microorganisms. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8518-8527.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the chinese medical association*, 81(1), 7-11.

Jenssen, H., Andersen, J. H., Uhlin-Hansen, L., Gutteberg, T. J., & Rekdal, Ø. (2004). Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral research*, 61(2), 101-109.

Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.

Jia, Y. P., Sun, Y. D., Wang, Z. H., Wang, Q., Wang, X. W., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2008). A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibitory activities. *Aquaculture*, 284(1-4), 246-259.



Jiménez-Vega, F., Yepiz-Plascencia, G., Söderhäll, K., & Vargas-Albores, F. (2004). A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 314(3), 681-687.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4), 213-236.

Jiravanichpaisal, P., Lee, S. Y., Kim, Y. A., Andren, T., & Söderhäll, I. (2007). Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(5), 441-455.

Johnson, P. T. (1980). Hemopoietic tissue, hemocytes, and hemolymph. *Histology of blue crab, Callinectes sapidus: A model for the Decapod*, 267-307.

Jones, J. P., Andriahajaina, F. B., Ranambintsoa, E. H., Hockley, N. J., & Ravoahangimalala, O. (2006). The economic importance of freshwater crayfish harvesting in Madagascar and the potential of community-based conservation to improve management. *Oryx*, 40(2), 168-175.

Jung, H. J., Park, Y., Sung, W. S., Suh, B. K., Lee, J., Hahm, K. S., & Lee, D. G. (2007). Fungicidal effect of pleurocidin by membrane-active mechanism and design of enantiomeric analogue for proteolytic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(6), 1400-1405.

Kaizu, A., Fagutao, F. F., Kondo, H., Aoki, T., & Hirono, I. (2011). Functional analysis of C-type lysozyme in penaeid shrimp. *Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44344-44349.

Kang, C. J., Xue, J. F., Liu, N., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2007). Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Immunology*, 44(7), 1535-1543.

Kang, H. K., Choi, M. C., Seo, C. H., & Park, Y. (2018). Therapeutic properties and biological benefits of marine-derived anticancer peptides. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 919.

Kang, X., Dong, F., Shi, C., Liu, S., Sun, J., Chen, J., ... & Zheng, H. (2019). DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. *Scientific data*, 6(1), 1-10.

Kao, F. S., Pan, Y. R., Hsu, R. Q., & Chen, H. M. (2012). Efficacy verification and microscopic observations of an anticancer peptide, CB1a, on single lung cancer cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(12), 2927-2935.

Karthik, V., Kamalakannan, V., Thomas, A., Sudheer, N. S., Singh, I. S. B., & Narayanan, R. B. (2014). Functional characterization of a c-type lysozyme from Indian shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 6(2), 114-121.

Kashima, M. (1991). H1 histones contribute to candidacidal activities of human epidermal extract. *The Journal of Dermatology*, 18(12), 695-706.

Kawano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y., & Iwanaga, S. (1990). Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). NMR determination of the beta-sheet structure. *Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15365-15367.

Keller, L., & Surette, M. G. (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 4(4), 249-258.

Khan, F., Lee, J. W., Manivasagan, P., Pham, D. T. N., Oh, J., & Kim, Y. M. (2019). Synthesis and characterization of chitosan oligosaccharide-capped gold nanoparticles as an effective antibiofilm drug against the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial pathogenesis*, 135, 103623.

Khandia, R., Dadar, M., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., ... & Chaicumpa, W. (2019). A comprehensive review of autophagy and its various roles in infectious, non-infectious, and lifestyle diseases: current knowledge and prospects for disease prevention, novel drug design, and therapy. *Cells*, 8(7), 674.



- Khoo, L., Robinette, D. W., & Noga, E. J. (1999). Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Marine Biotechnology*, 1(1), 44-51.
- Kim, J. Y. (2016). Human fungal pathogens: why should we learn?. *Journal of Microbiology*, 54(3), 145-148.
- Kim, S. M., Kim, H. C., & Lee, S. W. S. (2011). Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. *The Journal of Microbiology*, 49(4), 595-602.
- Kliger, Y. (2010). Computational approaches to therapeutic peptide discovery. *Peptide Science*, 94(6), 701-710.
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276(1-2), 172-174.
- Kontiza, I., Stavri, M., Zloh, M., Vagias, C., Gibbons, S., & Roussis, V. (2008). New metabolites with antibacterial activity from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron*, 64(8), 1696-1702.
- Kontiza, I., Vagias, C., Jakupovic, J., Moreau, D., Roussakis, C., & Roussis, V. (2005). Cymodienol and cymodiene: new cytotoxic diarylheptanoids from the sea grass *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron letters*, 46(16), 2845-2847.
- Kosikowska, P., & Lesner, A. (2016). Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, 26(6), 689-702.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a010306.
- Kourkoutas, Y., & Proestos, C. (2020). Food preservation: challenges and efforts for the future. *Foods*, 9(4), 391.
- Kraus, D., & Peschel, A. (2006). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrobial Peptides and Human Disease*, 231-250.
- Kumar Shukla, S., & Rao, T. S. (2013). Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *The Journal of antibiotics*, 66(2), 55-60.
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 9-27.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(2), 311-320.
- Lai, R., Zheng, Y. T., Shen, J. H., Liu, G. J., Liu, H., Lee, W. H., ... & Zhang, Y. (2002). Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides*, 23(3), 427-435.
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), 131-141.
- Laman, A. G., Lathe, R., Savinov, G. V., Shepelyakovskaya, A. O., Boziev, K. M., Baidakova, L. K., ... & Ivanov, V. T. (2015). Innate immunity: Bacterial cell-wall muramyl peptide targets the conserved transcription factor YB-1. *FEBS letters*, 589(15), 1819-1824.
- Laxminarayan, R., & Brown, G. M. (2001). Economics of antibiotic resistance: a theory of optimal use. *Journal of environmental economics and management*, 42(2), 183-206.
- LeCun, Y., Bengio, Y., & Hinton, G. (2015). Deep learning. *nature*, 521(7553), 436-444.
- Lee, E. Y., Fulan, B. M., Wong, G. C., & Ferguson, A. L. (2016). Mapping membrane activity in undiscovered peptide sequence space using machine learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), 13588-13593.



Lee, I. H., Cho, Y., & Lehrer, R. I. (1997a). Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3), 515-521.

Lee, I. H., Cho, Y., & Lehrer, R. I. (1997b). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavansins. *Infection and immunity*, 65(7), 2898-2903.

Lee, I. H., Lee, Y. S., Kim, C. H., Kim, C. R., Hong, T., Menzel, L., ... & Lehrer, R. I. (2001). Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1527(3), 141-148.

Lee, J. U., Kang, D. I., Zhu, W. L., Shin, S. Y., Hahm, K. S., & Kim, Y. (2007). Solution structures and biological functions of the antimicrobial peptide, arenicin-1, and its linear derivative. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 88(2), 208-216.

Lee, J. Y., Boman, A., Sun, C. X., Andersson, M., Jörnvall, H., Mutt, V., & Boman, H. G. (1989). Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23), 9159-9162.

Lee, S. Y., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2003). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7927-7933.

Lehrer, R. I., Andrew Tincu, J., Taylor, S. W., Menzel, L. P., & Waring, A. J. (2003). Natural peptide antibiotics from tunicates: structures, functions and potential uses. *Integrative and comparative biology*, 43(2), 313-322.

Lehrer, R. I., Szklarek, D., Ganz, T., & Selsted, M. E. (1985). Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* with candidacidal activity. *Infection and immunity*, 49(1), 207-211.

Leri, M., Ramazzotti, M., Vasarri, M., Peri, S., Barletta, E., Pretti, C., & Degl'Innocenti, D. (2018). Bioactive compounds from *Posidonia oceanica* (L.) Delile impair malignant cell migration through autophagy modulation. *Marine drugs*, 16(4), 137.

Li, C., Haug, T., Styrvold, O. B., Jørgensen, T. Ø., & Stensvåg, K. (2008a). Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(12), 1430-1440.

Li, C., Zhao, J., Song, L., Mu, C., Zhang, H., Gai, Y., ... & Xing, K. (2008b). Molecular cloning, genomic organization and functional analysis of an anti-lipopolysaccharide factor from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(7), 784-794.

Li, L., Sun, J., Xia, S., Tian, X., Cheserek, M. J., & Le, G. (2016). Mechanism of antifungal activity of antimicrobial peptide APP, a cell-penetrating peptide derivative, against *Candida albicans*: intracellular DNA binding and cell cycle arrest. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), 3245-3253.

Li, W., Tailhades, J., O'Brien-Simpson, N. M., Separovic, F., Otvos, L., Hossain, M. A., & Wade, J. D. (2014). Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. *Amino acids*, 46(10), 2287-2294.

Li, X., Li, P., Saravanan, R., Basu, A., Mishra, B., Lim, S. H., ... & Leong, S. S. J. (2014). Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties. *Acta biomaterialia*, 10(1), 258-266.

Liao, T. J., Gao, J., Wang, J. X., & Wang, X. W. (2018). Chicken-type lysozyme functions in the antibacterial immunity in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 85, 134-141.

Lim, K., Chua, R. R. Y., Saravanan, R., Basu, A., Mishra, B., Tambyah, P. A., ... & Leong, S. S. J. (2013). Immobilization studies of an engineered arginine-tryptophan-rich peptide on a silicone surface with antimicrobial and antibiofilm activity. *ACS applied materials & interfaces*, 5(13), 6412-6422.



- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology spectrum*, 3(3), 3-3.
- Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I., & Zhang, L. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, 6, 34.
- Lin, F. Y., Gao, Y., Wang, H., Zhang, Q. X., Zeng, C. L., & Liu, H. P. (2016). Identification of an anti-lipopolysaccharide factor possessing both antiviral and antibacterial activity from the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 213-221.
- Lindqvist, O. V., & Huner, J. V. (1999). Life history characteristics of crayfish: what makes some of them good colonizers?. *Crustacean Issues*, 11, 23-30.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2006). Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of virology*, 80(21), 10365-10371.
- Liu, N., Zhang, R. R., Fan, Z. X., Zhao, X. F., Wang, X. W., & Wang, J. X. (2016). Characterization of a type-I crustin with broad-spectrum antimicrobial activity from red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 61, 145-153.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2(1), 1-9.
- Liu, Y., Zhang, Y. H., Li, T., Cao, X. T., Zhou, Y., Yuan, J. F., ... & Lan, J. F. (2018). PcLys-i3, an invertebrate lysozyme, is involved in the antibacterial immunity of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 87, 109-115.
- Liu, F., He, D., Yu, Y., Cheng, L., & Zhang, S. (2019). Quaternary ammonium salt-based cross-linked micelles to combat biofilm. *Bioconjugate chemistry*, 30(3), 541-546.
- Lombardo, D., Kiselev, M. A., & Caccamo, M. T. (2019). Smart nanoparticles for drug delivery application: development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
- Lopatkin, A. J., Huang, S., Smith, R. P., Srimani, J. K., Sysoeva, T. A., Bewick, S., ... & You, L. (2016). Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nature microbiology*, 1(6), 1-8.
- Lopez Cascales, J. J., Zenak, S., García de La Torre, J., Lezama, O. G., Garro, A., & Enriz, R. D. (2018). Small cationic peptides: influence of charge on their antimicrobial activity. *ACS omega*, 3(5), 5390-5398.
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1990). Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Archives of Microbiology*, 154(4), 380-385.
- Lu, J., Xu, H., Xia, J., Ma, J., Xu, J., Li, Y., & Feng, J. (2020). D-and unnatural amino acid substituted antimicrobial peptides with improved proteolytic resistance and their proteolytic degradation characteristics. *Frontiers in microbiology*, 2869.
- Lu, K. Y., Sung, H. J., Liu, C. L., & Sung, H. H. (2009). Differentially enhanced gene expression in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii* challenged in vivo with lipopolysaccharide. *Journal of invertebrate pathology*, 100(1), 9-15.
- MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M., & Brownstein, J. S. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change*, 8(6), 510-514.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194.



- Mai, W. J., & Hu, C. Q. (2009). Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis*. *Molecular biology reports*, 36(6), 1587-1595.
- Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*, 157(3), 539-548.
- Majchrzykiewicz, J. A., Kuipers, O. P., & Bijlsma, J. J. (2010). Generic and specific adaptive responses of *Streptococcus pneumoniae* to challenge with three distinct antimicrobial peptides, bacitracin, LL-37, and nisin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 440-451.
- Malmsten, M. (2016). Interactions of antimicrobial peptides with bacterial membranes and membrane components. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 16-24.
- Mao, D., Luo, Y., Mathieu, J., Wang, Q., Feng, L., Mu, Q., ... & Alvarez, P. J. J. (2014). Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation. *Environmental science & technology*, 48(1), 71-78.
- Martínez, J. L., & Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 647-679.
- Masurier, N., Tissot, J. B., Boukhriess, D., Jebors, S., Pinese, C., Verdié, P., ... & Subra, G. (2018). Site-specific grafting on titanium surfaces with hybrid temporin antibacterial peptides. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(12), 1782-1790.
- Matanic, V. C. A., & Castilla, V. (2004). Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *International journal of antimicrobial agents*, 23(4), 382-389.
- Maurya, I. K., Pathak, S., Sharma, M., Sanwal, H., Chaudhary, P., Tupe, S., ... & Prasad, R. (2011). Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides*, 32(8), 1732-1740.
- Mayavu, P., Sugesh, S., & Ravindran, V. J. (2009). Antibacterial activity of seagrass species against biofilm forming bacteria. *Res J Microbiol*, 4(8), 314-319.
- Meher, P. K., Sahu, T. K., Saini, V., & Rao, A. R. (2017). Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Menzel, L. P., Chowdhury, H. M., Masso-Silva, J. A., Ruddick, W., Falkovsky, K., Vorona, R., ... & Diamond, G. (2017). Potent in vitro and in vivo antifungal activity of a small molecule host defense peptide mimic through a membrane-active mechanism. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- Messina, C. M., Arena, R., Manuguerra, S., Pericot, Y., Curcuraci, E., Kerninon, F., ... & Santulli, A. (2021). Antioxidant Bioactivity of Extracts from Beach Cast Leaves of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Marine Drugs*, 19(10), 560.
- Micheli, L., Vasarri, M., Barletta, E., Lucarini, E., Ghelardini, C., Degl'Innocenti, D., & Di Cesare Mannelli, L. (2021). Efficacy of *Posidonia oceanica* extract against inflammatory pain: In vivo studies in mice. *Marine drugs*, 19(2), 48.
- Miller, J. H., Novak, J. T., Knocke, W. R., & Pruden, A. (2016). Survival of antibiotic resistant bacteria and horizontal gene transfer control antibiotic resistance gene content in anaerobic digesters. *Frontiers in microbiology*, 7, 263.
- Mishra, M., Arukha, A. P., Patel, A. K., Behera, N., Mohanta, T. K., & Yadav, D. (2018). Multi-drug resistant coliform: water sanitary standards and health hazards. *Frontiers in pharmacology*, 9, 311.
- Mitchell, M. A., Iannetta, A. A., Jennings, M. C., Fletcher, M. H., Wuest, W. M., & Minbiolo, K. P. (2015). Scaffold-Hopping of Multicationic Amphiphiles Yields Three New Classes of Antimicrobials. *ChemBioChem*, 16(16), 2299-2303.



- Mitchell, J. B. (2014). Machine learning methods in chemoinformatics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 4(5), 468-481.
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., & Roch, P. (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 71-78.
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., ... & Shimonishi, Y. (1989). Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *The Journal of Biochemistry*, 106(4), 663-668.
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature reviews Drug discovery*, 19(5), 311-332.
- Mookherjee, N., Brown, K. L., Bowdish, D. M., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp, K., ... & Hancock, R. E. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *The Journal of Immunology*, 176(4), 2455-2464.
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 747-767.
- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2012). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 3, 408.
- Mu, C., Zheng, P., Zhao, J., Wang, L., Zhang, H., Qiu, L., ... & Song, L. (2010). Molecular characterization and expression of a crustin-like gene from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(7), 734-740.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 4-2.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., ... & Kristensen, H. H. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), 975-980.
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., & Vilcinskis, A. (2016). Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150290.
- Nakamura, T., Furunaka, H. T. T. M., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., ... & Shimonishi, Y. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 16709-16713.
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*, 59(3), 181-196.
- Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2014). Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy. In *Microbial Biofilms* (pp. 43-64). Humana Press, New York, NY.
- Ngo, D. H., Ryu, B., & Kim, S. K. (2014). Active peptides from skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-I converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. *Food Chemistry*, 143, 246-255.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*, 29(9), 464-472.
- Nicolas, M., Beito, B., Oliveira, M., Tudela Martins, M., Gallas, B., Salmain, M., ... & Humblot, V. (2021). Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices. *Antibiotics*, 11(1), 13.



Nicolas, P. (2009). Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *The FEBS journal*, 276(22), 6483-6496.

Nie, B. E., Long, T., Ao, H., Zhou, J., Tang, T., & Yue, B. (2017). Covalent immobilization of enoxacin onto titanium implant surfaces for inhibiting multiple bacterial species infection and in vivo methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), e01766-16.

Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D., Daffonchio, D., 2007. Release and persistence of extracellular DNA in the environment.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656.

Noble, W. S. (2006). What is a support vector machine?. *Nature biotechnology*, 24(12), 1565-1567.

Noga, E. J., Stone, K. L., Wood, A., Gordon, W. L., & Robinette, D. (2011). Primary structure and cellular localization of callinectin, an antimicrobial peptide from the blue crab. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(4), 409-415.

Normark, B. H., & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, 252(2), 91-106.

Organization for Economic Cooperation and Development. Stemming the superbug tide: just few dollars more. November, 7 2018.

Ochoa, T. J., Ruiz, J., Molina, M., Del Valle, L. J., Vargas, M., Gil, A. I., ... & Lanata, C. F. (2009). High frequency of antimicrobial resistance of diarrheagenic *E. coli* in Peruvian infants. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(2), 296.

O'Neill, J. (2019). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. London; 2014. *Google Scholar There is no corresponding record for this reference.*

Ordóñez, S. R., Amarullah, I. H., Wubbolts, R. W., Veldhuizen, E. J., & Haagsman, H. P. (2014). Fungicidal mechanisms of cathelicidins LL-37 and CATH-2 revealed by live-cell imaging. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2240-2248.

Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., ... & Kokryakov, V. N. (2006). Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(2), 514-523.

Paglianti, A., & Gherardi, F. (2004). Combined effects of temperature and diet on growth and survival of young-of-year crayfish: a comparison between indigenous and invasive species. *Journal of Crustacean Biology*, 24(1), 140-148.

Papenbrock, J. (2012). Highlights in seagrasses' phylogeny, physiology, and metabolism: what makes them special?. *International Scholarly Research Notices*, 2012.

Papo, N., & Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(7), 784-790.

Paredes-Gamero, E. J., Martins, M. N., Cappabianco, F. A., Ide, J. S., & Miranda, A. (2012). Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(7), 1062-1072.

Park, I. Y., Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1998). Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS letters*, 437(3), 258-262.



Parreira, P., Monteiro, C., Graça, V., Gomes, J., Maia, S., Gomes, P., ... & Martins, M. C. L. (2019). Surface grafted MSI-78A antimicrobial peptide has high potential for gastric infection management. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.

Pasqualini, V., Pergent-Martini, C., Clabaut, P., & Pergent, G. (1998). Mapping of *Posidonia oceanica* causing aerial photographs and side scan sonar: Application off the island of Corsica (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 47(3), 359-367.

Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology*, 32(2), 143-171.

Patat, S. A., Carnegie, R. B., Kingsbury, C., Gross, P. S., Chapman, R., & Schey, K. L. (2004). Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 271(23-24), 4825-4833.

Patocka, J., Nepovimova, E., Klimova, B., Wu, Q., & Kuca, K. (2019). Antimicrobial peptides: Amphibian host defense peptides. *Current medicinal chemistry*, 26(32), 5924-5946.

Paulsen, V. S., Blencke, H. M., Benincasa, M., Haug, T., Eksteen, J. J., Styrvold, O. B., ... & Stensvåg, K. (2013). Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin 1—and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. *PLoS one*, 8(1), e53326.

Peng, H., Yang, M., Huang, W. S., Ding, J., Qu, H. D., Cai, J. J., ... & Wang, K. J. (2010). Soluble expression and purification of a crab antimicrobial peptide scygonadin in different expression plasmids and analysis of its antimicrobial activity. *Protein expression and purification*, 70(1), 109-115.

Pergent, G. (1991). La protection légale de la Posidonie en France: un outil efficace—Nécessité de son extension à d'autres pays méditerranéens. *Les espèces marines à protéger en Méditerranée*, 29-33.

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., ... & Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 53(1), 28-52.

Piazzini, V., Vasarri, M., Degl'Innocenti, D., Guastini, A., Barletta, E., Salvatici, M. C., & Bergonzi, M. C. (2019). Comparison of chitosan nanoparticles and soluplus micelles to optimize the bioactivity of *Posidonia oceanica* extract on human neuroblastoma cell migration. *Pharmaceutics*, 11(12), 655.

Pietrantoni, A., Ammendolia, M. G., Tinari, A., Siciliano, R., Valenti, P., & Superti, F. (2006). Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 in vitro infection. *Antiviral research*, 69(2), 98-106.

Pinese, C., Jebors, S., Echalié, C., Licznar-Fajardo, P., Garric, X., Humblot, V., ... & Subra, G. (2016). Simple and specific grafting of antibacterial peptides on silicone catheters. *Advanced Healthcare Materials*, 5(23), 3067-3073.

Pinese, C., Jebors, S., Stoebner, P. E., Humblot, V., Verdié, P., Causse, L., ... & Subra, G. (2017). Bioactive peptides grafted silicone dressings: a simple and specific method. *Materials Today Chemistry*, 4, 73-83.

Piotrowska, U., Sobczak, M., & Oledzka, E. (2017). Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides—Therapeutic agents and promising delivery vectors. *Chemical Biology & Drug Design*, 90(6), 1079-1093.

Pisuttharachai, D., Fagutao, F. F., Yasuike, M., Aono, H., Yano, Y., Murakami, K., ... & Hirano, I. (2009). Characterization of crustin antimicrobial proteins from Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(10), 1049-1054.

Piva, G., Fracassetti, D., Tirelli, A., Mascheroni, E., Musatti, A., Inglese, P., ... & Rollini, M. (2017). Evaluation of the antioxidant/antimicrobial performance of *Posidonia oceanica* in comparison with three commercial natural extracts and as a treatment on fresh-cut peaches (*Prunus persica* Batsch). *Postharvest Biology and Technology*, 124, 54-61.



- Porto, W. F., Souza, V. A., Nolasco, D. O., & Franco, O. L. (2012). In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. *Peptides*, 38(1), 127-136.
- Powers, J. P. S., & Hancock, R. E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681-1691.
- Prabha, N., Sannasimuthu, A., Kumaresan, V., Elumalai, P., & Arockiaraj, J. (2020). Intensifying the anticancer potential of cationic peptide derived from serine threonine protein kinase of teleost by tagging with oligo tryptophan. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 75-83.
- Prager, E. M., & Jolles, P. (1996). Animal lysozymes c and g: an overview. *Exs*, 75, 9-31.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., & Lejeune, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181(19), 5993-6002.
- Procaccini, G., Buia, M. C., Gambi, M. C., Perez, M., Pergent, G., Pergent-Martini, C., & Romero, J. (2003). The seagrasses of the Western Mediterranean. *World atlas of seagrasses*, 48-58.
- Puri, S., & Edgerton, M. (2014). How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. *Eukaryotic cell*, 13(8), 958-964.
- Qutb, A. M., Wei, F., & Dong, W. (2020). Prediction and characterization of cationic arginine-rich plant antimicrobial peptide sm-985 from teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana*). *Frontiers in Microbiology*, 11, 1353.
- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3764-3773.
- Rabanal, F., & Cajal, Y. (2016). Therapeutic potential of antimicrobial peptides. In *New Weapons to Control Bacterial Growth* (pp. 433-451). Springer, Cham.
- Raja, A., Vipin, C., & Aiyappan, A. (2013). Biological importance of marine algae-an overview. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 2(5), 222-227.
- Raju, S. V., Sarkar, P., Kumar, P., & Arockiaraj, J. (2021). Piscidin, fish antimicrobial peptide: structure, classification, properties, mechanism, gene regulation and therapeutical importance. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 91-107.
- Raman, K., & Kuberan, B. (2010). Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans. *Current chemical biology*, 4(1), 20-31.
- Ramesh, S., Govender, T., Kruger, H. G., Albericio, F., & Beatriz, G. (2016). An improved and efficient strategy for the total synthesis of a colistin-like peptide. *Tetrahedron Letters*, 57(17), 1885-1888.
- Ranganathan, S., Simpson, K. J., Shaw, D. C., & Nicholas, K. R. (1999). The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17(2), 106-113.
- Rattanachai, A., Hirono, I., Ohira, T., Takahashi, Y., & Aoki, T. (2004). Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression. *Fisheries science*, 70(5), 765-771.
- Ravikumar, S., Thajuddin, N., Suganthi, P., Jacob Inbaneson, S., & Vinodkumar, T. (2010). Bioactive potential of seagrass bacteria against human bacterial pathogens. *Journal of Environmental Biology*, 31(3), 387.
- Regel, R., Matioli, S. R., & Terra, W. R. (1998). Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(5-6), 309-319.
- Relf, J. M., Chisholm, J. R., Kemp, G. D., & Smith, V. J. (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 350-357.



- Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2018). Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current opinion in microbiology*, 45, 70-76.
- Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L. P., & Calado, C. R. (2019). Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go?. *Antibiotics*, 8(2), 45.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*, 197(8), 1079-1081.
- Richard, P., Delangle, M. H., Merrien, D., Barillé, S., Reynaud, A., Minozzi, C., & Richet, H. (1994). Fluoroquinolone use and fluoroquinolone resistance: is there an association?. *Clinical Infectious Diseases*, 19(1), 54-59.
- Richards, R. C., O'Neil, D. B., Thibault, P., & Ewart, K. V. (2001). Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochemical and biophysical research communications*, 284(3), 549-555.
- Richman, N. I., Böhm, M., Adams, S. B., Alvarez, F., Bergey, E. A., Bunn, J. J., ... & Collen, B. (2015). Multiple drivers of decline in the global status of freshwater crayfish (Decapoda: Astacidea). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1662), 20140060.
- Riedl, S., Zwegyck, D., & Lohner, K. (2011). Membrane-active host defense peptides—challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and physics of lipids*, 164(8), 766-781.
- Rodríguez, C. F., Bécares, E., & Fernández-Aláez, M. (2003). Shift from clear to turbid phase in Lake Chozas (NW Spain) due to the introduction of American red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Hydrobiologia*, 506(1), 421-426.
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 293-297.
- Rolland, J. L., Abdelouahab, M., Dupont, J., Lefevre, F., Bachère, E., & Romestand, B. (2010). Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Molecular immunology*, 47(6), 1269-1277.
- Rolston, K. V. (2001). The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. *Current opinion in oncology*, 13(4), 218-223.
- Römling, U., & Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of internal medicine*, 272(6), 541-561.
- Rončević, T., Čikeš-Čulić, V., Maravić, A., Capanni, F., Gerdol, M., Pacor, S., ... & Manfrin, C. (2020). Identification and functional characterization of the astacin family of proline-rich host defence peptides (PcAst) from the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard 1852). *Developmental & Comparative Immunology*, 105, 103574.
- Rosa, R. D., & Barracco, M. A. (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2), 262-284.
- Rosa, R. D., Bandeira, P. T., & Barracco, M. A. (2007). Molecular cloning of crustins from the hemocytes of Brazilian penaeid shrimps. *FEMS microbiology letters*, 274(2), 287-290.
- Rosa, R. D., Stoco, P. H., & Barracco, M. A. (2008). Cloning and characterisation of cDNA sequences encoding for anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) in Brazilian palaemonid and penaeid shrimps. *Fish & shellfish immunology*, 25(5), 693-696.
- Roudi, R., Syn, N. L., & Roudbary, M. (2017). Antimicrobial peptides as biologic and immunotherapeutic agents against cancer: a comprehensive overview. *Frontiers in immunology*, 8, 1320.



Rubio-Portillo, E., Martin-Cuadrado, A. B., Ramos-Esplá, A. Á., & Antón, J. (2021). Metagenomics Unveils *Posidonia oceanica* “Banquettes” as a Potential Source of Novel Bioactive Compounds and Carbohydrate Active Enzymes (CAZymes). *Msystems*, 6(5), e00866-21.

Sable, R., Parajuli, P., & Jois, S. (2017). Peptides, peptidomimetics, and polypeptides from marine sources: A wealth of natural sources for pharmaceutical applications. *Marine drugs*, 15(4), 124.

Saito, T., Kawabata, S. I., Shigenaga, T., Takayenoki, Y., Cho, J., Nakajima, H., ... & Iwanaga, S. (1995). A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity. *The Journal of Biochemistry*, 117(5), 1131-1137.

Sallenave, J. M. (2000). The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. *Respiratory research*, 1(2), 1-6.

Sallenave, J. M. (2002). Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 111-115.

Sannasimuthu, A., Sharma, D., Paray, B. A., Al-Sadoon, M. K., & Arockiaraj, J. (2020). Intracellular oxidative damage due to antibiotics on gut bacteria reduced by glutathione oxidoreductase-derived antioxidant molecule GM15. *Archives of Microbiology*, 202(5), 1127-1133.

Sarkar, T., Chetia, M., & Chatterjee, S. (2021). Antimicrobial peptides and proteins: from nature’s reservoir to the laboratory and beyond. *Frontiers in Chemistry*, 9, 432.

Sathyanathan, C. V., Jyothirmayi, B., Sundaram, L. R., Abhinand, P. A., Eswaramoorthy, R., & Gnanambal, K. M. E. (2016). Pheophytin a isolated from the seagrass *Syringodium isoetifolium* plausibly blocks umuC proteins of select bacterial pathogens, in silico. *Journal of applied microbiology*, 121(6), 1592-1602.

Schild, H. G. (1992). Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in polymer science*, 17(2), 163-249.

Schillaci, D., Arizza, V., Dayton, T., Camarda, L., & Stefano, V. D. (2008). In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. *Letters in applied microbiology*, 47(5), 433-438.

Schillaci, D., Arizza, V., Parrinello, N., Di Stefano, V., Fanara, S., Muccilli, V., ... & Molin, S. (2010). Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of applied microbiology*, 108(1), 17-24.

Schillaci, D., Cusimano, M. G., Cunsolo, V., Saletti, R., Russo, D., Vazzana, M., ... & Arizza, V. (2013). Immune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. *Amb Express*, 3(1), 1-10.

Schillaci, D., Cusimano, M. G., Spinello, A., Barone, G., Russo, D., Vitale, M., ... & Arizza, V. (2014). Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *AmB Express*, 4(1), 1-9.

Schmidhuber, J. (2015). Deep learning in neural networks: An overview. *Neural networks*, 61, 85-117.

Schnapp, D., Kemp, G. D., & Smith, V. J. (1996). Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of biochemistry*, 240(3), 532-539.

Schneider, G., Schrödl, W., Wallukat, G., Müller, J., Nissen, E., Rösnspeck, W., ... & Kunze, R. (1998). Peptide design by artificial neural networks and computer-based evolutionary search. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12179-12184.

Scholtz, G. (2002). Phylogeny and evolution. *Biology of freshwater crayfish*, 30, 52.



Scott, M. G., Davidson, D. J., Gold, M. R., Bowdish, D., & Hancock, R. E. (2002). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *The journal of immunology*, 169(7), 3883-3891.

Segura, C., Guzmán, F., Salazar, L. M., Patarroyo, M. E., Orduz, S., & Lemeshko, V. (2007). BTM-P1 polycationic peptide biological activity and 3D-dimensional structure. *Biochemical and biophysical research communications*, 353(4), 908-914.

Seil, J. T., & Webster, T. J. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International journal of nanomedicine*, 7, 2767.

Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., Harwig, S. S., & Lehrer, R. I. (1985b). Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4579-4584.

Selsted, M. E., Harwig, S. S., Ganz, T., Schilling, J. W., & Lehrer, R. I. (1985a). Primary structures of three human neutrophil defensins. *The Journal of clinical investigation*, 76(4), 1436-1439.

Shariatnia, Z. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in colloid and interface science*, 263, 131-194.

Sharma, A., Gupta, P., Kumar, R., & Bhardwaj, A. (2016). dPABBs: a novel in silico approach for predicting and designing anti-biofilm peptides. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.

Sharma, A., Singla, D., Rashid, M., & Raghava, G. P. S. (2014). Designing of peptides with desired half-life in intestine-like environment. *BMC bioinformatics*, 15(1), 1-8.

Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-10.

Shi, X. Z., Zhang, R. R., Jia, Y. P., Zhao, X. F., Yu, X. Q., & Wang, J. X. (2009). Identification and molecular characterization of a Spätzle-like protein from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Fish & shellfish immunology*, 27(5), 610-617.

Shi, X. Z., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2014). A new type antimicrobial peptide astacidin functions in antibacterial immune response in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(1), 121-128.

Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H., & Usui, T. (1997). Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy*, 43(5), 340-345.

Shike, H., Lauth, X., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Van Olst, J. C., ... & Burns, J. C. (2002). Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *European Journal of Biochemistry*, 269(8), 2232-2237.

Shukla, A., Fleming, K. E., Chuang, H. F., Chau, T. M., Loose, C. R., Stephanopoulos, G. N., & Hammond, P. T. (2010). Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials*, 31(8), 2348-2357.

Silva, R. R., Avelino, K. Y., Ribeiro, K. L., Franco, O. L., Oliveira, M. D., & Andrade, C. A. (2016). Chemical immobilization of antimicrobial peptides on biomaterial surfaces. *Front. Biosci*, 8, 129-142.

Silveira, E., Freitas, A. R., Peixe, L., & Novais, C. (2009). Environmental spread of antibiotic molecules, antibiotic resistant bacteria and genes: jigsaw pieces of a public health problem.

Simmaco, M., Kreil, G., & Barra, D. (2009). Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1551-1555.

Sinha, S., Cheshenko, N., Lehrer, R. I., & Herold, B. C. (2003). NP-1, a rabbit α -defensin, prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(2), 494-500.



Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., ... & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*, 7(3), 219-242.

Skalickova, S., Heger, Z., Krejcová, L., Pekarík, V., Bastl, K., Janda, J., ... & Kizek, R. (2015). Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus. *Viruses*, 7(10), 5428-5442.

Smith, V. J., & Dyrinda, E. A. (2015). Antimicrobial proteins: from old proteins, new tricks. *Molecular immunology*, 68(2), 383-398.

Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrinda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine drugs*, 8(4), 1213-1262.

Smith, V. J., Fernandes, J. M., Kemp, G. D., & Hauton, C. (2008). Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(7), 758-772.

Söderhäll, I. (2016). Crustacean hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 129-141.

Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., ... & Bachère, E. (2005). Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, 29(10), 841-851.

Somboonwiwat, K., Bachère, E., Rimphanitchayakit, V., & Tassanakajon, A. (2008). Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(10), 1170-1176.

Song, Z., Wu, Y., Cao, Q., Wang, H., Wang, X., & Han, H. (2018). pH-responsive, light-triggered on-demand antibiotic release from functional metal-organic framework for bacterial infection combination therapy. *Advanced Functional Materials*, 28(23), 1800011.

Sotelo-Mundo, R. R., Islas-Osuna, M. A., De-la-Re-Vega, E., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F., & Yepiz-Plascencia, G. (2003). cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 15(4), 325-331.

Souza, P. F., Marques, L. S., Oliveira, J. T., Lima, P. G., Dias, L. P., Neto, N. A., ... & Freitas, C. D. (2020). Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. *Biochimie*, 175, 132-145.

Sperandeo, P., Bosco, F., Clerici, F., Polissi, A., Gelmi, M. L., & Romanelli, A. (2020). Covalent grafting of antimicrobial peptides onto microcrystalline cellulose. *ACS Applied Bio Materials*, 3(8), 4895-4901.

Sperstad, S. V., Haug, T., Paulsen, V., Rode, T. M., Strandskog, G., Solem, S. T., ... & Stensvåg, K. (2009). Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 583-591.

Sricharoen, S., Kim, J. J., Tunkijjanukij, S., & Söderhäll, I. (2005). Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish. *Developmental & Comparative Immunology*, 29(12), 1017-1031.

Stec, B. (2006). Plant thionins—the structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(12), 1370-1385.

Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H. G., ... & Schitteck, B. (2006). Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2608-2620.

Steinstraesser, L., Kraneburg, U., Jacobsen, F., & Al-Benna, S. (2011). Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*, 216(3), 322-333.



Stensvåg, K., Haug, T., Sperstad, S. V., Rekdal, Ø., Indrevoll, B., & Styrvold, O. B. (2008). Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyaas araneus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3), 275-285.

Stewart, P. S. (1998). A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, 59(3), 261-272.

Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199-210.

Stoss, T. D., Nickell, M. D., Hardin, D., Derby, C. D., & McClintock, T. S. (2004). Inducible transcript expressed by reactive epithelial cells at sites of olfactory sensory neuron proliferation. *Journal of neurobiology*, 58(3), 355-368.

Struelens, M. J. (1998). The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *Bmj*, 317(7159), 652-654.

Subhaswaraj, P., Barik, S., Macha, C., Chiranjeevi, P. V., & Siddhardha, B. (2018). Anti quorum sensing and anti biofilm efficacy of cinnamaldehyde encapsulated chitosan nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Lwt*, 97, 752-759.

Sun, C., Du, X. J., Xu, W. T., Zhang, H. W., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2010). Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4), 517-524.

Sun, C., Xu, W. T., Zhang, H. W., Dong, L. P., Zhang, T., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2011). An anti-lipopolysaccharide factor from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, exhibited antimicrobial activities in vitro and in vivo. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 295-303.

Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T., & Tassanakajon, A. (2004). Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Diseases of aquatic organisms*, 61(1-2), 123-135.

Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Jitrapakdee, S., Hirono, I., Aoki, T., & Tassanakajon, A. (2002). Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Marine Biotechnology*, 4(5), 487-494.

Supungul, P., Tang, S., Maneeruttanarungroj, C., Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T., & Tassanakajon, A. (2008). Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(1), 61-70.

Sureda, A., Box, A., Terrados, J., Deudero, S., & Pons, A. (2008). Antioxidant response of the seagrass *Posidonia oceanica* when epiphytized by the invasive macroalgae *Lophocladia lallemandii*. *Marine environmental research*, 66(3), 359-363.

Sutherland, I. W. (1999). Biofilm exopolysaccharides. In *Microbial extracellular polymeric substances* (pp. 73-92). Springer, Berlin, Heidelberg.

Tao, B., Zhao, W., Lin, C., Yuan, Z., He, Y., Lu, L., ... & Cai, K. (2020). Surface modification of titanium implants by ZIF-8@ Levo/LBL coating for inhibition of bacterial-associated infection and enhancement of in vivo osseointegration. *Chemical Engineering Journal*, 390, 124621.

Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236-1241.

Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, 8(4), 711-757.



Tanaka, S., Nakamura, T., Morita, T., & Iwanaga, S. (1982). Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of Limulus coagulation system. *Biochemical and biophysical research communications*, 105(2), 717-723.

Tasiemski, A., Schikorski, D., Le Marrec-Croq, F., Pontoire-Van Camp, C., Boidin-Wichlacz, C., & Sautière, P. E. (2007). Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(8), 749-762.

Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & shellfish immunology*, 34(4), 954-967.

Taylor, K., Barran, P. E., & Dorin, J. R. (2008). Structure-activity relationships in β -defensin peptides. *Peptide Science*, 90(1), 1-7.

Taylor, P. K., Yeung, A. T., & Hancock, R. E. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of biotechnology*, 191, 121-130.

Thakur, N., Qureshi, A., & Kumar, M. (2012). AVPpred: collection and prediction of highly effective antiviral peptides. *Nucleic acids research*, 40(W1), W199-W204.

Tharntada, S., Somboonwiwat, K., Rimphanitchayakit, V., & Tassanakajon, A. (2008). Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. *Fish & shellfish immunology*, 24(1), 46-54.

Thies, C. G., & Porche, S. (2007). Crawfish tails: a curious tale of foreign trade policy making. *Foreign Policy Analysis*, 3(2), 171-187.

Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711-721.

Thundimadathil, J. (2012). Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *Journal of amino acids*, 2012.

Tkhilaishvili, T., Winkler, T., Müller, M., Perka, C., & Trampuz, A. (2019). Bacteriophages as adjuvant to antibiotics for the treatment of periprosthetic joint infection caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(1), e00924-19.

Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules*, 25(12), 2850.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.

Tutar, O., Marín-Guirao, L., Ruiz, J. M., & Procaccini, G. (2017). Antioxidant response to heat stress in seagrasses. A gene expression study. *Marine environmental research*, 132, 94-102.

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., ... & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750-1766.

Umamaheshwari, R., Thirumaran, G., & Anantharaman, P. (2009). Potential antibacterial activities of seagrasses from Vellar Estuary; Southeast Coast of India. *Advan Biol Res*, 3(3-4), 140-143.

Unep. (2017). Frontiers 2017 emerging issues of environmental concern.

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., ... & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649-5654.

van der Does, A. M., Bogaards, S. J., Ravensbergen, B., Beekhuizen, H., van Dissel, J. T., & Nibbering, P. H. (2010). Antimicrobial peptide hLF1-11 directs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-driven



monocyte differentiation toward macrophages with enhanced recognition and clearance of pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(2), 811-816.

van der Does, A. M., Hiemstra, P. S., & Mookherjee, N. (2019). Antimicrobial host defence peptides: immunomodulatory functions and translational prospects. *Antimicrobial Peptides*, 149-171.

Van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and molecular life sciences*, 70(19), 3545-3570.

van Kan, E. J., van der Bent, A., Demel, R. A., & de Kruijff, B. (2001). Membrane activity of the peptide antibiotic clavamin and the importance of its glycine residues. *Biochemistry*, 40(21), 6398-6405.

Vasarri, M., Barletta, E., Ramazzotti, M., & Degl'Innocenti, D. (2020). In vitro anti-glycation activity of the marine plant *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Journal of Ethnopharmacology*, 259, 112960.

Vasarri, M., De Biasi, A. M., Barletta, E., Pretti, C., & Degl'Innocenti, D. (2021). An overview of new insights into the benefits of the seagrass *Posidonia oceanica* for human health. *Marine Drugs*, 19(9), 476.

Vasarri, M., Leri, M., Barletta, E., Ramazzotti, M., Marzocchini, R., & Degl'Innocenti, D. (2019). Anti-inflammatory properties of the marine plant *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Journal of Ethnopharmacology*, 247, 112252.

Velayutham, M., & Arockiaraj, J. (2022). Aquatic peptides: prospects and limitations in developing them as therapeutic products. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 15(1), 195-211.

Verweij, P. E., Chowdhary, A., Melchers, W. J., & Meis, J. F. (2016). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles?. *Clinical Infectious Diseases*, 62(3), 362-368.

Vidal-Dupiol, J., Ladrière, O., Destoumieux-Garzón, D., Sautière, P. E., Meistertzheim, A. L., Tambutté, E., ... & Mitta, G. (2011). Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22688-22698.

Viso, A. C., Pesando, D., Bernard, P., & Marty, J. C. (1993). Lipid components of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Phytochemistry*, 34(2), 381-387.

Vo, T. S., Ngo, D. H., Kang, K. H., Park, S. J., & Kim, S. K. (2014). The role of peptides derived from *Spirulina maxima* in downregulation of FcεRI-mediated allergic responses. *Molecular nutrition & food research*, 58(11), 2226-2234.

Von Wintersdorff, C. J., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., ... & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, 173.

Vriens, K., Cammue, B., & Thevissen, K. (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules*, 19(8), 12280-12303.

Vunnam, S., Juvvadi, P., ROTONDI, K. S., & Merrifield, R. B. (1998). Synthesis and study of normal, enantio, retro, and retroenantio isomers of cecropin A-melittin hybrids, their end group effects and selective enzyme inactivation. *The Journal of peptide research*, 51(1), 38-44.

Waghu, F. H., & Idicula-Thomas, S. (2020). Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Science*, 29(1), 36-42.

Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*, 7(5), 545-594.

Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1087-D1093.

Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., ... & Shan, A. (2019). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal research reviews*, 39(3), 831-859.



- Wang, K. R., Yan, J. X., Zhang, B. Z., Song, J. J., Jia, P. F., & Wang, R. (2009). Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer letters*, 278(1), 65-72.
- Wang, X., Yue, T., & Lee, T. C. (2015). Development of Pleurocidin-poly (vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. *Food control*, 54, 150-157.
- Wang, Y. S., Li, D., Shi, H. S., Wen, Y. J., Yang, L., Xu, N., ... & Wei, Y. Q. (2009). Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 mediates antitumor immunity in mice. *Clinical Cancer Research*, 15(22), 6901-6911.
- Wang, X., Han, Q., Yu, N., Wang, T., Wang, C., & Yang, R. (2018). GO-AgCl/Ag nanocomposites with enhanced visible light-driven catalytic properties for antibacterial and biofilm-disrupting applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 296-305.
- Welch, M., Mikkelsen, H., Swatton, J. E., Smith, D., Thomas, G. L., Glansdorp, F. G., & Spring, D. R. (2005). Cell-cell communication in Gram-negative bacteria. *Molecular Biosystems*, 1(3), 196-202.
- Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Heydorn, A., Molin, S., ... & Stewart, P. S. (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 6188-6196.
- World Health Organization. (2018). Global tuberculosis report 2017. 2017.
- World Health Organization. (2021). No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. 2019.
- Wicker, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Hultmark, D., Samakovlis, C., & Hoffmann, J. A. (1990). Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterecin family of immune peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 265(36), 22493-22498.
- Willcox, M. D. P., Hume, E. B. H., Aliwarga, Y., Kumar, N., & Cole, N. (2008). A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. *Journal of applied microbiology*, 105(6), 1817-1825.
- Wu, D., Gao, Y., Qi, Y., Chen, L., Ma, Y., & Li, Y. (2014). Peptide-based cancer therapy: opportunity and challenge. *Cancer letters*, 351(1), 13-22.
- Xiao, H., Shao, F., Wu, M., Ren, W., Xiong, X., Tan, B., & Yin, Y. (2015). The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 1-6.
- Xiao, M., Jasensky, J., Gerszberg, J., Chen, J., Tian, J., Lin, T., ... & Chen, Z. (2018). Chemically immobilized antimicrobial peptide on polymer and self-assembled monolayer substrates. *Langmuir*, 34(43), 12889-12896.
- Xiao, X., Wang, P., Lin, W. Z., Jia, J. H., & Chou, K. C. (2013). iAMP-2L: a two-level multi-label classifier for identifying antimicrobial peptides and their functional types. *Analytical biochemistry*, 436(2), 168-177.
- Xiao, Y. F., Jie, M. M., Li, B. S., Hu, C. J., Xie, R., Tang, B., & Yang, S. M. (2015). Peptide-based treatment: a promising cancer therapy. *Journal of immunology research*, 2015.
- Xu, N., Wang, Y. S., Pan, W. B., Xiao, B., Wen, Y. J., Chen, X. C., ... & Wei, Y. Q. (2008). Human α -defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice. *Molecular cancer therapeutics*, 7(6), 1588-1597.
- Xu, Q., Hu, X., & Wang, Y. (2021). Alternatives to Conventional Antibiotic Therapy: Potential Therapeutic Strategies of Combating Antimicrobial-Resistance and Biofilm-Related Infections. *Molecular biotechnology*, 63(12), 1103-1124.
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., & Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of applied Toxicology*, 29(1), 69-78.



- Yien, L., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International journal of Biomaterials*, 2012.
- Yang, Y., Poncet, J., Garnier, J., Zatylny, C., Bachère, E., & Aumelas, A. (2003). Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36859-36867.
- Yasin, B., Pang, M., Turner, J. S., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J., ... & Wagar, E. A. (2000). Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(3), 187-194.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), 27-55.
- Yedery, R. D., & Reddy, K. V. R. (2009a). Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolysaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Fish & shellfish immunology*, 27(2), 275-284.
- Yedery, R. D., & Reddy, K. V. R. (2009b). Purification and characterization of antibacterial proteins from granular hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1).
- Yeung, A. T., Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2011). Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2161-2176.
- Yount, N. Y., & Yeaman, M. R. (2013). Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of sciences*, 1277(1), 127-138.
- Yount, N. Y., Bayer, A. S., Xiong, Y. Q., & Yeaman, M. R. (2006). Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 84(5), 435-458.
- Yu, Q., Cho, J., Shivapooja, P., Ista, L. K., & López, G. P. (2013). Nanopatterned smart polymer surfaces for controlled attachment, killing, and release of bacteria. *ACS applied materials & interfaces*, 5(19), 9295-9304.
- Yu, A. Q., Shi, Y. H., & Wang, Q. (2016). Characterisation of a novel type i crustin involved in antibacterial and antifungal responses in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 48, 30-38.
- Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R., & Rolff, J. (2018). Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1874), 20172687.
- Yu, K., Lo, J. C., Mei, Y., Haney, E. F., Siren, E., Kalathottukaren, M. T., ... & Kizhakkedathu, J. N. (2015). Toward infection-resistant surfaces: achieving high antimicrobial peptide potency by modulating the functionality of polymer brush and peptide. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(51), 28591-28605.
- Yuan, K., Wang, X., Chen, X., Zhao, Z., Fang, L., Chen, B., ... & Chen, B. (2019a). Occurrence of antibiotic resistance genes in extracellular and intracellular DNA from sediments collected from two types of aquaculture farms. *Chemosphere*, 234, 520-527.
- Yuan, Q. B., Huang, Y. M., Wu, W. B., Zuo, P., Hu, N., Zhou, Y. Z., & Alvarez, P. J. (2019b). Redistribution of intracellular and extracellular free & adsorbed antibiotic resistance genes through a wastewater treatment plant by an enhanced extracellular DNA extraction method with magnetic beads. *Environment international*, 131, 104986.
- Yue, F., Pan, L., Miao, J., Zhang, L., & Li, J. (2010). Molecular cloning, characterization and mRNA expression of two antibacterial peptides: crustin and anti-lipopolysaccharide factor in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 156(2), 77-85.
- Yuvaraj, N., Kanmani, P., Satishkumar, R., Paari, A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2012). Seagrass as a potential source of natural antioxidant and anti-inflammatory agents. *Pharmaceutical biology*, 50(4), 458-467.



Zahreddine, H., & Borden, K. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in pharmacology*, 4, 28.

Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6).

Zanjani, N. T., Miranda-Saksena, M., Cunningham, A. L., & Dehghani, F. (2018). Antimicrobial peptides of marine crustaceans: The potential and challenges of developing therapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry*, 25(19), 2245-2259.

Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5449-5453.

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., & York, D. (2007). Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, 9(3), 479-489.

Zhang, H. W., Sun, C., Sun, S. S., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2010). Functional analysis of two invertebrate-type lysozymes from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 1066-1072.

Zhang, J., Li, F., Wang, Z., & Xiang, J. (2007). Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of biotechnology*, 127(4), 605-614.

Zhang, J., Yang, M., Zhong, H., Liu, M., Sui, Q., Zheng, L., ... & Wei, Y. (2018). Deciphering the factors influencing the discrepant fate of antibiotic resistance genes in sludge and water phases during municipal wastewater treatment. *Bioresource technology*, 265, 310-319.

Zhang, T. C., & Bishop, P. L. (1996). Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilm. *Water environment research*, 68(7), 1107-1115.

Zhang, X. Y., Zhao, Y. Q., Zhang, Y., Wang, A., Ding, X., Li, Y., ... & Xu, F. J. (2019). Antimicrobial peptide-conjugated hierarchical antifouling polymer brushes for functionalized catheter surfaces. *Biomacromolecules*, 20(11), 4171-4179.

Zhang, Y., Snow, D. D., Parker, D., Zhou, Z., & Li, X. (2013). Intracellular and extracellular antimicrobial resistance genes in the sludge of livestock waste management structures. *Environmental science & technology*, 47(18), 10206-10213.

Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2008). The antimicrobial peptides of the immune response of shrimp. *Invertebrate Survival Journal*, 5(2), 162-179.

Zhong, G., Cheng, J., Liang, Z. C., Xu, L., Lou, W., Bao, C., ... & Fan, W. (2017). Short synthetic β -sheet antimicrobial peptides for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Advanced healthcare materials*, 6(7), 1601134.

Zhu, C. F., Peng, H. B., Liu, G. Q., Zhang, F., & Li, Y. (2010). Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes. *Nutrition*, 26(10), 1014-1020.

Zhu, J. J., Ye, Z. Z., Li, C. S., Kausar, S., Abbas, M. N., Xiang, G. H., ... & Dai, L. S. (2019). Identification and molecular characterization of a novel anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *International journal of biological macromolecules*, 132, 43-50.