

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E SCIENZE DELLA SALUTE



Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale e Clinica

XXXIII ciclo

Tesi in Microbiologia e Microbiologia Clinica (MED/ 07)

***“Modelli preclinici non convenzionali: vantaggi, limiti e applicabilità
dalla proof of concept agli aspetti regolatori”***

Tutor:

Chiar.mo Prof. Roberto Di Marco

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Marco Sarchiapone

Dottorando:

Marco Alfio Cutuli

Marco Alfio Cutuli
Matr. 160473

Anno Accademico 2019 / 2020

Sommario

Introduzione.....	1
1.1 Modelli sperimentali alternativi <i>in vivo</i>	1
1.2 Quadro normativo Europeo sulla sperimentazione animale.....	3
Capitolo I: <i>Galleria mellonella</i>	6
2.1 Modello ospite <i>G. mellonella</i>	6
2.2 Sistema immunitario <i>G. mellonella</i>	9
2.2.1 Risposta cellulare e opsonine.....	10
2.2.2 Peptidi antimicrobici e proteine immuno-rilevanti.....	12
2.3 Aspetti sperimentali e messa a punto del modello <i>G. mellonella</i>	16
2.4 Applicazioni del modello <i>G. mellonella</i> in microbiologia.....	19
2.4.1 <i>G. mellonella</i> per indagare la virulenza dei batteri e funghi patogeni.....	19
2.4.2 <i>G. mellonella</i> per lo studio <i>in vivo</i> dell'attività di agenti antimicrobici	20
2.4.3 <i>G. mellonella</i> modello per investigare le proprietà dei probiotici	22
2.4.4 <i>G. mellonella</i> per lo studio dell'attività di tossine batteriche.....	23
2.5 Limitazioni del modello <i>G. mellonella</i>	24
2.6 Applicazione del modello <i>G. mellonella</i> per valutare l'attività antimicrobica di sostanze naturali.....	26
2.6.1 Stato dell'arte e scopo dello studio.....	26
2.6.2 Materiali e Metodi	32
2.6.3 Risultati	43
2.6.4 Discussione	61
2.7 Applicazione del modello <i>G. mellonella</i> per valutare l'azione immunosoppressiva del desametasone sul decorso dell'infezione con <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	67
2.7.1 Stato dell'arte e scopo dello studio.....	67
2.7.2 Materiali e metodi	69
2.7.3 Risultati	72
2.7.4 Discussione	78
2.8 <i>G. mellonella</i> per valutare l'attività di ceppi potenzialmente probiotici: Effetto di <i>Akkermansia muciniphila</i> sul decorso dell'infezione da <i>E. coli</i> nel modello <i>G. mellonella</i>	81
2.8.1 Stato dell'arte e scopo dello studio.....	81
2.8.2 Materiali e Metodi.....	83
2.8.3 Risultati	85
2.8.4 Discussione	88
2.9 <i>G. mellonella</i> per valutare l'attività di ceppi potenzialmente probiotici: studio pilota sulla somministrazione orale e adesione di <i>Lactobacillus plantarum</i>	92

2.9.1 Stato dell'arte e scopo dello studio.....	92
2.9.2 Materiali e Metodi.....	94
2.9.3 Risultati	99
2.9.4 Discussione	103
Capitolo II: <i>Tenebrio molitor</i>	107
3.1 <i>Tenebrio molitor</i>	107
3.2 Cenni di fisiologia del tratto digerente degli insetti e similarità con i mammiferi ..	108
2.3 Modelli di inflammatory bowel disease (IBD)	111
3.4 Studio preliminare modello di colite indotta da DSS nell'insetto <i>Tenebrio molitor</i>	114
3.4.1 Stato dall'arte e scopo dello studio	114
3.4.2 Materiali e metodi	117
3.4.3 Risultati	120
3.4.4 Discussione	126
Capitolo III: <i>Limacus Flavus</i>	129
4.1 Legislazione e panoramica dei test per la valutazione dell'irritazione mucosale ..	129
4.2 Valutazione del potenziale di irritazione mucosale di sostanze biocide: specie di lumaca <i>Limacus flavus</i> come test alternativo di tossicità mucosale.....	131
4.2.1 Stato dell'arte e scopo dello studio.....	131
4.2.2 Materiali e metodi	136
4.2.3 Risultati	142
4.2.4 Discussione	153
5.0 Conclusioni.....	160
Bibliografia	163

Introduzione

1.1 Modelli sperimentali alternativi *in vivo*

Un modello sperimentale viene definito come una rappresentazione semplice di un sistema più complesso.

La maggior parte delle nostre conoscenze in campo medico deriva da studi sperimentali condotti su animali, in seguito estrapolati e traslati sull'uomo.

I modelli animali sono essenziali per colmare il divario traslazionale tra ricerca preclinica e clinica. Tuttavia, un modello non ha l'obiettivo di riprodurre un fenomeno in tutte le sue complessità, ma di mimare specifici processi di base fisiologici e biologici delle malattie umane in altre specie animali [1].

Fin dal 1900 i modelli vertebrati rappresentano il *gold standard* per gli studi preclinici *in vivo*, in quanto hanno fornito preziose informazioni sull'eziologia delle malattie e sul meccanismo d'azione e tossicità di molteplici farmaci [2].

In particolare, i modelli murini sono largamente utilizzati nella ricerca come strumento *in vivo*, per le somiglianze anatomiche, fisiologiche e immunologiche con l'uomo.

I modelli che utilizzano mammiferi, pur essendo una necessità, non sono privi di limitazioni, infatti oltre alle preoccupazioni etiche, l'uso di animali nella ricerca richiede un elevato investimento economico, manodopera qualificata e protocolli che richiedono tempo [3].

Le nuove regole globali e una maggiore coscienza etica hanno orientato le Autorità Competenti per la sperimentazione animale verso controlli sempre più rigorosi sull'impiego dei vertebrati negli studi *in vivo*.

Di conseguenza, negli ultimi anni, sono stati proposti nuovi modelli alternativi per ovviare ai rilevanti costi e ai tempi necessari per ottenere le autorizzazioni per gli studi condotti sui vertebrati. Inoltre, secondo le nuove prescrizioni i ricercatori devono attenersi al principio delle “3R” (*replacement, reduction e refinement*) sugli esperimenti condotti sugli animali [4, 5].

Pertanto la selezione, lo sviluppo e il perfezionamento di approcci alternativi che non utilizzano o riducono l’utilizzo dei vertebrati è un argomento attuale di cruciale interesse. Per oltre 100 anni, il moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*, è stato un potente strumento per studi genetici, comportamentali e molecolari.

Oltre alla *Drosophila*, altri insetti sono stati più recentemente valutati come possibili modelli alternativi ai test sui mammiferi, ad esempio la *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Periplaneta americana* e la *Locusta migratoria* sono emersi come organismi modello nella ricerca biologica, medica e nella ricerca ambientale [6, 7].

In questo lavoro di tesi sono stati esaminati tre modelli sperimentali alternativi.

La *G. mellonella* come *host* per lo studio del rapporto ospite parassita e come modello preclinico per lo studio di sostanze antimicrobiche e ceppi batterici probiotici.

Le larve di *Tenebrio molitor* presentano nell’intestino medio microvilli e cellule calciformi simili a quelle dei vertebrati. Sfruttando questa caratteristica è stato proposto un modello innovativo di colite indotta da destrano sodio solfato (DSS).

Infine è stato messo a punto un modello per valutare l’irritazione mucosale di sostanze chimiche utilizzando la specie di lumaca *Limacus flavus*

L’uso di questi host offre vantaggi economici ed etici rispetto ai mammiferi, inoltre non richiedendo approvazioni etiche e limitazioni sul numero di animali che possono essere

utilizzati in un dato studio sono adatti per condurre screening rapidi ad alto rendimento e con un elevato grado di robustezza statistica [8-10].

1.2 Quadro normativo Europeo sulla sperimentazione animale

Studi scientifici sugli animali sono essenziali per lo sviluppo di nuove tecnologie, farmaci e per il miglioramento della salute umana. I ricercatori di tutto il mondo, soprattutto per motivi morali ed etici sono tenuti a giustificare i loro approcci sperimentali sugli studi condotti utilizzando animali. Vi è una grande attenzione da parte dei ricercatori e degli enti regolatori internazionali al benessere e alla cura degli animali da laboratorio al fine di non arrecare sofferenze inutili alle cavie se non per validi motivi scientifici e previa valutazione del rapporto tra danno e beneficio. Pertanto, la comunità scientifica accetta che gli animali vengano utilizzati solo per la ricerca all'interno di un quadro legislativo ed etico ben definito [11].

In Europa la sperimentazione animale è regolata dalla direttiva CE 63/2010 che ha sostituito la direttiva 86/609/CEE. La direttiva CE 63/2010 ha l'obiettivo di armonizzare il quadro legislativo all'interno dell'Unione Europea (UE), aumentare significativamente il benessere degli animali utilizzati nella ricerca di base o applicata e attuare esplicitamente i principi delle 3R [12].

La normativa è costituita da una parte introduttiva che precede 66 disposizioni (suddivise in 6 capitoli) e 8 allegati supplementari. Il concetto delle 3R è stato sviluppato per la prima volta da Russell e Burch nel 1959 e si è radicato nella legislazione e nelle linee guida relative alla sperimentazione animale in molti paesi. Questo principio fa riferimento a tre essenziali concetti: rimpiazzare (*replacement*), ridurre (*reduction*) e rifinire

(*refinement*) [13]. Secondo queste regole l'uso di animali è consentito solo se non esistono metodi alternativi comparabili (*replacement*). Il numero delle cavie utilizzate negli esperimenti deve essere ridotto al minimo ovviamente senza compromettere la validità scientifica del dato sperimentale (*reduction*). Infine, gli animali devono essere manipolati da personale qualificato in stabulari attrezzati e protocolli ben definiti devono essere applicati al fine di ottenere risultati riproducibili e per ridurre il più possibile il dolore e la sofferenza delle cavie (*refinement*) [12, 13].

Queste normative hanno introdotto un sofisticato sistema di controllo che in Europa va applicato a tutti gli animali vertebrati vivi non umani, nonché ad alcuni invertebrati che provano l'esperienza del dolore (cefalopodi) [14].

Per ogni sperimentazione animale è obbligatorio ottenere l'autorizzazione del Ministero della Salute. In Italia l'Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA) ha il compito di inoltrare le domande di autorizzazione all'Ufficio VI della DGSAF del Ministero. L'autorizzazione viene rilasciata dopo una valutazione da parte del comitato tecnico-scientifico dell'Istituto Superiore di Sanità o di altri enti tecnico-scientifici. La sperimentazione può avere inizio soltanto quando si riceve una valutazione favorevole, che attesta che i benefici ottenibili dallo studio superano i danni causati agli animali. Per la richiesta di autorizzazione è necessario il pagamento della relativa Tassa e per ricevere la comunicazione della valutazione Ministeriale sul progetto di ricerca sono richiesti circa 40 giorni lavorativi o 55 giorni lavorativi per progetti complessi o multidisciplinari [15]. Le norme e le procedure burocratiche necessarie per tutti gli studi condotti sui vertebrati (compreso lo zebrafish) non vengono attualmente applicate, in molti stati, per gli studi sugli invertebrati come insetti e nematodi (tabella 1). Ciò consente ai ricercatori di

ottenere rapidamente e a basso costo dei dati *in vivo*, traslabili parzialmente sui mammiferi, e quindi effettuare studi sui vertebrati o studi clinici più mirati.

Paesi	Animali protetti da norme legislative
Australia	Vertebrati e cefalopodi
Brasile	Tutti gli animali
Cina	Tutti gli animali
Europa	Vertebrati adulti Mammiferi Uccelli e rettili (esclusa la fase embrionale) Anfibi e pesci che sono in grado di nutrirsi autonomamente Cefalopodi (esclusa la fase embrionale)
India	Tutti gli animali
Sudafrica	Tutti i vertebrati (compresi uova, feti ed embrioni) Cefalopodi
Stati Uniti	Vertebrati a sangue caldo (esclusi gli animali da allevamento utilizzati nella ricerca alimentare e industriale)

Tabella 1: Animali protetti da norme legislative sulla sperimentazione *in vivo* [13]

Capitolo I: *Galleria mellonella*

2.1 Modello ospite *G. mellonella*

Gli insetti sono invertebrati appartenenti al gruppo degli Artropodi e rappresentano nel loro insieme la classe più grande del regno animale con circa un milione di specie conosciute.

Sono caratterizzati da un sistema immunitario altamente versatile ed efficiente che ha permesso agli insetti di sopravvivere e di colonizzare un'ampia varietà di ambienti. Invertebrati e vertebrati sono separati da circa 500 milioni di anni di evoluzione, ma nonostante questo ci sono sorprendenti somiglianze funzionali e strutturali tra loro come ad esempio il sistema immunitario innato e il tratto gastrointestinale [16-18].

Pertanto una vasta gamma di insetti sono stati utilizzati come alternativa ai modelli vertebrati convenzionali per studiare la virulenza degli agenti patogeni, lo screening di sostanze antimicrobiche e per lo studio del rapporto ospite-parassita [19].

Tra i modelli di invertebrati impiegati nella ricerca microbiologica le larve di *Galleria mellonella* rappresentano un modello emergente nella ricerca microbiologica [20].

La *G. mellonella* è un insetto, infestante gli alveari dell'*Apis mellifera*, membro della famiglia dei *Pyralidae* dell'ordine dei Lepidotteri. Questo insetto vivendo all'interno degli alveari si nutre principalmente di cera e polline ed è in grado di adattarsi anche alla temperatura di 37°C.

Il suo sviluppo avviene attraverso quattro stadi: uovo, larva, pupa e adulto.

Le larve si evolvono attraverso 6 stadi larvali, in un periodo di circa 5-6 settimane, prima di raggiungere la fase di pre-pupa. Le larve di *G. mellonella* (figura 2a), vengono utilizzate

come modello animale, si presentano opache di colore bianco, sono lunghe circa 2-3 cm e pesano da 0,3 a 0,5 g [21, 22].

La *G. mellonella*, così come tutti gli insetti, non possiede una risposta immunitaria adattiva. Tuttavia, possiede meccanismi di risposta innata a livello epiteliale, cellulare e umorale sorprendentemente ben conservati e che condividono le stesse origini evolutive con i mammiferi [23]. La mancanza di immunità adattativa non è da considerare come uno svantaggio, piuttosto i modelli di insetti consentono lo studio delle interazioni ospite-parassita e dei relativi meccanismi di immunità innata senza l'interferenza delle risposte adattative [19, 24].

Rispetto ad altri modelli di invertebrati, come *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* le larve di *G. mellonella* presentano numerosi vantaggi (tabella 2a).

Il sistema di difesa antimicrobica delle larve è molto più avanzato rispetto a quello dei nematodi e delle mosche. Le cellule epiteliali dell'intestino medio delle larve condividono fenotipi fisiologici simili a quelli delle cellule intestinali dei mammiferi [22]. La possibilità di stabulare le larve a 37°C consente di effettuare studi sui fattori di virulenza dipendenti dalla temperatura. Infine, le dimensioni delle larve di *G. mellonella* consentono di inoculare sia microorganismi che sostanze antimicrobiche permettendo una facile manipolazione e raccolta di campioni di tessuto ed emolinfa senza richiedere attrezzature sofisticate [25].



Figura 2a: *Galleria mellonella* all'ultimo stadio larvale

Caratteristiche	Modelli di invertebrati			Vantaggi
	<i>G.mellonella</i>	<i>C.elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	
Temperatura di stabulazione	37°C	15°-25°C	16°-29°C	Espressione di fattori di virulenza dei microorganismi dipendenti dalla temperatura
Ciclo vitale	breve	lungo	lungo	Facilita la sperimentazione, stabulazione e l'allevamento
Grandezza (lunghezza)	20-30 mm	1 mm	3 mm	Facilita l'inoculo e la manipolazione di emolinfa e tessuti
Fagocitosi	Presente a	Assente	Assente	Traslabilità con i neutrofili umani; informazioni interazione ospite parassita.

Tabella 2a. Vantaggi di *G. mellonella* rispetto ad altri invertebrati come modello ospite in microbiologia [19]

2.2 Sistema immunitario *G. mellonella*

Una delle ragioni principali del successo del modello *G. mellonella* nello studio della virulenza microbica è dovuto al suo sistema immunitario che condivide un alto grado di somiglianza strutturale e funzionale con il sistema immunitario innato dei vertebrati [26]. La cuticola, costituita principalmente da chitina, è la prima linea di difesa contro gli agenti patogeni e agisce in modo simile alla pelle dei mammiferi, fornendo una barriera fisica contro le infezioni[27]. Gli agenti patogeni che penetrano la cuticola attivano meccanismi di guarigione della ferita attraverso il meccanismo della coagulazione [18].

La coagulazione è una componente essenziale del sistema immunitario innato e promuove l'emostasi inducendo la formazione di una matrice / coagulo insolubile nell'emolinfa dell'insetto o nel sangue dei mammiferi. La formazione di un coagulo contribuisce a chiudere le ferite e a prevenire l'ingresso e l'infezione di agenti patogeni [28].

Somiglianze tra le cascate di coagulazione di insetti e mammiferi possono essere osservate nella famiglia delle transglutaminasi che sono coinvolte nell'indurimento del coagulo. Le transglutaminasi degli insetti sono omologhe al fattore di coagulazione umano XIIIa. Inoltre, sono state osservate somiglianze nella sequenza proteica anche tra l'emolectina degli insetti e il fattore di von Willebrand umano, una glicoproteina coinvolta nell'emostasi [29].

Altre barriere importanti sono rappresentate dal rivestimento di chitina dell'intestino anteriore (foregut) e posteriore (hindgut) e dalle condizioni biochimiche dell'intestino il pH, gli enzimi digestivi e il microbiota generano un ambiente sfavorevole alla colonizzazione dei patogeni [3, 30].

Quando le barriere fisiologiche sono compromesse, gli insetti attivano la risposta immunitaria innata costituita da due componenti fortemente interconnesse tra loro: la risposta cellulare e umorale [31].

La risposta immunitaria cellulare è mediata dagli emociti coinvolti nella fagocitosi, nodulazione e incapsulamento [17]. Gli ematociti si trovano all'interno dell'emolinfa, questa presenta funzioni simili al sangue dei mammiferi come il trasporto di nutrienti, prodotti di scarto e molecole di segnale; tuttavia non ha nessun ruolo nel trasporto di ossigeno [32].

La risposta umorale comprende una vasta gamma di molecole effettrici tra cui opsonine, peptidi antimicrobici e proteine coinvolte nel processo di melanizzazione che svolgono un ruolo cruciale nell'ultima linea di difesa contro i patogeni [33].

2.2.1 Risposta cellulare e opsonine

Nell'emolinfa di *G. mellonella* sono stati identificati e caratterizzati quattro diversi tipi di emociti: plasmacociti, granulociti, cellule sferiche e oenocitoidi. I plasmacociti e le cellule granulari svolgono un ruolo chiave nella difesa cellulare e sono coinvolti nella fagocitosi, nella nodulazione e nell'incapsulamento [34, 35].

Affinché le cellule fagocitiche possano fagocitare e uccidere gli agenti patogeni, gli ematociti devono prima riconoscere gli agenti patogeni invasori attraverso meccanismi di riconoscimento che mostrano somiglianze con quelli utilizzati dai mammiferi [17, 19]. Infatti il riconoscimento e le componenti effettive delle risposte immunitarie innate si sono conservate nel corso dell'evoluzione.

Gli ematociti identificano i microrganismi patogeni attraverso l'interazione diretta delle proteine di riconoscimento dei patogeni (PRR) con pattern molecolari associati ai

patogeni (PAMP), queste opsonine sono simili ai recettori di riconoscimento del pattern presenti nei mammiferi [36].

G. mellonella produce diverse proteine plasmatiche che fungono da opsonine che riconoscono e si legano ai componenti strutturali microbici. Tra le PRR sono stati identificate nelle larve di *G. mellonella* le proteine di riconoscimento dei peptidoglicani (PGRP), proteine leganti i batteri Gram negativi (GNBP) e l'apolipoproteina III che media il riconoscimento dei beta-1,3 glucani e l'incapsulamento cellulare [37, 38]. ApoLp-III mostra un'elevata omologia con l'apolipoproteina E (apoE) dei mammiferi, proteina coinvolta nella disintossicazione da LPS, nella stimolazione della fagocitosi e nel rilascio di ossido nitrico (NO) dalle piastrine [39, 40].

Le PRR degli insetti si legano specificamente e idrolizzano il peptidoglicano batterico, permettendo il legame con i recettori localizzati sugli ematociti e di conseguenza innescano le vie di trasduzione del segnale Toll, IMD e Jstat. Queste vie portano all'attivazione dei fattori di trascrizione NFκB che inducono la fagocitosi e causano la degranulazione con conseguente rilascio di peptidi antimicrobici [18].

Le principali vie di segnalazione Toll e Imd sono mediate da recettori accoppiati a proteine G come *Drosophila* toll, toll-like e 18 wheeler [37].

Oltre alle principali proteine di segnalazione immunitaria, le larve immuno stimolate di *G. mellonella* esprimono sugli emociti una proteina con elevata omologia alla calreticulina umana presente sui neutrofili, che si ritiene sia coinvolta nella discriminazione tra self e non self nelle risposte di difesa cellulare [41].

Dopo che sono stati fagocitati, i patogeni vengono neutralizzati da diversi meccanismi, tra cui la secrezione di enzimi litici processo noto come degranulazione e la produzione

di specie reattive dell'ossigeno generate dal burst ossidativo catalizzato dal complesso della NADPH ossidasi [42].

Negli ematociti sono state identificate proteine omologhe a proteine essenziali per la generazione degli anioni superossido dei neutrofilo umani, in particolare le proteine p47 e p67. Nei neutrofilo il complesso funzionale NADPH si forma dopo la traslocazione delle proteine p47 phox e p67 phox dal citosol alla membrana plasmatica [43].

L'incapsulamento è una risposta immunitaria rivolta alla neutralizzazione di microbi più grandi, come protozoi e nematodi parassiti. Questo processo è mediato dai granulociti che si legano intorno al patogeno e rilasciano peptidi che promuovono l'adesione dei plasmaciti attorno al bersaglio estraneo [44].

Le infezioni batteriche e fungine su larga scala delle larve sono isolate dalla reazione di nodulazione. Un processo complesso che inizia con la microaggregazione degli emociti, che intrappolano un gran numero di microrganismi. Questi micro-aggregati crescono reclutando infine un ultimo strato di plasmaciti che circonda i noduli. I siti nodulari si attaccano alla parete del corpo o ai vari organi interni degli insetti portando all'attivazione della cascata della fenolossidasi e alla conseguente formazione di melanina [45].

2.2.2 Peptidi antimicrobici e proteine immuno-rilevanti

La risposta umorale di *G.mellonella* è caratterizzata, oltre che dalle opsonine, dai peptidi antimicrobici (AMP), dagli inibitori delle metalloproteinasi (IMPI) e dalle proteine coinvolte nella via della fenolossidasi. Studi di proteomica hanno recentemente dimostrato che i meccanismi molecolari che regolano la produzione di AMP sono regolati, in parte, da microRNA non codificanti (miRNA), come avviene nei vertebrati

[46]. I peptidi antimicrobici svolgono un ruolo importante nell'immunità innata mostrando attività immunomodulatoria e/o microbica ad ampio spettro [47, 48]. Gli AMP degli insetti sono secreti principalmente dagli emociti, dal corpo grasso, dal tratto digerente, nel tratto riproduttivo e nelle ghiandole salivari. Nei vertebrati gli AMP sono prodotti dalle superfici epiteliali e dalle cellule fagocitiche. Nell'emolinfa di *G. mellonella* sono stati identificati un'ampia gamma di AMP: cecropina (attiva contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi), gallerimicina (attiva contro funghi entomopatogeni ma non attiva contro i lieviti), galiomicina (attiva contro funghi e lievito filamentosi ma nessuna attività antibatterica), gloverina e moricina (particolarmente attive contro funghi filamentosi ma anche, contro lieviti, batteri Gram-positivi e Gram-negativi), Il lisozima (degrada il peptidoglicano della parete cellulare idrolizzando il legame β -1, 4 tra N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico) [3, 49].

In risposta all'infezione batterica e fungina nell'emolinfa di *G. mellonella* è stato isolato un inibitore della metalloproteinasi degli insetti IMPI-1. L'IMPI-1 è un peptide glicosilato e termostabile con peso molecolare 8,6 kDa, contenente 5 intermolecolari legami di disolfuro agisce inibendo le metalloproteinasi contenenti zinco [50].

La profenolossidasi è stata tra le prime proteine coinvolte nella risposta immunitaria identificate in *G. mellonella*. Questo proenzima è presente negli ematociti principalmente negli enocitoidi [51]. Dopo il riconoscimento dell'infezione il proenzima viene rilasciato dagli enocitoidi e in seguito viene attivato da una serina proteasi. La fenolossidasi, è un enzima contenente rame, mostra regioni di sequenza simili alle proteine C3 e C4 del complemento dei vertebrati [52]. Il complesso della profenolossidasi comprende anche inibitori della serina proteasi che impediscono l'iperattivazione dell'enzima. Il controllo dell'attività della fenolossidasi è molto importante a causa dell'elevata citotossicità dei

prodotti intermedi: diidrossifenilalanina (DOPA), il chinone e i radicali liberi che potrebbe danneggiare le cellule ospitanti [53].

È stato dimostrato che i chinoni, formati dall'attivazione della cascata della fenolossidasi, polimerizzano trasformandosi in granuli di melanina. Il processo di melanizzazione collabora con la risposta immunitaria cellulare, infatti la melanina si deposita intorno ai parassiti e ai microbi favorendone l'intrappolamento in capsule o noduli. La forma e la velocità con cui avviene la melanizzazione varia a seconda della virulenza del patogeno [54]. Tipicamente, la melanizzazione inizia con macchie nere distinte sulla superficie della cuticola larvale e con il progredire dell'infezione la larva può diventare completamente melanizzata. Questo evento è correlato alla successiva morte delle larve [8]. Sebbene ci siano differenze significative tra la componente umorale del sistema immunitario degli insetti e il sistema immunitario innato dei mammiferi, le somiglianze presenti sono sufficienti per consentire l'uso della *G. mellonella* come modello per lo studio del rapporto ospite-parassita e lo screening di sostanze biologicamente attive.

Componenti della risposta immunitaria innata di <i>G. mellonella</i>	Attività in <i>G. mellonella</i>	Sovrapposizioni con il sistema immunitario innato dei mammiferi
• Risposta cellulare		
Ematociti: plasmotociti granulociti cellule sferiche oenocitoidi	Cellule coinvolte nella fagocitosi, nodulazione e incapsulamento. Vanno incontro al processo di degranulazione. ROS: O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ , NO ⁻ AMPs: Peroxynectina, transferrina, lisozima, defensina Recettori: TLRs, B-1,3-glucan, IL-IR Fattori di trascrizione: NFκB, IκB Cascata di segnalazione: IMD, JNK, JAK-STAT Chinasi: p38 MAPK, ERK, PKC, PKA	Neutrofili: attività fagocitaria. Vanno incontro al processo di degranulazione. ROS: O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ , NO ⁻ AMPs: MPO, transferrina, lisozima, defensina Recettori: TLRs, B-1,3-glucan, IL-IR Fattori di trascrizione: NFκB, IκB Cascata di segnalazione: IMD, JNK, JAK-STAT Chinasi: p38 MAPK, ERK, PKC, PKA
• Opsonine		
a) Apolipoproteina III (apoL-III) b) Proteine di riconoscimento del peptidico glicano (PGRP) c) Proteine leganti i batteri Gram-negativi (GNBP) d) cationic protein 8 (GmCP8) e) hemolina	Si legano a componenti strutturali dei microorganismi aumentando enormemente l'efficienza della fagocitosi in quanto vengono riconosciuti da recettori espressi sulla membrana degli ematociti	ApoLp-III mostra un'elevata omologia con l'apolipoproteina E (apoE) dei mammiferi.
• Peptidi antimicrobici (AMPs)		
Lisozima, cecropina morcin-like peptides, gloverina, galiomcina, gallerimicina, galleria defensina, Gm proline- rich peptides, Gm anionic peptide 1 and 2, inducibile serine protease inhibitor 2, heliocin-like peptide, x-tox, Gm apolipophoricin	Piccole molecole cariche positivamente secrete nel corso dell'infezione e dotate di attività microbica ad ampio spettro.	α e β defensina, catelicidina, istatina 5, dermicidina e lisozima sono AMPs identificati nei mammiferi oltre all'azione microbica esplicano ruoli immunomodulatori come la modulazione delle citochine e chemochine.
• melanizzazione		
Formazioni di granuli di melanina dalla polimerizzazione dei chinoni	Processo catalizzato dall'enzima fenolossidasi. Ha un ruolo importante per l'eliminazione dei patogeni	Presenta analogie con il sistema del complemento in particolare la fenolossidasi presenta delle sovrapposizioni strutturali con le proteine del complemento c3 e c4

Tabella 2b: componenti del sistema immunitario innato di *G. mellonella* e sovrapposizioni con il sistema immunitario dei mammiferi [8, 17, 28]

2.3 Aspetti sperimentali e messa a punto del modello *G. mellonella*

Le larve al quinto stadio larvale, lunghe da 2 a 3 cm e di peso compreso tra i 250-300mg, vengono abitualmente utilizzate negli studi sperimentali. Le larve possono essere stabulate a 15 C° in trucioli di legno o su carta da filtro, è raccomandato di starvare le larve almeno 24 ore prima dell'infezione [19, 26]. Infatti diversi studi dimostrano che la composizione e la qualità della dieta delle larve sono fattori importanti che possono influenzare significativamente l'immunità dell'insetto e di conseguenza la suscettibilità alle infezioni [55]. Possono essere acquistate direttamente da fornitori locali che utilizzano diete artificiali certificate prive di antibiotici, o possono essere allevate direttamente in laboratorio [26, 56]. Attualmente soltanto un'azienda (TruLarv™) alleva larve standardizzate a scopo scientifico e garantisce risultati sperimentali con un maggiore grado di riproducibilità rispetto a quelle convenzionali [57].

Prima di ogni esperimento devono essere selezionate le larve che presentano un'elevata motilità (a meno che formano sottili bozzoli di seta, che devono essere rimossi delicatamente prima dell'inoculazione) e che hanno un colore crema chiaro relativamente uniforme e nessun segno di melanizzazione [56, 58, 59].

L'iniezione intra-emocelica per via dell'elevata precisione è il metodo di inoculazione più utilizzato per somministrare sostanza o per indurre l'infezione in *G. mellonella*. Queste vengono solitamente effettuate nell'ultima proleg destra o sinistra delle larve con siringhe da insulina da tuberculina o Hamilton con l'ausilio di dosatori semi-automatici in quanto il volume dell'inoculo varia da 10 a 20 µL. Gli insetti sono comunemente tenuti delicatamente tra il pollice e l'indice dell'operatore, e la cuticola della larva viene perforata longitudinalmente dall'ago prestando attenzione nel non danneggiare gli organi interni [19, 26]. Altro metodo, meno diffuso, per infettare le larve è quello dell'alimentazione

forzata o gavage che presenta il vantaggio di una via più naturale di esposizione al patogeno e rappresenta meglio la via di somministrazione di probiotici [60]

Per avere risultati statisticamente rilevanti è necessario utilizzare almeno 10-20 larve per ogni gruppo di trattamento e controllo [8].

Dopo l'inoculo, le larve vengono incubate senza cibo alla temperatura di 37°C e preferibilmente in un ambiente ad umidità controllata. La possibilità di incubare le larve alla temperatura di 37°C è un fattore particolarmente importante quando si studia la virulenza degli agenti patogeni, poiché la temperatura regola l'espressione di diversi fattori di virulenza [61].

Diversi *readout* possono essere presi in considerazione per quantificare la risposta all'inoculo. Il tasso di sopravvivenza misurata a diversi tempi è uno dei parametri più importanti. la morte delle larve non deve essere determinata soltanto basandosi sull'osservazione visiva della motilità ma deve essere misurata dopo aver esercitato una lieve pressione sul dorso delle larve[59].

Il grado di melanizzazione può dare un'indicazione della risposta larvale all'agente patogeno o tossina. I microrganismi virulenti promuovono la formazione progressiva di pigmentazione scura, che inizialmente è più prominente nella regione dorsale delle larve, a causa dell'accumulo di emociti sul vaso dorsale larvale. Una forte melanizzazione porta spesso all'annerimento completo delle larve e alla loro morte (figura 2b) [62].

Un parametro che correla la sopravvivenza e il grado di melanizzazione è l'health score system. Questo score si basa su osservazioni legate alla salute delle larve: la mobilità, la formazione del bozzollo, la melanizzazione e la sopravvivenza [63].

Gli emociti possono essere isolati dalle larve e sottoposte a una serie di saggi cellulari *in vivo*. La valutazione della densità degli ematociti nell'emolinfa è un indicatore importante

per studiare il decorso dell'infezione e per valutare se una sostanza inoculata è in grado di modulare il sistema immunitario [59, 64, 65].

Sull'emolinfa possono essere effettuati diversi saggi biologici per determinare il grado di fagocitosi, la produzione di ossido nitrico, la catalasi e la superossido dismutasi [66, 67]. La virulenza microbica può anche essere valutata misurando la proliferazione del microrganismo all'interno dell'insetto durante diversi endpoints dall'infezione.

Questo viene fatto tipicamente placcando l'emolinfa su un appropriato terreno selettivo [59, 68]

Un'analisi più approfondita può essere condotta quantificando l'espressione genica o proteica per ottenere un quadro più completo dei cambiamenti relativi all'immunità e allo stress-ossidativo che si verificano durante l'infezione [69, 70].

Infine, studi istologici possono essere effettuati per una migliore comprensione dell'interazione ospite-patogeno. Gli effetti istopatologici locali del microrganismo inoculato possono essere osservati al microscopio dopo fissazione e inclusione delle larve. I punti di melanizzazione possono essere osservati direttamente al microscopio, mentre i metodi di colorazione sono applicati per rilevare specifiche alterazioni, danni tessutali delle larve [71].



Figura 2b: Larve di *G. mellonella* melanizzate e decedute in seguito ad una infezione indotta con un ceppo patogeno.

2.4 Applicazioni del modello *G. mellonella* in microbiologia

2.4.1 *G. mellonella* per indagare la virulenza dei batteri e funghi patogeni

Il potenziale di un microorganismo di causare malattie è correlato al suo repertorio di fattori di virulenza. I fattori di virulenza permettono l'ingresso, l'invasione e la moltiplicazione del patogeno nell'organismo ospite, inoltre sono determinanti per eludere la risposta immunitaria [72]. A causa delle somiglianze strutturali e funzionali tra il sistema immunitario innato dei mammiferi e la risposta immunitaria le larve di *G. mellonella* sono ampiamente utilizzate per valutare la virulenza dei patogeni umani [73, 74]. Poiché la risposta immunitaria innata è una componente vitale nella risposta immunitaria alle infezioni patologiche, i risultati ottenuti utilizzando come modello di infezione gli insetti mostrano una forte correlazione con quelli ottenibili negli studi *in vivo* condotti sui mammiferi [19, 75, 76].

Infatti, diversi studi hanno dimostrato che alcuni ceppi batterici virulenti sono letali per *G. mellonella* come lo sono per gli ospiti mammiferi, in particolare nei topi [77, 78].

Sono stati studiati tantissimi patogeni umani utilizzando il modello *G. mellonella* ma la maggior parte dei lavori in bibliografia sono relativi allo *S. aureus*, *E. coli*, *K. Pneumoniae* e *C. albicans* [73].

Per alcuni patogeni, gli effetti istopatologici e le risposte cellulari riscontrate in *G. mellonella* sono paragonabili a quelle osservate nelle infezioni umane. Ad esempio, l'infezione da *Staphylococcus aureus* provoca la formazione di noduli in *G. mellonella* con strutture simili a quelle trovate negli ascessi umani [79]. Allo stesso modo, gli effetti istopatologici causati da *Mycobacterium abscessus* includono strutture granulomatose come si è visto negli esseri umani infettati da questo batterio [80].

Le larve di *G. mellonella* sono impiegate per determinare la virulenza degli isolati di *Candida albicans* e per differenziare tra specie di lieviti patogeni e non patogeni [75, 81]. È stata stabilita una correlazione positiva tra la virulenza dei mutanti di *C. albicans* non produttori di ife inoculati nelle larve di *G. mellonella* e nei topi BalbC ed è stata identificata una serie di fattori che influenzano la virulenza dei mutanti di *C. albicans* nelle larve [75, 82].

2.4.2 *G. mellonella* per lo studio *in vivo* dell'attività di agenti antimicrobici

A causa dell'antibiotico resistenza diffusa tra i microorganismi clinicamente rilevanti e il limitato sviluppo di nuove molecole il trattamento delle infezioni batteriche sta diventando una sfida problematica per la comunità scientifica. I nuovi composti vengono generalmente sottoposti a screening *in vitro* e *in silico* per valutarne l'efficacia e la potenziale tossicità [83, 84]. Alla fine, i candidati idonei vengono valutati in un modello animale, di solito in modelli murini e altri roditori, prima della loro potenziale applicazione nell'uomo.

L'uso di modelli mammiferi è essenziale per la valutazione della sicurezza e dell'efficacia dei farmaci, l'impiego delle larve di *G. mellonella*, permette di ridurre l'utilizzo dei mammiferi e l'attività *in vivo* dei nuovi farmaci può essere valutata più rapidamente, permettendo di condurre test più mirati [19, 20]. Il modello di *G. mellonella* può quindi servire come ulteriore esperimento di pre-screening per minimizzare la probabilità che un agente antimicrobico attivo *in vitro* possa non essere efficace quando viene testato nei modelli di mammifero. Infatti, nonostante i test *in vitro* sono utilizzati come procedura di pre-screening si osservano spesso discrepanze nell'attività antimicrobica tra *esperimenti in*

vitro e in vivo. Ciò può essere dovuto al fatto che nei test *in vitro* sono esclusi numerosi fattori e variabili presenti nei modelli *in vivo* come l'immunità cellulare e umorale dell'ospite [19]. Gli insetti possiedono una risposta immunitaria altamente sensibile e la somministrazione di agenti antimicrobici possono provocare una forte risposta immunitaria che rende l'insetto resistente alle infezioni successive [85]. Quindi è necessario prestare attenzione per quei composti che inducono modulazione del sistema immunitario in quanto questo si aggiunge all'apparente efficacia antimicrobica del composto del test. Le larve di *G. mellonella* sono uno strumento efficace per studiare l'efficacia *in vivo* di nuovi composti antimicrobici. L'attività antimicrobica può essere valutata su diversi parametri (ad es. sopravvivenza, densità degli ematociti, recovery dei batteri nell'emolinfa, proteoma e espressione genica) che possono dare una buona indicazione dei potenziali effetti nei mammiferi. Inoltre, le larve possono essere utilizzate per valutare la tossicità *in vivo* di nuovi composti prima di valutarne l'attività. Sono state proposte diverse strategie terapeutiche utilizzando *G. mellonella* come modello *in vivo*. Per superare la resistenza antimicrobica e diminuire il dosaggio dei singoli farmaci, sono stati condotti diversi studi di combinazione tra antibatterici. Inoltre, sono stati valutati utilizzando questo modello antibiotici ibridi, batteriofagi, peptidi antimicrobici, vitamine e sostanze attive estratte da piante [19].

2.4.3 *G. mellonella* modello per investigare le proprietà dei probiotici

I probiotici sono "microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite". I probiotici sono usati per sostenere il microbiota intestinale naturale dell'ospite. Le raccomandazioni più recenti sui probiotici affermano che alcuni generi e specie esercitano effetti benefici. Ad esempio, gli effetti a livello di genere includono l'esclusione competitiva dei patogeni, la produzione di butirrato e altri acidi grassi a catena corta (SCFA) o la regolazione del transito intestinale. Le specie probiotiche possono produrre vitamine, enzimi benefici, metabolizzare i sali biliari, interagire con il normale microbiota dell'ospite stimolando i meccanismi immunitari della mucosa e stimolando i meccanismi non immunitari attraverso l'antagonismo e la competizione con potenziali patogeni [86, 87].

La necessità di approcci *in vivo* per esplorare il potenziale probiotico ha portato allo sviluppo di un'enorme varietà di modelli biologici più o meno complessi, che vanno da semplici organismi come vermi e invertebrati a sofisticati modelli knock-out nei roditori fino a studi clinici sull'uomo in diversi campioni di popolazione.

La valutazione finale della funzionalità probiotica dovrebbe idealmente essere eseguita direttamente nella popolazione target, la preselezione dei ceppi da includere in questi costosi studi clinici viene solitamente effettuata utilizzando modelli *in vivo* appropriati [88]. Negli ultimi anni la *G. mellonella* è stata impiegata come organismo per valutare la potenziale attività probiotica di alcune specie e ceppi.

Infatti questo ospite può essere utilizzato come un semplice modello per studiare *in vivo* l'interazione tra ceppi probiotici e microorganismi patogeni [89, 90]. Alcuni generi batterici, come *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sono tradizionalmente riconosciuti per avere attività benefica sul microbiota intestinale umano, mentre altre specie, come

Faecalibacterium prausnitzii e *Akkermansia muciniphila* sono candidati probiotici e pertanto possono beneficiare di questo modello per studi sulla sicurezza e attività probiotica [26].

Uno screening preliminare sulla sicurezza di ceppi potenzialmente probiotici può essere effettuato inoculando direttamente il microorganismo nell'emolinfa delle larve.

Infatti è stato osservato che ceppi non patogeni con attività probiotica, anche se inoculati ad alte concentrazioni non inducono nessuna tossicità e/o morte larvale significativa.

È stato inoltre osservato che le larve pre-esposte a ceppi con attività probiotica sono in grado di contrastare più efficacemente l'infezione indotta inoculando ceppi patogeni.

L'attività dei potenziali ceppi può essere condotta inoculando la coltura "viva", inattivata al calore o il terreno privo di cellule contenente i metaboliti e registrando numerosi *readout* [91, 92].

Nonostante i pochi lavori ancora pubblicati, la *G. mellonella* si è dimostrata un valido surrogato per lo screening di potenziali ceppi probiotici e ottenere preziosi dati pre-clinici.

2.4.4 *G. mellonella* per lo studio dell'attività di tossine batteriche

Altra applicazione del modello *G. mellonella* riguarda lo studio di tossine prodotte da funghi o batteri. Nella maggior parte degli studi le larve sono state adottate per studiare la tossicità di tossine ad azione insetticida che possono essere direttamente inoculate nell'emolinfa o somministrate per *force-feeding* [57, 93]. Soltanto in alcuni lavori il modello *G. mellonella* è stato impiegato per studiare il ruolo delle tossine nelle malattie umane e per esplorare il meccanismo d'azione delle tossine prodotte da funghi e batteri patogeni dell'uomo.

Fallon *et al.*, hanno scoperto che la tossina fumagillina prodotta dall'*Aspergillus fumigatus* sopprime il sistema immunitario di *G. mellonella* rendendo di conseguenza le larve più suscettibili all'infezione del fungo stesso [94]. In un altro studio la gelatinasi extracellulare (GelE) e la serina proteasi (SprE), due tossine secrete dall'*Enterococcus faecalis*, sono state inoculate in *G. mellonella*. È stato osservato che la gelatinasi extracellulare degrada i peptidi antimicrobici prodotti dalle larve. Questa scoperta ha condotto a studi successivi che hanno dimostrato che la gelatinasi è in grado di idrolizzare la componente C3a del complemento e mediare la degradazione della catena α di C3b. Mentre la serina proteasi prodotta da *E. faecalis* non ha mostrato virulenza né nell'emolinfa degli insetti né nel siero umano [95]. La caratterizzazione dell'interazione tra i composti extracellulari e la risposta immunitaria degli insetti potrebbe fornire informazioni su come alcune tossine interagiscono con il sistema immunitario dei mammiferi [57].

Tuttavia un rapporto non pubblicato da Champion *et al.*, riporta che le enterotossine alpha ed epsilon prodotte da *Clostridium perfringens* attive contro le cellule di mammifero sono prive di tossicità nelle larve.

2.5 Limitazioni del modello *G. mellonella*

Come discusso nei paragrafi precedenti, l'ospite *G. mellonella* è un modello idoneo per valutare la virulenza dei microrganismi, l'efficacia di sostanze antimicrobiche, la potenziale attività probiotica di alcuni ceppi e il meccanismo d'azione di tossine. Malgrado non sostituirà totalmente i modelli mammiferi, la *G. mellonella* rappresenta una valida alternativa per ottenere dati pre-clinici. Tuttavia il modello non è privo di

limitazioni, ad esempio la breve durata della fase larvale non permette di studiare i processi associati alle infezioni croniche.

La mancanza di un genoma completamente sequenziato rappresenta un'importante limitazione del modello. L'azienda TruLarv ha avviato un programma per sequenziare il genoma delle larve e i dati verranno resi di dominio pubblico una volta completati [57].

Inoltre non sono ancora disponibili per questo organismo microarray, ceppi mutanti, nonché la capacità di generare knockdown o knockout che sono già prontamente disponibili per topi, nematodi e moscerini della frutta [19].

Un altro limite che attualmente ostacola l'espansione di questo modello è rappresentato dalla mancanza di standardizzazione delle procedure sperimentali e dell'allevamento delle larve. Differenze nei genotipi, nel mantenimento, stabulazione e inoculo delle larve possono spiegare i risultati contrastanti ottenuti da diversi laboratori di ricerca che hanno utilizzato stessi ceppi ma osservato esiti differenti nel decorso dell'infezione.

Infine, altro problema del modello è causato dalla difficoltà nello standardizzare l'inoculo batterico al fine di ottenere risultati sperimentali riproducibili. Infatti, la concentrazione dell'inoculo (CFU/larva) necessaria per indurre una letalità significativa nelle larve è molto variabile anche per i ceppi più virulenti e piccole variazioni nella concentrazione portano a risultati differenti nell'esito dell'infezione.

2.6 Applicazione del modello *G. mellonella* per valutare l'attività antimicrobica di sostanze naturali

2.6.1 Stato dell'arte e scopo dello studio

Nel seguente studio il modello *G. mellonella* viene applicato per valutare l'attività del cloruro di berberina verso ceppi di *E.coli* uropatogeni (UPEC). La berberina (C₂₀H₁₈NO₄) è una molecola appartenente al gruppo degli alcaloidi protoberberinici, caratterizzati da un anello tetraciclico basato sul sistema della dibenzo[a,g]chinolizidina. Questa molecola si presenta sotto forma di polvere cristallina gialla, inodore e caratterizzata da un sapore amaro. È scarsamente solubile in acqua fredda ma la solubilità aumenta leggermente in acqua calda. Tuttavia è altamente solubile in metanolo e soprattutto in dimetilsolfossido (DMSO). La berberina è stata scoperta da Buchner e Herberger nel 1830 ma piante che contengono questo alcaloide sono usate da secoli nella medicina tradizionale cinese, indiana e iraniana per la guarigione delle ferite e per il trattamento della diarrea. Viene isolata dalla radice, dal rizoma e dalla corteccia in numerose piante medicinali quali la *Berberis aristata*, la *Berberis thunbergii*, *Berberis vulgaris*, la *Coptis chinensis*, *Coptis japonica*, la *Hydrastis canadensis*, il *Thalictrum lucidum*, *Scutellaria baicalensis* e molte altre.

Sono stati condotti numerosi studi che hanno dimostrato che la berberina possiede un'ampia attività farmacologica. Questo alcaloide è dotato di attività anti-ossidante, anti-infiammatoria e immuno-regolatoria. Inoltre la berberina e suoi derivati hanno mostrato attività in diverse applicazioni cliniche tra cui malattia di Alzheimer, cancro, colite-ulcerosa, diarrea, iperlipidemia, diabete, obesità e aterosclerosi.

Nei trials clinici condotti finora la berberina presenta bassa tossicità infatti non sono stati riscontrati effetti collaterali significativi. Tuttavia studi condotti *in vivo* su animali hanno dimostrato che la somministrazione di berberina ad alte dosi può portare a diversi disturbi gastro-intestinali, ingrossamento del fegato, reni e milza e riduzione del numero di leucociti, neutrofilo e linfociti.

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica la berberina ha mostrato attività verso batteri Gram-positivi, Gram-negativi, funghi, protozoi, tripanosomi e plasmodi.

È stata osservata una debole attività battericida contro i batteri Gram-negativi ed una maggiore attività contro i batteri Gram-positivi tra cui *S. aureus* e *S. epidermidis* [96].

Diversi studi hanno dimostrato che la berberina può aumentare l'efficacia degli antibiotici nei confronti di isolati clinici di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), abbassando le MIC degli antibiotici e diminuendo l'adesione e l'invasione intracellulare degli MRSA [97-99].

Nonostante non è stata osservata una significativa attività battericida verso i batteri Gram-negativi *studi in vitro* hanno rilevato che la berberina a concentrazioni sub-inibenti può alterare diversi geni coinvolti nella biosintesi delle pareti della membrana, nel trasporto e nella mobilità di *E.coli* [100].

Uno studio *in vitro* condotto da Boberek *et al.*, ha dimostrato che la berberina regola negativamente la proteina FtsZ, ipotizzando quindi un meccanismo antibatterico basato sull'inibizione della vitalità e la divisione cellulare di *E. coli* [101].

Inoltre, questo alcaloide inibisce selettivamente la sintesi e l'espressione delle fimbrie PAP (pili associate alle pielonefriti), un fattore di virulenza che gioca un ruolo importante nelle infezioni del tratto urinario superiore [102]

Più recentemente, è stato riportato da Sun T. *et al.*, l'azione di inibizione della berberina nella formazione di biofilm per alterazione del Quorum Sensing System in un ceppo di *E. coli* multiresistente [103].

L'attività antibatterica del cloruro di berberina si basa quindi su un meccanismo multi-target che ha come obiettivo funzioni fisiologiche essenziali della cellula, compresa l'inibizione della duplicazione del DNA, la trascrizione dell'RNA e la biosintesi delle proteine nelle cellule batteriche attraverso l'inibizione delle attività enzimatiche e modifiche della struttura superficiale della parete batterica [104].

A causa di questo meccanismo d'azione ad ampio spettro, Jin *et al.*, hanno dimostrato che colture batteriche esposte a concentrazione sub-inibenti di berberina per oltre 200 generazioni, a differenza del trattamento con i comuni antibiotici, non sviluppano mutanti resistenti [105].

Nonostante i numerosi studi *in vitro* sulla berberina, sono insufficienti gli studi *in vivo* e gli studi clinici che possono dimostrare la sua attività antibatterica soprattutto verso ceppi di *E.coli* uropatogeni (UPEC) annoverati tra i principali responsabili delle infezioni urinarie [106].

Il tratto urinario, che comprende i reni, gli ureteri, la vescica e l'uretra, è costantemente esposto ai microrganismi che colonizzano il tratto gastrointestinale.

La protezione dalla colonizzazione microbica è mediata da vari fattori solubili secreti nell'urina e da barriere anatomiche come lo strato superficiale rappresentato da cellule a “ombrello” interconnesse da giunzioni strette e ricoperte sulla superficie apicale da glicoproteine chiamate uroplachine. Inoltre, il tratto urinario è ricco di diverse cellule immunitarie residenti e reclutate che proteggono ulteriormente dalle infezioni. Le barriere

epiteliali e le risposte immunitarie innate impediscono normalmente agli agenti patogeni di entrare nel tratto urinario e di stabilire un'infezione persistente[107].

Le infezioni del tratto urinario (UTIs) rappresentano la seconda infezione più diffusa dopo l'infezione delle alte vie respiratorie e sono la causa più comune di infezioni comunitarie e nosocomiali nei pazienti ospedalizzati.

Si stima che ogni anno in tutto il mondo si verifichino 150 milioni di casi di UTI in tutto il mondo con costi elevati per il sistema sanitario.

L'incidenza delle UTIs varia in relazione al sesso e all'età. Queste infezioni sono meno frequenti negli uomini e nelle bambine dai 2 ai 13 anni. L'incidenza aumenta notevolmente durante l'adolescenza, è stato stimato che almeno una donna su tre, prima dei 24 anni, manifesti un caso di UTI che richiede una terapia antimicrobica e che il 40%-50% delle donne manifesterà almeno una volta nella sua vita questa patologia [108, 109].

Secondo la linea guida dell'European Association of Urology (EAU), le UTI sono generalmente classificate in base alla sede anatomica dell'infezione, alla presenza di fattori di rischio e al grado di severità dell'infezione.

In base alla localizzazione anatomica, le UTI sono classificate come infezioni delle basse vie urinarie (cistiti, uretriti e prostatiti) e infezioni delle alte vie urinarie (pielonefriti) [110].

Sono definite UTI non complicate le infezioni che si presentano nei pazienti con vie urinarie strutturalmente e fisiologicamente integre.

Mentre le UTI complicate sono definite come infezioni che si verificano in pazienti con alterazioni anatomiche, funzionali o delle difese immunitarie [111].

Tra le UTI complicate sono annoverate le infezioni delle vie urinarie associate a catetere (CA-UTI). Quest'ultime sono definite infezioni delle vie urinarie che si verificano nei pazienti portatori di catetere uretrale da almeno 48 ore. Le CA-UTI rappresentano una

delle principali cause di infezione nosocomiale e sono spesso associate a batteri resistenti ai comuni antibiotici utilizzati in terapia [112].

Gli agenti eziologici responsabili delle UTI nosocomiali e comunitarie sono soprattutto batteri Gram-negativi e Gram-positivi ma talvolta le UTI possono essere sostenute anche da alcune specie di funghi e protozoi [113].

Il microorganismo che causa più frequentemente le UTI sia complicate che non complicate è l'*Escherichia coli* uropatogeno (UPEC), come dimostrato da diversi studi epidemiologici tra cui quello condotto da Laupland *et al.*, in cui sono stati analizzati 40.618 episodi di UTI e *E. coli* uropatogeno è emerso come il germe infettivo più comune nel 70% dei pazienti [114].

Altri microorganismi coinvolti nelle UTI sono *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp* [115].

Gli UPEC sono un gruppo eterogeneo di *E. coli* patogeni extra-intestinali che esprimono numerosi fattori di virulenza che permettono a questi batteri di colonizzare il tratto urinario e di resistere ai meccanismi di difesa dell'ospite.

Questi fattori di virulenza sono peculiari e diversi da quelli osservati in altre comunità microbiche, includono fimbrie adesive, flagelli, capsula e tossine.

Gli organelli adesivi, tra cui i pili di tipo 1 e le fimbrie P sono presenti sulla superficie degli UPEC, permettono ai batteri di legare le cellule e i tessuti dell'ospite, di resistere al flusso di urina e di promuovere l'invasione alle cellule uroteliali. Oltre a promuovere l'adesione, questi fattori di virulenza stimolano anche l'ingresso degli UPEC nelle cellule epiteliali dell'ospite favorendone la sopravvivenza nel tratto urinario. Inoltre gli UPEC

formano comunità intracellulari simili a biofilm contenenti diverse migliaia di batteri protetti dall'azione del sistema immunitario e antibiotici.

Gli antibiotici sono il trattamento di prima linea per le infezioni del tratto urinario. In particolare, le UTI complicate e le CAUTI secondo le linee guida europee sono trattate con aminoglicosidi da soli o in associazione ad amoxicillina o cefalosporina di seconda o terza generazione.

Recentemente è stato regolamentato l'uso degli antibiotici fluoroquinolonici spesso utilizzati anche per il trattamento delle infezioni urinarie. Il Comitato dei Medicinali per Uso Umano dell'EMA ha sospeso l'autorizzazione all'immissione in commercio dei medicinali contenenti cinoxacina, flumechina, acido nalidissico e acido pipemidico. Il CHMP ha inoltre ristretto l'uso dei rimanenti antibiotici fluorochinolonici, a causa degli effetti indesiderati gravi, proibendone l'utilizzo per la prevenzione delle infezioni ricorrenti delle basse vie urinarie e per il trattamento di infezioni batteriche lievi o moderate [116].

Gli antibiotici rappresentano "l'arma" più importante che abbiamo a disposizione per combattere le malattie infettive. Tuttavia, negli ultimi anni diversi fattori, tra cui gli elevati tassi di terapie empiriche prescritte senza test di sensibilità agli antibiotici hanno contribuito ad aumentare la pressione selettiva favorendo lo sviluppo di agenti patogeni resistenti ai farmaci [117]. L'emergere di batteri multi-resistenti rende più complessa la gestione delle infezioni e rappresenta un'importante sfida per i ricercatori di tutto il mondo impegnati nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Lo screening e lo studio dell'attività antimicrobica delle molecole estratte dalle piante e fito-estratti è da sempre uno dei più esplorati campi di ricerca in microbiologia. Le piante medicinali e i loro derivati sono studiati sin dall'inizio del 21 ° secolo per la prevenzione

e il trattamento delle infezioni urinarie, spesso in associazione agli antibiotici convenzionali per combattere i microorganismi multi-resistenti [118].

I principali meccanismi d'azione dei fito-estratti nelle UTI includono l'interferenza con la capacità dell'UPEC di aderire e invadere l'urotelio, l'inibizione della crescita e l'attività antiossidante [119].

Come discusso in precedenza i lavori che sono stati finora condotti sulla berberina si sono focalizzati sullo studio del meccanismo d'azione e sull'attività antimicrobica *in vitro* ma nonostante la potenzialità della molecola non sono ancora stati effettuati studi *in vivo* o studi clinici che possano provarne l'efficacia nelle infezioni urinarie.

Scopo dello studio è stato pertanto quello di valutare l'attività *in vivo* della berberina cloridrato utilizzando il modello pre-clinico *G. mellonella* al fine di verificare la traslabilità dei risultati ottenuti *in vitro*. Inoltre dato che l'adesione e l'invasione sono dei meccanismi fondamentali per l'instaurarsi delle infezioni urinarie è stata valutata l'azione anti-adesiva e anti-invasiva *in vitro* su cellule di vescica 5637 ATCC HTB-9.

2.6.2 Materiali e Metodi

Batteri e linee cellulari

I ceppi batterici utilizzati nei test *in vitro* e per indurre l'infezione nel modello ospite *G.mellonella* sono: *Escherichia coli* ATCC 11775 (sierotipo O1:K1:H7) isolato dalle urine, acquistato presso la ceppoteca American Type Culture Collection; *Escherichia coli* DSM 22312 ceppo multiresistente isolato da UTI, acquistato presso la ceppoteca DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH; L'*Escherichia coli* CL1

(CA-UTI) e l'*Escherichia coli* CL2 (CA-UTI) sono ceppi isolati da pazienti portatori di cateteri a lungo termine affetti da infezioni urinarie croniche. I ceppi clinici sono stati precedentemente identificati mediante biotipizzazione con GN-ID A e GN-ID B galleria Microgen® utilizzando il software di identificazione Microgen® (Kairosafe Srl Sistiana TS Italia). Tutti i ceppi crioconservati sono stati rigenerati e coltivati in Brain Heart Infusion Agar Broth aerobicamente con agitazione a 37°C.

La linea cellulare umana di vescica impiegata per condurre i saggi di adesione e invasione è la 5637 (ATCC HTB-9) acquistata dalla American Type Culture Collection.

Le linea cellulare in terreno di congelamento composto da DMEM, FBS (Fetal Bovin Serum) al 10% e DMSO (dimetilsolfossido) al 10% è stata riattivata e coltivata in terreno RPMI-1640, integrato con il 10% di siero bovino fetale, 1% di L-glutammina e 1% di penicillina / streptomina in un incubatore a 37 ° C e al 5% di CO².

Test di sensibilità berberina *in vitro*

La valutazione della MIC della berberina cloruro è stata stimata con il metodo della microdiluzione in brodo. La determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) è stata effettuata mediante il metodo della microdiluzione in bordo secondo le linee guida CLSI M100 30th Edition (Clinical Standard Laboratory Institute) [120]. Il terreno Mueller Hinton II Broth supplementato con cationi calcio e magnesio (Cation-Adjusted), è stato utilizzato per i test di sensibilità. Le diluizioni della sostanza test sono state effettuate partendo da una soluzione madre concentrata e effettuando delle diluizioni intermedie come da protocollo. La berberina data la sua ridotta solubilità in acqua è stata sciolta in DMSO 68.2 mg/mL in dimetilsolfossido (DMSO) per ottenere una soluzione

madre e diluita opportunatamente prima dell'uso a in acqua deionizzata e filtrata mediante un filtro Millipore da 0.22 μm . La berberina è stata testata a concentrazioni comprese tra 2048 e 0.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Le piastre 96 well sono state in seguito inoculate con 100 μL delle diluizioni seriali di berberina e terreno privo di antibiotico (controllo). L'inoculo è stato preparato utilizzando il metodo della sospensione diretta della colonia batterica in una soluzione salina sterile (NaCl 0.85% p / v). Al fine di stimare la concentrazione batterica la sospensione è stata confrontata con lo 0.5 Standard McFarland, corrispondente circa a $1\text{-}2 \times 10^8$ CFU/mL e confermata spettrofotometricamente mediante lettura dell'assorbanza a 600 nm. Al fine di ottenere una concentrazione di circa 5×10^5 CFU/mL, 10 μL della sospensione batterica, entro 15 minuti dalla sua preparazione, è stata inoculata nei pozzetti delle 96-well. Le piastre sono state avvolte con il parafilm e incubate per 16-20 ore a 37°C entro 15 minuti dall'inoculo della sospensione batterica. Infine è stata determinata la MIC osservando la concentrazione più bassa che inibisce completamente la crescita del batterio. La più alta concentrazione di DMSO a contatto con i batteri è stata del 3% (v/v) non ha interferito significativamente con la crescita dei batteri.

Infuenza della berberina sulla crescita batterica *in vitro*

Per valutare l'influenza della berberina cloruro sulla crescita batterica, le sospensioni dei ceppi di *E.coli* in terreno MH sono state centrifugate, lavate con soluzione saline e standardizzate alla concentrazione di 1×10^8 CFU/mL mediante determinazione spettrofotometrica (O.D 600). Le sospensioni sono state diluite al fine di ottenere una concentrazione finale circa di 5×10^5 CFU/mL in 5 mL di MH posti in provette a fondo conico da 15 mL. La berberina è stata testata a due diverse concentrazioni (1/2 MIC e 1/4

MIC). Le provette sono state incubate a 37 ° C e in agitazione costante. La curva di crescita è stata determinata mediante conta dei batteri vitali. A tal fine 100 µl della sospensione batterica è stata prelevata ogni 60 min per 24 ore e le diluizioni seriali in soluzione salina (NaCl 0.85% p/v) sono state seminate su piastre di agar MH.

Analisi della curva di crescita batterica

L'analisi delle curve di crescita batterica è stata eseguita utilizzando l'analisi della curva sigmoideale con il software GraphPad Prism dopo aver verificato la bontà del coefficiente del coefficiente di determinazione R².

La percentuale di inibizione della crescita batterica (% inibizione) è stata calcolata secondo la formula:

$$\% \text{ di inibizione} = 100 - \frac{Y_{top \text{ 1/2 MIC o 1/4 MIC}}}{Y_{top \text{ Controllo}}} \times 100$$

Dove Y_{top} rappresenta il valore massimo di CFU / mL ottenuto per ogni ceppo batterico testato.

Il ritardo (espresso in ore) nel raggiungere la fase di crescita esponenziale (ΔX_{CFU50}) per ogni ceppo esposto alla berberina rispetto al controllo è stato calcolato con la seguente formula:

$$(\Delta X)_{CFU50} = X_{CFU50 \text{ 1/2 o 1/4 MIC}} - X_{CFU50 \text{ Controllo}}$$

Dove X_{CFU50} è il valore X (espresso in ore) in cui la curva di crescita si trova a metà della fase di crescita esponenziale.

Infine Il parametro Hillslope è un valore che indica il grado di pendenza della curva di crescita. $\Delta Hillslope$ rappresenta la differenza tra la pendenza della curva dei ceppi esposti alla berberina rispetto al controllo secondo la seguente formula:

Δ Hillslope = hillslope 1/2 o 1/4 MIC berberina - Hillslope controllo.

Effetto della berberina sull'adesione e invasione dei ceppi di *E. coli* in cellule di vescica

Il saggio di adesione e invasione dei ceppi di *E. coli* sulla linea di carcinoma cellulare di vescica umana (ATCC 5637 HTB-9) è stato condotto seguendo il metodo proposto da Mohanty *et al.*, [121]. Sono stati effettuati sia degli esperimenti di pre-trattamento in cui i ceppi sono stati esposti alla berberina per valutare l'effetto post-biotico sia esperimenti di co-inubazione.

Nel test di pre-trattamento le sospensioni over-night dei ceppi di *E. coli* sono state standardizzate alla concentrazione di 10^8 CFU /mL in MH broth e incubate per quattro ore a 37 ° C con la berberina alla concentrazione di 1/2 MIC o 1/4 MIC.

Mentre per il saggio di co-incubazione, le sospensioni batteriche dei ceppi di *E. coli* sono state standardizzate alla concentrazione di 10^8 CFU/mL in brodo MH e incubate a 37 ° C senza berberina cloruro per quattro ore.

Successivamente, le sospensioni batteriche sono state centrifugate, il pellet lavato due volte con tampone fosfato salino (PBS), normalizzate utilizzando la densità ottica (OD600) e risospese in terreno RPMI. Per determinare la carica batterica iniziale a contatto con le cellule le diluizioni seriali delle sospensioni sono state piastrate in MH agar.

I test sono stati condotti utilizzando piastre 6 well (superficie 9.6 cm²) quando il monostrato cellulare ha raggiunto una confluenza del 95%. Il mezzo colturale è stato rimosso e le cellule sono state lavate tre volte con PBS al fine di eliminare gli antibiotici

presenti nel terreno di crescita. Successivamente, in ogni pozzetto sono stati distribuiti 2 mL di sospensione batterica precedentemente allestita in RPMI. Le cellule sono state infettate a una molteplicità di infezione (MOI) di circa 30 batteri per cellula ($\sim 4 \times 10^7$ batteri). Nei test di co-incubazione le cellule immediatamente dopo l'infezione sono state trattate con la berberina a concentrazione di 1/2 MIC o 1/4 MIC.

Dopo un tempo di incubazione di due ore (37 ° C; 5% di CO²), il terreno è stato rimosso e le cellule sono state lavate tre volte con DPBS al fine di rimuovere i batteri non aderenti.

Nel test di adesione, in ogni pozzetto è stato addizionato 1 mL di PBS e le cellule di vescica sono state staccate con l'ausilio di un raschietto cellulare.

Nel saggio di invasione, sono stati inoculati in ogni pozzetto 2 mL di RPMI addizionati con 100 µg/mL di gentamicina al fine di rimuovere i batteri extracellulari che hanno aderito. Dopo un'ulteriore incubazione (2 ore a 37 °C; 5% di CO²), i monostrati sono stati lavati tre volte con DPBS e le cellule sono state lisate aggiungendo 100 µL di tripsina-EDTA 0.25% e 900 µL di Triton X 0.05% -100 per 5 min.

Infine, è stato prelevato 1 mL da ciascun pozzetto, contenente i batteri che hanno aderito o invaso le cellule di vescica, e sono state effettuate delle diluizioni seriali. 100 µL di ciascuna diluizione è stata seminata su piastre di MH agar. Dopo 24 ore di incubazione a 37 ° C è stato effettuato il conteggio delle colonie su piastra per determinare il grado di adesione e invasione batterica.

***G. mellonella* condizioni di stabulazione**

Le larve di *G. mellonella* al sesto stadio larvale sono state acquistate presso SA.GI.P. s.a.s. (Ravenna, Italia). L'azienda fornisce larve di elevata qualità di dimensioni ideali e

non trattate con antibiotici e ormoni quindi anche adatte ad essere impiegate nella ricerca. La dieta fornita per l'allevamento è composta da farina di mais, farina di soia, sorbitolo, zucchero, miele e cera d'api. Le larve sono state stabulate a 15 °C al buio in contenitori di plastica contenenti dei trucioli e sono state utilizzate entro sette giorni dal ricevimento.

Inoculo e infezione delle larve di *G. mellonella*

Sono state selezionate larve con peso compreso tra 300 e 350 mg, lunghe 2 -3 cm, colore crema chiaro, prive di macchie scure e segni di melanizzazione o infezione.

L'inoculo intra-emocelico è stato effettuato nell'ultima proleg destra delle larve con una siringa da tubercolina (27G) e con l'ausilio di micro dosatore. Nel caso in cui la stessa larva è stata inoculata una seconda volta per evitare un eccessivo trauma l'iniezione è stata effettuata nell'ultima proleg sinistra. Prima di ogni inoculo nella zona di perforazione dell'ago la cuticola è stata disinfettata con EtOH al 70% al fine di evitare contaminazioni batteriche. La larva tenuta tra il pollice e l'indice è stata perforata longitudinalmente dall'ago ed è stato iniettato 20µL della sospensione o della soluzione prestando attenzione a non traumatizzare e non danneggiare gli organi interni (figura 2c). Esperimenti preliminari sono stati condotti per determinare la dose di trattamento e per valutare l'eventuale tossicità della berberina cloruro inoculando concentrazioni scalari dell'alcaloide comprese tra 4096 e 200 µgr/ml.

Le sospensioni batteriche utilizzate nei challenge di sopravvivenza sono state allestite partendo dalle colture over-night dei ceppi di *E.coli* in BHI broth.

Per determinare la carica microbica ottimale da inoculare negli esperimenti di pre-trattamento e di co-incubazione, le larve sono state infettate con 20 µl delle sospensioni

batteriche standardizzate in un intervallo di concentrazione da 1×10^2 a 1×10^8 CFU/larva. Da questi saggi di sopravvivenza è stata scelta una dose infettiva di 10^5 CFU/larva per tutti gli esperimenti successivi.

Nel test di pre-trattamento come descritto precedentemente le sospensioni batteriche dei ceppi di *E. coli* sono stati allestiti a concentrazione di 10^8 CFU/ml in brodo MH e incubate a 37°C con la berberina alla concentrazione di $1/4$ MIC o $1/8$ MIC per quattro ore.

Mentre per il saggio di co-incubazione, le sospensioni batteriche dei ceppi di *E. coli* sono state diluite alla concentrazione di 10^8 CFU/ml in brodo MH e incubate a 37°C senza berberina per quattro ore.

Successivamente, le sospensioni batteriche sono state centrifugate a 5000 rpm per due minuti.

Il pellet batterico è stato lavato 3 volte con PBS, per rimuovere tracce di metaboliti e terreno di coltura, e risospeso nello stesso mezzo. Le sospensioni in PBS sono state standardizzate mediante lettura della densità ottica (O.D 600) allo spettrofotometro e successivamente confermate dal conteggio delle colonie su piastra.

Le sospensioni sono state inoculate nelle larve con la procedura descritta in precedenza.

Nei gruppi di co-incubazione le larve sono state trattate con la soluzione di berberina alla concentrazione di 2 MIC quindici minuti dopo l'infezione con le sospensioni batteriche.

Il gruppo di controllo è stato inoculato con una soluzione di PBS sterile per valutare eventuali traumi causati dalla perforazione della cuticola.

Le larve di ogni gruppo sono state poste in piastre petri da 9 cm (10 larve ognuna) e incubate a 37°C ad umidità relativa controllata. Per tutti i saggi di sopravvivenza sono state utilizzate venti larve per ogni gruppo e la percentuale di sopravvivenza è stata determinata nelle 72 ore successive all'infezione. La mortalità non è stata determinata

soltanto visivamente (larve nere diffusamente melanizzate) ma anche osservando la mancanza di movimento dopo stimolazione.



Figura 2c: inoculo intraemocelico della larva di *G. mellonella*

Quantificazione *E. coli* CFU/mL nell'emolinfa di *G. mellonella*

Tre larve per gruppo sono state collocate ognuna in provette per microcentrifuga sterili e sono state refrigerate in ghiaccio per 10 minuti per anestetizzarle. Successivamente utilizzando delle pinzette metalliche e delle forbici precedentemente sterilizzate la parte inferiore delle larve in prossimità dell'ultima proleg è stata tagliata per far drenare l'emolinfa. I tubi contenente l'emolinfa e le larve durante questa procedura vengono mantenute in ghiaccio al fine di rallentare la reazione di melanizzazione. L'emolinfa raccolta è stata diluita immediatamente in terreno Luria-Bertani e piastrata su piastre di Brilliance UTI agar, un terreno cromogenico per la differenziazione dei principali microrganismi che causano infezioni delle vie urinarie. Dopo un periodo di incubazione di 24 h sono state derminate le CFU/mL di *E. coli* nell'emolinfa, effettuando la conta soltanto delle colonie di colore rosa

Raccolta degli emociti e test di vitalità

L'emolinfia di tre larve per gruppo raccolta secondo la metodica descritta nel precedente paragrafo è stata raccolta in microtubi refrigerati e centrifugata a 3000 RPM a 4°C per 5 minuti. Il pellet contenente gli ematociti è stato risospeso in 1 mL di un tampone anticoagulante costituito da (150 mM di sodio cloruro, 5 mM cloruro di potassio, 10 mM tris-HCl, pH 6,9, 10 mM EDTA e 30 mM citrato di sodio). Dopo un'ulteriore fase di centrifugazione a 3000 RPM per 5 minuti, il surnatante rimanente è stato rimosso e il pellet è stato nuovamente risospeso in 1 ml di tampone anticoagulante.

Per il test di vitalità cellulare 50 µl della sospensione di ematociti è stata diluita con 50 µl di una soluzione di tripan blu (0,4%, p/v). Un'aliquota (10 µl) di questa miscela dopo un tempo di incubazione di 5 minuti è stata trasferita in un emocitometro. Le cellule non colorate che escludono il colorante sono state ritenute vitali.

Espressione genica (qPCR)

Tre larve per ogni gruppo a 48 h dall'infezione con *E.coli* ATCC 11775 sono state recuperate e conservate a -80°C. In seguito le larve sono state omogenizzate e l'RNA è stato estratto utilizzando il TRI Reagent® (Sigma Aldrich) seguendo il protocollo indicato dal produttore. L'RNA è stato quantizzato spettrofotometricamente e quindi trascritto a cDNA con il ReadyScript™ cDNA syntetis mix (Sigma Aldrich).

La funzione dei primers e le sequenze utilizzate nei saggi di espressione genica sono elencati nella Tabella 1c. L'espressione genica relativa al gene di riferimento EF1, è stata effettuata nei campioni normalizzati utilizzando la PowerSYBR®(AppliedBiosystems) e il termociclatorre Rotore-Gene Q – QIAGEN. Parametri di termociclazione: 95°C 10 min

poi 42 cicli 95°C 5 sec, 72°C 20 sec; touchdown iniziale di 1°C per ciclo a partire da 65°C per i primi 5 cicli. Concentrazioni utilizzate per reazione: DNA 150 ng/μL; primer 50nM.

I fold di espressione genica sono stati calcolati con il metodo $\Delta\Delta Ct$.

Secondo le seguenti formule: $\Delta Ct = Ct (\text{gene target}) - Ct (\text{gene housekeeping})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{campione controllo}) - \Delta Ct (\text{campione trattato})$; $\text{fold} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

Primer	Process	function	Forward primer	Reverse primer
EF1	Elongation factor 1-Alpha	housekeeping	AACCTCCTTACAGTGAATCC	ATGTTATCTCCGTGCCAG
IMPI	Inibitor Metalloproteina	Target gene	TAGTAAGCAGTAGCATAGTCC	GCCATCTTCACAGTAGCA
Nf-kB	Nf-kB cascade	Target gene	CGAGCTAAAGACAGGCGATT	TCACCTGCGGTTGAATCATA

Tabella 2c: primer utilizzati per l'analisi dell'espressione genica nelle larve di *G. mellonella* [69]

Analisi statistica

Tutti i saggi sono stati effettuati in triplicato e sono stati ripetuti in maniera indipendente per tre volte. I dati espressi come media \pm deviazione standard (SD) sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 6.0. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi a $p < 0.05$. I dati dei saggi sulla linea cellulare ATCC 5637 HTB-9, sulla conta degli ematociti vitali e sull'espressione genica sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) a una via seguito dal test post-hoc Bonferroni.

L'ANOVA a due vie seguito dal test post-hoc Bonferroni è stata eseguita per confrontare le differenze tra controllo e trattamento a tempi differenti nel saggio di quantificazione delle CFU/ml di *E.coli* nell'emolinfa delle larve infettate.

Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier degli esperimenti sulle larve di *G. mellonella* sono state analizzate con il Log-rank Mantel-Cox test.

2.6.3 Risultati

Test di sensibilità *in vitro* alla berberina cloruro

La minima concentrazione inibente determinata per il cloruro di berberina verso i ceppi di *E. coli* uropatogeni varia da 2048 a 1024 µg/mL. Per *E. coli* DSM 22312 e *E. coli* CL2 è stata registrata una MIC di 2048 µg/mL. Mentre per i ceppi *E. coli* ATCC 11775 e *E. coli* CL1 è stato determinato un valore di MIC di un fold più basso 1024 µg/mL (tabella 2d).

Ceppi	Berberina
<i>E. coli</i> ATCC 11775	1024
<i>E. coli</i> DSM 22312	2048
CL1 (CA-UTI)	1024
CL2 (CA-UTI)	2048

Tabella 2d. Minima concentrazione inibitoria (MIC) dei ceppi di *E.coli* uropatogeni esposti alla berberina cloruro espressa in µg/mL

Influenza del cloruro di berberina sulle curve di crescita dei ceppi di *E. coli* uropatogeni

Concentrazioni sub-inibitorie di berberina hanno modificato significativamente le curve di crescita di tutti i ceppi trattati in maniera concentrazione dipendente (figura 2d e tabella 2e).

Entrambe le dosi testate hanno inibito parzialmente la crescita *in vitro* dei ceppi di *E. coli* uropatogeni. La percentuale più alta di inibizione (43.03%) è stata osservata per l'*E. coli* DSM 22312 esposto a 1/2 MIC di berberina (1024 µg/mL). Mentre la percentuale più bassa di inibizione (12.47%) è stata osservata per l'*E. coli* ATCC 11775 trattato con 1/4 MIC (256 µg/mL).

Il trattamento con la berberina rallenta il raggiungimento della fase esponenziale di crescita (ΔX_{CFU50}), il valore di ritardo più alto è stato registrato per l'*E. coli* DSM 22312 (3.7 h) e il più basso per l'*E. coli* CL2 (0.9 h)

Anche la pendenza della curva (HillSlope) è stata lievemente influenzata dal trattamento. L'esposizione della berberina sui ceppi *E. coli* ATCC 1775, *E. coli* DSM 22312 ed *E. coli* CL1 ha indotto un piccolo aumento della ripidezza della curva rispetto al controllo non trattato, al contrario, per l'*E. coli* CL2, i valori di dell' HillSlope si sono ridotti (-0.03 per 1/4 MIC e -0.02 per 1/2 MIC).

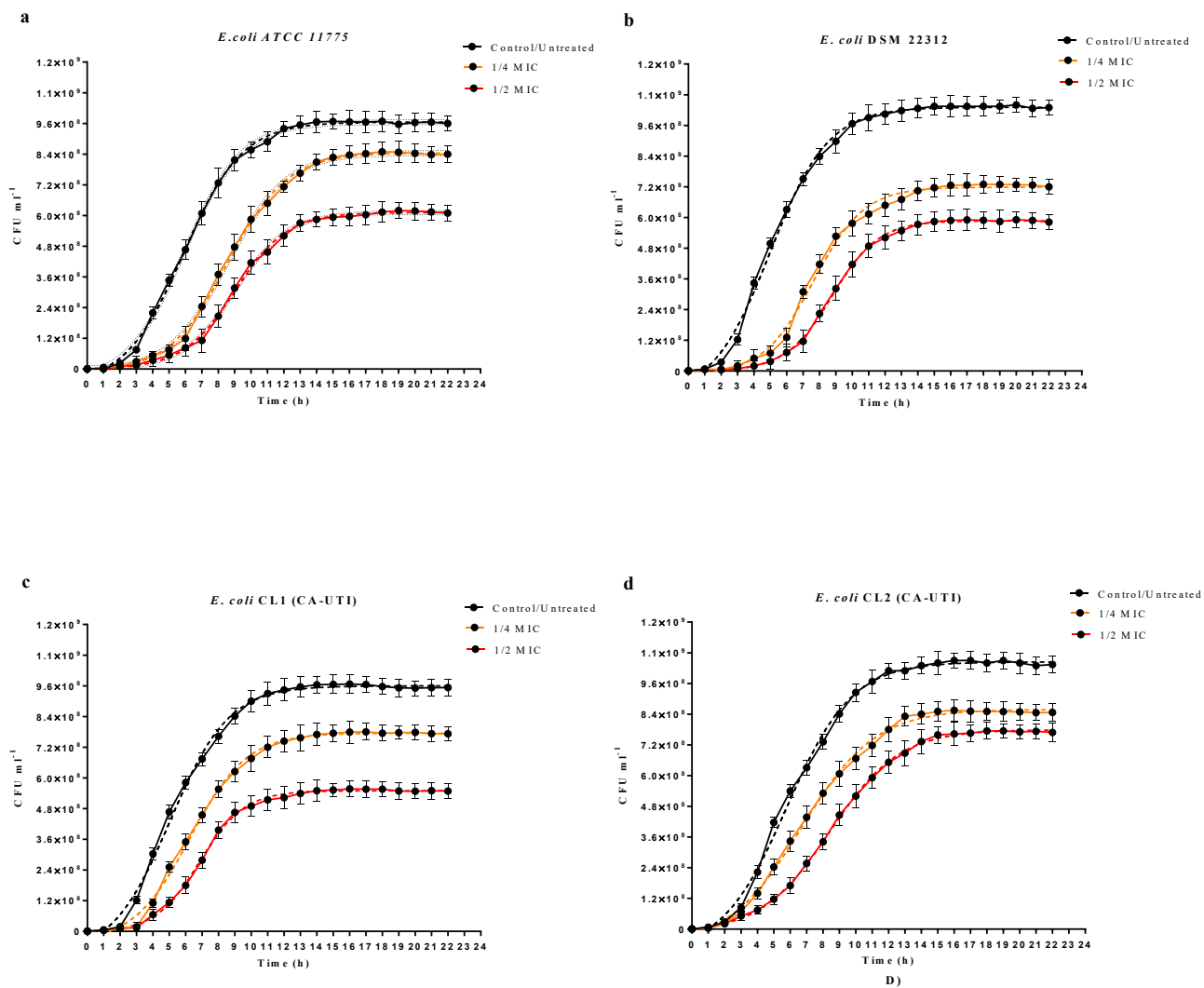


Figura 2d. Influenza del cloruro di berberina sulle curve di crescita *in vitro* di UPEC. I risultati sono espressi come media \pm DS.

	<i>E. coli</i> ATCC 1775			<i>E. coli</i> DSM 22312			<i>E. coli</i> CL1 (CA-UTI)			<i>E. coli</i> CL2 (CA-UTI)		
	CNT	¼ MIC	½ MIC	CNT	¼ MIC	½ MIC	CNT	¼ MIC	½ MIC	CNT	¼ MIC	½ MIC
Coefficiente di determinazione R²	0.998	0.998	0.998	0.997	0.995	0.999	0.996	0.997	0.998	0.997	0.998	0.999
Y_{Top} (CFU/mL)	9.66 x 10 ⁸	8.45 x 10 ⁸	6.12 x 10 ⁸	1.03 x 10 ⁹	7.19 x 10 ⁸	5.87 x 10 ⁸	9.59 x 10 ⁸	7.75 x 10 ⁸	5.49 x 10 ⁸	1.04 x 10 ⁹	8.58 x 10 ⁸	7.79 x 10 ⁸
Y_{top} ± D.S (CFU/mL)	1.98 x 10 ⁷	1.54 x 10 ⁷	2.11 x 10 ⁷	3.00 x 10 ⁷	2.92 x 10 ⁷	9.00 x 10 ⁶	2.95 x 10 ⁷	2.17 x 10 ⁷	1.08 x 10 ⁷	3.30 x 10 ⁷	2.36 x 10 ⁷	1.13 x 10 ⁷
Inhibition (%)	/	12.47	36.61	/	30.29	43.03	/	19.25	42.72	/	17.75	25.35
X_{CFU50} (h)	5.87	8.58	9.03	4.99	7.63	8.76	5.05	6.26	6.86	5.79	6.69	8.42
X_{CFU50} ± D.S (h)	0.35	0.3	0.28	0.57	0.5	0.16	0.62	0.44	0.24	0.62	0.5	0.2
ΔX_{CFU50} (h)	/	2.71	3.16	/	2.64	3.77	/	1.21	1.81	/	2.63	0.9
HillSlope	0.24	0.24	0.27	0.25	0.28	0.3	0.24	0.25	0.31	0.22	0.19	0.20
HillSlope ±S.D	0.039	0.037	0.043	0.06	0.081	0.032	0.064	0.054	0.049	0.054	0.036	0.018
Δ HillSlope	/	0	0.03	/	0.03	0,05	/	0.01	0.07	/	-0.03	-0.02

Tabella 2e: Analisi delle curve di crescita batterica.

Attività della berberina sull'adesione dei ceppi di *E.coli* alle cellule di vescica

Tutti i ceppi uropatogeni testati hanno mostrato un elevato tropismo verso la linea cellulare di vescica 5637. I valori medi di adesione dei ceppi non trattati con la berberina (controllo positivo) variano a seconda del ceppo: 1.01×10^7 CFU/well per *E. coli* ATCC 11775, 1.22×10^7 CFU/well per *E. coli* DSMZ 22312, 4.68×10^6 CFU/well per *E. coli* CL1 e 1.59×10^7 CFU/well per *E. coli* CL2 (Figura 2e). Il pre-trattamento dei ceppi con il cloruro di berberina alla concentrazione di 1/2 MIC e 1/4 MIC ha ridotto significativamente i valori di adesione di tutti i ceppi, ad eccezione dell'*E. coli* ATCC 1775. Per quest'ultimo ceppo soltanto l'esposizione con la concentrazione di 1/2 MIC ha ridotto il grado di adesione in maniera statisticamente significativa.

Per quanto riguarda l'esperimento di co-incubazione entrambe le concentrazioni di berberina non hanno ridotto significativamente il grado di adesione dei ceppi testati.

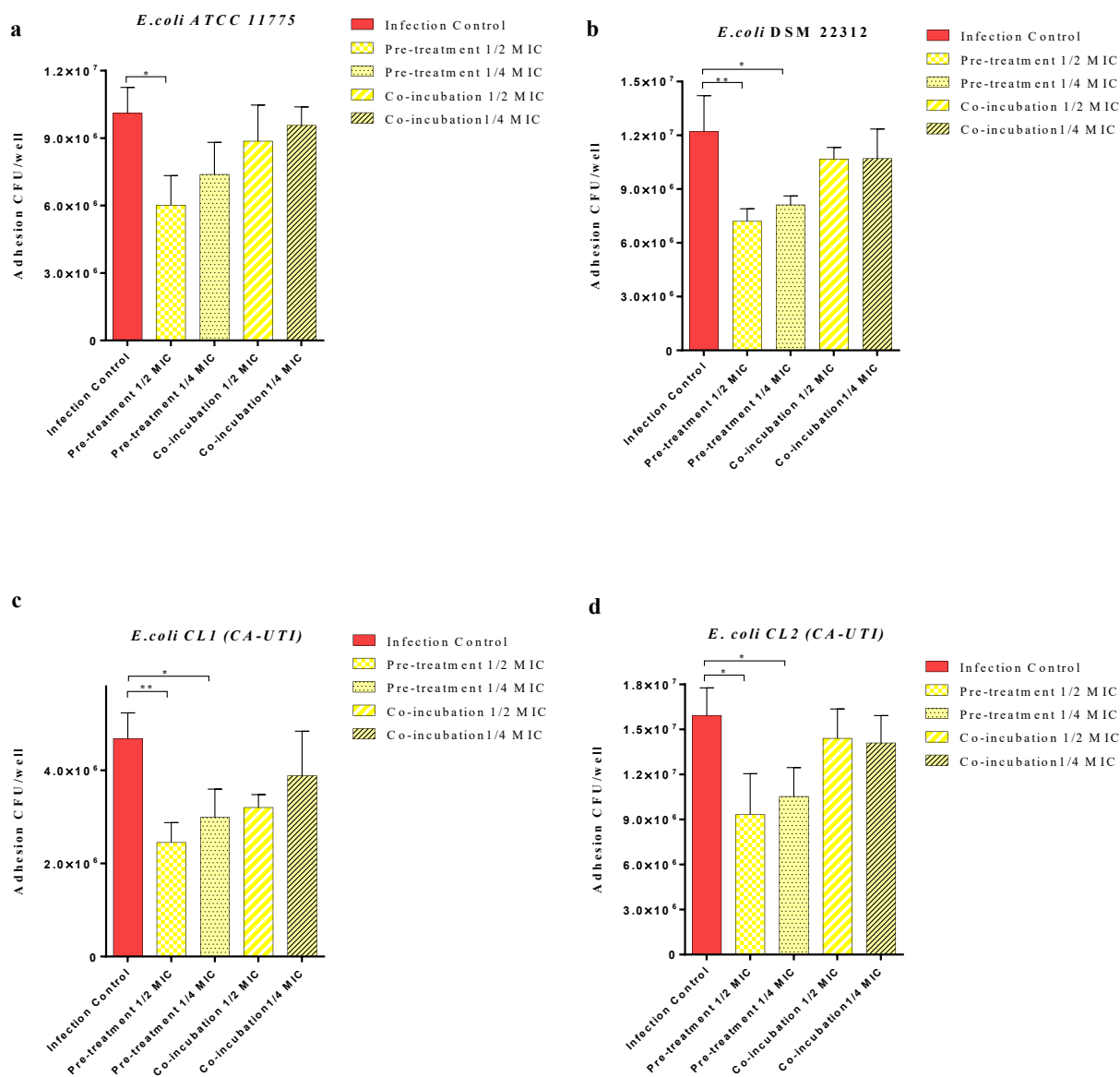


Figura 2e: Effetto della berberina sull'adesione dei ceppi di *E. coli* sulla linea cellulare ATCC 5637. I risultati sono espressi in CFU/well. Differenze statisticamente significative sono state determinate dall'analisi della varianza (ANOVA) a una via. *indica una differenza significativa $p < 0.05$ rispetto al controllo non trattato, ** indica una differenza significativa $p < 0.01$ rispetto al controllo/non trattato.

Attività della berberina sull'invasione dei ceppi di *E.coli* alle cellule di vescica

È stato osservato che tutti i ceppi di *E.coli* uropatogeni testati sono in grado di penetrare e invadere le cellule di vescica 5637. I valori medi di invasione dei ceppi non esposti alla berberina variano da 6050 CFU/Well per il ceppo *E.coli* CL2 che ha mostrato un maggiore capacità a 625 CFU/Well per l'*E.coli* CL1 (figura 2f). Il pre-trattamento con la berberina alla concentrazione di 1/2 MIC riduce in maniera statisticamente significativamente la capacità di *E. coli* ATCC 11775, *E. coli* DSM 22312 ed *E. coli* CL1 di penetrare e invadere la linea cellulare. Il pre-trattamento con la concentrazione 1/4 MIC riduce significativamente la capacità invasiva solo per il ceppo di *E. coli* ATCC 11775. Tuttavia, l'attività anti-invasiva della berberina cloruro non è stata osservata per il ceppo CL1. Così come nei saggi di adesione la co-incubazione con la berberina, ha ridotto la capacità invasiva soltanto per alcuni ceppi ma non in maniera statisticamente significativa.

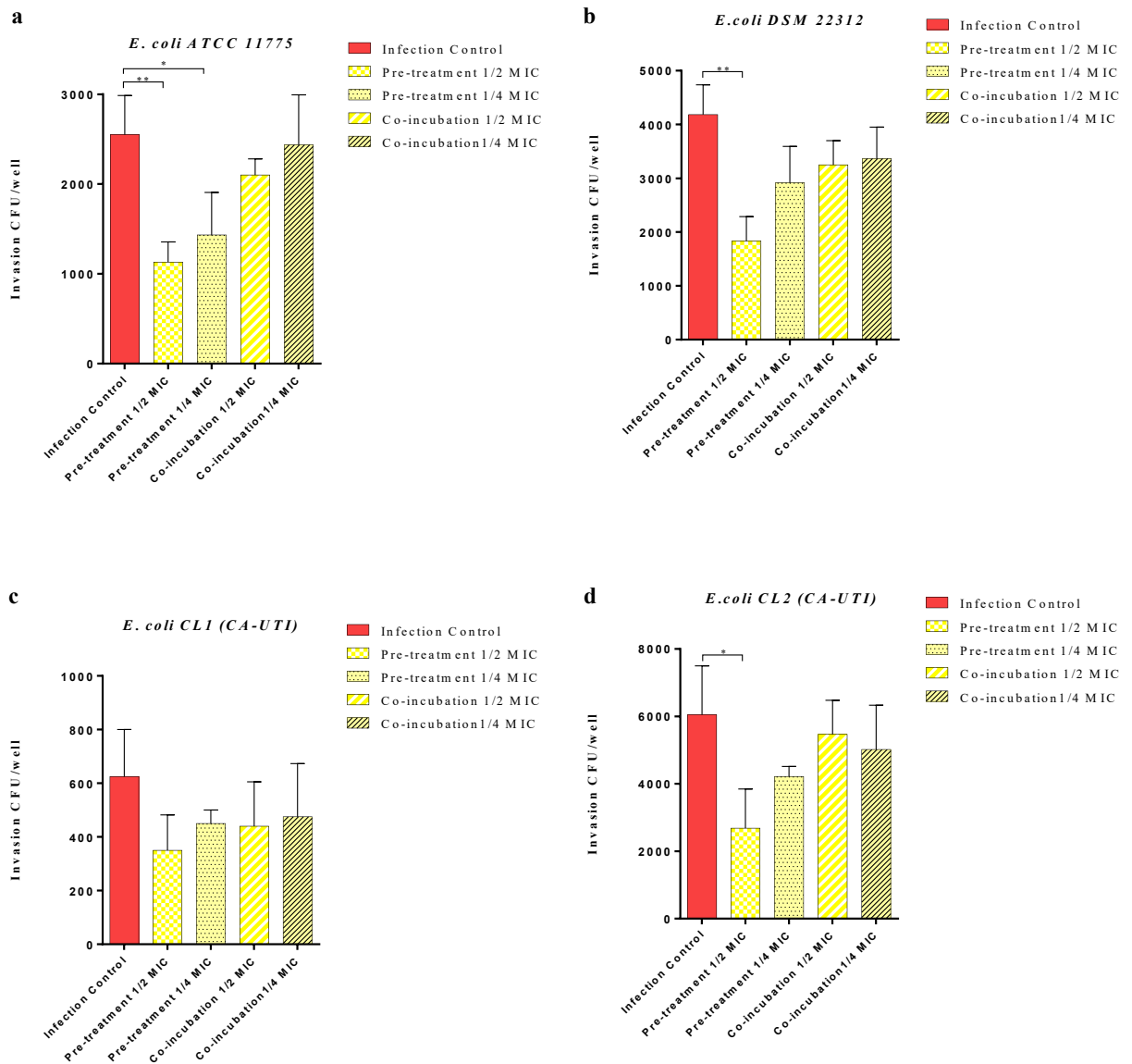


Figura 2f. Effetto della berberina sull'invasione dei ceppi di *E. coli* sulla linea cellulare ATCC 5637. I risultati sono espressi in CFU/well. Differenze statisticamente significative sono state determinate dall'analisi della varianza (ANOVA) a una via. *indica una differenza significativa $p < 0,05$ rispetto al controllo non trattato, ** indica una differenza significativa $p < 0,01$ rispetto al controllo/non trattato.

Saggio di sopravvivenza larve infettate e trattate con berberina

Come esperimento preliminare è stata valutata l'eventuale tossicità della soluzione di berberina. Nelle larve inoculate con la sostanza test a concentrazioni comprese tra 4096 µg/mL e 64 µg/mL non è stata osservata alcuna riduzione dei tassi di sopravvivenza o comparsa di segni di melanizzazione evidenti.

Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier dei diversi gruppi di trattamento e controllo sono rappresentate in figura 2g.

Tutti i ceppi di *E.coli* uropatogeni inoculati (10^5 CFU/larve) nell'emolinfa delle larve si sono rilevati virulenti in *G. mellonella*. I ceppi che si sono dimostrati più virulenti sono l'*E. coli* DSM 22312 e *E. coli* CL2, quest'ultimi a 72 ore dall'inoculo hanno causato la morte del 100% delle larve. Mentre l'infezione con *E. coli* ATCC 11775 e *E. coli* CL1 ha ridotto la sopravvivenza dopo 72 ore rispettivamente del 76,64% e 75.73%.

Nei gruppi di controllo inoculati con la soluzione salina, per verificare eventuali traumi meccanici causati dalla perforazione della cuticola, non è stata osservata nessuna riduzione della sopravvivenza soltanto in alcuni casi dei lievi segni di melanizzazione.

Le larve che sono state inoculate con i ceppi di *E.coli* pre-trattati con le concentrazioni 1/2 MIC e 1/4 MIC hanno mostrato delle percentuali di sopravvivenza più alte rispetto ai controlli infettati.

L'aumento del tasso di sopravvivenza delle larve inoculate con ceppi di *E. coli* pretrattati con 1/2 MIC di berberina è risultato statisticamente significativo per *E. coli* ATCC 11775, *E. coli* DSM 22312 e *E.coli* CL2. Mentre, nei gruppi in cui le larve sono state infettate con i ceppi pre-trattati con la concentrazione di 1/4 MIC, solo per il ceppo *E. coli* ATCC 11775 si è osservata una protezione significativa.

Per quanto riguarda il test di co-incubazione, a differenza degli esperimenti *in vitro*, in tutti i gruppi in cui le larve sono state infettate e trattate con la berberina alla concentrazione di 2 MIC si è registrata un aumento della sopravvivenza rispetto al controllo.

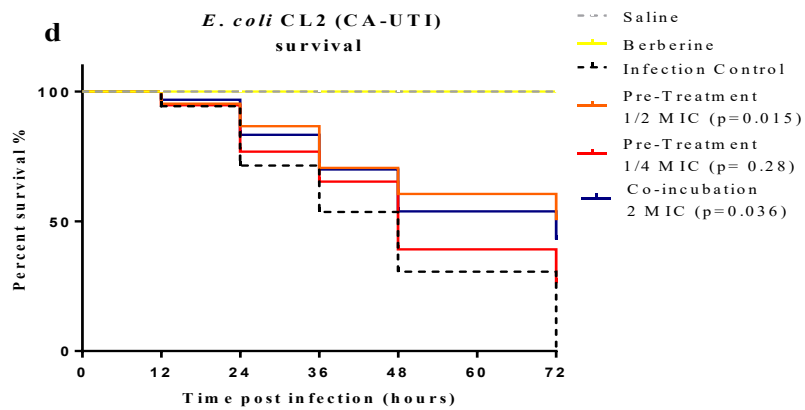
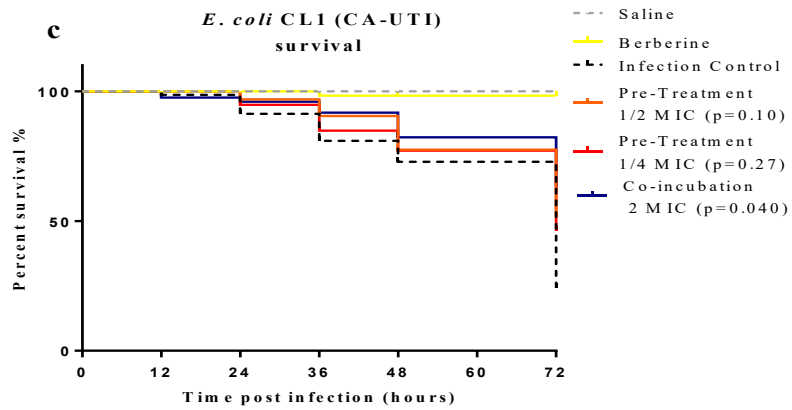
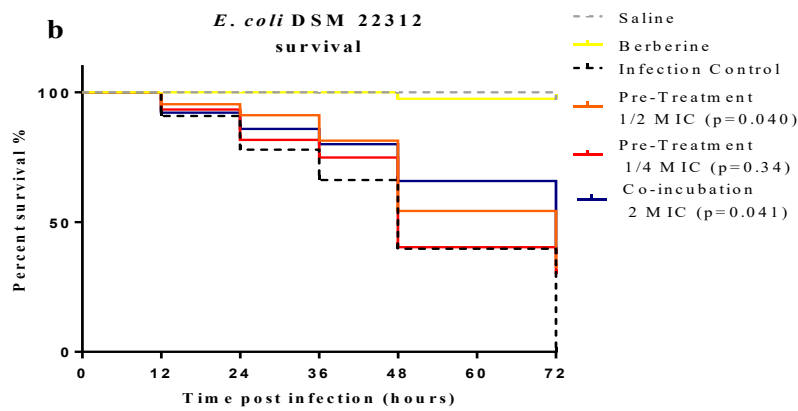
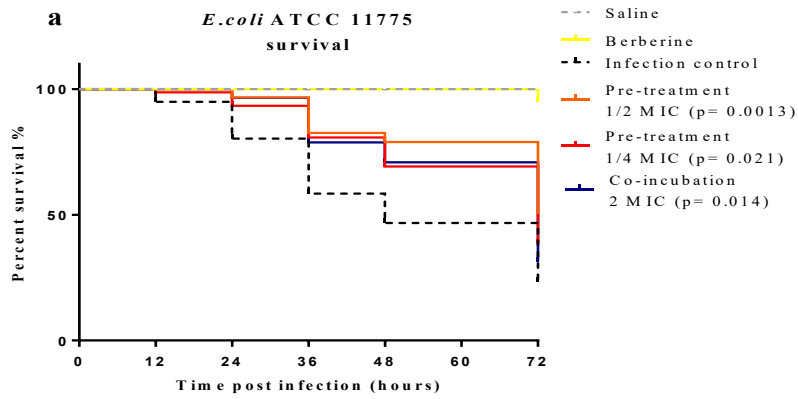


Figura 2g. Curve di Kaplan-Meier delle larve di *G. mellonella* infettate da *E.coli*. Tutti i gruppi di trattamento sono stati confrontati con il gruppo di controllo utilizzando il test log-rank, i valori p sono riportati per ogni gruppo.

Conta delle CFU/mL dei ceppi di *E.coli* inoculati nelle larve

In accordo con i risultati dei saggi di sopravvivenza, nell'emolinfa delle larve trattate con la berberina il numero delle CFU/mL si è rilevato più basso sia nei gruppi di pre-trattamento che nei gruppi di co-incubazione rispetto ai controlli infettati (figura 2h e tabella 2f).

Nei gruppi di controllo non infettati come atteso non è stata rilevata nessuna colonia di *E.coli*. Nelle larve infettate non trattate il numero di patogeni all'interno dell'emolinfa è dipendente dalla virulenza del ceppo inoculato.

Nei gruppi di pre-trattamento con berberina 1/2 MIC, le cellule batteriche recuperate dalla conta su piastra sono significativamente ridotte a 24 h, 36 h e 48 h dall'infezione per *E. coli* ATCC 11775, CL1 e CL2, mentre a 12 h, 24 h, 36 h e 48 h per *E. coli* DSM 22312.

Nelle larve inoculate con patogeni pretrattati con 1/4 MIC, è stata riscontrata una riduzione significativa a: 24 h e 36 h per l'*E. coli* ATCC 11775; 12 h e 36 h per *E. coli* DSM 22312; 48 h per *E. coli* CL1 e 24 h, 36 h e 48 h per *E. coli* CL2.

Per quanto riguarda le larve co-incubate con la berberina è stata osservata una riduzione significativa del conteggio dei patogeni a: 24 h, 36 h e 48 h per l'*E. coli* ATCC 11775 e CL2; 12 h, 24 h e 36 h per l'*E. coli* DSM 22312.

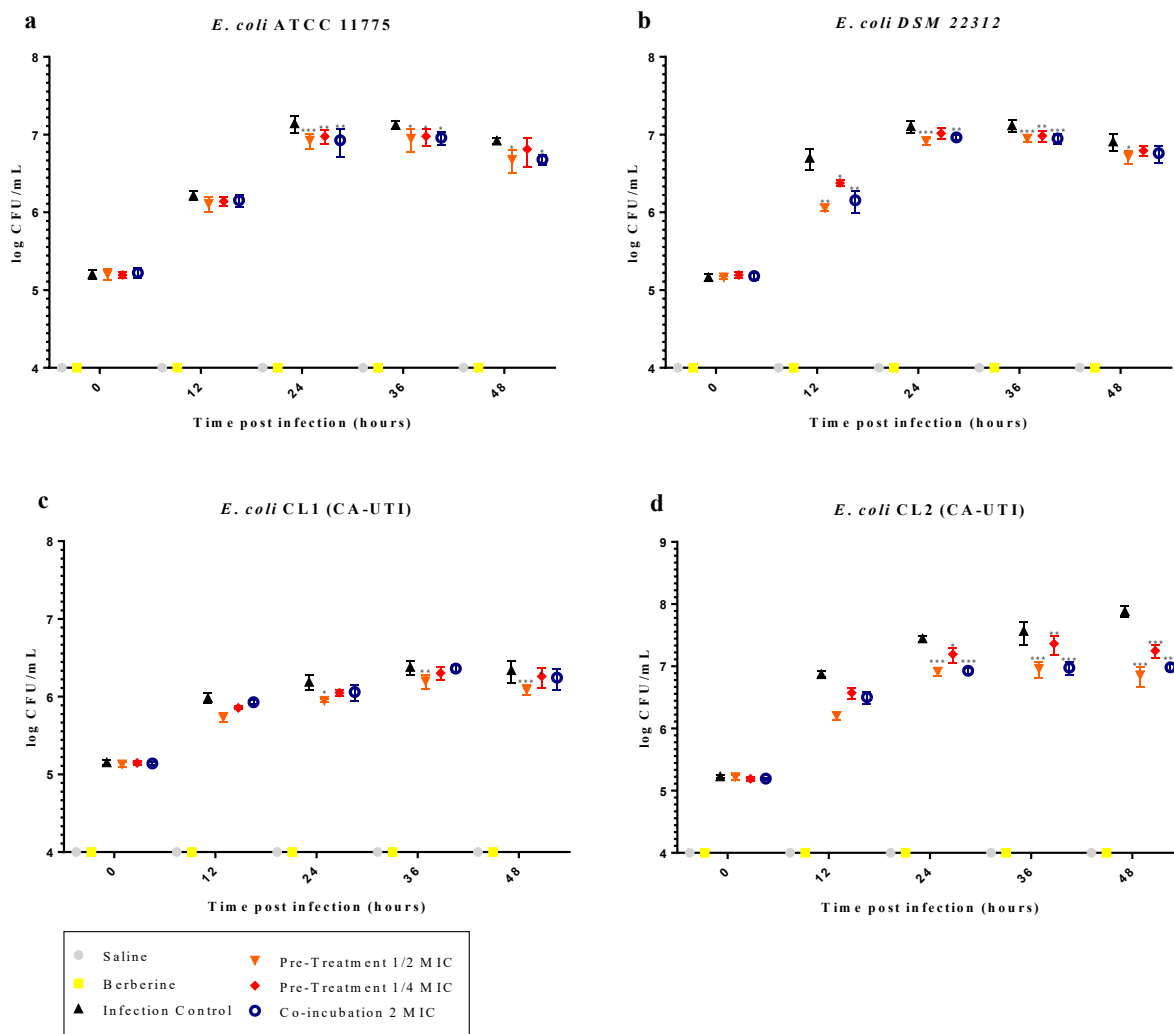


Figura 2h. *E. coli* CFU/mL recovery dall'emolinfa di *G. mellonella*. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando l'ANOVA a due vie e analisi post-hoc con il metodo di Bonferroni. ****P < 0.001, ***P < 0.01, *P < 0.05

		<i>E.coli</i> ATCC 1175		<i>E.coli</i> DSM 22318		<i>E.coli</i> CL1		<i>E.coli</i> CL2	
		<i>log units</i>	<i>P Value</i>	<i>log units</i>	<i>P Value</i>	<i>log units</i>	<i>P Value</i>	<i>log units</i>	<i>P Value</i>
time post infection 12h	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/2 MIC</i>	0,1093	> 0,9999	0,6462	0,0014	0,2492	0,2989	0,6700	0,5716
	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/4 MIC</i>	0,0767	> 0,9999	0,3220	0,0406	0,1255	> 0,999	0,3000	> 0,9999
	<i>Infection Control vs. Co-incubation MIC</i>	0,0612	> 0,9999	0,5442	0,0032	0,0524	> 0,999	0,3689	> 0,9999
time post infection 24h	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/2 MIC</i>	0,2225	0,001	0,1888	0,0002	0,2422	0,0329	0,5333	0,0002
	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/4 MIC</i>	0,1706	0,0083	0,0906	0,0675	0,1411	0,2733	0,2519	0,0239
	<i>Infection Control vs. Co-incubation MIC</i>	0,2191	0,0011	0,1428	0,0032	0,1304	0,3411	0,5190	0,0002
time post infection 36h	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/2 MIC</i>	0,1761	0,0101	0,1708	0,0004	0,1849	0,005	0,6078	< 0,0001
	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/4 MIC</i>	0,1462	0,0323	0,1364	0,0036	0,0807	0,3198	0,2036	0,0096
	<i>Infection Control vs. Co-incubation MIC</i>	0,1648	0,0156	0,1676	0,0005	0,0214	> 0,999	0,5896	< 0,0001
time post infection 48h	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/2 MIC</i>	0,2486	0,0432	0,1964	0,0177	0,2520	0,0011	1,0291	< 0,0001
	<i>Infection Control vs. Pre-Treatment 1/4 MIC</i>	0,1105	0,5842	0,1163	0,2028	0,0791	0,4485	0,6337	< 0,0001
	<i>Infection Control vs. Co-incubation MIC</i>	0,2425	0,0485	0,1491	0,0758	0,0968	0,2572	0,9015	< 0,0001

Tabella 2f: Fold logaritmico tra i gruppi di trattamento e di controllo ($\log \text{CFU/mL}_{\text{contr}} - \log \text{CFU/mL}_{\text{trattato}}$) e valori di significatività statistica determinati dall' ANOVA a due vie con test post-hoc Bonferroni.

Attività della berberina sulla conta degli emociti

In tutte le larve infettate con i ceppi di *E.coli* si è osservato un aumento del numero di ematociti circolanti indotti dalla risposta immunitaria innata all'infezione (figura 2i).

Nell'emolinfa delle larve esposte alla berberina alla concentrazione di 2 MIC dopo 48 ore di esposizione alla sola berberina si è osservato un aumento nel conteggio degli ematociti, ma non statisticamente significativo, rispetto al controllo inoculato con la soluzione salina.

Il trattamento con la berberina ha ridotto soltanto in alcuni gruppi il numero degli ematociti rispetto ai gruppi di controllo dell'infezione.

Nelle larve infettate con *E. coli* ATCC 11775 e *E. coli* DSM 22312, è stata osservata una riduzione del conteggio degli ematociti nel gruppo di pre-trattamento con 1/2 MIC.

Mentre il trattamento con 1/4 MIC non ha avuto nessun effetto significativo sulla conta degli ematociti, anche se è possibile osservare un trend di riduzione rispetto al controllo.

Per quanto riguarda i gruppi di co-incubazione soltanto nelle larve infette da *E. coli* CL2 e successivamente trattate con la berberina (2 MIC) si è osservata una diminuzione degli ematociti.

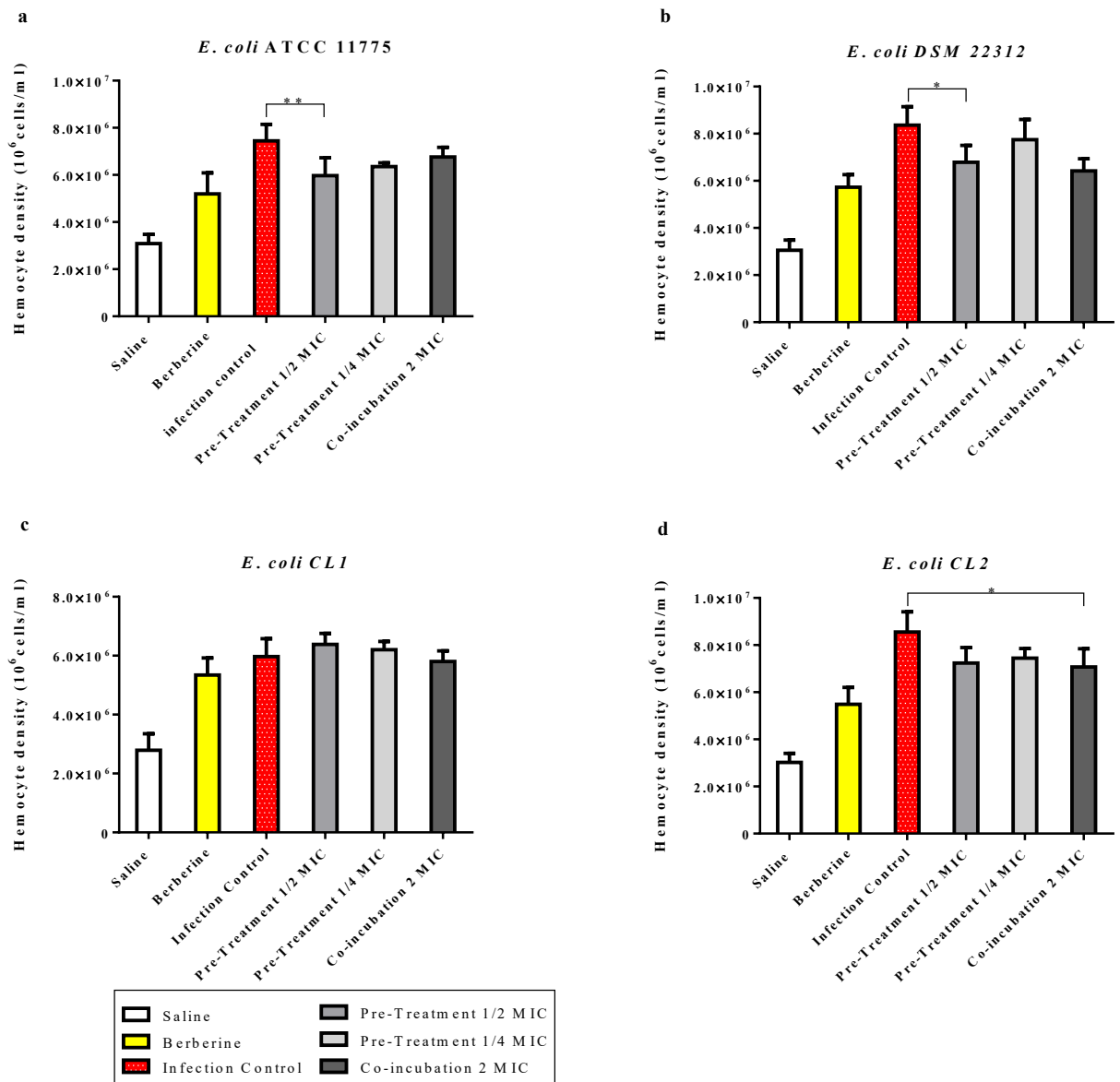


Figura 2i. Conta degli ematociti delle larve di *G. mellonella* a 48h dall'infezione. * indica una differenza significativa a $p < 0.05$, ** indica una differenza significativa a $p < 0.01$

Espressione dei geni che codificano per Nf-kappa b e IMPI

L'espressione trascrizionale dei geni è rappresentata come fold di espressione delle larve trattate rispetto al controllo (soluzione salina) e normalizzata mediante il gene housekeeping EF-1 (figura 21). Il trattamento con la berberina non ha alterato l'espressione di entrambi i geni. Mentre l'infezione con il ceppo UPEC ha indotto un aumento dell'espressione genica di 6.1 volte del gene Nf-kB e di 4.9 volte di IMPI (insect metalloproteinase inhibitor). È stato riscontrato che l'espressione del gene Nf-kB è diminuita in tutti i gruppi infettati e trattati con la berberina. Tuttavia, soltanto nel gruppo di co-incubazione il dato è statisticamente significativo (riduzione di 3.6 fold). Anche per quanto riguarda il gene IMPI si è osservata una riduzione della trascrizione nelle larve trattate con 2 MIC di berberina (riduzione di 4,8 fold) e nelle larve inoculate con il ceppo pre-trattato con la concentrazione di 1/2 MIC (riduzione di 2,2 fold)

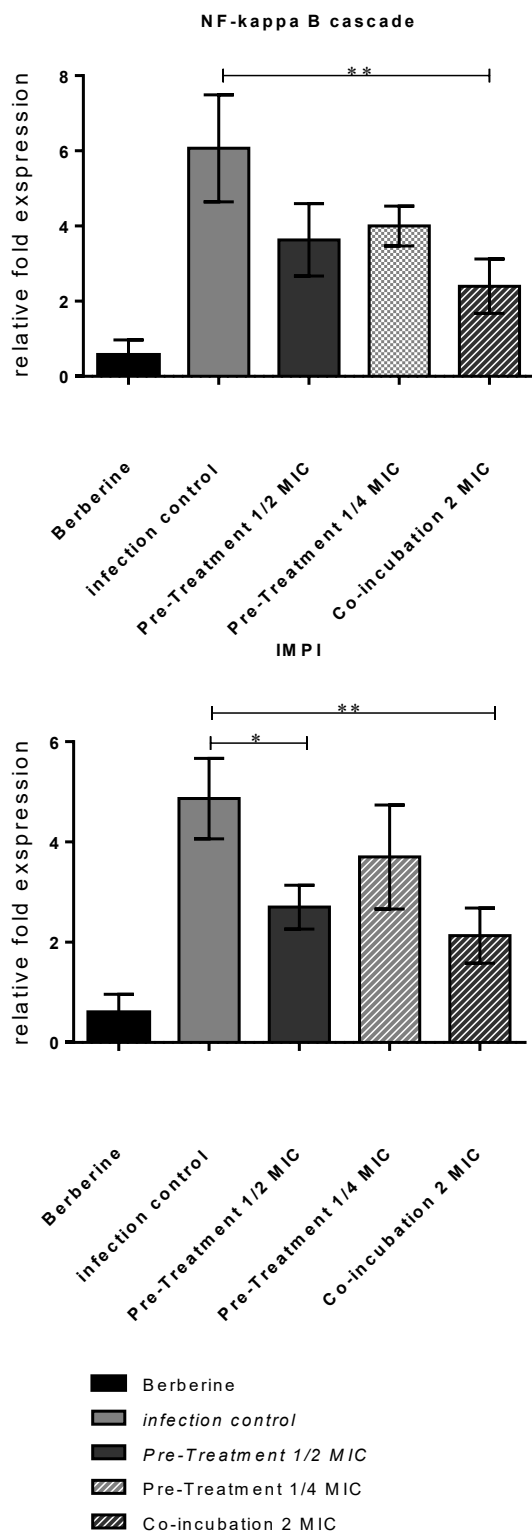


Figura 2l: espressione dei geni “normalizzati” rispetto al controllo a 48h dall’infezione con *E.coli* ATCC 11775

2.6.4 Discussione

I fitoestratti come agenti per trattare le infezioni sono da secoli impiegati nella medicina popolare, tuttavia negli ultimi anni hanno acquistato sempre più interesse nella ricerca scientifica in quanto i loro meccanismi differiscono dagli antibiotici comunemente usati e quindi potrebbero essere utilizzati come agenti per trattare germi multi-resistenti [118, 122]. Lo studio dell'attività dei fitoestratti, così come di nuovi composti di sintesi, viene inizialmente condotta *in vitro* attraverso studi di suscettibilità antimicrobica soltanto dopo questa fase iniziale di screening vengono condotti studi *in vivo* [123]. Come precedentemente descritto il *gold standard* per gli studi *in vivo* sono i modelli mammiferi, tuttavia quest'ultimi presentano delle limitazioni dovuti agli alti costi e alle autorizzazioni necessarie prima di iniziare lo studio. Inoltre spesso i risultati ottenuti *in vitro* non sono sovrapponibili a quelli ottenuti *in vivo*. Modelli alternativi come le larve di *G.mellonella* non si propongono di sostituire i modelli mammiferi, che rimangono certamente indispensabili, ma di ridurre l'utilizzo così come prescritto dalle normative vigenti internazionali [19].

Inoltre, l'attività *in vivo* dei composti può essere valutata più rapidamente e a basso costo, agendo come ulteriore esperimento di pre-screening prima di effettuare test nei modelli mammiferi.

Nella maggior parte dei lavori in bibliografia l'ospite *G. mellonella* viene utilizzato per lo studio dell'attività di antibiotici già noti o di nuova sintesi pochi invece sono quelli relativi allo studio di molecole estratte da piante medicinali [5].

In questo contesto abbiamo testato l'attività del cloruro di berberina verso ceppi UPEC nel modello *G. mellonella*, dimostrando che tale ospite può essere utile per lo screening di fitoestratti in particolare del gruppo degli alcaloidi.

Per questo studio è stato impiegato la berberina cloruro European Reference Standard. Le ragioni di questa scelta sono da ricondurre alle appropriate caratterizzazioni analitiche effettuate su questo standard di riferimento [124, 125].

Il meccanismo d'azione *in vitro* di questo alcaloide verso diverse specie di batteri è ben noto ed è stato studiato anche attraverso studi di proteomica e trascrittomica. Si tratta di un meccanismo multi-target che prende di mira le principali funzioni fisiologiche della cellula batterica, tra cui la duplicazione del DNA, la trascrizione dell'RNA e la biosintesi delle proteine attraverso l'inibizione di attività enzimatiche [100, 105, 126].

I valori delle MIC della berberina nei confronti dei 4 ceppi UPEC testati si sono rilevati elevati infatti il range di inibizione era compreso tra 2048 e 1024 µg/mL. Questi valori sono in accordo con i numerosi studi che dimostrano che la berberina è inibente ad alte concentrazioni sui batteri Gram-negativi e a concentrazioni più basse sui batteri Gram-positivi e in particolare verso *S. aureus* [127].

Dall'analisi delle curve di crescita dei ceppi esposti *in vitro* a dosi sub-inibitorie (1/2 e 1/4 MIC) abbiamo osservato che, nonostante l'attività inibitoria è presente soltanto ad alte concentrazioni, la berberina influenza la crescita in maniera dose e ceppo dipendente. Il ceppo *E. coli* DSM 22312, con un valore di MIC (2048 µg/mL), ha mostrato una maggiore suscettibilità alla berberina per quanto riguarda i tassi di inibizione e il ritardo nel raggiungere la fase di crescita esponenziale. Inoltre, l'effetto della berberina sulla pendenza della curva (parametro Hill slope) è risultato più evidente nel ceppo clinico CL2, sebbene quest'ultimo ha un valore MIC di 2048 µg/mL.

In un recente lavoro condotto da Sun *et al.*, è stata rilevata un'azione inibitoria sulla crescita simile a quella evidenziata in questo studio nel ceppo multi-resistente *E. coli* ATCC® 25922 [103].

I risultati *in vitro* sulla linea cellulare ATCC 5637 HTB-9 hanno provato che il pre-trattamento con la berberina alla concentrazione sub inibitoria di 1/2 MIC diminuisce significativamente l'adesione e l'invasione dei ceppi di *E. coli* alle cellule della vescica. Tuttavia, la co-incubazione con la berberina non ha ridotto significativamente la capacità adesiva e invasiva dei ceppi testati.

Sulla base di precedenti studi possiamo ipotizzare che nell'esperimento di pre-trattamento la berberina a concentrazioni sub-inibenti a contatto per 4 ore con i ceppi UPEC abbia indotto delle modifiche strutturali in particolare nei fattori di virulenza cruciali nell'adesione come pili e fimbrie [100, 102].

Dai saggi di invasione condotti sempre sulla linea cellulare di vescica è stata osservata l'attività anti-invasiva della berberina cloruro nei confronti sempre dei ceppi pre-esposti alla sostanza.

L'attività antiadesiva e antiinvasiva della berberina se confermata anche confermata da studi *in vivo* su mammiferi potrebbe avere delle significative implicazioni terapeutiche. Infatti, i ceppi uropatogeni che invadono le cellule epiteliali del tratto urinario sono in grado di resistere più facilmente alla terapia antibiotica ed eludere la risposta immunitaria. Partendo dai dati ottenuti *in vitro* abbiamo utilizzato il modello *G. mellonella* per valutare se l'attività della berberina venisse confermata *in vivo*. I dati presentati in questo studio acquisiti dal modello ospite *G. mellonella*, a nostra conoscenza, sono i primi che documentano l'attività della berberina *in vivo* nelle infezioni indotta da UPEC.

Sono stati condotti saggi di sopravvivenza delle larve, conta delle cellule di *E. coli* nell'emolinfa, conta degli ematociti vitali e di espressione genica. La berberina inoculata nelle larve anche ad alte concentrazioni non ha mostrato alcuna tossicità, pertanto la *G.*

mellonella si è rilevata un modello idoneo per lo studio dell'attività antimicrobica *in vivo* di questo alcaloide.

L'azione protettiva della berberina verso le larve infette è stata rilevata sia negli esperimenti di pretrattamento che di co-incubazione.

Non sorprende che i dati ottenuti da questo modello siano in accordo con il modello murino di sepsi pubblicato recentemente da Pierpaoli *et al.*, che riporta l'attività della berberina verso la somministrazione intraperitoneale di un ceppo di *E. coli* [128].

A differenza degli studi condotti *in vitro* sulla linea cellulare di vescica l'attività della berberina *in vivo* è stata osservata anche nei gruppi di co-incubazione.

L'effetto protettivo delle larve osservato nei saggi di co-incubazione potrebbe essere spiegato dall'azione soppressiva della berberina nei confronti dell'attività pro-infiammatoria del lipopolisaccaride (LPS). Mahdavi *et al.*, ha dimostrato che la somministrazione di berberina protegge i topi gravidi dall'aborto indotto da LPS attraverso la modulazione della cascata infiammatoria e della risposta immunitaria [129].

In un altro studio, il trattamento con berberina ha aumentato il tasso di sopravvivenza dei topi con endotossiemia indotta da LPS, questa protezione è stata spiegata dall'elevata affinità della berberina nei confronti del recettore TLR4/ MD-2 e dalla significativa soppressione dei livelli di NF- κ B, IL-6, TNF α e IFN β [130].

I dati ottenuti dalla conta delle CFU/mL di *E. coli* ci danno la possibilità di esplorare con maggiore dettaglio le dinamiche dell'infezione.

Il numero di *E. coli* nel corso dell'infezione viene ridotto significativamente nei gruppi trattati già a partire da 12h dall'inoculo batterico. Quindi la berberina, attraverso la sua attività antimicrobica e/o interferendo con l'adesione di ceppi batterici, potrebbe ridurre

la virulenza dei ceppi UPEC permettendo al sistema immunitario innato delle larve di contrastare l'infezione in modo più efficace.

Quanto affermato viene confermato anche dal saggio della conta degli ematociti e dai dati dell'espressione genica.

La berberina inoculata alla concentrazione di 2 MIC stimola la formazione degli ematociti, sebbene i dati non siano statisticamente significativi. Gli ematociti giocano un ruolo importante nella risposta immunitaria indotta dall'infezione, quindi questo aumento potrebbe agire in combinazione con le proprietà antimicrobiche della berberina per prevenire la morte delle larve.

Riduzioni statisticamente significative nel conteggio degli ematociti sono state invece osservate nei gruppi pre-incubati con 1/2 MIC e nei gruppi trattati con la berberina dopo l'infezione.

Questi dati correlano bene con i risultati dei test della conta batterica a 48h e possono essere attribuiti al fatto che gli ematociti delle larve trattate hanno contrastato più efficacemente l'agente patogeno durante le prime fasi dell'infezione.

Dai risultati dell'espressione genica sul gene Nf-kb e IMPI viene avvalorata l'ipotesi che il trattamento con la berberina è in grado di proteggere le larve dall'infezione con un meccanismo dovuto sia all'azione antimicrobica sia all'azione modulatrice sulla cascata infiammatoria.

Infatti le larve trattate con la berberina presentano dei livelli di espressione del gene Nf-kb e IMPI più bassi rispetto anche alle larve infettate con *E. coli* pre-trattato.

Alla luce delle prove riportate in questo documento, possiamo affermare che il modello *in vivo* *G. mellonella* è stato in grado di fornire promettenti risultati preliminari

sull'attività della berberina verso ceppi UPEC, fornendo nuove opportunità di utilizzo della berberina nel trattamento e nella prevenzione delle UTI.

Sono già stati pubblicati diversi studi che dimostrano l'effetto sinergico e protettivo *in vitro* tra berberina e antimicrobici [131]. L'uso di questa sostanza come complemento terapeutico nelle infezioni batteriche umane, soprattutto contro i ceppi rilevanti di *E. coli*, sebbene non sia incluso tra gli obiettivi di questo studio, merita di essere approfondito utilizzando *G. mellonella* come modello preclinico di screening *in vivo*. Inoltre, la concentrazione testata in questo studio potrebbe essere molto elevata per futuri studi clinici, per cui sarà necessario valutare una possibile combinazione sinergica tra berberina e altri antimicrobici nel modello *in vivo* di *G. mellonella*.

2.7 Applicazione del modello *G. mellonella* per valutare l'azione immunosoppressiva del desametasone sul decorso dell'infezione con *E. coli* e *S. aureus*.

2.7.1 Stato dell'arte e scopo dello studio

Il modello *G. mellonella*, essendo relativamente recente, presenta ancora numerose applicazioni da esplorare tra queste di particolare interesse è lo studio dell'attività di sostanze ad azione immunosoppressiva o farmaci immunostimolanti.

Il sistema immunitario di *G. mellonella*, così come tutti gli insetti, è caratterizzato soltanto dalla risposta innata che presenta diversi meccanismi in comune con le risposte innate dei mammiferi. La mancanza dell'immunità adattiva può essere un vantaggio nel caso in cui si vogliano esplorare i meccanismi dell'immunità innata senza l'interferenza della risposta adattiva [19].

Pertanto lo studio della risposta immunitaria delle larve trattate con sostanze che agiscono sul sistema immunitario rappresenta una opportunità per comprendere come questi farmaci agiscono sulla risposta innata e sul rapporto ospite-parassita.

Gli eicosanoidi svolgono un ruolo cruciale nel mediare l'immunità degli insetti nelle risposte cellulari e umorali. Nel corso dell'infezione, diversi mediatori immunitari propagano i segnali di riconoscimento del non *self* ai tessuti immunitari vicini come gli emociti. Questi mediatori immunitari attivano anche il segnale eicosanoide attivando la fosfolipasi A2 (PLA2). La stimolazione della PLA2 porta all'idrolisi e alla liberazione dell'acido arachidonico e alla conseguente biosintesi di vari eicosanoidi in diversi tessuti[132]. Gli eicosanoidi possono mediare negli insetti così come nei mammiferi diversi segnali biochimici tra cui citochine, ammine biogene e ossido nitrico.

Il primo rapporto sull'attività di inibitori degli eicosanoidi sugli insetti risale al lavoro pubblicato da Stanley-Samuelson *et al.*, nel 1991 in cui è stato dimostrato che il desametasone, inibitore della PLA2, riduceva la capacità dell'insetto *Manduca sexta* di contrastare i batteri inoculati nell'emolinfa e quindi un aumento della mortalità delle larve [133]. Alcuni studi hanno dimostrato che gli inibitori degli eicosanoidi sono implicati nella regolazione del sistema immunitario anche di *G. mellonella* [134, 135]. Tuttavia, pochi lavori valutano l'influenza del desametasone sulla dinamica dell'infezione in *G. mellonella* e nessun studio ha valutato quali sono le variazioni dell'espressione genica delle larve trattate con immunosoppressori.

Pertanto scopo dello studio è stato quello di valutare se il trattamento con il desametasone rendesse il modello *G. mellonella* più suscettibile all'infezione indotta da ceppi patogeni di *E. coli* e *S. aureus*. Altro obiettivo è stato determinare quali sono le variazioni dell'espressione genica che si verificano in alcuni sistemi di regolazione dell'immunità innata delle larve trattate con desametasone.

2.7.2 Materiali e metodi

Chemicals e condizioni di coltura

È stato scelto il desametasone 21-fosfato disodico, acquistato da Sigma-Aldrich, in quanto a differenza di altri sali è solubile in acqua.

I ceppi utilizzati per infettare le larve sono lo *S. aureus* DSM 20491 ed *E.coli* DSM 1576. Quest'ultimi sono stati riattivati, dal terreno di congelamento, in Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C in condizioni di aerobiosi. Lo *S. aureus* e l'*E. coli* dopo riattivazione sono stati seminati rispettivamente in Mannitol Salt-agar e MacConkey agar.

Trattamento e infezione delle larve di *G. mellonella*

Le larve di *G. mellonella*, acquistate presso SA.GI.P. s.a.s (Ravenna, Italia), sono state suddivise nei vari gruppi (20 ciascuno) selezionandole in base al peso (300-350 mg) e includendo soltanto quelle prive di segni di melanizzazione.

Tutti gli esperimenti condotti sono stati effettuati con le metodiche descritte precedentemente.

Gli inoculi sono stati effettuati mediante una siringa da tuberculina (27G) e con l'ausilio di un micro-dosatore utile per standardizzare il volume inoculato (20 µL).

La tossicità del desametasone fosfato è stata valutata inoculando concentrazioni seriali della soluzione acquosa della sostanza da 40µg-a 4µg/larvae.

Per determinare la concentrazione ottimale dell'inoculo batterico sono stati effettuati degli esperimenti preliminari inoculando le larve con le sospensioni batteriche in un range di concentrazioni compreso tra 1×10^3 a 1×10^9 CFU/mL.

Dai dati delle curve di sopravvivenza sono state determinate le dosi di 10^5 CFU/mL per *E.coli* DSM 1576 e 10^6 CFU / ml per *S.aureus* DSM 2049 che sono state utilizzate per l'esperimento con il desametasone.

Per valutare l'effetto del pre-trattamento con desametasone sulla dinamica dell'infezione.

Le larve di *G. mellonella* sono state trattate con desametasone alla dose di 40 µg/larva.

Dopo due ore dal trattamento le larve sono state inoculate nuovamente con 20 µL delle sospensioni batteriche. Le larve poste nelle piastre Petri da 9 cm sono state incubate a 37°C e la percentuale di sopravvivenza è stata determinata nelle 96 ore successive.

Raccolta dell'emolinfa e densità degli ematociti nelle larve trattate con desametasone

A 48 h dall'infezione sono state prelevate tre larve per ogni gruppo e l'emolinfa è stata raccolta in una soluzione anticoagulante e cercando di mantenere tutto il sistema in ghiaccio al fine di rallentare la reazione di coagulazione. La densità degli ematociti è stata stimata utilizzando la camera di Burker.

Saggio di espressione genica (qPCR) larve trattate con desametasone

L'RNA di tre larve per ogni gruppo a 24 h e 48 h dopo il trattamento è stato estratto in TRI Reagent® (Sigma Aldrich), retrotrascritto in cDNA utilizzando il reagente cDNA ReadyScript™ (Sigma Aldrich). L'espressione genica relativa al gene di riferimento EF1, è stata effettuata nei campioni normalizzati utilizzando la PowerSYBR® (AppliedBiosystems) e il termociclatorre Rotore-Gene Q – QIAGEN. Le condizioni di

termociclazione sono le medesime descritte nel precedente saggio di qPCR (paragrafo 1.6.2).

Primer	Process	Function	Forward primer	Reverse primer
EF1	Elongation factor 1-Alpha	housekeeping	AACCTCCTTACAGTGAATCC	ATGTTATCTCCGTGCCAG
Nf-kB	Nf-kB cascade	Target gene	CGAGCTAAAGACAGGCGATT	TCACTGCGGTTGAATCATA
PLA2	Phospholipase A2 activity	Target gene	CCACACTGTGAGGCAACATT	GTTTGCTTAGCACGGTCACA
Phag	Phagocytosis	Target gene	ATTGCTAGCCAGGTTTCAGGA	AGCTATTTGGCGGAAACTCA
18w	Toll Receptor	Target gene	CACTCGATTTAGGCAACAACA	TCCGAGACGATCAACACTTC

Tabella 2g: primer utilizzati per l'analisi dell'espressione genica delle larve di *G. mellonella* trattate con desametasone

Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e sono stati ripetuti tre volte in maniera indipendente. I dati espressi come media \pm deviazione standard (SD) sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 6.0. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi a $p < 0.05$. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier degli esperimenti sulle larve di *G. mellonella* sono state analizzate con il Log-rank Mantel-Cox test. I dati sulla conta degli ematociti e sull'espressione genica sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguita dal test post-hoc Bonferroni.

2.7.3 Risultati

Saggio di sopravvivenza delle larve di *G. mellonella* trattate con desametasone

Le curve di Kaplan-Meier delle larve di *G. mellonella* sono presentate in figura 1m.

Nelle larve inoculate con concentrazioni comprese tra 40 e 4 µg/larva di desametasone non è stata osservata alcuna tossicità (dati non mostrati).

L'infezione indotta da *E. coli* DSM 1576 ha determinato la morte del 33% delle larve dopo 72 ore dall'inoculo. Mentre il ceppo di *S. aureus* DSM 204921 si è rilevato meno virulento, infatti l'infezione ha causato la morte soltanto del 18% delle larve.

La percentuale di sopravvivenza delle larve che sono state pre-trattate con desametasone fosfato e successivamente infettate con i ceppi patogeni si è ridotta significativamente.

Nel gruppo in cui le larve pre-trattate sono state infettate con il ceppo di *E.coli*, DSM 1576 è stata rivelata una percentuale di mortalità del 70%, a 72h. Mentre nel gruppo trattato e successivamente infettato con il ceppo *S. aureus* DSM 20491, è stato osservato un tasso di mortalità del 50% a 72h (figura 2m).

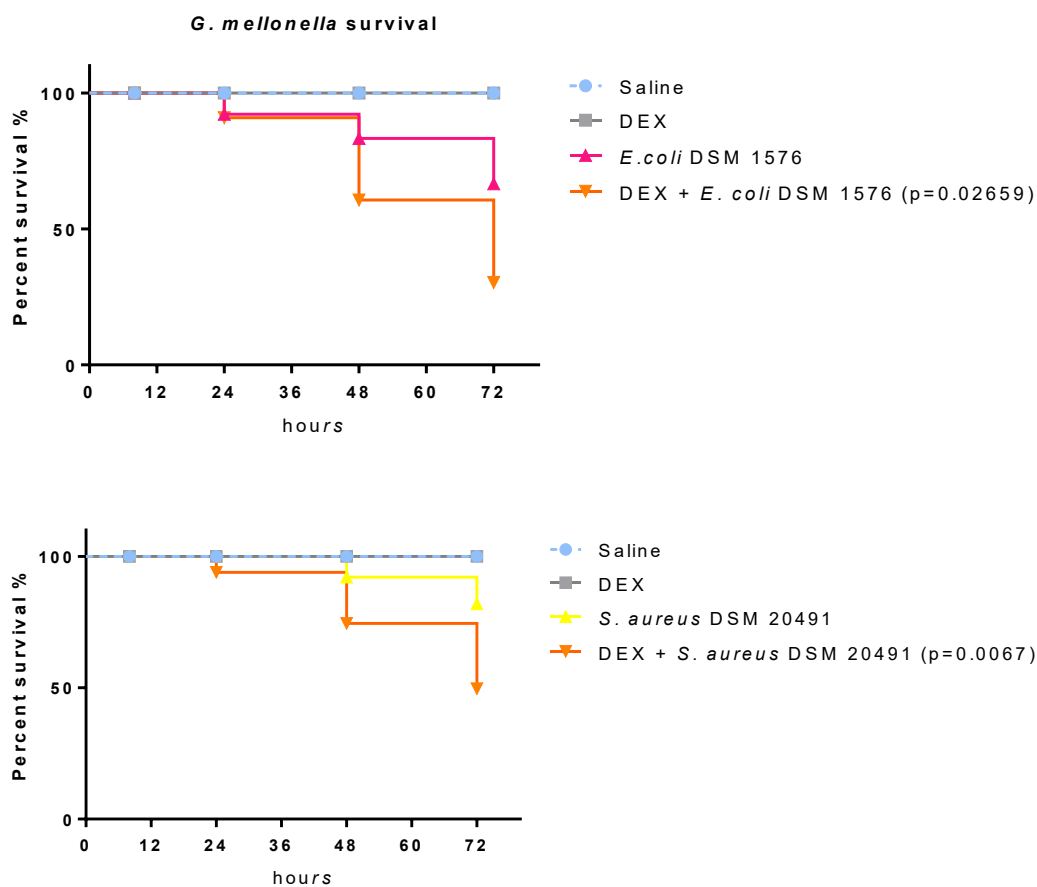


Figura 2m: Curve di Kaplan-Meier delle larve di *G. mellonella* trattate con desametasone fosfato. Tutti i gruppi di trattamento sono stati confrontati con il gruppo di controllo utilizzando il test log-rank, i valori p sono riportati per ogni gruppo.

Densità degli ematociti nelle larve trattate con desametasone

Dalla conta degli ematociti è emerso che il trattamento con desametasone ha ridotto significativamente la densità emocitaria rispetto al controllo (soluzione salina). Nei gruppi infettati con i ceppi patogeni, come atteso, si è osservato un aumento del numero di ematociti. Invece, il pre-trattamento con il desametasone ha significativamente ridotto

gli ematociti delle larve infettate con entrambi i ceppi rispetto alle larve non trattate (Figura 2n).

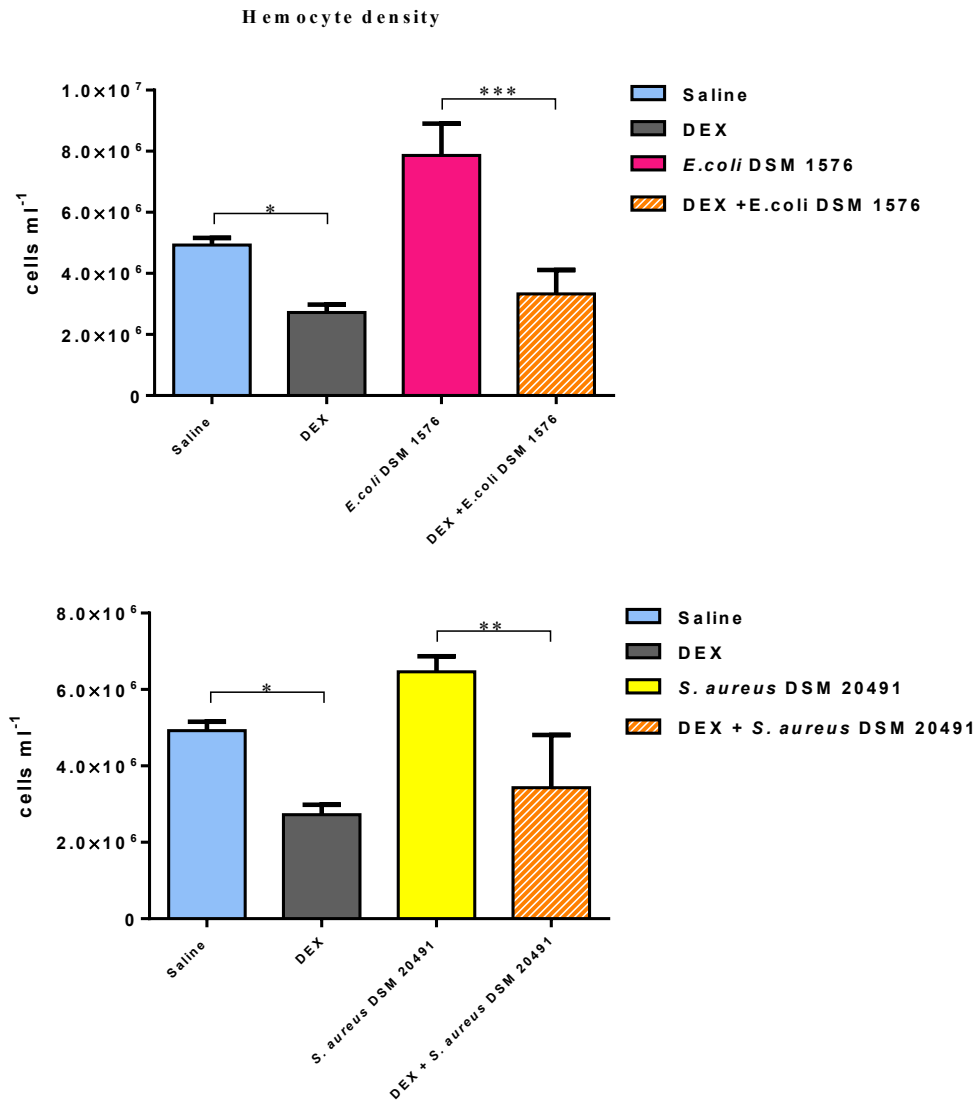


Figura 2n. Conta degli emociti a 48 h dal trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando l'ANOVA a una via con Bonferroni post-test. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

Espressione genica delle larve trattate con desametasone

I dati dell'espressione genica rappresentati come fold rispetto al controllo inoculato con la soluzione fisiologica sono rappresentati nelle figure 2o e 2p.

Dall'analisi dell'espressione genica è emerso che le larve trattate con il desametasone presentano dei livelli di espressione di NF-Kappa B a 24h (0.13 fold) e 48h (0.55 fold), della fosfolipasi A2 a 24h (0.72 fold), e dell'attività fagocitaria a 24h (0.52 fold) e 48h (0.66 fold) più bassi rispetto al controllo non trattato. Tuttavia non è stato rilevato nessun cambiamento nell'espressione del gene 18 weeler (un Toll-like receptor degli insetti).

L'infezione con i ceppi patogeni, come atteso, ha alterato l'espressione di tutti i geni testati. Il ceppo *E. coli* DSM 1576 e il ceppo *S. aureus* DSM 20491 hanno up-regolato l'espressione dei geni coinvolti nella risposta immunitaria sia a 24h che a 48h dall'inoculo batterico. Si è osservato che il ceppo di *E. coli* ha aumentato l'espressione genica dell'NF-Kappa B, della fosfolipasi A2 e in maniera statisticamente significativa l'attività fagocitaria a 24h (14.4 differenza fold) rispetto all'infezione indotta con *S. aureus*.

Nelle larve che sono state pre-esposte con desametasone e infettate dopo 2h i livelli si è osservata una marcata down-regolazione dell'espressione dei geni rispetto alle larve infettate non trattate. Nei gruppi infettati con *E. coli* i risultati statisticamente significativi sono: l'espressione di NF-Kappa B a 24 h (5.5 differenza fold) e 48 h (3 differenza fold); l'espressione della fosfolipasi A2 a 48h (2.5 differenza fold); l'attività della fagocitosi (15.4 differenza fold). Mentre nei gruppi infettati con *S. aureus* gli unici dati statisticamente significativi sono la riduzione dell'espressione del gene 18 weeler sia a 24h che a 48h.

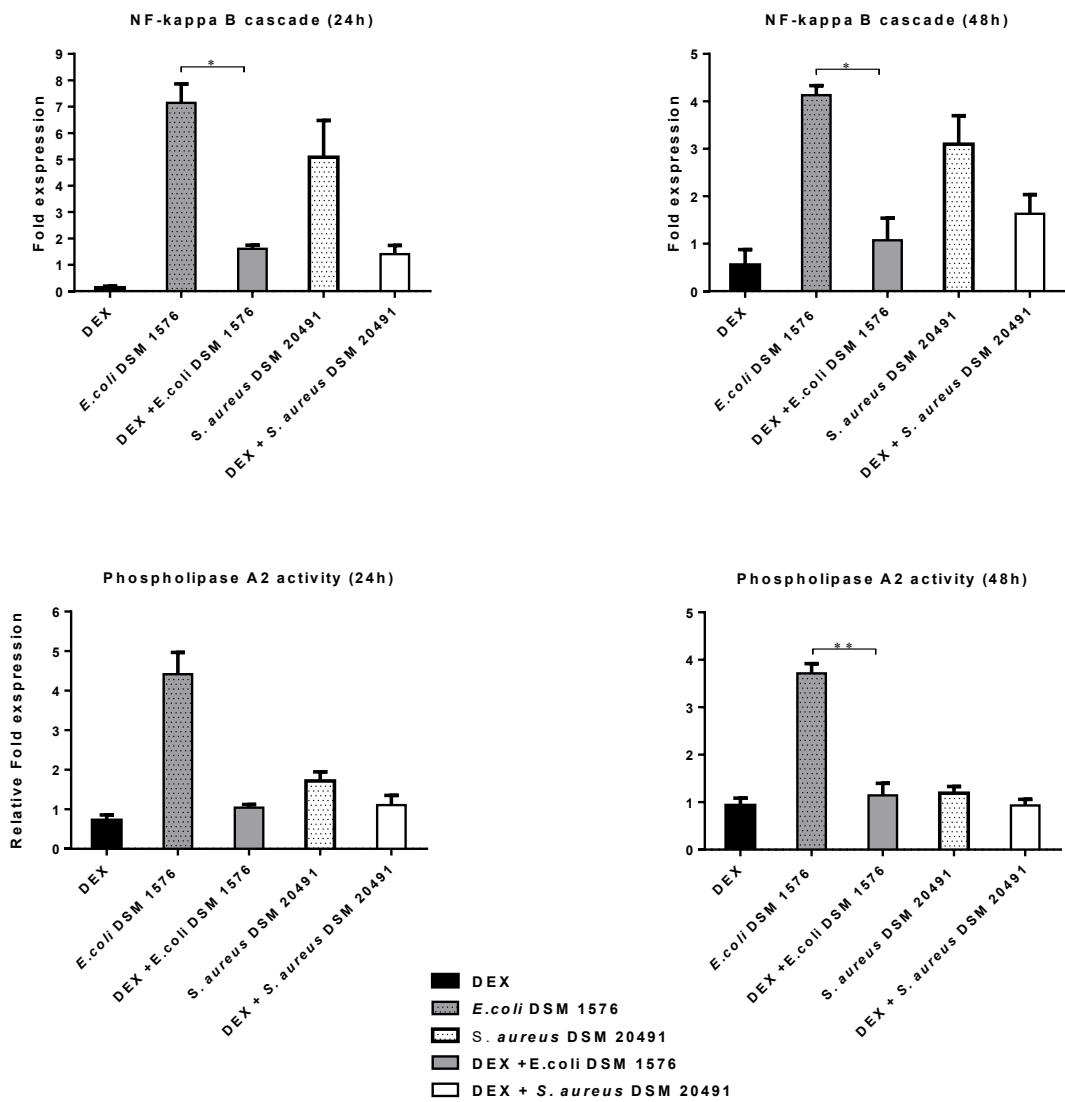


Figura 2o: espressione dei geni “normalizzati” rispetto al controllo a 24h e 48h dall’inoculo con desametasone. **P < 0.01, *P < 0.05

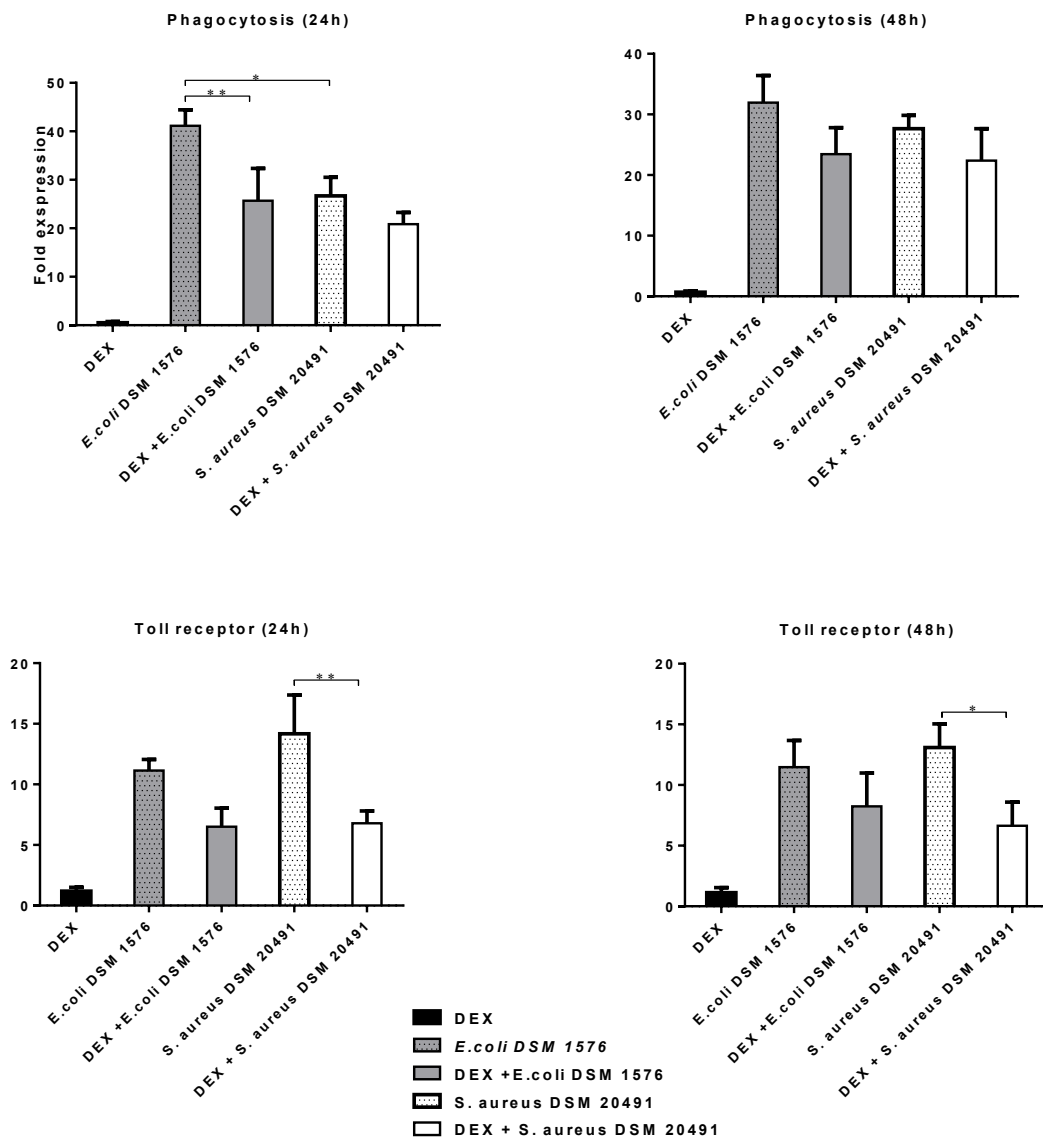


Figura 2p: espressione dei geni “normalizzati” rispetto al controllo a 24h e 48h dall’inoculo con desametasone. **P < 0.01, *P < 0.05

2.7.4 Discussione

Nel presente studio è stato valutato l'effetto del desametasone sulla dinamica dell'infezione delle larve infettate con ceppi patogeni e la variazione dell'espressione di alcuni geni del pathway immunitario.

La somministrazione intra-emocelica di desametasone 21-fosfato alla concentrazione di 40µg/larva, corrispondente a circa 0.13 gr/ kg, ha immunosoppresso la *G. mellonella* rendendola più suscettibile all'infezione. Ciò potrebbe agevolare lo studio di patogeni umani che hanno normalmente una bassa virulenza in *G. mellonella*.

Le larve pre-trattate hanno mostrato una minore capacità di contrastare la sepsi indotta sia dall'inoculo nell'emolinfa di *E. coli* DSM 1576 (ceppo isolato dalle feci) sia di *S. aureus* DSM 20491 (ceppo dermatotossico produttore di α -tossina).

I batteri utilizzati per questi esperimenti sono stati scelti per la loro bassa virulenza nel modello *G. mellonella* e dopo aver individuato la dose che determinava la mortalità soltanto del 18% delle larve infettate con *S. aureus* a 72h e del 33% per quelle infettate con *E. coli*. Il trattamento con desametasone ha ridotto del 36% la percentuale di sopravvivenza delle larve inoculate con *E. coli* e del 32% di quelle inoculate con *S. aureus*. I risultati sulla virulenza concordano con quelli di uno studio condotto da Torres *et al.*, in cui è stato dimostrato che il desametasone alla concentrazione di 100µg/larva, una dose maggiore rispetto a quella utilizzata in questo lavoro, aumenta la letalità di *E. coli* e *K. pneumoniae* in *G. mellonella* [134].

Questa maggiore sensibilità all'infezione si verifica probabilmente a causa di una proliferazione incontrollata dei batteri nelle larve che non riescono a contrastare efficacemente l'infezione. Infatti, i dati della conta ematocitaria dimostrano che il

desametasone, 48h dopo aver indotto la sepsi, riduce la densità degli ematociti, cellule coinvolte nella fagocitosi, nella nodulazione e nell'incapsulamento.

L'analisi dell'espressione di alcuni geni coinvolti nella risposta immunitaria rileva che il desametasone è in grado di modulare negativamente alcuni pathway fondamentali per la risposta immunitaria di *G. mellonella*. L'inibizione della via di segnalazione NFκ-B ostacola l'espressione di peptidi antimicrobici e altre molecole che vengono indotte dai pattern molecolari associati a patogeni attraverso le vie Toll, Imd e Jak-STAT [37].

L'inibizione della PLA2 ostacola la biosintesi degli eicosanoidi molecole che svolgono un ruolo cruciale nella mediazione delle risposte immunitarie degli insetti [132].

Il desametasone inoltre inibisce la fagocitosi processo, svolto dagli ematociti e in particolare dalle cellule granulari, che ha un ruolo chiave nella difesa cellulare di *G. mellonella* [19]. Per quanto riguarda il gene 18 wheeler, un Toll-like receptor accoppiato a proteina G, si è osservato un cambiamento significativo dell'espressione soltanto nei gruppi infettati con *S. aureus*. Il ruolo del recettore Toll-like 18-Wheeler nell'immunità degli insetti non è ancora del tutto chiaro. Uno studio condotto su *Drosophila* dimostra che questo recettore non sembra coinvolto nel riconoscimento dei pattern dei batteri *Gram-negativi* ma è correlato con l'espressione dei peptidi antimicrobici [136].

I risultati molecolari presentati in questo studio dimostrano l'azione inibitoria del desametasone sul sistema immunitario di *G. mellonella*.

La *G. mellonella* è un potente modello pre-clinico per valutare la virulenza di ceppi batterici e studiare l'effetto dei farmaci sull'esito dell'infezione. Gli agenti patogeni inoculati e l'ospite *G. mellonella* interagiscono strettamente tra loro innescando una risposta immunitaria che può portare all'eliminazione del patogeno o alla morte dell'ospite.

In questo caso il desametasone nonostante ha agito come modulatore della risposta immunitaria non ha portato ad un miglioramento dell'esito dell'infezione anzi ha causato un aumento della mortalità delle larve.

Nella pratica clinica la sepsi è causata da infezioni batteriche Gram-negative o Gram-positive associate al rilascio incontrollabile di alti livelli di citochine pro-infiammatorie e altri mediatori infiammatori, che portano alla sindrome da disfunzione multiorgano nell'ospite.

Poiché la sepsi è associata a un'intensa risposta infiammatoria, i glucocorticoidi per la loro azione sulla risposta immunitaria sono usati clinicamente per trattare la sepsi.

Tuttavia l'uso dei glucocorticoidi nella sepsi grave rappresenta una dei principali dibattiti nella medicina di terapia intensiva [137]. Sembra che il risultato dell'uso dei glucocorticoidi nel trattamento della sepsi grave dipenda dal dosaggio dei glucocorticoidi. I glucocorticoidi ad alto dosaggio nel trattamento della sepsi grave e dello shock settico non hanno prodotto un esito clinico positivo, mentre i glucocorticoidi a basso dosaggio hanno avuto effetti antinfiammatori come dimostrato da una diminuzione della risposta infiammatoria e da un aumento delle citochine antinfiammatorie [138, 139].

La dose testata sulle larve di *G. mellonella* (0,13 gr/ Kg) è molto più alta rispetto a quella che normalmente viene somministrata negli studi nei modelli murini (circa 0.2- 2 mg/Kg) e nella pratica clinica.

Questo potrebbe spiegare perché le larve non sono state protette dal trattamento con desametasone, saranno necessari ulteriori studi per poter confermare queste ipotesi.

I dati presentati implementano le nostre conoscenze su questo modello e offrono numerosi altri spunti di ricerca per lo studio dell'effetto dell'immunosoppressione nell'infezione in *G.mellonella*

2.8 *G. mellonella* per valutare l'attività di ceppi potenzialmente probiotici: Effetto di *Akkermansia muciniphila* sul decorso dell'infezione da *E. coli* nel modello *G. mellonella*

2.8.1 Stato dell'arte e scopo dello studio

In questo studio, per la prima volta, è stato inoculato nelle larve di *G. mellonella* il batterio *Akkermansia muciniphila* DSM 22959, un ceppo potenzialmente probiotico.

Diverse specie microbiche stanno ricevendo una crescente attenzione per il loro ruolo nel modulare il microbiota intestinale. Al momento, è stato segnalato che molte patologie sono strettamente correlate al microbiota intestinale quindi è di grande interesse migliorare la salute dell'ospite modulando i batteri intestinali [140].

Akkermansia muciniphila è un batterio intestinale, Gram-negativo, strettamente anaerobico, non mobile, appartenente al phylum Verrucomicrobia, costituisce il 3-5% della comunità microbica intestinale sia umana che di altre specie di mammiferi [141, 142].

È stato isolato per la prima volta da un campione fecale umano nel 2004 e l'interesse per questo microrganismo è aumentato nel tempo grazie alla sua capacità di rilasciare enzimi nel tratto intestinale che aiutano a regolare l'equilibrio della mucina, un componente importante dello strato mucoso che risiede sulla superficie della mucosa gastrointestinale [141, 143].

Akkermansia muciniphila inibisce significativamente l'adesione di una varietà di batteri enteropatogeni ed è in grado di stimolare il sistema immunitario dell'ospite [144].

Diversi autori hanno affermato che *A. muciniphila* esercita una serie di attività biologiche positivamente correlate alla salute umana; è stato quindi ampiamente considerato come un nuovo potenziale candidato probiotico per migliorare i disturbi metabolici associati a obesità, diabete, malattie del fegato e disturbi cardiometabolici [145].

Secondo le raccomandazioni della FAO (Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura) e dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità), i ceppi probiotici devono soddisfare specifici criteri di sicurezza e funzionalità [146].

L'efficacia e la sicurezza devono essere confermate attraverso studi clinici condotti sugli esseri umani. Nondimeno, studi *in vitro* o studi *in vivo* su candidati probiotici sono dei validi punti di partenza e potrebbero fornire dati pre-clinici sui potenziali meccanismi di azione probiotica [88].

In vitro vengono condotti diversi saggi per valutare le proprietà probiotiche tra cui test per la tolleranza all'acidità gastrica, la resistenza alla bile, la capacità di aderenza al muco e / o alle cellule intestinali, l'idrofobicità, l'autoaggregazione, la co-aggregazione, la formazione di biofilm, suscettibilità agli antibiotici e l'attività antimicrobica [147].

Tuttavia, studi *in vivo* che utilizzano roditori, zebrafish o invertebrati come modelli animali sono sicuramente più adatti a fornire informazioni rilevanti sui meccanismi probiotici [148].

La *G. mellonella* negli ultimi anni è stata impiegata come strumento per valutare l'attività probiotica di diverse specie batteriche in particolare l'interazione con microorganismi patogeni e con il sistema immunitario innato delle larve [90, 92].

Scopo del presente studio è stato quello di valutare se *G. mellonella* potesse essere un modello idoneo per lo studio delle proprietà di *A. muciniphila*, a tal fine è stata testata l'attività antagonista / competitiva di nei confronti di ceppi di *E. coli* patogeni.

2.8.2 Materiali e Metodi

Batteri e condizioni di coltura

I ceppi che sono stati testati in questo studio sono *A. muciniphila* DSMZ 22959 (ceppo isolato dall'intestino umano), *E. coli* ATCC 11775 ed *E. coli* ATCC 25922.

A. muciniphila è stata coltivata in Brain Heart Infusion (BHI) in condizioni anaerobiche, mentre i ceppi di *E. coli* sono stati coltivati in Tryptic Soy Broth (TSB).

Preparazione dell'inoculo batterico

Le colture batteriche cresciute over-night a 37°C sono state centrifugate a 5000 RPM per cinque minuti. Il pellet cellulare ottenuto è stato lavato 3 volte con una soluzione salina di tampone fosfato salino e risospeso nello stesso mezzo. Le sospensioni cellulari sono state normalizzate mediante misurazione della densità ottica (O.D 600nm) e le unità vitali formanti colonie (CFU/mL) sono state confermate dalla conta su piastra.

Preparazione del modello d'infezione di *G. mellonella*

Sono state utilizzate larve di *G. mellonella* nella quinta fase larvale stabulate al buio a 20°C. Studi preliminari sono stati condotti per determinare la concentrazione subletale di *A. muciniphila* inoculando nelle larve diluizioni seriali del batterio da 10^8 a 10^3 CFU/mL. La concentrazione subletale determinata 10^5 CFU/mL è stata inoculata nell'emolinfa delle larve tramite una siringa da insulina. Dopo due ore, tempo necessario per la riattivazione del batterio e per evitare un eccessivo stress alle larve, è stata indotta

l'infezione inoculando 10 µL delle sospensioni di *E. coli* alla concentrazione di 5×10^7 CFU/mL. Dopo l'inoculo, venti larve per ogni gruppo sperimentale sono state incubate nelle piastre di Petri a 37 ° C, ed è stato determinato nelle 24 ore successive lo score secondo l'Health Index Scoring System. Questo score si basa su osservazioni legate alla salute delle larve: la mobilità, la melanizzazione e la sopravvivenza (tabella 2h).

Per valutare la densità degli emociti l'emolinfa è stata raccolta a t = 0h e t = 24h dopo il trattamento e diluita in una soluzione anticoagulante contenente 2-mercaptoetanolo allo 0,2%. La densità degli emociti è stata stimata usando la camera di Neubauer.

L'emolinfa di quattro larve per gruppo è stata raccolta e le diluizioni seriali in PBS sono state seminate in MacConkey agar per quantificare il numero di *E. coli* CFU/mL.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i risultati espressi come media ± SD. Per la significatività statistica è stato utilizzato il T- Student test con soglia di significatività $p < 0.05$.

Category	Description	Score
Activity	no movement	0
	minimal movement on stimulation	1
	move when stimulated	2
	move without stimulation	3
Cocoon formation	no cocoon	0
	partial cocoon	0,5
	full cocoon	1
Melanization	black larvae	0
	black spots on brown larvae	1
	<3 spots on beige larvae	2
	<3 spots on beige larvae	3
	no melanization	4
Survival	dead	0
	alive	2

Tabella 2h: *G. mellonella* Health score system

Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e sono stati ripetuti tre volte in maniera indipendente. I dati espressi come media \pm deviazione standard (SD) sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 6.0. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi a $p < 0,05$. I risultati sono dell'Health score system sono stati analizzati mediante ANOVA a una via con Bonferroni post-test. Mentre i dati della conta degli ematociti e dei CFU/mL batterici mediante il T-student test.

2.8.3 Risultati

Health index score system I dati ottenuti dall'Health Index Score System dimostrano che *A. muciniphila* alla concentrazione di 10^5 CFU/mL non determina alcuna tossicità significativa nelle larve infatti lo score medio era 176 dopo 24h (figura 2q).

Tuttavia abbiamo registrato che concentrazioni più alte di 10^5 CFU/mL causano mortalità e melanizzazione diffusa delle larve (dati non mostrati).

Nei gruppi infettati con i ceppi di *E. coli* ATCC 11775 ed *E. coli* ATCC 25922 alla concentrazione di 10^8 CFU/mL i punteggi dopo 24h erano 33 e 23, rispettivamente.

Il pretrattamento con *A. muciniphila* ha protetto l'ospite dall'infezione infatti lo score è significativamente più alto rispetto ai gruppi inoculati soltanto con *E. coli* (117 per il ceppo ATCC 11775 e 109 per ceppo ATCC 25922).

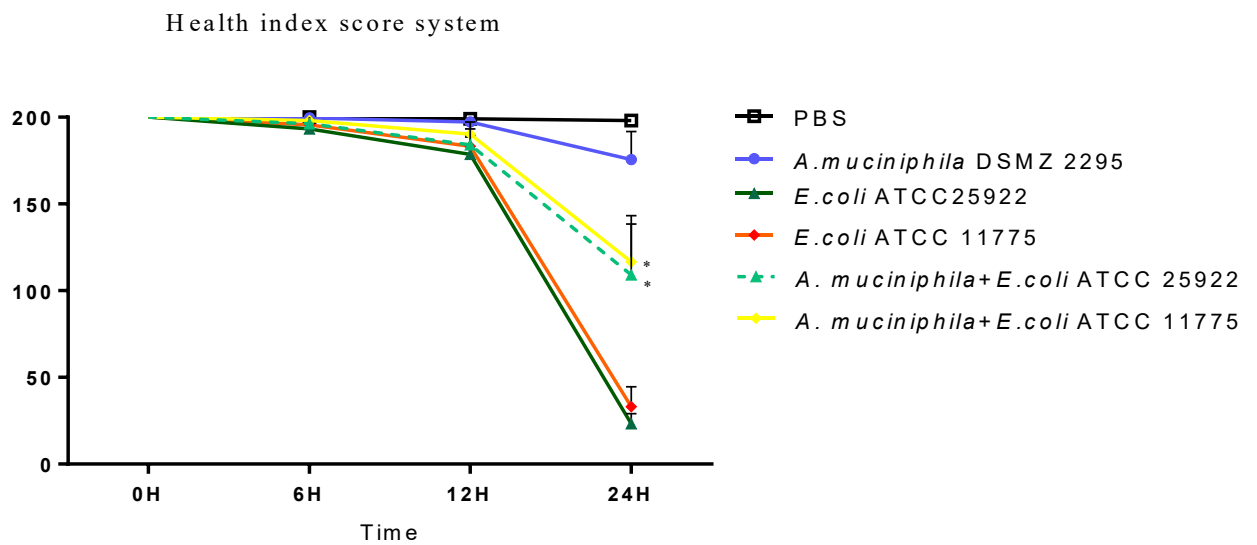


Figura 2q: Health index score system *G. mellonella* inoculata con *A. muciniphila*. I risultati sono espressi come media \pm SD. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando l'ANOVA a una via con Bonferroni post-test. * indica i valori $p > 0.05$

Conta totale degli ematociti trattati con *A. muciniphila*

L'inoculo con *A. muciniphila* non ha indotto una variazione dalla conta degli ematociti.

Nei gruppi infettati con i ceppi di *E. coli* è stata osservato un aumento del numero degli ematociti nell'emolinfa.

Nei gruppi pre-trattati con *A. muciniphila* e in seguito infettati con *E. coli*, è stato rilevato una potenziale azione modulatrice di *A. muciniphila* sul sistema immunitario delle larve.

Infatti il pre-trattamento stimola significativamente la produzione degli ematociti dopo 24h (figura 2r).

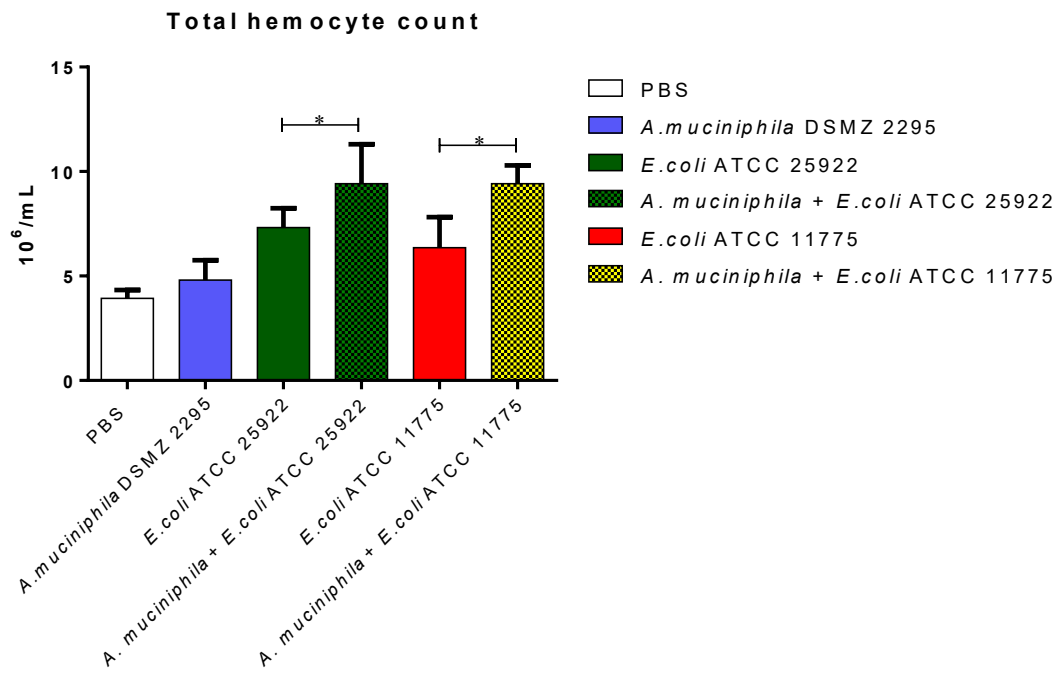


Figura 2r. CFU/mL (log 10) 24 ore dopo il trattamento. I risultati sono espressi come media \pm SD. Il T- Student test è usato per la significatività statistica. * indica i valori $p > 0.05$

Conta *E. coli* CFU/mL nelle larve trattate con *A. muciniphila*

Ne gruppo di controllo negativo (PBS), come atteso, non sono state rilevate colonie di *E. coli* nell'emolinfa.

Nelle larve inoculate con *E. coli* dopo 24h sono state ritrovate 6.5×10^6 colonie nei gruppi inoculati con *E. coli* ATCC 11775 e 6.4×10^6 colonie nei gruppi inoculati con *E. coli* ATCC 25922. Il trattamento con *A. muciniphila* ha ridotto il numero di colonie batteriche all'interno dell'emolinfa di 1.37 fold per *E. coli* ATCC 11775 e 0.94 fold per *E. coli* ATCC 25922 (figura 2s).

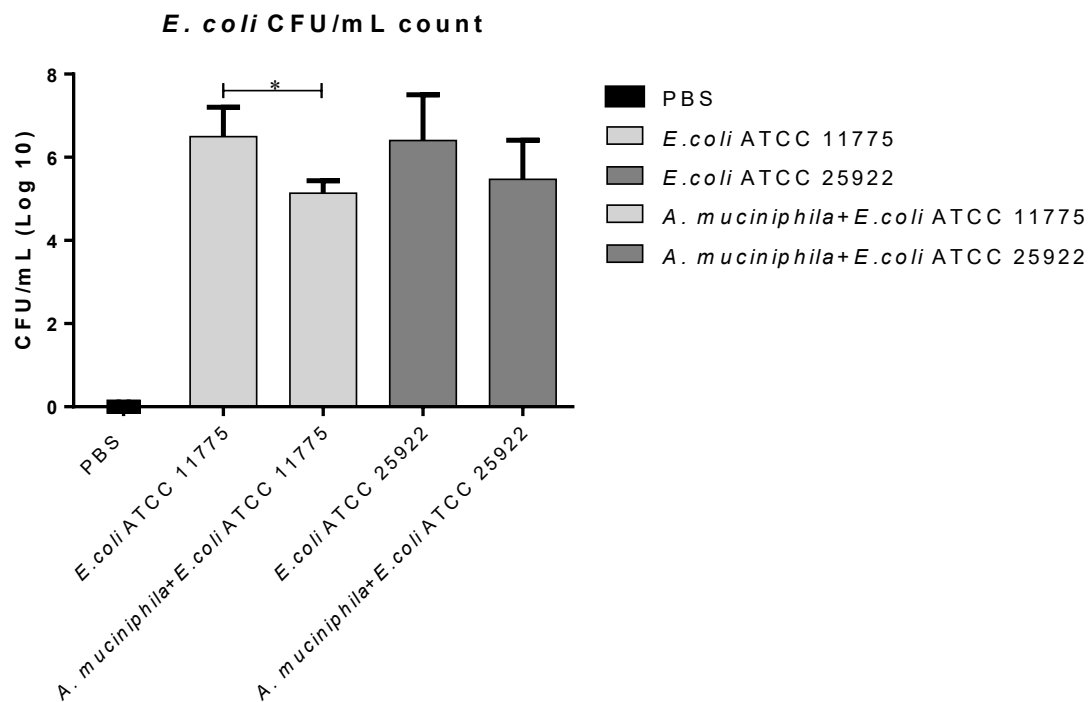


Figura 2s. CFU/mL (log 10) 24 ore dopo il trattamento. I risultati sono espressi come media \pm SD. Il T- Student test è usato per la significatività statistica. * indica i valori $p > 0.05$.

2.8.4 Discussione

In questo studio, per la prima volta, è stato utilizzato il modello *G. mellonella* per valutare *in vivo* l'attività protettiva di *A. muciniphila* DSM 22959 nei confronti di ceppi di *E. coli* patogeni.

Attualmente, il numero esiguo di studi clinici sugli effetti dell'assunzione di *A. muciniphila* nell'uomo, non sono sufficienti per avere prove definitive sulla sua sicurezza e sull'attività di questo potenziale ceppo probiotico.

Le interazioni tra l'ospite e *A. muciniphila* sono state studiate ampiamente nei modelli murini. La colonizzazione di *A. muciniphila* induce cambiamenti trascrizionali, portando ad un aumento dell'espressione dei geni associati alle risposte immunitarie. Inoltre, è stato riscontrato anche in nostri precedenti studi che *A. muciniphila* ha un ruolo benefico e rafforza la barriera intestinale nei modelli di colite infiammatoria murini [149].

La somministrazione di *A. muciniphila* nelle larve di *G. mellonella* ha mostrato tossicità, causando la morte delle larve e melanizzazione diffusa, quando il batterio è stato inoculato a concentrazioni superiori a 10^5 CFU/mL.

A. muciniphila, è un batterio Gram-negativo, la sua parete contiene pertanto lipopolisaccaride (LPS), ma non sembra essere associato endotossiemia [145]. L'LPS di *A. muciniphila* differisce strutturalmente da quello di *E. coli* e non è un potente agonista del TLR4 [150]. Depommier *et al.*, hanno condotto uno studio clinico sin cui è stata somministrata oralmente, a 32 volontari sovrappeso insulino-resistenti ogni giorno per 3 mesi, 10^{10} CFU/mL di *A. muciniphila* viva o pastorizzata. La somministrazione si è dimostrata sicura e ben tollerata, ed è stata osservata una diminuzione del colesterolo plasmatico totale e dell'insulinemia [151]. Questo studio ha confermato i risultati di uno studio clinico precedente sulla somministrazione per 2 settimane di *A. muciniphila* agli esseri umani [152]. Inoltre numerosi studi *in vivo* su ratti e topi confermano la tollerabilità di questo batterio. Tuttavia, secondo un recente report dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) la specie *A. muciniphila* non è raccomandata per lo stato di *qualified presumption of safety* (QPS) a causa di dubbi sulla sicurezza [153]. Infatti secondo L'EFSA *A. muciniphila* potrebbe contribuire alla progressione delle malattie neurali, la sua capacità di degradare mucina, potrebbe indurre infiammazione locale,

aumento della permeabilità intestinale, perdita di integrità della mucosa e endotossitemia [154, 155].

La tossicità riscontrata nel modello *G. mellonella* a dosi elevate potrebbe essere spiegata dalla produzione di metaboliti secondari come acido butirrico e acido propionico che vengono prodotti da *A. muciniphila* [145]. Per avvalorare questa ipotesi abbiamo somministrato *A. muciniphila* inattivata al calore ad alte dosi (10^7 - 10^5 CFU/mL) nelle larve e non è stata osservata nessuna tossicità significativa (dati non mostrati).

Per valutare l'interazione tra *A. muciniphila* e *E. coli* nel modello è stata presa in considerazione non solo la sopravvivenza delle larve ma il parametro health index score che include diversi aspetti della salute delle larve (tabella 2h).

A. muciniphila ha protetto l'ospite dall'infezione da *E. coli*, infatti è stato registrato uno score significativamente più alto nelle larve pre-trattate rispetto al controllo.

I due ceppi di *E. coli* testati ATCC 11775 e DSM 25922 hanno mostrato un health index molto simile tra loro anche nei gruppi pre-trattati, presentano pertanto un grado di patogenicità sovrapponibile in *G. mellonella*.

I risultati sull'inibizione sono difformi con i dati ottenuti da test *in vitro* che hanno dimostrato che *A. muciniphila* non ha elevata capacità di co-aggregazione né attività inibitoria nei confronti di *E. coli* [147].

Tuttavia i modelli *in vitro* e *in vivo* presentano differenze sostanziali che possono essere responsabili della mancanza di correlazione tra i risultati.

I saggi di co-coltura *in vitro* implicano l'interazione diretta tra i batteri patogeni e probiotici in un mezzo adatto, ma privo di numerosi fattori presenti nei modelli *in vivo* come l'immunità dell'ospite e l'espressione di fattori di virulenza.

A. muciniphila è in grado di aumentare il numero di ematociti nel corso dell'infezione dimostrando un'attività immunomodulatoria nelle larve. Tuttavia questa attività non è stata osservata nel gruppo inoculato soltanto con *A. muciniphila*.

L'aumento del numero totale degli ematociti in seguito al trattamento con un ceppo batterico è stato osservato anche in altri studi in cui sono stati somministrati ceppi probiotici in *G. mellonella* [156].

I dati della conta di *E. coli* CFU/mL correlano bene con i risultati dell'health index score e con la conta degli ematociti. Infatti, la quantità di *E. coli* recuperati dall'emolinfa delle larve era inferiore nel gruppo trattato con *A. muciniphila* rispetto al gruppo di controllo, suggerendo un aumento della fagocitosi del microorganismo patogeno [90].

In conclusione il modello *G. mellonella* può essere utilizzato per lo studio dell'attività del potenziale probiotico *A. muciniphila*, per indagare *in vivo* l'interazione con microrganismi ma anche per lo studio delle sue attività immunomodulatorie sul sistema immunitario innato.

2.9 *G. mellonella* per valutare l'attività di ceppi potenzialmente probiotici: studio pilota sulla somministrazione orale e adesione di *Lactobacillus plantarum*.

2.9.1 Stato dell'arte e scopo dello studio

Obiettivo del presente studio è stato quello di valutare la permanenza nell'intestino di *Galleria mellonella* di due ceppi di *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917 e ATCC BAA-793) al fine di mettere a punto un modello *in vivo* di somministrazione orale per lo screening e lo studio delle proprietà di adesione di potenziali ceppi probiotici.

I probiotici sono generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) dalla United States Food and Drug Administration (FDA) e quando somministrati per via orale si replicano e colonizzano il tratto gastrointestinale per determinare effetti benefici per l'ospite.

Il processo di adesione e interazione con l'epitelio intestinale dell'ospite costituisce la prima linea di resistenza contro la colonizzazione di microbi patogeni esogeni e commensali opportunisti, competendo per i siti recettoriali e quindi impedendo la loro penetrazione e colonizzazione [157].

Per questo motivo, l'adesione alla mucosa intestinale è considerata uno dei principali criteri di selezione per i potenziali ceppi probiotici in quanto può aumentare la persistenza nell'intestino permettendo ai batteri promotori della salute di esercitare i suoi effetti [158].

Dato il crescente interesse verso i ceppi probiotici, è cruciale avere la possibilità di studiare questi microrganismi in modelli *in vivo* attendibili, riproducibili e che permettano la traslazionale dei risultati ottenuti nel contesto umano [159].

L'adesione dei batteri probiotici *in vitro* viene comunemente valutata utilizzando linee cellulari tumorali umane come Caco-2 e HT-29 (adenocarcinoma del colon umano) per mimare le cellule epiteliali intestinali.

Sebbene gli esperimenti *in vitro* siano fondamentali per comprendere i meccanismi di adesione e selezionare candidati probiotici con potenziale capacità di aderenza *in vivo*, è difficile estrapolare questi risultati al tratto intestinale dove numerosi altri fattori come i movimenti peristaltici, il sistema di difesa dell'ospite, la competizione con il residente il microbiota potrebbe interferire con l'adesione [159].

Quindi per esplorare le proprietà adesive sull'intestino e in generale per tutte le proprietà probiotiche sono necessari modelli *in vivo*.

I modelli di roditori sono sicuramente più vicini alla fisiologia umana e rappresentano il gold standard, mentre modelli più semplici come il *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, zebrafish (*Danio rerio*) e più recentemente la *G. mellonella* mostrano evidenti benefici per scopi di screening [88].

Nel modello *G. mellonella* i probiotici vengono inoculati nell'emolinfa delle larve per valutare le interazioni con ceppi patogeni e l'attività sul sistema immunitario innato. Nessuno studio ha finora utilizzato la via di somministrazione orale (*force-feeding*) per valutare la permanenza di ceppi probiotici nell'intestino delle larve.

Questo progetto ha un razionale, perché oltre alle somiglianze nelle risposte immunitarie, i tratti gastrointestinali di insetti e mammiferi condividono tessuti, anatomia e funzioni fisiologiche simili e i microbi trovati nel midgut delle larve di *G. mellonella* assomigliano a quelli trovati nei microvilli intestinali dei mammiferi [60, 160, 161].

In questo lavoro l'adesione di due ceppi di *Lactobacillus plantarum* sono stati preliminarmente studiati *in vitro* utilizzando le linee cellulari Caco-2 e HT-29 e inseguito è stata documentata la permanenza *in vivo* sull'intestino di *G. mellonella*.

2.9.2 Materiali e Metodi

Ceppi batterici, linee cellulari e larve di *Galleria mellonella*

Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* ATCC® 14917™ (isolato da matrice alimentare), *Lactobacillus plantarum* ATCC® BAA-793™ (isolato da saliva umana) acquistato dalla American Type Culture Collection (Rockville, MD). Tutti i ceppi sono stati coltivati in MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) a 37°C in condizioni di microaerofilia. Le cellule di adenocarcinoma del colon caucasico umano (Caco-2 ATCC® HTB-37™) e le cellule di adenocarcinoma del colon umano (HT-29 ATCC® HTB-38™) sono state acquistate dalla American Type Culture Collection (Rockville, MD). Le linee cellulari sono state coltivate nel terreno DMEM, con l'aggiunta di 10% FBS, 1% di penicillina/streptomina e 1% di L-glutamina 200 mM e incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata al 95% contenente 5% di CO₂.

Le larve di *G. mellonella* al sesto stadio larvale sono state acquistate da SA.GI. P. s.a.s. (Ravenna, Italia) e conservate a 15°C al buio fino all'utilizzo.

Adesione *in vitro* su linee cellulari Caco-2 e HT-29

Le colture dei ceppi di *L. plantarum* sono state raccolte mediante centrifugazione a 5000 rpm per due minuti, lavate tre volte in DPBS e diluite da 10⁴ a 10⁸ CFU/mL nello stesso

mezzo. Le sospensioni sono state piastrate in piastre di agar MRS a 37°C per 48 ore con 5% di CO₂ per determinare le cariche batteriche inoculate nelle cellule.

Le linee cellulari al 95% circa di confluenza (1.2×10^6 cellule) sono state lavate tre volte in DPBS, per rimuovere gli antibiotici presenti nel terreno di coltura, prima di aggiungere 2 ml delle sospensioni batteriche. Tutti i media utilizzati in questo test erano privi di antibiotici e siero. Le sospensioni batteriche sono state inoculate in triplicato nelle linee cellulari con un rapporto tra cellule batteriche e umane di 1/10, 1/1, 10/1, e 100/1.

Le piastre sono state quindi incubate per 1 ora a 37°C, 5% CO₂.

Dopo il periodo di incubazione, i surnatanti sono stati rimossi e i pozzetti sono stati lavati tre volte con tampone DPBS per rimuovere i batteri che non hanno aderito.

Infine, le cellule sono state staccate mediante trattamento con tripsina-EDTA soluzione 1X e le conte batteriche sono state effettuando delle diluizioni seriali su piastre MRS agar. I dati di adesione sono stati espressi come la percentuale di batteri vitali recuperati aderito (% adesione) rispetto al inoculo iniziale.

Permanenza di *L. plantarum* nell'intestino di *G. mellonella*

Studi preliminari sono stati condotti per valutare se la somministrazione orale dei ceppi di *L. plantarum* in studio influenzasse la vitalità delle larve di *G. mellonella*. A tal fine 10 µL delle sospensioni batteriche (da 10^3 a 10^8 CFU/mL) sono state somministrate per gavage, utilizzando una siringa da insulina inserita delicatamente nella bocca delle larve, con l'ausilio di un microdosatore e di uno stereomicroscopio.

I saggi di permanenza sono stati condotti a partire dalle sospensioni overnight dei ceppi di *L. plantarum* coltivati in brodo MRS a 37°C con 5% CO₂ raccolte mediante centrifugazione a 5000 rpm per dieci minuti, lavate tre volte in soluzione salina, la

concentrazione batterica (espressa in CFU/mL) è stata valutata mediante determinazione spettrofotometrica (O.D 600).

Quaranta larve di *G. mellonella* sono state alimentate tramite gavage con 10µl di ciascuna sospensione batterica (1×10^4 CFU/larva) e venti larve con DPBS (controllo per valutare l'eventuale presenza di ceppi di *L. plantarum* nell'intestino di *G. mellonella*). Dopo il trattamento le larve sono state incubate in piastre Petri a 37°C per 24 ore al buio.

Recupero e isolamento di *L. plantarum* dalle larve di *G. mellonella*

Subito dopo l'alimentazione delle larve con i ceppi di *L. plantarum* (T0) e dopo 24 ore (T24) le larve sono state disinfettate tamponandole con un tampone imbevuto con una soluzione di etanolo (70% v/v) e dopo un breve shock termico (congelamento per 5 min) per minimizzare la stimolazione dolorosa, sono state sacrificate.

I loro canali digestivi sono stati rimossi asetticamente utilizzando bisturi sterili e delle pinzette sterili e in seguito omogeneizzati in 1 ml di DPBS all'interno di provette da laboratorio a fondo conico utilizzando un pestello sterile.

Per valutare la persistenza di *L. plantarum* dopo la somministrazione orale sono stati recuperati e omogeneizzati cinque canali digestivi per ogni gruppo di larve. 100µL della sospensione contenente gli intestini omogeneizzati in PBS sono stati piastrati sul terreno agarizzato LAMVAB (Lactobacillus Anaerobic MRS con Vancomicina e Bromocresol verde) un mezzo cromogenico per la differenziazione di *Lactobacillus spp.*

Per la conta delle CFU/larve batteriche, sono state prese in considerazione dopo 48h di incubazione a 37°C solo le colonie verdi (*Lactobacillus spp.*).

L'agar LAMVAB è composto da 104.4 g/L di brodo MRS, 0.05% (w/v) di cloridrato di cisteina, 0.005% (w/v) verde di bromocresolo, 4% (w/v) di agar batteriologico e 0.0002%

(w/v) di cloridrato di vancomicina. Il pH è stato regolato a 5.0 ± 0.1 usando 4 M HCl prima della sterilizzazione. Abbiamo scelto questo terreno perché il LAMVAB per il suo pH acido e per la presenza della vancomicina, inibisce i batteri Gram-positivi, inoltre il verde di bromocresolo è un indicatore acido-base con un range di pH di 3.8-5.4 (giallo-blu) l'acido organico prodotto dai *Lactobacillus spp* fa virare il terreno agarizzato che assumerà un colore giallo mentre le colonie batteriche assumono un colore verde.

Identificazione dei ceppi di *L. plantarum* dall'intestino di *G. mellonella*

Le colonie verdi circostanti sulle piastre LAMVAB (figura 2t) sono state sottoposte a alla colorazione di Gram e al saggio della catalasi.

I *Lactobacillus spp.* sono stati identificati con la galleria API® 50 CH (Biomerieux, Francia). Il profilo biochimico ottenuto è stato identificato utilizzando il software di identificazione Apiweb™ (<http://apiweb.biomerieux.com>).

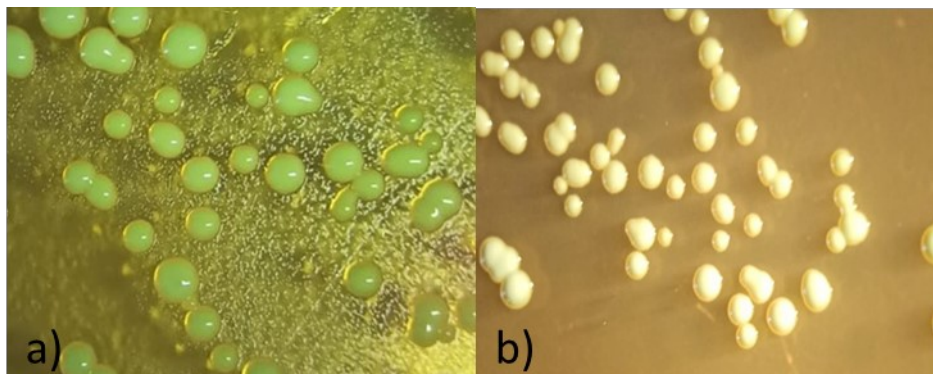


Figura 2t: a) LAMVAB agar: Dopo incubazione, entrambi i ceppi di *L. plantarum* testati hanno mostrato colonie circolari/intere sollevate di colore verde. È stato osservato un cambiamento di colore delle aree circostanti (da verde scuro a giallo brillante), dovuto alla presenza del verde bromocresolo come indicatore di pH. b) MRS agar: Dopo

l'incubazione, entrambi i ceppi di *L. plantarum* testati hanno mostrato le tipiche colonie bianche circolari/intere sollevate. Non è stato osservato alcun cambiamento nel colore delle aree circostanti.

Identificazione molecolare dei ceppi di *L. plantarum* mediante 16S rDNA dall'intestino di *G. mellonella*

I campioni di DNA sono stati estratti con il kit di estrazione del DNA genomico (sangue/batteri/cellule coltivate) (RBC Bioscience, Taiwan), secondo le istruzioni del produttore. Il DNA batterico è stato estratto dalle colonie verdi LAMVAB isolate dall'intestino delle larve di *G. mellonella* alimentate con i due ceppi di *L. plantarum* testati a T0h e a T24h.

Il DNA di *L. plantarum* ATCC 14917 e *L. plantarum* ATCC BAA-793 cresciuto su piastre MRS è stato utilizzato come controllo positivo.

La purezza e la concentrazione del DNA sono state valutate con il metodo dell'assorbanza utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop 2000 Thermo Scientific™ (Massachusetts, USA). La PCR di *L. plantarum* 16S rDNA è stata condotta secondo Berthier *et al.*, [162].

Gli oligonucleotidi utilizzati erano 16F forward (GCTGGATCACCTCCTTTC) e reverse (ATGAGGTATTCAACTTATG). Le reazioni di PCR da 50µl sono state eseguite con EmeraldAmp GT PCR Master Mix (2X Premix), 1µl di DNA, 0.2µM Primer Forward, 0.2µM Primer Reverse e acqua sterile. Le reazioni di PCR sono state eseguite in un Heal Force Thermal Cycler. La reazione di amplificazione: 30 cicli di 1 minuto a 94°C e 30 secondi a 50°C, poi 1 minuto a 72°C. Il primo ciclo è stato preceduto da un'incubazione di 5 minuti a 94°C. I prodotti della PCR sono stati sottoposti a elettroforesi

su gel di agarosio all'1.5% (w/v) e sono stati successivamente visualizzati mediante illuminazione UV dopo colorazione SYBR Safe.

Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (S.D.) per tre repliche di tre esperimenti indipendenti. Il Software Prism GraphPad 6 è stato utilizzato per tutte le analisi statistiche. Le differenze tra l'adesione di due ceppi di *L. plantarum* alle linee cellulari umane Caco-2 e HT-29 sono stati valutati dall'ANOVA a due vie seguito dal test post-hoc Bonferroni. Il t-test multiplo con correzione Holm-Sidak è stato eseguito sui dati del recupero dei batteri dall'intestino di *G. mellonella*.

2.9.3 Risultati

Test di adesione *L. plantarum in vitro*

I due ceppi di *L. plantarum* ATCC 14917 e ATCC BAA-793 hanno mostrato una capacità di adesione *in vitro* comparabile su entrambe le linee cellulari.

I ceppi di *L. plantarum* hanno presentato una percentuale di adesione più alta quando il rapporto tra batteri e cellule era di 100/1 e una minore adesione quando il rapporto era 1/10.

I ceppi hanno mostrato valori di adesione statisticamente maggiori sulla linea cellulare HT-29 rispetto alle Caco-2. *L. plantarum* ATCC 14917 ha registrato percentuali massime di adesione del 24.1% per la linea HT-29 e del 17.8% per Caco-2. Mentre, *L. plantarum*

ATCC BAA-793 aderisce al massimo 26.9% per HT-29 e al 20.0% per Caco-2 (Figura 2u).

Questi dati hanno evidenziato un tasso di adesione di *L. plantarum* ATCC BAA-793 leggermente più alto verso entrambe le linee cellulari Caco-2 e HT-29 (Tabella 2i).

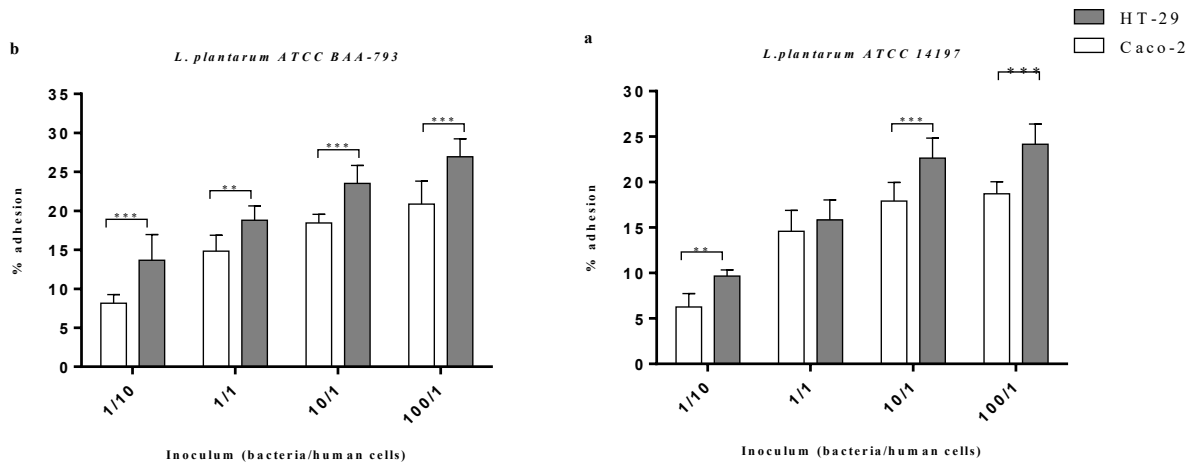


Figura 2u Saggio di adesione *in vitro* di *L. plantarum* su cellule Caco-2 e HT-29. I dati sono espressi come numero di batteri aderenti rispetto al numero di batteri seminati (% di adesione). Le barre rappresentano le medie \pm DS di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

Bacteria/Human Cells	Δ % ATCC BAA-793 vs ATCC 14197	
	Caco- 2	HT-29
1/10	1.900	4.000
1/1	0.266	2.967
10/1	0.533	0.900
100/1	2.167	2.767

Tabella 2i: Differenza percentuale di adesione (Δ %) tra *L. plantarum* ATCC 14917 e *L. plantarum* ATCC BAA-793 *in vitro*. 1/10, 1/1, 10/1 e 100/1 sono i rapporti tra cellule batteriche e umane inoculate nelle linee cellulari umane.

Recupero e identificazione fenotipica di *L. plantarum* nell'intestino di *G. mellonella*

I ceppi di *L. plantarum* somministrati per *force-feeding* non hanno mostrato nessuna tossicità significativa nelle larve alle concentrazioni testate (da 10^3 a 10^8 CFU/mL).

L'analisi culturale dell'omogenizzato dell'intestino delle larve di *G. mellonella* inoculate mediante gavage con DPBS non ha mostrato alcuna crescita sulle piastre di LAMVAB agar sia a tempo 0 che a 24h.

Mentre nelle larve trattate con i probiotici alla concentrazione (1×10^4 CFU/larva) la presenza dei ceppi di *L. plantarum* testati è stata confermata dalla conta su piastra di LAMVAB agar.

Come mostrato in figura 17, a T0 sono stati contati per *L. plantarum* ATCC 14917 $9.2 \times 10^3 \pm 0.6 \times 10^3$ CFU/larva e per *L. plantarum* ATCC BAA-793 $9.2 \times 10^3 \pm 0.7 \times 10^3$ CFU/larva, con una percentuale di recupero del 92% per entrambi i ceppi.

A 24 ore, sono state contate $1.03 \times 10^2 \pm 0.2 \times 10^2$ CFU/larva per *L. plantarum* ATCC 14917 e $1.72 \times 10^2 \pm 0.3 \times 10^2$ CFU/larva per *L. plantarum* ATCC BAA-793, con una percentuale di recupero di 1.03% per *L. plantarum* ATCC 14917 e 1.72% per ATCC BAA-793.

Questi dati hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra i due ceppi testati, in particolare una maggiore capacità di permanenza di *L. plantarum* ATCC BAA-793 rispetto a *L. plantarum* ATCC 14917 nell'intestino di *G. mellonella* (Figura 2v).

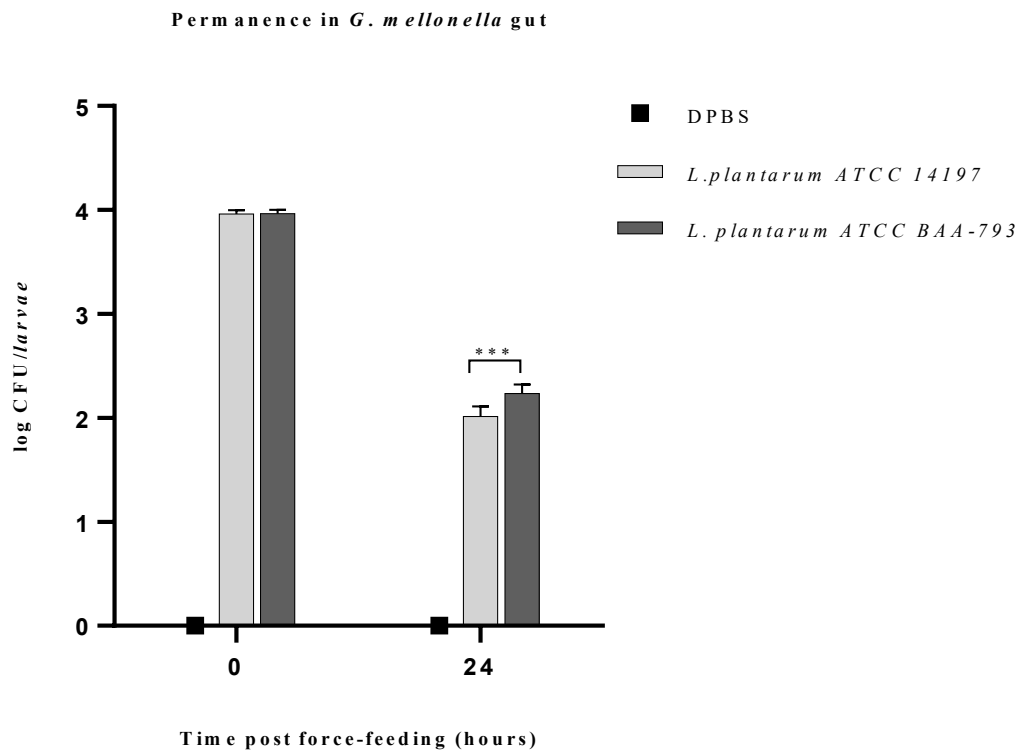


Figura 2v: CFU/larva di ceppi di *L. plantarum* recuperati dall'intestino delle larve di *G. mellonella* somministrate per gavage con 1×10^4 CFU/larva. Dati espressi come media \pm deviazione standard (CFU/larva) di tre esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

Amplificazione di *L. plantarum* 16S rDNA

Le colonie isolate dall'omegenizzato degli intestini su LAMVAB agar sono state confermate dall'amplificazione PCR del gene 16S rRNA con primer specifici per *L. plantarum*. La figura 2z mostra i risultati dell'elettroforesi. Tutto il DNA genomico batterico estratto dai quattro diversi campioni biologici testati ha rivelato una banda di 205 bp corrispondente al gene 16S rRNA di *L. plantarum*.

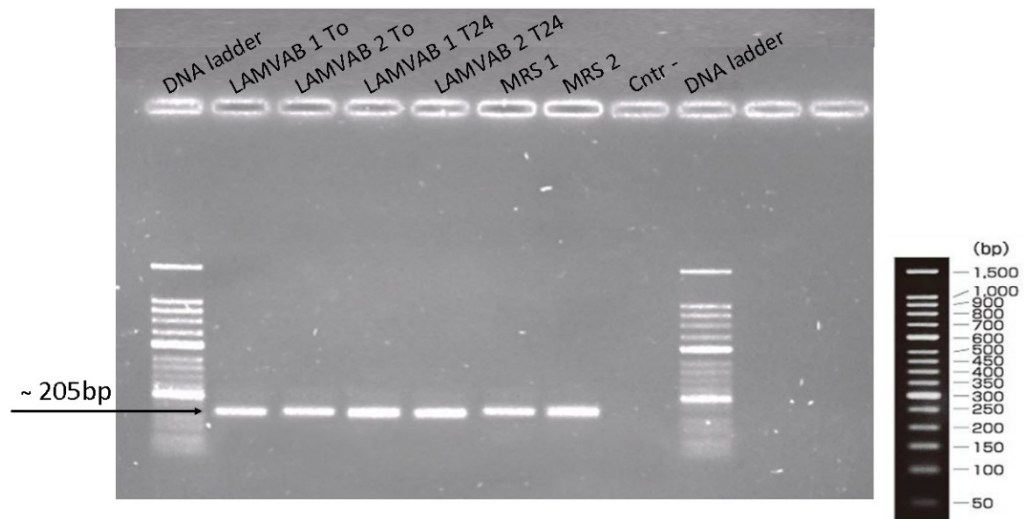


Figura 2z: Elettroforesi su gel di agarosio dell'amplificazione del gene 16S rRNA dell'intestino di *G. mellonella* omogeneizzato con i due ceppi di *L. plantarum* e placcato su piastre di agar LAMVAB. LAMVAB1: *L. plantarum* ATCC 14917; LAMVAB2: *L. plantarum* ATCC BAA-793 sia immediatamente dopo la somministrazione del batterio (T0) che a 24 ore. MRS1 e MRS2: DNA di *L. plantarum* ATCC 14917 e ATCC BAA 793 cresciuto su piastre di agar MRS (come controllo positivo). Cntr--: controllo negativo di amplificazione. DNA Ladder: Dye Plus (Takara BIO INC., Giappone) di 50 bp.

2.9.4 Discussione

In questo studio, per la prima volta, è stata valutata l'attività probiotica *in vivo* di due ceppi di *L. plantarum* somministrati per via orale nel modello ospite *G. mellonella*. In particolare, è stata determinata sia la permanenza nell'intestino sia l'eventuale tossicità del probiotico somministrato ad alte dosi mediante gavage.

L'apparato digerente dei *Lepidoptera*, presenta delle differenze rispetto a quello dei mammiferi, è costituito da tre regioni distinte: intestino anteriore, intestino medio e

intestino posteriore, con l'intestino medio come sito primario di digestione e assorbimento.

Tuttavia, l'intestino delle larve di *G. mellonella* ha anche numerose similitudini con l'intestino umano [163]. L'architettura tissutale primaria dell'intestino medio (midgut) è simile a quello dell'intestino umano. Infatti, presenta un epitelio di rivestimento con analoghi delle giunzioni strette (tight junction) e con cellule epiteliali con estroflessioni della membrana plasmatica simili ai microvilli. La matrice peritrofica, come il muco nei mammiferi, funziona come una barriera per le cellule epiteliali e impedisce l'invasione degli agenti patogeni nel sistema circolatorio (emocele) [164, 165].

I meccanismi di adesione batterica alle cellule epiteliali dell'intestino di *G. mellonella* non sono ancora noti, ciò nonostante la presenza delle analogie funzionali e strutturali tra l'intestino dei mammiferi e quello degli insetti rende potenzialmente questo ospite adatto allo studio delle capacità adesive dei probiotici e dei meccanismi di esclusione competitiva tra batteri intestinali.

I nostri dati dimostrano che *L. plantarum* è in grado di colonizzare il canale digestivo delle larve con un comportamento simile a quello mostrato negli esperimenti di adesione *in vitro* sulle linee cellulari Caco-2 e HT-29.

I risultati di adesione *in vitro* hanno rilevato che i ceppi di *L. plantarum* presentano un'elevata capacità di adesione alle linee cellulari intestinali umane. Il ceppo *L. plantarum* ATCC BAA-793 ha un tasso di adesione più alto rispetto al ceppo ATCC 14197. Questi dati sono in accordo con studi precedenti che dimostrano che la capacità di adesione dei probiotici è sia ceppo che specie dipendente [166, 167]. Inoltre, per ogni inoculo batterico, l'adesione percentuale era più alta per le cellule HT-29, una linea

caratterizzata da una bassa produzione di muco, rispetto al modello cellulare Caco-2 non produttore di muco.

L'andamento del grado di adesione osservato nei saggi *in vitro* è simile ai risultati ottenuti *in vivo*. Nel gruppo di larve alimentate con DPBS, non è stata osservata crescita batterica su piastre di agar LAMVAB, confermando l'assenza di *Lactobacillus* spp nell'intestino di *G. mellonella* come già documentato da Johnston *et al.*, [168]. La somministrazione di alte dosi di *L. plantarum* non ha indotto nessuna tossicità nelle larve. Risultati simili sono stati osservati anche in altri studi in cui sono state studiate le interazioni tra *G. mellonella* e *Lactobacillus* spp, tuttavia in questi lavori i ceppi sono stati sempre somministrati tramite inoculo diretto nell'emolinfa delle larve.

La permanenza nell'intestino di *G. mellonella* dei due ceppi di *L. plantarum* somministrato per gavage è stata confermata da analisi culturali, fenotipiche e molecolari. In particolare, dopo 24 ore dalla somministrazione, è stata osservata una maggiore capacità di permanenza nell'intestino di *G. mellonella* per *L. plantarum* ATCC BAA-793 (1.72%) rispetto al ceppo di *L. plantarum* ATCC 14917 (1.03%).

I dati ottenuti in questo studio hanno dimostrato che entrambi i ceppi batterici possono aderire alle cellule intestinali *in vitro* e persistere nell'intestino di *G. mellonella* senza causare nessun effetto nocivo sulle larve. Inoltre, questi risultati hanno provato che *L. plantarum* ATCC BAA-793 ha una capacità di adesione superiore a *L. plantarum* ATCC 14917 sia *in vitro* che *in vivo*.

Questo lavoro pone le basi per lo sviluppo di una nuova applicazione del modello *G. mellonella* per lo studio dei batteri probiotici. La somministrazione orale rispetto alla classica intra-emocelica rappresenta una via di somministrazione più naturale, permette di valutare le proprietà di aderenza e le interazioni con batteri patogeni includendo diversi

fattori non presenti negli studi *in vitro* e quindi con maggiore possibilità di avere dei risultati traslabili sui mammiferi.

Capitolo II: *Tenebrio molitor*

3.1 *Tenebrio molitor*

Gli insetti sono nuovi organismi modello per lo studio delle malattie umane e per stabilire la tossicità dei farmaci grazie all'elevato grado di conservazione evolutiva delle loro vie di segnalazione, del metabolismo energetico e del sistema immunitario con i mammiferi [169].

La *Drosophila melanogaster* è sicuramente l'insetto più usato nella ricerca biologica genetica e molecolare. Oltre alla *Drosophila*, alcuni altri insetti come *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Periplaneta americana*, e *Locusta migratoria* sono emersi come organismi modello nella ricerca biologica e medica [7].

Durante l'ultimo decennio, l'interesse degli scienziati si è rivolto anche verso l'ordine dei *Coleoptera*, l'ordine più diffuso del regno animale con circa 400.000 specie che costituiscono quasi 25% di tutte le forme di vita animale conosciute e occupano la maggior parte ambienti terrestri [170].

Dato l'interesse crescente verso queste specie sono in corso diversi programmi di sequenziamento genomico. Il primo genoma pubblicato è stato quello del *Tribolium castaneum* nel 2008 [171].

Il *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), popolarmente noto come il verme della farina, appartiene all'ordine dei Coleotteri e alla famiglia *Tenebrionidae*. Si trova in tutto il mondo, tuttavia, ha preferenze climatiche per le regioni temperate dell'emisfero settentrionale. È una specie di coleottero scuro e il suo ciclo vitale è composta da quattro stadi di vita: uovo, larva, pupa e adulto. Le femmine di *T. molitor* depongono circa 500 uova, che si schiudono dopo 3-9 giorni. La larva dura 1-8 mesi e ha un colore giallo-

marrone chiaro (figura 3a). La dimensione della larva è solitamente di circa 2.0-3.5 cm o più e quella degli adulti è di circa 1 cm. È onnivoro e può mangiare prodotti vegetali e animali, nell'ambito dell'allevamento commerciale, questi esemplari vengono alimentati principalmente con crusca o farina di cereali (grano, avena e mais).

Il *T. molitor* in un numero limitato di studio è emerso come modello ospite alternativo, per lo studio di miceti patogeni come *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia furfur* [169].



Figura 3a: larve di *Tenebrio molitor*

3.2 Cenni di fisiologia del tratto digerente degli insetti e similarità con i mammiferi

L'intestino dell'insetto è costituito da un singolo strato di cellule epiteliali supportato da una lamina basale circondata da muscoli. L'intestino è organizzato in tre regioni principali (foregut, midgut e hindgut) con diverse caratteristiche e funzioni [172]. Il Midgut intestino medio è la parte funzionale del canale alimentare destinato alla digestione e l'assorbimento dei nutrienti (Fig. 3b). L'architettura tissutale di base dell'intestino medio è simile a quella dell'intestino umano, infatti le disposizioni epiteliali delle cellule

colonnari e le giunzioni che controllano la permeabilità sono analoghe alle giunzioni strette dei mammiferi [66, 172, 173]. La matrice peritrofica degli insetti ha la funzione di barriera per le cellule epiteliali ed è l'equivalente funzionale dello strato di muco dei mammiferi [174].

Le cellule colonnari rappresentano il principale tipo di cellule presente nell'intestino medio di tutti gli insetti e sono in grado di secernere nel lume enzimi responsabili della digestione del cibo. Queste cellule sono caratterizzate da un nucleo centrale e da una membrana plasmatica apicale profondamente ripiegata, che forma microvilli.

Le cellule colonnari degli insetti vengono anche comunemente chiamate come enterociti, in quanto presentano numerose similitudini con gli enterociti dell'intestino dei mammiferi [172]. Tuttavia, le cellule colonnari a differenza degli enterociti, che sono essenzialmente coinvolti nel trasporto di soluti organici, ioni e acqua, sono anche responsabili della secrezione degli enzimi digestivi [175].

I primi report sulle peptidasi digestive larvali di insetti riguardavano il *Tenebrio molitor*. Alcuni degli enzimi proteolitici (tripsina-like e chemotripsina-like) prodotti dalle cellule colonnari del *T. molitor*, sono molto simili sia da un punto di vista strutturale che per le proprietà cinetiche a quelle prodotte dai mammiferi [176, 177].

Le cellule endocrine sono cellule caratteristiche del midgut localizzate tra le cellule colonnari e sono responsabili della produzione e secrezione di peptidi bioattivi con attività importanti per l'omeostasi dell'insetto [178].

Le cellule staminali, localizzate alla base dell'epitelio intestinale, svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere l'integrità complessiva dell'intestino. Il tratto digerente degli insetti è sottoposto a continua sollecitazione come ad esempio l'abrasione meccanica del cibo e l'interazione con i batteri residenti. Le cellule staminali con la loro elevata capacità

di differenziazione e proliferazione svolgono un ruolo chiave nel rinnovamento delle cellule dell'intestino medio. La composizione cellulare e la rigenerazione osservate nell'intestino posteriore della *Drosophila* sono sorprendentemente simili a quelle dei mammiferi ed è esemplificata nelle vie di segnalazione Notch, K-Ras / Ras, JNK e Wnt / wg [179]. L'intestino medio larvale dei lepidotteri tra cui *G. mellonella* ha delle caratteristiche peculiari in quanto sono presenti delle cellule specializzate le cellule caliciformi, che sono responsabili della secrezione di ioni di potassio nel lume (antiporto $K^+ / 2H^+$). Queste cellule sono responsabili degli alti valori di pH (10-12) che caratterizzano l'intestino medio dei lepidotteri[180, 181]. Mentre l'intestino medio del *T. molitor* presenta dei valori di pH più simili a quelli dei mammiferi: i valori di pH vanno da 5,6 nel midgut anteriore a 7,9 nel midgut posteriore[176]. Per quanto riguarda il metabolismo per gli insetti l'organo deputato a tale funzione è il corpo grasso che ha una funzione simile a quella del fegato dei mammiferi. Diversi enzimi antiossidanti sono prodotti dal corpo grasso, come il superossido dismutasi, la catalasi e la glutatione-transferasi che sono altamente conservati tra le specie [182]. Inoltre, enzimi del metabolismo di fase I come il citocromo p450 ed enzimi del metabolismo di fase II della classe delle transferasi sono altamente conservati tra le specie di mammiferi e insetti [183, 184].

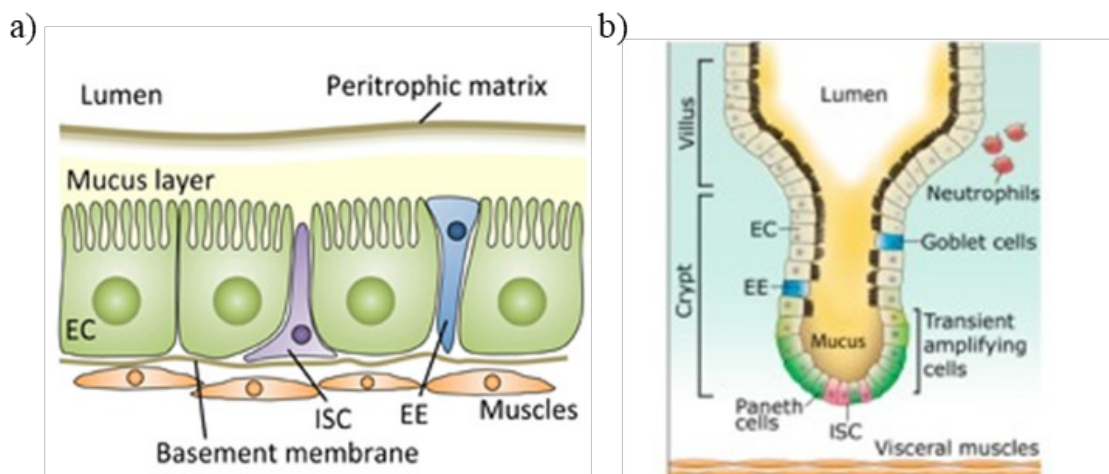


Figura 3b: a) Rappresentazione schematica del tratto digestivo (midgut) dell'adulto *Drosophila*, che può servire da modello approssimativo per l'architettura del tratto della maggior parte degli insetti, compresi i vermi della farina. b) Rappresentazione schematica dell'epitelio intestinale umano. Enterociti assorbenti (EC) o cellule colonnari; cellule enteroendocrine secretorie (EE); cellule staminali intestinali pluripotenti (ISC). Le cellule muscolari sono presenti sotto la membrana basale delle cellule epiteliali. Tra il lume e gli epitelii, una struttura non cellulare semipermeabile, la matrice peritrofica, protegge gli enterociti da particelle abrasive e agenti patogeni. Uno strato di muco si trova tra la matrice peritrofica e le cellule colonnari lungo l'intestino medio [185, 186].

2.3 Modelli di inflammatory bowel disease (IBD)

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (inflammatory bowel disease - IBD) sono uno spettro di malattie infiammatorie croniche multifattoriali del tratto digerente. Comprendono due forme principali: la colite ulcerosa e il morbo di Crohn.

Sebbene l'eziologia rimanga in gran parte sconosciuta, numerose ricerche hanno suggerito che fattori genetici, epigenetici, microbiota, ambiente e risposta immunitaria sono coinvolti nella patogenesi [187, 188].

L'intestino è un organo altamente complesso che necessita di modelli sofisticati e completi per studiarne la funzione e la malattia.

I modelli animali sono indispensabili per migliorare le nostre conoscenze sull'IBD e per approfondire dettagli meccanicistici, consentendo una progettazione e sviluppo di farmaci che mirano a componenti specifici implicati nella patogenesi della malattia [189, 190].

Diversi modelli animali vengono utilizzati dai ricercatori per studiare l'infiammazione intestinale acuta e cronica. I modelli murini sono comunemente utilizzati poiché il loro sviluppo intestinale è relativamente simile a quello dell'intestino umano e presentano analogie per quanto riguarda la risposta immunitaria. I modelli di ratto hanno il vantaggio di essere più grandi dei topi consentendo una migliore manipolazione e raccolta dei campioni per le analisi [191]. I suini sono comunemente usati come modello di mammifero monogastrico alternativo, poiché la loro funzione intestinale e la loro morfologia sono simili a quelle degli esseri umani. Lo zebrafish è ampiamente utilizzato per studiare le risposte immunitarie innate e adattive [192]. Infine, gli invertebrati, inclusi i nematodi e la *Drosophila*, sono utilizzati nella ricerca sulle malattie infiammatorie intestinali, per indagare i meccanismi molecolari coinvolti nell'immunità innata [193].

I metodi per indurre l'infiammazione intestinale possono essere classificati in quattro gruppi: modelli indotti chimicamente, modelli indotti biologicamente, genetici (knockout) e colite indotta da trasferimento cellulare.

La colite indotta chimicamente può essere indotta con sodio solfato destrano (DSS), oxazolone, acido acetico, acido 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonico (TNBS), acido dinitrobenzenesulfonico (DNB) e indometacina [194, 195].

Sebbene la maggior parte di questi metodi sono stati eseguiti sui topi, la colite indotta chimicamente è stata testata anche su altre specie, che vanno da organismi inferiori come zebrafish e drosophila a organismi superiori, inclusi ratti e suini [190].

Il DSS è uno degli induttori più comunemente utilizzati nei modelli animali di colite, è un modello riproducibile che somiglia morfologicamente e sintomaticamente alla colite ulcerosa nell'uomo [194, 196]. Il DSS è tipicamente somministrato nell'acqua potabile di topi o ratti. Regolando la concentrazione e la durata del trattamento con DSS, è possibile studiare i meccanismi coinvolti nell'infiammazione sia acuta che cronica [197].

La colite cronica può essere indotta somministrando 4 ~ 5 cicli ripetuti di DSS, ogni ciclo comporta la somministrazione di 5% DSS per 1 settimana seguita da acqua per 10 ~ 14 giorni nei topi BALB/C. La colite acuta viene tipicamente indotta nei incorporando dal 3 al 5% di DSS (p / v) nell'acqua potabile *ad libitum* per 5 ~ 8 giorni [198] . L'esatto meccanismo con cui il DSS induce la colite è ancora poco conosciuto, generalmente sembra interferire chimicamente con l'integrità della barriera della mucosa intestinale, esponendo la lamina propria al contenuto intestinale e agli antigeni batterici [190, 199]. Questa esposizione innesca l'attivazione delle vie infiammatorie con conseguente aumento della produzione delle citochine infiammatorie, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ [200]. La colite acuta indotta da DDS è caratterizzata morfologicamente e macroscopicamente da iperemia, ulcerazioni, edema sottomucoso da moderato a grave, lesioni accompagnate da alterazioni istopatologiche che includono infiltrazione di granulociti, i sintomi si manifestano sotto forma di diarrea sanguinolenta [194, 198, 201].

3.4 Studio preliminare modello di colite indotta da DSS nell'insetto *Tenebrio molitor*

3.4.1 Stato dall'arte e scopo dello studio

Scopo dello studio è quello di mettere a punto un nuovo modello di colite utilizzando la specie di coleottero *Tenebrio molitor*.

Un sistema modello ideale dovrebbe riflettere la biologia umana riducendo la complessità della malattia di interesse, in modo che possa essere studiata e manipolata efficacemente.

Nel caso delle patologie intestinali, i modelli murini di IBD sono strumenti fondamentali per comprendere i meccanismi molecolari dell'infiammazione intestinale e per lo sviluppo pre-clinico di farmaci [202, 203]. Tuttavia, la ricerca sui mammiferi presenta alcuni svantaggi quali il costo elevato degli studi, le preoccupazioni etiche e le procedure per ottenere le autorizzazioni che richiedono solitamente diverse settimane, pertanto lo sviluppo di modelli alternativi per lo studio delle patologie intestinali potrebbe dare un significativo contributo alla ricerca scientifica [19, 179].

L'unico modello di colite sugli invertebrati è stato messo a punto sulla *Drosophila*.

Nel 2009 Amcheslavsky *et al.*, hanno dimostrato che la somministrazione di una soluzione di saccarosio contenente il 5% di DSS (PM medio 40 kDa) induce nelle *Drosophila* adulte danni ai tessuti intestinali simili a quelli che si verificano nei mammiferi.

La struttura e la funzioni del tratto gastrointestinale sono ampiamente conservate nei metazoi [204]. La *Drosophila* si è rivelata un modello idoneo per l'alto grado di conservazione tra gli insetti e i mammiferi delle vie di segnalazione che controllano la rigenerazione intestinale, l'immunità innata e l'infiammazione [179, 205, 206]. Inoltre, l'intestino degli insetti presentano cellule epiteliali proliferanti e differenziate simili a

quelle dell'intestino dei vertebrati [207, 208]. Ciò è fondamentale poiché è stato dimostrato che l'IBD è associata a perdita di enterociti attraverso apoptosi e diminuzione della proliferazione dell'epitelio del colon [209].

Sebbene gli insetti non possono sviluppare un modello di IBD che riflette tutti gli aspetti della malattia umana, la ricerca che utilizza questi sistemi biologici ha portato importanti sviluppi nella comprensione dell'infiammazione intestinale nei mammiferi [179, 193].

Dato che tutti gli insetti presentano la stessa architettura cellulare del midgut, Il *Tenebrio molitor* presenta delle caratteristiche anatomiche dell'intestino molto simili a quelle della *Drosophila* [172]. Nell'intestino degli insetti sono presenti tre tipi di cellule ubiquitarie le cellule colonnari, le cellule endocrine e le cellule staminali. Insieme a quest'ultime sono state segnalate cellule con morfologia e funzioni distintive nell'intestino medio di alcuni insetti, le cellule caliciformi nei lepidotteri larvali e le "cellule di rame" nei Brachiceri (sottordine dei Ditteri che comprende anche la specie *Drosophila melanogaster*). Queste cellule sono entrambe caratterizzate dall'invaginazione della membrana apicale a formare una grande cavità e la loro presenza è accompagnata da valori estremi di pH del lume dell'intestino medio [172, 181]. L'intestino di *Drosophila* comprende una regione acida prossimale (~ pH 2), tuttavia il suo genoma manca della caratteristica $H^+ / K^+ ATPasi$ della cellula parietale gastrica dei mammiferi. La generazione e il mantenimento di tali valori di pH in questo tratto di intestino medio delle larve di *Drosophila* dipendono dal complesso $H^+ V-ATPasi$ e dai canali ionici che mediano il trasporto di H^+ , Cl^- , K^+ e HCO_3^- [210]. Il midgut di *Tenebrio molitor* non presenta cellule caliciformi e cellule di rame, il pH intestinale è compreso tra 5.2-5.6 nella porzione anteriore a 7.8-8.2 nella porzione posteriore, pertanto range di pH più vicini a quelli dell'intestino umano [211].

Lo sviluppo di un modello di colite che impiega la larva di *T. molitor* invece che la *Drosophila* adulta presenta anche il vantaggio di una più semplice manipolazione e raccolta di campioni di tessuto ed emolinfa senza la necessità di disporre di attrezzature sofisticate.

Inoltre, le larve di *T. molitor* possono essere stabulate a 37°C [212], mentre la *Drosophila* viene stabulata a 25°-29°C [213], quindi potrebbe rappresentare un modello più idoneo per studiare l'impatto delle popolazioni batteriche sulla fisiologia dell'intestino e l'interazione ospite-microbioma.

3.4.2 Materiali e metodi

***Tenebrio molitor* condizioni di stabulazione**

Le larve di *Tenebrio molitor* sono state acquistate presso l'azienda Agripetgarden S.r.l. (PD) - Italia. L'azienda fornisce larve di *T. molitor* di elevata qualità e con la stessa età larvale. Per ridurre al minimo i possibili danni alla membrana epiteliale dell'intestino prima dei saggi di esposizione con destrano sodio solfato, gli insetti sono stati stabulati al buio a 25°C per una settimana e sono stati nutriti *ad libitum* ogni due giorni con farina di crusca.

Induzione di colite con destrano sodio solfato

Dopo una settimana di stabulazione, le larve sono state selezionate per peso e lunghezza e sono state distribuite casualmente in ciascun gruppo di trattamento. 20 Larve per gruppo sono state collocate in piastre di Petri da 140 mm. Per gli esperimenti è stato utilizzato il destrano sodio solfato (DSS) con peso molecolare 40 kDa e contenente una percentuale di solfato del 17-19% (TdB Labs AB, Svezia). La sostanza è stata solubilizzata in acqua alle percentuali di 2.5, 5 e 10% (W/V). IL DSS è stato somministrato *ad libitum* per 10 giorni, includendolo nel cibo delle larve, omogenizzando la soluzione di DSS con la farina di crusca in rapporto 1:1. Nel gruppo di controllo negativo la crusca è stata omogenizzata con l'acqua utilizzata per solubilizzare il DSS. Il cibo omogeneizzato il DSS è stato sostituito ogni 24 ore. Per mettere a punto le migliori condizioni per lo sviluppo del modello, sono state testate due temperature di stabulazione delle larve nei saggi di esposizione al DSS 20°C e 28°C.

Valutazione macroscopica della colite

Dato che variazioni di peso corporeo, consistenza delle feci e l'analisi della sopravvivenza sono degli endpoints che vengono valutati negli studi sui mammiferi. Ogni gruppo di larve è stato pesato prima del trattamento. A intervalli di tempo regolari (48h), ogni gruppo di trattamento è stato pesato ed è stata valutata la mortalità (risposta alla sollecitazione).

Raccolta dell'emolinfa e saggio di citotossicità

Le larve sono state anestetizzate esponendole ad una temperatura di 4°C per 15 minuti. L'emolinfa di larve per gruppo è stata raccolta sezionando gli insetti con un bisturi sterile e con l'ausilio di pinzette sterili. L'emolinfa è stata raccolta in una provetta eppendorf preraffreddata per rallentare la reazione di melanizzazione. La produzione di lattato deidrogenasi (LDH), come marker di danno cellulare [214], è stata determinata utilizzando il CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) seguendo il protocollo del produttore.

Istologia

L'esoscheletro larvale, costituito da chitina è resistente ai reagenti fissativi. Pertanto, le larve sono state fissate iniettando una soluzione di formalina tamponata al 10% con una siringa da insulina all'interno dei tessuti. Il volume della soluzione iniettata, per avere una consistenza turgida delle larve, era di circa 60-80 µL. Le larve sono state in seguito poste all'interno di provette da 15 mL contenenti circa 5 mL di formalina tamponata al

10%. I campioni dopo essere stati sottoposti a concentrazioni di etanolo crescenti sono stati sezionati trasversalmente con un bisturi e inclusi nei blocchi di paraffina. Sezioni di tessuto da 4 μm sono state tagliate dai blocchi di paraffina su vetrini per microscopia caricati positivamente per evitare il distacco di sezioni di tessuto dai vetrini. I vetrini sono stati colorati con ematossilina ed eosina e digitalizzati utilizzando un sistema di scansione Aperio AT2.

Analisi statistica

I dati dei test espressi come media \pm deviazione standard (SD) sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 6.0. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi a $p < 0.05$. I dati sulla variazione di peso corporeo e sul rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) a due vie seguito dal test post-hoc Tukey.

3.4.3 Risultati

Valutazione macroscopica della colite

La somministrazione *ad libitum* di DSS non ha causato nessuna mortalità delle larve. Nelle larve incubate alla temperatura di 30°C il trattamento con DSS ha indotto delle variazioni di peso corporeo. Nel gruppo trattato con il 10% di DSS si è osservato una significativa riduzione del peso corporeo rispetto al controllo e al trattamento con il 2.5% di DSS a partire dal settimo giorno di trattamento. Abbiamo osservato che la temperatura di incubazione influenza l'esito del trattamento. Infatti nelle larve incubate ad una temperatura di 20°C non è stata registrata nessuna riduzione del peso corporeo medio.

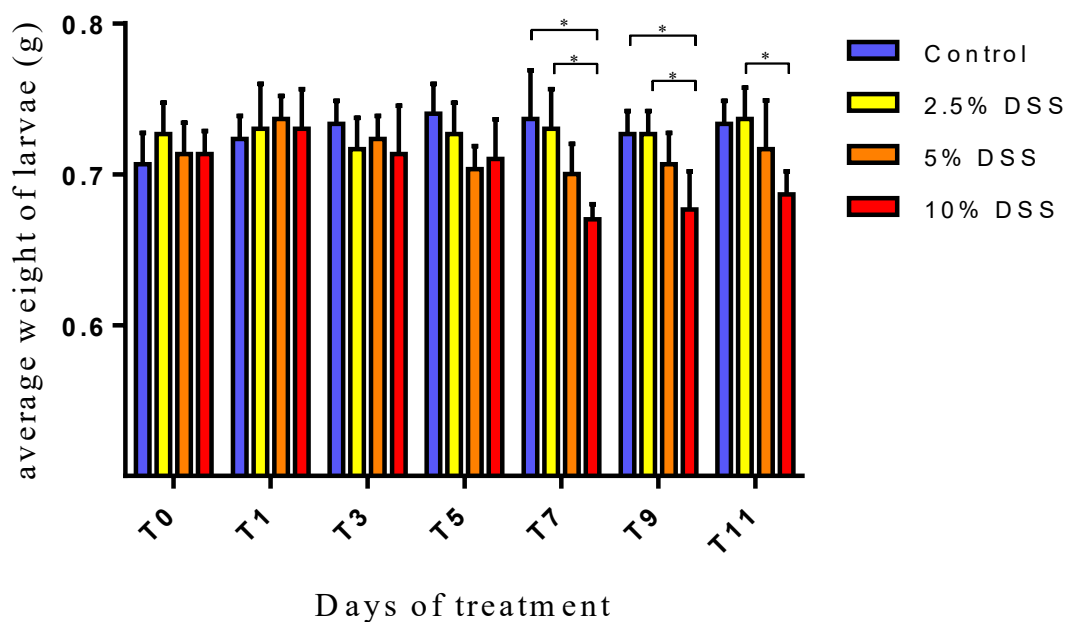


Figura 3c: Effetti del trattamento con DSS sul peso medio delle larve di *T. molitor*. I risultati sono espressi come media \pm SD. L'ANOVA a due vie è stato usato per l'analisi statistica. * indica i valori $p < 0.05$

Istologia midgut *T. molitor* trattato con DSS

Sono stati osservati gli effetti dell'alimentazione forzata con DSS (10%) sulle larve di *T. molitor* mediante esame istologico con colorazione ematossilina ed eosina. Il midgut delle larve non trattate non ha mostrato alcun chiaro segno di danno o alterazione morfologia del tessuto (figura 3e, 3f e 3g). Infatti le cellule colonnari presentano un aspetto uniforme, la membrana basale e la muscolatura viscerale appaiono intatti. Il trattamento con DSS ha causato danno tessutale e degradazione del midgut visibili dal nono giorno di trattamento in tutti gli insetti esaminati. Disintegrazione parziale dell'epitelio midgut e cambiamenti della disposizione e morfologia delle cellule epiteliali e della membrana basale sono evidenti nelle larve trattate dopo nove giorni, anche se lo strato muscolare viscerale appare per lo più intatto. L'esame istologico delle larve dopo undici giorni di trattamento rileva che il tessuto è in fase di rigenerazione infatti la morfologia e la disposizione delle cellule presenta un aspetto parzialmente paragonabile a quello del controllo.

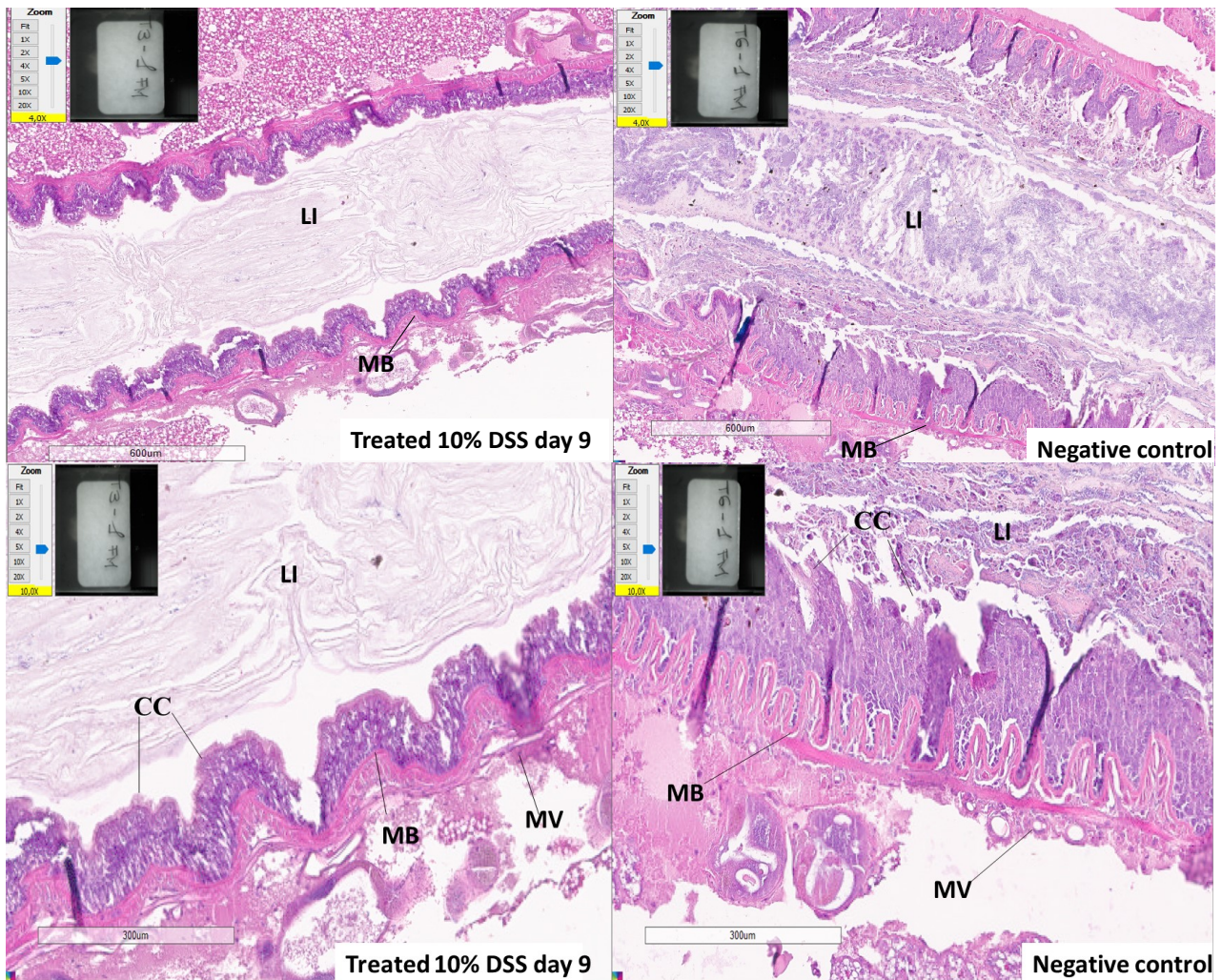


Figura 3e: sezione longitudinale intestino medio di *T. molitor*: LI: lume intestinale; MB: membrana basale; CC: cellule colonnari; MV: muscoli viscerali.

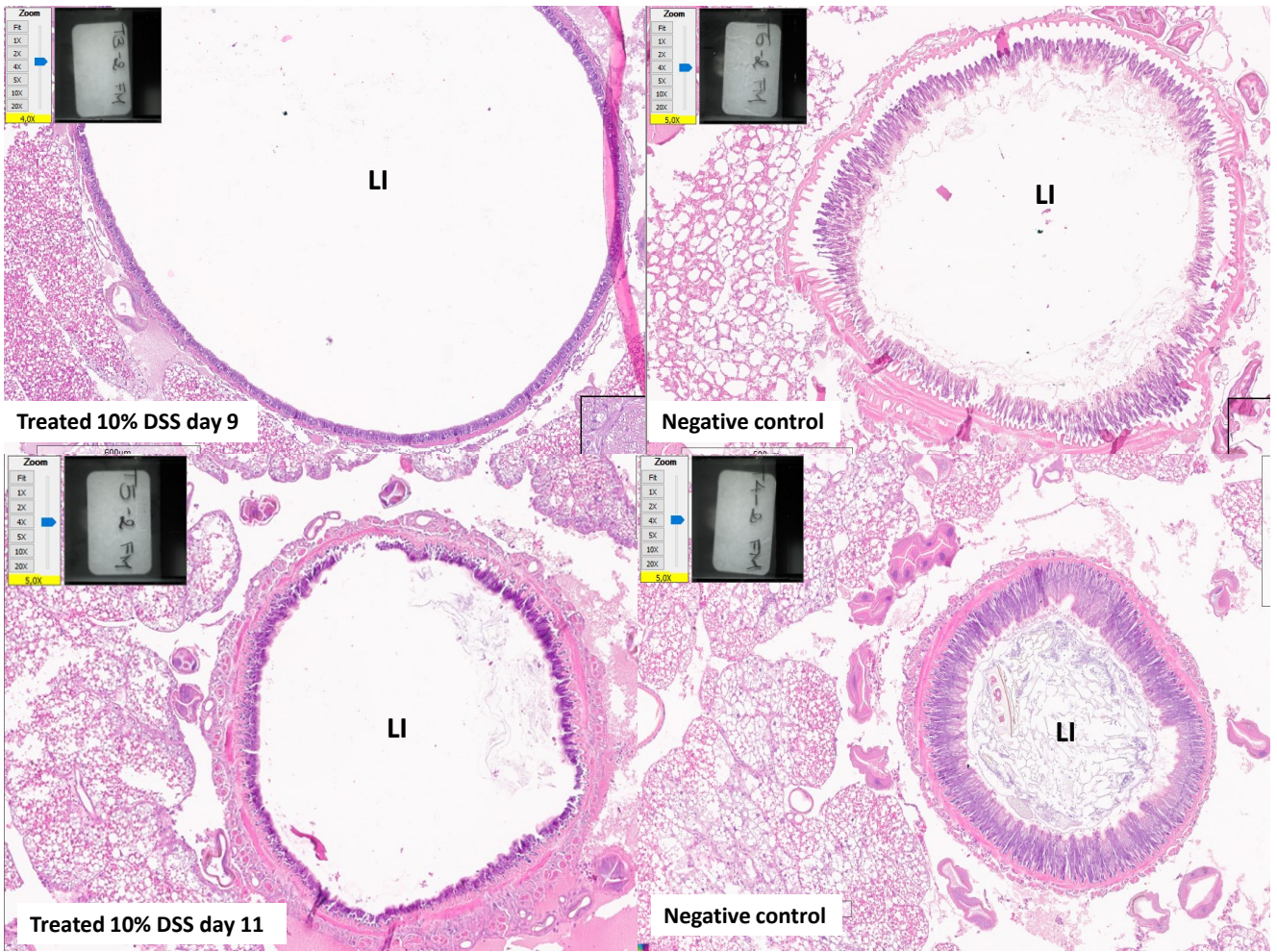


Figura 3f: sezioni trasversali intestino medio di *T. molitor*. LI: lume intestinale.

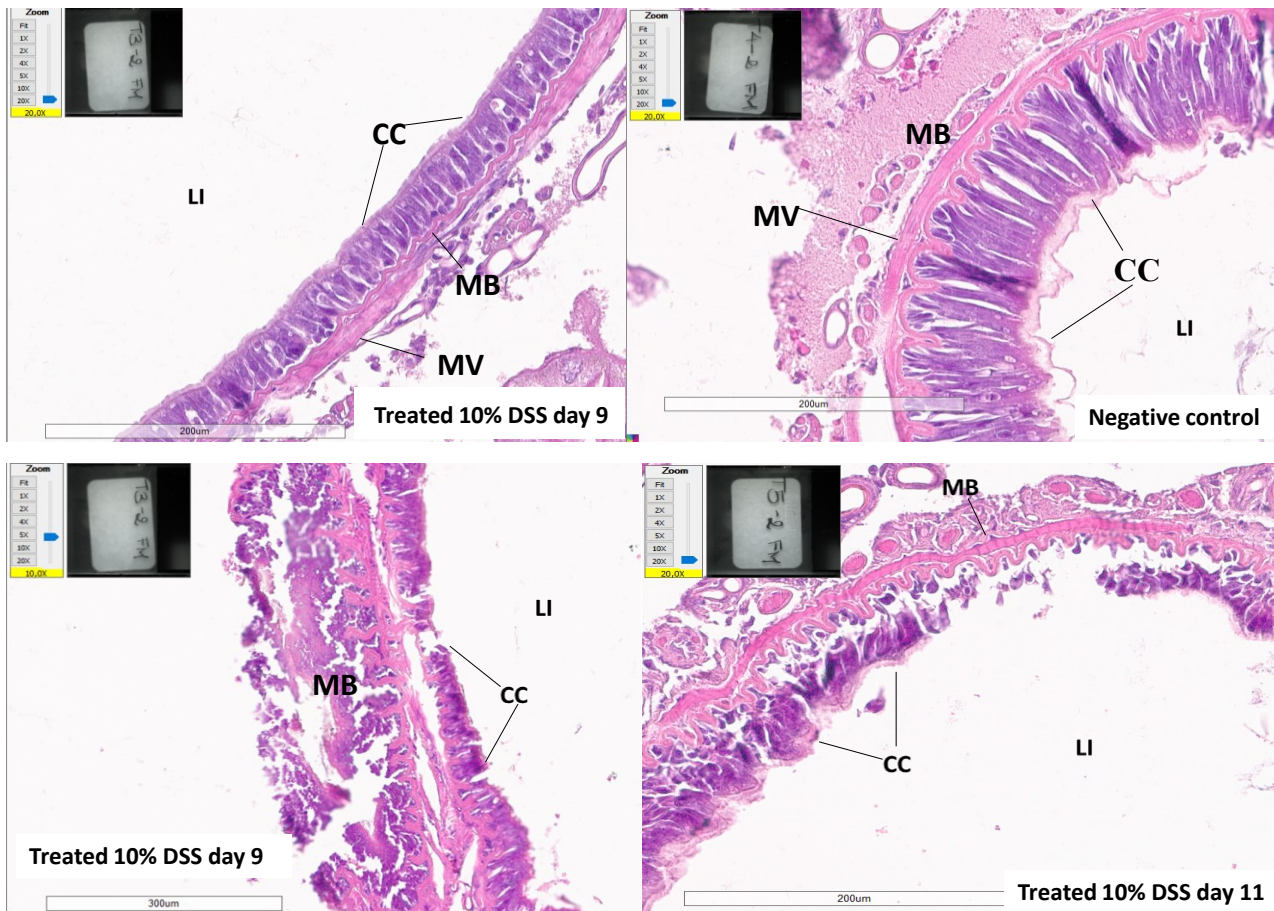


Figura 3g: sezioni trasversali intestino medio di *T. molitor*. LI: lume intestinale; MB: membrana basale; CC: cellule colonnari.

Saggio di Citotossicità

Nel gruppo trattato con il 10% di DSS si è osservato un aumento significativo del rilascio dell'enzima Lattato deidrogenasi (LDH) rispetto al controllo, a partire dal settimo giorno di trattamento, l'attività citotossica è stata mantenuta anche l'undicesimo giorno di trattamento. Nelle larve trattate con il 5% di DSS è stato documentato un aumento della LDH nell'emolinfa dopo sette e undici giorni di trattamento, ma i dati non sono

statisticamente significativi. Infine il gruppo trattato con il 2.5% di DSS non è stata osservata alcuna variazione nei livelli di LDH rispetto al controllo (figura 3h).

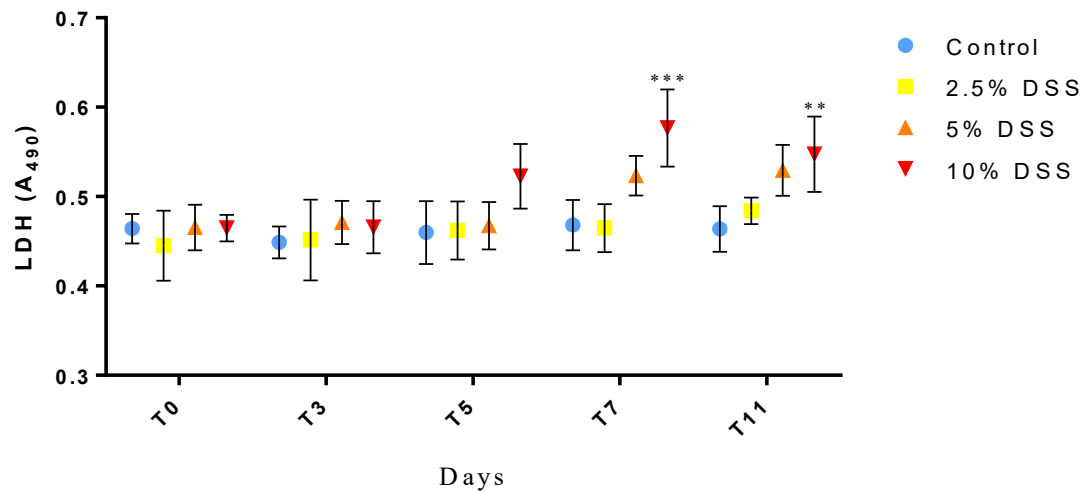


Figura 3h: Rilascio enzima LDH nell'emolinfia di *T. molitor* durante il trattamento con DSS. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando l'ANOVA a due vie. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

3.4.4 Discussione

In questo studio preliminare abbiamo valutato la tossicità nelle larve di *T. molitor* del destrano sodio solfato somministrato *ad libitum* alla concentrazione di 2.5, 5 e 10% (W/V). La comparsa del fenotipo intestinale è influenzata dalla temperatura infatti negli esperimenti condotti ad una temperatura di stabulazione di 20°C non abbiamo osservato variazioni del fenotipo rispetto al controllo. Mentre quando le larve sono state mantenute alla temperatura di 30°C è stato osservato nei gruppi trattati perdita di peso, cambiamenti morfologici dell'intestino medio e rilascio nell'emolinfa dell'enzima LDH. L'importanza della temperatura di stabulazione nella comparsa del fenotipo intestinale indotto dal DSS negli insetti è stata riportata anche in un lavoro condotto sulla *Drosophila* adulta da Amcheslavsky *et al.*, in cui è stato osservato che l'esposizione alla temperatura di 18°C rallenta significativamente la comparsa del danno tissutale nell'intestino [215]. Tuttavia, a differenza degli esperimenti condotti sulla *Drosophila* adulta non sono stati osservati effetti collaterali significativi in termini di sopravvivenza delle larve [199, 215].

Differenze rilevanti tra il peso medio delle larve esposte al 10% di DSS e quelle non trattate sono state osservate a partire dal settimo giorno di trattamento.

Nei modelli mammiferi uno dei principali *readout* di tipo clinico per monitorare la colite indotta da DSS è la perdita di peso [216]. Nei modelli murini inizialmente, può verificarsi un leggero aumento del peso corporeo (giorno 3-4) ciò dipende dal ceppo di topo utilizzato e della concentrazione e peso molecolare del DSS [217]. Dopo circa sei giorni dal trattamento si verifica generalmente una perdita fino al 25-30% del peso corporeo iniziale [216]. L'analisi istologica ha mostrato chiaramente che il DSS ha indotto danni ai tessuti del midgut delle larve in particolare nella lamina basale e nelle cellule a colonna.

Il danno osservato è parzialmente comparabile con quello che si verifica nella colite indotta da DSS nel modello murino (figura 3i).

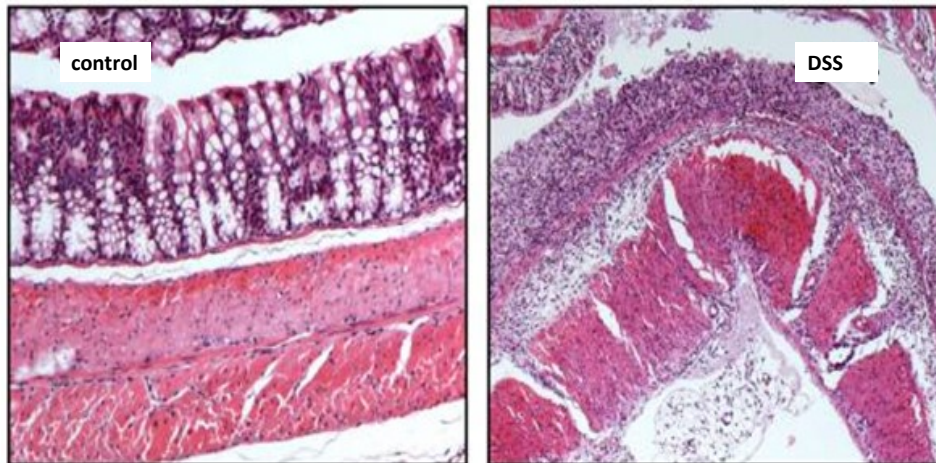


Figura 3i: Infiammazione intestinale indotta da DSS nel modello murino [217].

Il rilascio dell'enzima LDH nell'emolinfa, come marker di integrità cellulare, ha confermato che il DSS induce un danno tissutale significativo nelle larve dal settimo giorno di trattamento. Analogamente nella colite indotta da DSS nei modelli mammiferi si osserva nel plasma un aumento dei livelli di LDH causato dal danno tissutale [218].

Le somiglianze strutturali/ fisiologiche dei tessuti dell'intestino medio degli insetti con quello dei mammiferi fanno sì che questo modello alternativo di flogosi intestinale sia un potenziale strumento per lo screening di sostanze farmacologiche e probiotici. A differenza degli screening farmacologici su cellule di mammifero, i saggi condotti su questo surrogato forniscono la complessa composizione cellulare di un intestino reale e l'opportunità di valutare la tossicità e l'attività in un organismo a un costo molto più basso rispetto agli studi sui vertebrati.

Tuttavia bisogna sottolineare che la progressione della colite indotta da DSS nei mammiferi implica complesse interazioni del tessuto danneggiato con il sistema

immunitario intestinale, compresi i linfociti B e T e un sistema complesso di citochine e chemochine prodotte da diversi tipi di cellule [198, 219]. Il *T. molitor* come tutti gli insetti, non è dotato di una risposta immunitaria adattiva pertanto non possiede linfociti B e T, ma solo emociti che funzionano in modo simile a macrofagi e neutrofilo [220]. L'effetto primario causato dalla somministrazione di DSS nella *Drosophila* così come in *T.molitor* è un danno tissutale nel midgut degli insetti senza l'intervento dei linfociti, pertanto rappresenta un modello più semplice, rispetto a quello murino, in cui è possibile indagare i meccanismi coinvolti nell'immunità innata [215].

I dati presentati in questo studio preliminare dimostrano l'attività tossica nei confronti dell'epitelio intestinale del DSS nelle larve di *T. molitor*. Ulteriori studi su bersagli molecolari e di immunoistochimica saranno necessari per comprendere il meccanismo di tossicità del DSS e mettere a punto il modello per lo screening farmacologico.

Capitolo III: *Limacus Flavus*

4.1 Legislazione e panoramica dei test per la valutazione dell'irritazione mucosale

Le mucose orali, nasali, vaginali, peniene e rettali, sono barriere naturali che hanno un'importante funzione protettiva, prevengono l'ingresso di microorganismi e di sostanze nocive dall'ambiente all'interno del nostro organismo [221]. Questi epitelii possono essere esposti intenzionalmente e accidentalmente a farmaci, medical device, presidi medici chirurgici e cosmetici [222]. Di conseguenza, questo può causare irritazioni e microlesioni che aumentano la suscettibilità a infezioni [221].

Test sulla sicurezza sono strumenti fondamentali per la selezione dei candidati principali nella fase di scoperta e sviluppo dei farmaci inoltre studi di biocompatibilità sono necessari per l'immissione in commercio di farmaci e medical device [223].

Studi pre-clinici per valutare la tolleranza mucosale di medical device, ad esempio il test di irritazione vaginale (RVI), vengono condotti comunemente sui conigli, in conformità alle direttive e linee guida dell'UE (UNI EN ISO 10993-10).

Mentre, la direttiva 93/35 CEE sui cosmetici, adottata nel giugno 1993 come sesto emendamento della Direttiva 76/768 CEE, ha introdotto importanti cambiamenti nella legislazione sui prodotti cosmetici vietando i test sui mammiferi per gli ingredienti e per il prodotto finito. Quest'ultima direttiva è in accordo con le indicazioni riportate nel regolamento 86/609/CEE che ha lo scopo di limitare l'uso di animali da laboratorio senza compromettere la sicurezza umana.

Pertanto sono stati proposti numerosi metodi *in vitro* per i test di irritazione delle mucose e della pelle. Tessuti ricostruiti, espianati e sistemi di coltura cellulare sono la principale alternativa ai modelli tradizionali, ma presentano diversi svantaggi. Infatti, fattori come

il controllo nervoso, il flusso sanguigno sistemico e la motilità sono assenti in questi modelli. Attualmente sono disponibili metodi alternativi solo per la valutazione della corrosività cutanea, dell'irritazione cutanea, dell'assorbimento dermico e della fototossicità [224]. Attualmente non esiste un metodo alternativo *in vitro* per la tossicità mucosale convalidato e/o accettato dalle dalla Food and Drug Administration (FDA) e dall'Agenzia europea per i medicinali (EMA) [225, 226].

La direzione attuale nel campo della tossicologia è quella di utilizzare metodi alternativi che riducono, perfezionano e sostituiscono l'uso dei mammiferi [227].

Un modello alternativo *in vivo* per la valutazione della tossicità mucosale di sostanze chimiche e formulazioni è rappresentato dal saggio Slug mucosal Irritation (SMI). Questo test è stato sviluppato presso il Laboratorio di Tecnologia Farmaceutica dell'Università di Ghent, Belgio e viene condotto utilizzando la lumaca *Arion lusitanicus*. Le lumache esposte a sostanze irritanti producono muco per proteggere la parete del corpo. Il danno tissutale può essere stimato in base alla produzione di muco, variazioni di peso, rilascio di proteine ed enzimi dalla parete del corpo delle lumache [228-230] .

4.2 Valutazione del potenziale di irritazione mucosale di sostanze biocide: specie di lumaca *Limacus flavus* come test alternativo di tossicità mucosale.

4.2.1 Stato dell'arte e scopo dello studio

La disinfezione è un'operazione o un complesso di operazioni che comporta l'uso di procedure fisiche, prodotti chimici o biologici per eliminare selettivamente i microrganismi patogeni. È stato ampiamente comprovato che la disinfezione costituisce un'efficace pratica preventiva contro le malattie infettive [231].

La pandemia di COVID-19 è stata dichiarata un'emergenza sanitaria globale dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Un tasso di mortalità tra il 2 e il 2,5%, 103 milioni di casi nel mondo e più di 2 milioni di morti confermano la gravità dell'infezione. La trasmissione della malattia avviene generalmente per via aerea o da uomo a uomo attraverso goccioline e superfici contaminate [232].

Il SARS-CoV-2, essendo un virus provvisto di un involucro pericapsidico (envelope), è poco resistente agli acidi, ai detergenti, ai disinfettanti, all'essiccazione e al calore, quindi suscettibile ai metodi di disinfezione standard [233, 234].

Tra i disinfettanti, i prodotti chimici sono ampiamente utilizzati, grazie all'ampia disponibilità di prodotti, al rapporto costo-beneficio, all'ampio spettro d'azione e alla possibilità di utilizzarli su molte superfici e oggetti. In questo contesto, diverse istituzioni, sia nazionali [235] che internazionali [236, 237], hanno stilato delle liste di prodotti, da usare sulle superfici e non sulle persone, che possono uccidere il coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) se usati secondo le indicazioni dell'etichetta.

Le sostanze comunemente raccomandate sono alcoli, composti contenenti cloro, perossido di idrogeno, fenoli, sostanze a base di iodio e sali di ammonio quaternario, ogni classe presenta un diverso meccanismo di azione:

- alcoli, reticolazione, coagulazione, raggruppamento, agiscono principalmente emulsionando le proteine di membrana;
- composti del cloro, ossidazione di proteine, carboidrati e lipidi anche a basse concentrazioni;
- perossido di idrogeno, ossidazione dei componenti della membrana cellulare attraverso la formazione di radicali e perossidi;
- fenoli, reticolazione, coagulazione, raggruppamento che causa la distruzione della parete cellulare e il blocco dell'attività enzimatica;
- sostanze a base di iodio, interferiscono a livello della catena respiratoria bloccando il trasporto di elettroni, diminuendo così l'apporto di ossigeno dei microrganismi aerobi;
- sali di ammonio quaternario, agiscono come composti ionici che legano irreversibilmente i fosfolipidi di membrana, alterandone la permeabilità [238].

L'efficacia di un prodotto antisettico dovrebbe completarsi entro trenta secondi o al massimo entro 60 secondi. Poiché, maggiore è il tempo richiesto affinché a disinfezione sia efficace, più alto è il rischio che l'utente non segua la corretta procedura di applicazione richiesta. I prodotti disponibili per la disinfezione della pelle (PT1) ed efficaci contro i virus si dividono in 2 gruppi: a base di alcol e senza alcol [239, 240].

Le linee guida internazionali sul controllo e prevenzione si sono dimostrate efficaci sin da subito nel contrastare l'epidemia COVID-19 [241]. Tra queste misure, la disinfezione eseguita con prodotti chimici svolge un ruolo chiave. L'aumento delle procedure di disinfezione porta di conseguenza ad un aumento del numero di persone che maneggiano

frequentemente disinfettanti e quindi a un maggiore rischio di irritazione accidentale delle mucose.

Per la valutazione del potenziale irritante delle sostanze chimiche sulle membrane mucose i vertebrati sono principalmente utilizzati nella routine di laboratorio [242]. Anche se la sperimentazione animale garantisce dati affidabili, solleva problemi etici, legali e scientifici di grande importanza. Per questo motivo, sono state emanate direttive che limitano l'uso di mammiferi e vertebrati [243]. A causa di queste limitazioni, i ricercatori hanno iniziato a utilizzare gli invertebrati per studi su modelli *in vivo* [19].

Per far fronte a questo scenario, è stato proposto un nuovo saggio *in vivo* "Slug Mucosal Irritation" (SMI) e la lumaca *Arion lusitanicus* è stato il primo invertebrato utilizzato come alternativa ai mammiferi per studi di tossicologia mucosale [244]. Le ragioni di questa scelta risiedono nell'anatomia e nella fisiologia di questo invertebrato. Infatti possiede un tessuto mucoso, simile a quello umano, che può essere facilmente osservato essendo all'esterno e non all'interno dell'organismo. La sua parete corporea è morbida e non cheratinizzata e comprende un epitelio esterno monostratificato composto da cellule non ciliate con microvilli e cellule ghiandolari secernenti muco [245]. Le secrezioni di muco servono non solo per la locomozione, la lubrificazione e la prevenzione della disidratazione, ma anche per proteggere il corpo dai danni [246].

Le proprietà uniche del muco dipendono principalmente dalla secrezione di mucine. La stimolazione meccanica e chimica della lumaca provoca la contrazione della muscolatura liscia situata vicino alle cellule secernenti muco che produce granuli di secrezione apocrina [247]. Una volta che i granuli raggiungono l'ambiente extracellulare e trovano le condizioni di attivazione appropriate, le proprietà della membrana cambiano

permettendo il passaggio di ioni e acqua. Come risultato, le mucine si idratano e si gonfiano fino a 100 volte in poche frazioni di secondo [248].

Diversi studi che utilizzano la produzione di muco di della specie *Arion lusitanicus* sono stati sviluppati come test comparativi con un alto grado di predittività del potenziale irritante delle sostanze testate, come la previsione del grado di irritazione della mucosa nasale [249], la valutazione della tollerabilità di alcuni eccipienti sulla pelle dei bambini e l'identificazione delle sostanze chimiche che causano gravi danni agli occhi e irritazione [250, 251].

Inoltre, il modello della lumaca supera il grave problema dei test effettuati su colture cellulari *in vitro*. Queste ultime sono più sensibili alle sostanze chimiche rispetto alla mucosa reale a causa della mancanza di una barriera protettiva formata dal muco. Un altro importante vantaggio è la valutazione del danno tissutale, che può essere valutato mediante la perdita di peso, produzione di muco e il rilascio di diversi marcatori tra cui proteine ed enzimi [229].

Limacus flavus (Phylum: Mollusca, Classe: Gastropoda, Ordine: Stylommatophora, Famiglia: Limacidae) conosciuto anche come "Lumaca gialla" è un gasteropode terrestre polmonato, ermafrodita, sinantropo, autoctono della regione mediterranea e diffuso in tutto il mondo. La colorazione varia dal giallastro al rosa-arancio, con macchie grigio-verdi. Presenta tubercoli grigio-azzurri, corta cresta, il ventre (o i piedi) giallo-bianco. Il muco prodotto dal corpo è giallo, quello del ventre è trasparente [252, 253]

Gli studi di Cook *et al.*, sull'anatomia e l'istochimica delle ghiandole produttrici di muco di *Limax pseudoflavus*, una specie di lumaca strettamente legata a *Limacus flavus*, hanno dimostrato la presenza di cellule granulari gialle diffuse sulla superficie dorsale. Queste ghiandole sono responsabili della colorazione gialla del muco dorsale di *Limax*

pseudoflavus [254]. Inoltre, altri studi condotti da Chang, *et al.*, sulle cellule epiteliali e produttrici di muco hanno mostrato notevoli somiglianze tra *Limacus flavus* e *Arion Lusitanicus* nella produzione di muco [255].

In uno studio condotto da Dhondt *et. al.* nel 2006 ha confrontato l'uso di *L. flavus* versus *A. lusitanius* con il test SMI per la valutazione di 28 sostanze chimiche oculari. In questo lavoro, gli autori giustificano la scelta di questa lumaca in base a diversi criteri, come le dimensioni maggiori e la maggiore longevità rispetto a *A. lusitanicus*. I risultati hanno mostrato una maggiore produzione di muco per *L. flavus* rispetto a *A. lusitanicus* [256].

In questo studio, per la prima volta, oltre ai parametri standard registrati nel test SMI (cioè produzione di muco, variazione di peso, contenuto proteico e produzione di LDH), è stata valutata la produzione di pigmento giallo in risposta a sostanze irritanti, unica per la lumaca *L. flavus*.

Quindi, lo scopo dello studio è quello di valutare se la specie *L. flavus* possa rappresentare uno strumento affidabile per la determinazione del potenziale irritante delle sostanze chimiche. A tal fine, il saggio SMI è stato implementato e adattato alle caratteristiche della *L. flavus* per valutare e classificare il potenziale irritante delle principali sostanze biocide utilizzate per la disinfezione. Le sostanze chimiche testate sono le più comuni tra quelle presenti nelle linee guida ufficiali fornite dalle organizzazioni sanitarie nazionali e internazionali per contrastare la diffusione del COVID-19 [235, 237].

4.2.2 Materiali e metodi

Sostanze chimiche testate

Tampone fosfato salino pH 7,4 (PBS) 4 (P3813 Sigma-Aldrich) , Benzalconio cloruro (BAC) 1% (w/v) (12060 Sigma-Aldrich), Etanolo (EtOH) 70% (v/v) (1.07017 Supelco), Isopropanolo 95% (v/v) (34863 Sigma-Aldrich), Isopropanolo 70% (v/v) (34863 Sigma-Aldrich), Ipoclorito di Sodio 0.1% (v/v) (71696 Honeywell Fluka), Perossido di Idrogeno 3% (v/v) (H1009 Sigma-Aldrich), Clorexidina 1% (w/v) (282227 Sigma-Aldrich), Iodopovidone 10% (w/v) (PVP1 Sigma-Aldrich). Tutte le sostanze sono state opportunamente diluite alla concentrazione utilizzata in acqua deionizzata sterile.

Raccolta e stabulazione degli esemplari di *Limacus flavus*

Le lumache sono state campionate nelle vicinanze del comune di Trivento (Campobasso, Molise Italia) e sono state alloggiate in laboratorio ad una temperatura compresa tra 16-18 °C con un fotoperiodo di 12-12. Ogni esemplare è stato attentamente ispezionato alla ricerca di lesioni macroscopiche o danni ai tubercoli, al fine di escludere le lumache non idonee. L'identificazione della lumaca è stata effettuata tramite valutazione macroscopica: colore del corpo (verde, marrone, grigiastro), consistenza del mantello (rete di macchie gialle di forma ovoidale) e le antenne (colore bluastro). Inoltre, sono state valutate sia le dimensioni degli esemplari che la posizione del poro respiratorio (pneumostomo) situato dietro la linea mediana del mantello [257].

Test di irritazione mucosale *in vivo*

Il test è stato condotto in accordo con il test di irritazione delle mucose delle lumache proposto da Adriaens *et al.*, con alcune modifiche studiate per ottimizzare la produzione di muco della specie *Limacus flavus* [251]. Sono state selezionate lumache con un peso compreso tra 3 e 5g. Tre giorni prima del test, sono state alloggiare in un terrario di plastica ventilato foderato con carta assorbente imbevuta di PBS (pH 7.4) e dotato di una rete metallica per drenare il muco. Le lumache prima del test sono state pesate e disposte ognuna in una piastra Petri. Il grado di irritabilità dei biocidi testati è stato valutato esponendo le lumache a 100µl di ciascuna delle sostanze in esame (Figura 4a). A differenza dello Slug mucosal irritation *assay* ottimizzato da Adriensen *et al.*, le sostanze di prova sono state applicate sul dorso e non nella parte inferiore delle lumache [251]. Inoltre il periodo di contatto con la sostanza in esame è stato ridotto da 60 a 15 minuti, in quanto abbiamo osservato un'elevata risposta delle lumache allo stimolo delle sostanze chimiche. Dopo 15 minuti di contatto con le sostanze, le lumache sono state pesate per valutare la perdita di peso e trasferite in un'altra piastra Petri a contatto con 1 ml di PBS per 45 minuti (Figura 4b). Successivamente, i campioni sono stati raccolti e congelati a -80°C per le ulteriori analisi. Le variazioni di peso indotte dai trattamenti sono state calcolate dopo 15 minuti di contatto con le sostanze chimiche ed è stato espresso come percentuale peso/peso (% w/w) rispetto al peso iniziale della lumaca (peso lumaca dopo trattamento x 100/ peso lumaca). Le piastre Petri in cui erano poste le lumache a contatto con le sostanze test sono state pesate prima e dopo il test per determinare il muco prodotto dallo stimolo irritante (Figura 4c). La quantità di muco prodotta è stata determinata dopo il periodo di contatto di 15 minuti ed è stata espressa in percentuale rispetto al peso iniziale della lumaca (muco prodotto dopo trattamento x 100/ peso iniziale lumaca). Per

ogni sostanza testata sono state utilizzate tre lumache, e l'esperimento è stato ripetuto tre volte in modo indipendente (tre repliche biologiche e tecniche).



Figura 4a: *Limacus flavus* esposte a 100 μ l delle sostanze test

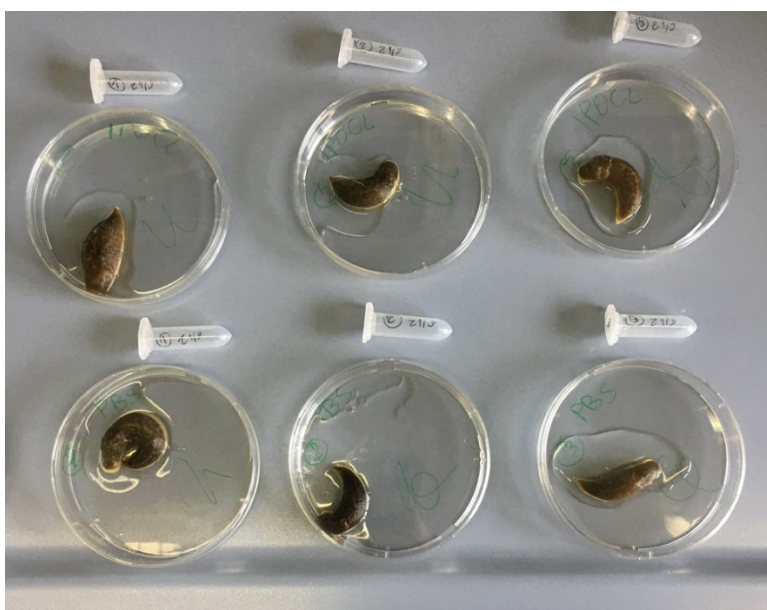


Figura 4b: *Limacus flavus* poste a contatto con PBS dopo esposizione alle sostanze test

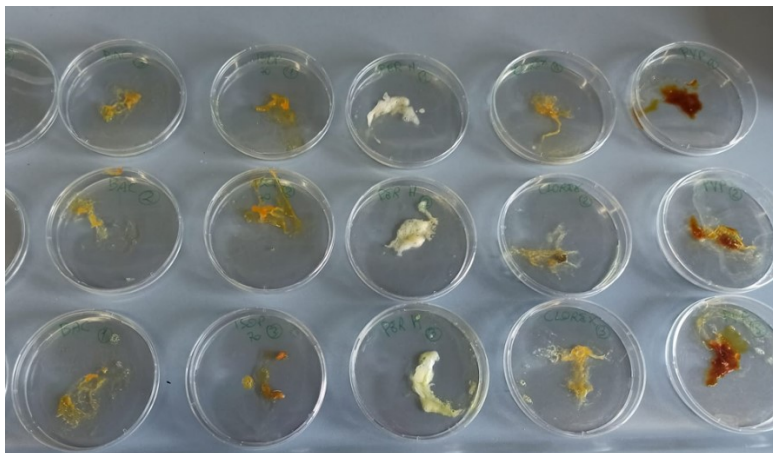


Figura 4c: muco prodotto dalle lumache dopo 15 minuti di trattamento con le sostanze test

Quantificazione proteica

I campioni dopo 45 minuti di contatto con PBS sono stati analizzati per determinare il contenuto proteico. La quantificazione è stata effettuata utilizzando il Pierce BCA Protein Assay Kit (23227 Thermo-Scientific) seguendo le istruzioni del produttore. Diluizioni seriali di BSA da 2000-20 μ g/mL sono state effettuate per costruire la curva di calibrazione. 25 μ L dei campioni di muco sono stati aggiunti a 200 μ L della working solution BCA in una micropiastre. Dopo un periodo di incubazione a 37 °C per 30 min sono state effettuate le misurazioni con il VICTOR 3 1420 (Perkin-Elmenel) alla lunghezza d'onda di 562 nm. I risultati sono stati espressi come μ gr/mL e normalizzati per il peso iniziale della lumaca.

Lattato deidrogenasi

L'attività enzimatica della lattato deidrogenasi (LDH) dei campioni è stata misurata con il kit enzimatico Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (MAK066 Sigma-Aldrich). In questo test, LDH riduce il NAD in NADH, che viene rilevato in modo specifico dallo spettrofotometro (450 nm). L'attività LDH è riportata come nmole/min/mL = milliunità/mL. Un'unità di attività LDH è definita come la quantità di enzima che catalizza la conversione del lattato in piruvato per generare 1.0 mole di NADH al minuto a 37 C. il saggio è stato condotto in piastre 96-well, 50 µL della Master Reaction Mix sono stati aggiunti a ciascun pozzetto contenente 50 µL dei campioni test.

Curve di assorbimento UV-VISIBILE

Dato che abbiamo osservato che le lumache della specie *Limacus flavus* producono un muco con caratteristico colore giallo, quando vengono stimulate con sostanze irritanti, abbiamo misurato l'assorbanza del muco per correlarla al danno mucosale indotto dal contatto delle sostanze chimiche con il dorso della lumaca. I campioni diluiti 1:10 (V/V) in acqua deionizzata sterile sono stati analizzati mediante lettura allo spettrofotometro Lambda 25 UV/VIS nel range di lunghezza d'onda da 400 a 700 nm con intervalli di 1nm.

Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) di tre repliche biologiche relative a tre esperimenti indipendenti. Per l'analisi statistica dei saggi è stato utilizzato il

software Prism Graph Pad 6. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test ANOVA a una via, seguito da Bonferroni correzione.

Come precedentemente riportato da Adriens *et al.*, [242], l'Analisi Discriminante Lineare (LDA) è stata usata per correlare i dati ottenuti e determinare il grado di irritabilità delle sostanze biocide. In questo studio, l'LDA è stata applicata per la valutazione comparativa del potenziale irritante di nove disinfettanti per superfici e oggetti prescritti per contrastare la diffusione della SARS-CoV-2. Nove osservazioni (3 repliche tecniche e 3 biologiche) sono state considerate per ogni variabile (variazioni di peso, produzione di muco, quantificazione delle proteine, attività della lattato deidrogenasi e λ_{\max} 420nm). Sono stati sviluppati due modelli LDA, uno basato sulla combinazione lineare delle prime quattro variabili senza λ_{\max} 420nm (LDA w/o λ_{\max} 420nm), l'altro comprendente la variabile spettrofotometrica λ_{\max} 420nm (LDA λ_{\max} 420nm). Il confronto delle matrici di confusione di ciascun modello (LDA w/o λ_{\max} 420nm e LDA λ_{\max} 420nm) ha permesso di valutare la correlazione tra le categorie osservate e previste.

Infine, le distanze al quadrato di PBS (controllo) (D2) della LDA λ_{\max} 420nm sono state utilizzate per la classificazione comparativa delle sostanze testate con un punteggio numerico (da 0 a 7) e un grado (da nessuno a estremamente alto). Il software XLSTAT è stato utilizzato per l'analisi LDA.

4.2.3 Risultati

	Body weight variation (w/W %)	Mucus production (w/W %)	Protein quantification ($\mu\text{g/ml}$)/g ^a	Lactate dehydrogenase (IU/l)/g ^b	$\lambda_{\text{max}420}$ (nm)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
PBS	100,00 \pm 1,84	0.30 \pm 0,41	20.07 \pm 8.68	-	0.028 \pm 0.006
sodium hypochlorite 0,1%	96.53 \pm 1,15	3.73 \pm 1.27	28.72 \pm 13.36	0.57 \pm 0.15	0.035 \pm 0.005
hydrogen peroxide 3%	96.37 \pm 2,05	5.03 \pm 1,68	56,47 \pm 15,21	0.47 \pm 0.12	0.048 \pm 0.006
chlorhexidine 1%	82.04 \pm 5,19	10.23 \pm 2,28	104.90 \pm 29.35	2.10 \pm 0.73	0.103 \pm 0.016
povidone iodine 10%	84.09 \pm 6,22	14.29 \pm 2,07	139.11 \pm 51.58	2.28 \pm 0.16	0.117 \pm 0.016
ethanol 70%	78.78 \pm 5,93	14.63 \pm 2.85	68.64 \pm 28.85	3.62 \pm 0.75	0.070 \pm 0.012
BAC 1%	86.68 \pm 1,98	12.36 \pm 3.32	230.02 \pm 103.95	3.64 \pm 0.90	0.301 \pm 0.015
isopropanol 70%	83.04 \pm 5,54	11.58 \pm 3.98	275.53 \pm 76.64	3.51 \pm 0.51	0.330 \pm 0.020
isopropanol 95%	78.95 \pm 3,10	19.96 \pm 4.08	396.87 \pm 73.77	5.73 \pm 1.13	0.394 \pm 0.019

Tabella 4a: Risultati del test SMI per tutti i disinfettanti testati. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD).

Variatione del peso corporeo

La variazione media del peso delle lumache esposte ai disinfettanti e ai controlli testati (tampone fosfato pH 7.4, Benzalconio cloruro 1% (w/v), Etanolo 70% (v/v), Isopropanolo 70%, Isopropanolo 95%, Ipoclorito di sodio 0.1%, Perossido di idrogeno 3%, Clorexidina 1% e Povidone iodio (PVP-I) 10%) è compresa tra 100% e 78% (Figura 4d). Nessuna variazione del peso corporeo è stata osservata nelle lumache trattate con PBS (controllo). Nei gruppi esposti ai disinfettanti si è osservata una variazione di peso causata dall'azione irritante delle sostanze biocide sulla mucosa della lumaca. Tra tutte le soluzioni testate,

l'etanolo 70% (v/v) e l'isopropanolo 95% (v/v) hanno ridotto significativamente il peso corporeo delle lumache del 78.7±5.93% e del 78.95±3.10%, rispettivamente. Mentre, il perossido di idrogeno e l'ipoclorito di sodio hanno avuto la minore influenza sulla variazione del peso corporeo con una riduzione del 96.37±2.05 e del 96.53±1.15%, rispettivamente.

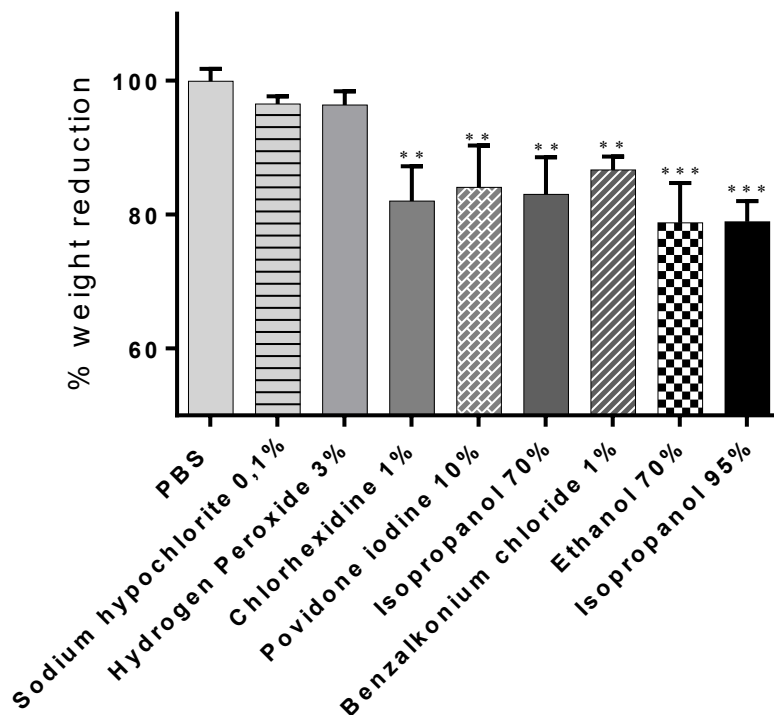


Figura 4d: Variazione del peso corporeo indotta dai diversi trattamenti. I dati sono presentati come media ± DS ed espressi in percentuale rispetto al peso corporeo iniziale. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05. * indica una differenza significativa rispetto al controllo negativo (PBS)

Produzione di muco

I dati relativi alla quantità di muco prodotta espressa come percentuale del peso iniziale delle lumache sono mostrati in figura 4e. Il trattamento con PBS ha stimolato scarsamente la produzione di muco $0.3\pm 0.41\%$. Tutte le sostanze testate, eccetto il perossido di idrogeno $5.03\pm 1.68\%$ e l'ipoclorito di sodio $3.73\pm 1.27\%$, hanno indotto un aumento significativo della secrezione di muco ($14.63\pm 2.88\%$ Etanolo 70%; $11.58\pm 3.98\%$ Isopropanolo 70%; $10.23\pm 2.28\%$ Clorexidina 1%; 14.29 ± 2.07 iodopovidone). L'isopropanolo 95% è stata la sostanza che ha stimolato maggiormente la produzione di muco rispetto al controllo 19.96 ± 4.08 .

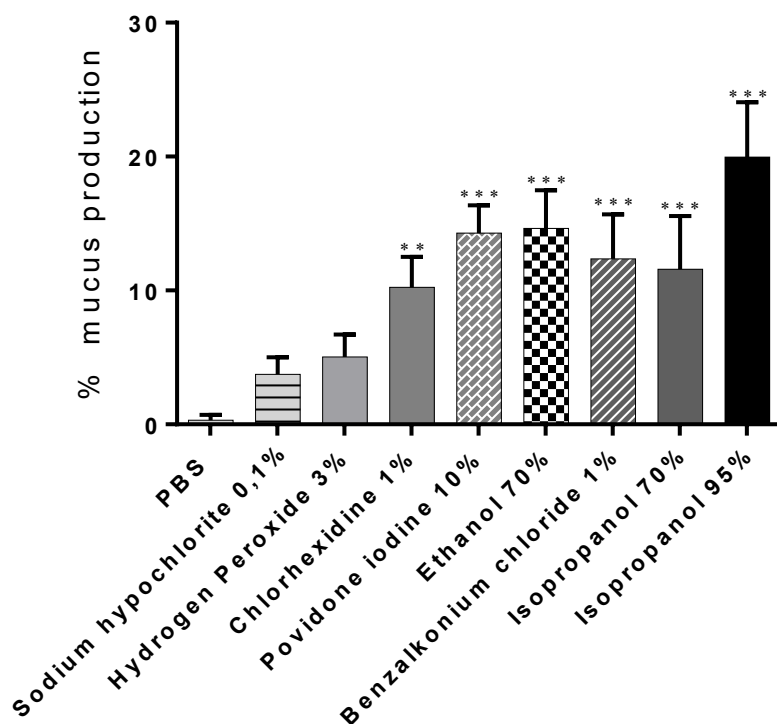


Figura 4e: Quantità di muco (espressa in percentuale rispetto al peso iniziale della lumaca) prodotta dalle lumache dopo un periodo di contatto di 15 minuti con le sostanze

test. I dati sono presentati come media \pm DS. ***P < 0.001, **P < 0.01. * indica una differenza significativa rispetto al controllo negativo (PBS)

Quantificazione proteica

I dati dalla quantificazione proteica (normalizzata rispetto al peso iniziale delle lumache) nei campioni prelevati dopo un periodo di esposizione di 15 minuti con i diversi trattamenti e successivo contatto con PBS per 1h sono mostrati in figura 4f. Nel gruppo di controllo PBS si è registrato un moderato rilascio di proteine nel muco ($20.07 \pm 8.68 \mu\text{g/ml}$). Il trattamento con isopropanolo 95%, BAC 1% e isopropanolo al 70% hanno indotto un significativo rilascio di proteine rispetto al controllo. Nei campioni dei gruppi esposti al perossido di idrogeno e l'ipoclorito sono state determinate le più basse concentrazioni di proteine tra le sostanze biocide testate.

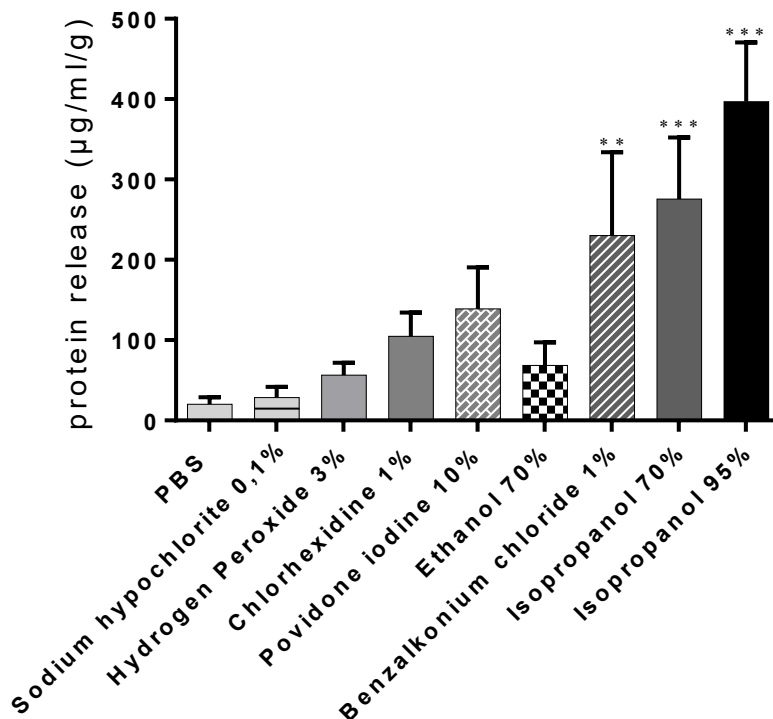


Figura 4f: Proteine rilasciate dalla mucosa delle lumache dopo un periodo di esposizione di 15 minuti con i diversi trattamenti e successivo contatto con PBS per 1h. I dati sono presentati come valori medi \pm DS ed espressi in $\mu\text{g/ml}$. ***P < 0.001, **P < 0.01. * indica una differenza significativa rispetto al controllo negativo (PBS)

Lattato deidrogenasi

Il rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) nel muco è correlato al danno cellulare causato dall'esposizione delle lumache con le sostanze test. Per le lumache trattate con PBS, il rilascio dell'enzima non è stato rilevato dal kit d'identificazione in quanto i valori erano inferiori al limite d'identificazione. Tutte le altre sostanze testate hanno causato un danno cellulare che è stato rilevato dal rilascio dell'enzima (figura 4g).

I dati pertanto sono stati analizzati confrontandoli con il controllo positivo Benzalconio cloruro 1% (media LDH 3.6 IU/LG/g). Quest'ultimo è utilizzato storicamente come controllo positivo nello *slug mucosal irritation assay* [242]. L'isopropanolo 95% ha indotto un rilascio significativo di LDH rispetto al controllo positivo (media LDH 5.73 ± 1.12 IU/LG/g). Mentre il perossido di idrogeno e il sodio ipoclorito hanno indotto un minor rilascio di LDH rispetto al BAC 1% rispettivamente 0.47 ± 0.190 e 0.57 ± 0.15 IU/LG/g.

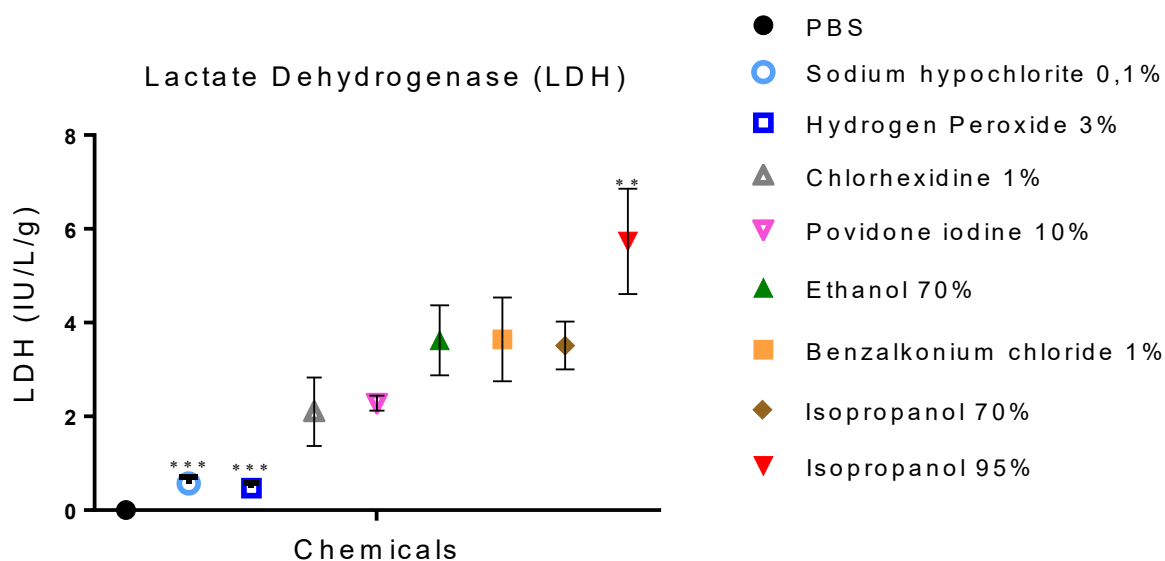


Figura 4g: Attività della lattato deidrogenasi nei campioni di PBS dopo un periodo di contatto con i differenti biocidi per 15 minuti. I dati sono presentati come valori medi ed espressi in unità/ml PBS per g di peso corporeo. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. * indica una differenza significativa rispetto al controllo positivo (BAC 1%).

Curve di assorbimento VIS

In esperimenti preliminari sono state eseguite delle curve di assorbimento sui campioni di muco, nel range di lunghezza d'onda (λ) da 400 a 600 nm (figura 4h). Il picco di assorbanza è stato individuato a 420 nm. La tabella 1 mostra i valori di $\lambda_{max420nm}$, valori di assorbanza più bassi sono stati trovati per i gruppi PBS, ipoclorito di sodio 0.1% e perossido di idrogeno 3% mentre i valori più alti sono stati trovati per i gruppi isopropanolo 95%, isopropanolo 70% e cloruro di benzalconio 1%.

Inoltre, è stata osservata una correlazione lineare tra $\lambda_{max420nm}$ e la proteina del muco ($r^2 = 0.96$) (Figura 4i).

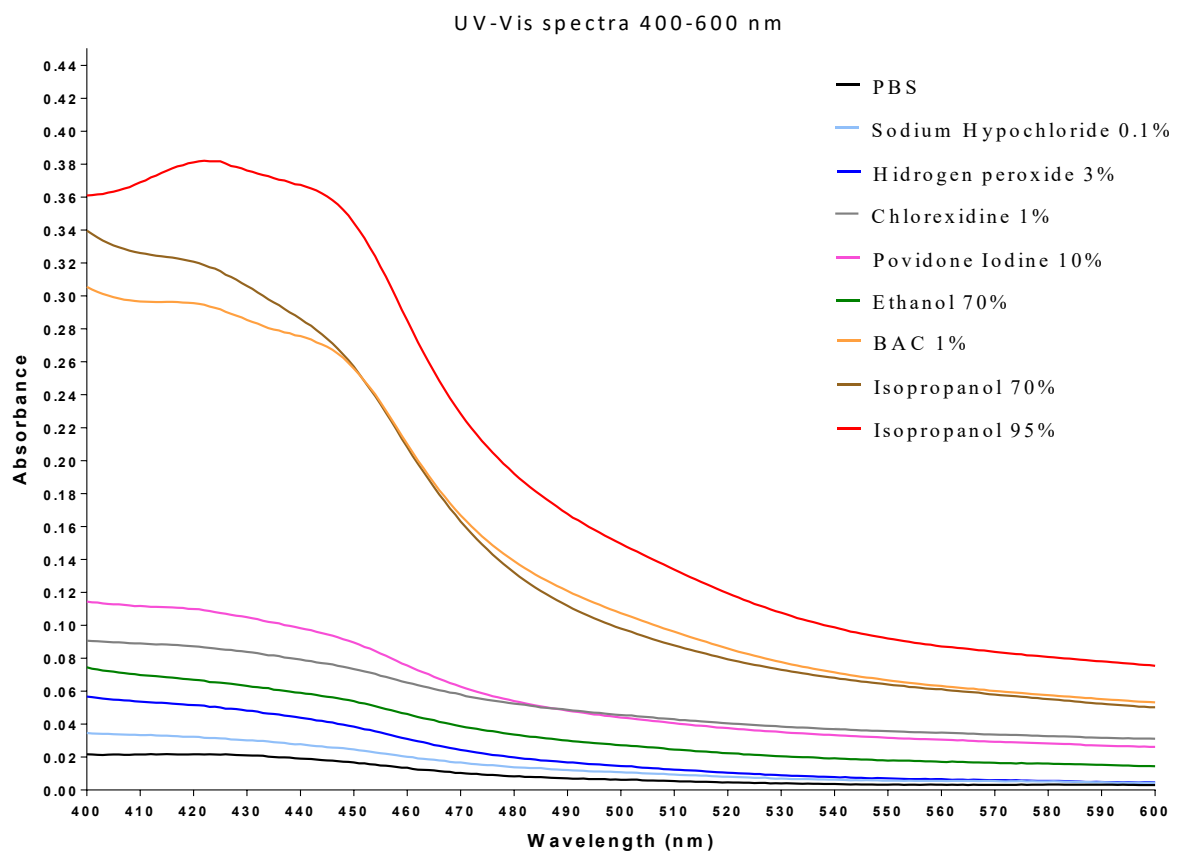


Figura 4h: Curve di assorbimento VIS nella regione tra 400 e 600 nm dei campioni dopo un periodo di contatto con differenti biocidi per 15 minuti e successivo contatto di 45 minuti con PBS.

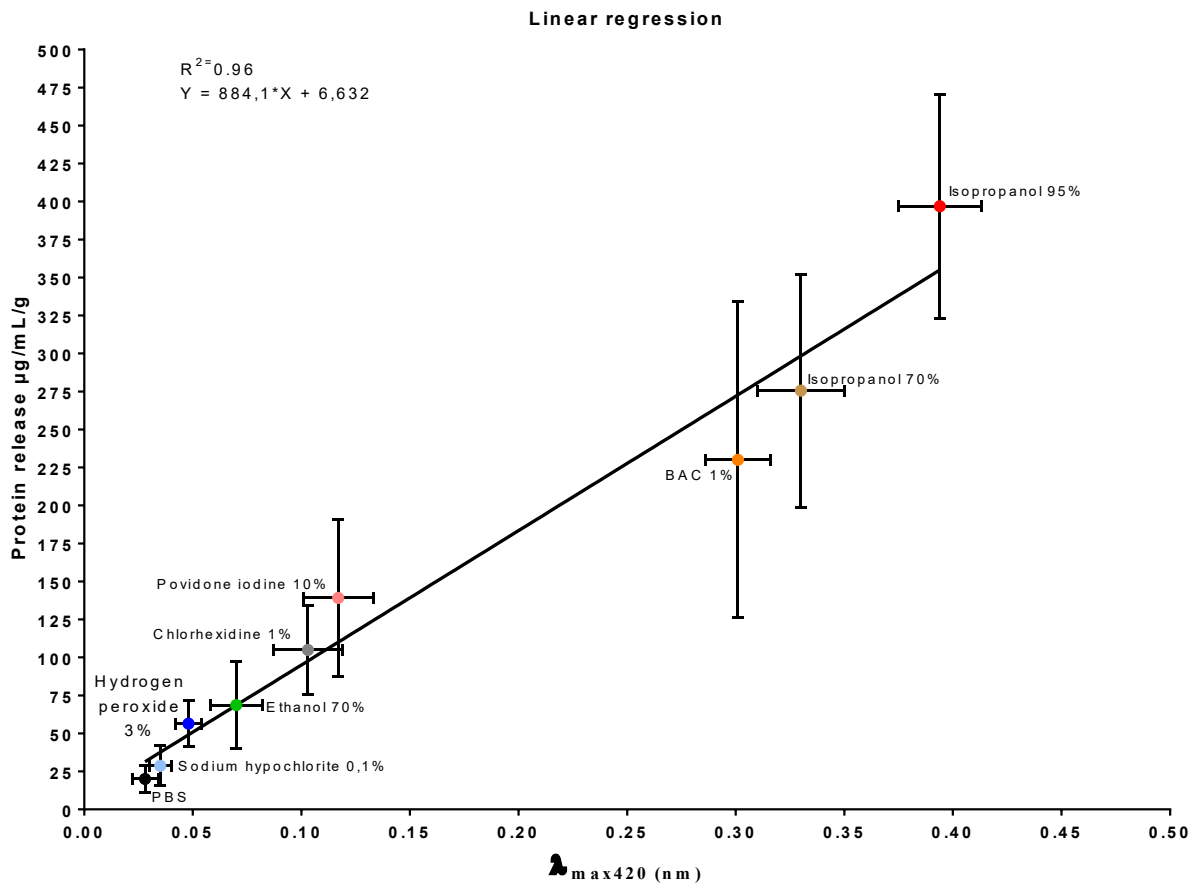


Figura 4i: Correlazione lineare tra i valori di $\lambda_{max420nm}$ e la concentrazione di proteine nel muco ($R^2=0.96$) I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Analisi discriminante lineare (LDA)

Il grafico dei centroidi dell'analisi LDA eseguita senza i dati relativi $\lambda_{max420nm}$ è mostrato in figura 4l. Sugli assi ci sono le combinazioni lineari delle variabili con la più alta percentuale di discriminazione estratta dall'analisi. Sull'asse delle x è rappresentato il fattore uno (F1) con l'89,44% di discriminazione e sull'asse delle y è il fattore due (F2) con l'8,72%. La somma dei due fattori (F1 e F2) ha raggiunto una discriminazione totale del 98,16%.

Dei nove disinfettanti testati, tre sono stati completamente discriminati (PBS, etanolo 70% e isopropanolo 95%), mentre i rimanenti sono stati raggruppati in tre gruppi distinti (perossido di idrogeno 3%-ipoclorito di sodio 0.1%; clorexidina 1%-iodio pevidone 10% e BAC 1%-isopropanolo 70%).

Il grafico dei centroidi dell'analisi discriminante eseguita includendo i valori di $\lambda_{\max 420\text{nm}}$ è mostrato in figura 3m. Sugli assi sono mostrate le combinazioni lineari delle variabili in esame con la più alta percentuale discriminata estratta dall'analisi. Sull'asse x si trova il fattore uno (F1) con il 95,62% di discriminazione e sull'asse y il fattore due (F2) con il 4,09%. La somma dei due fattori (F1 e F2) ha raggiunto una percentuale totale di discriminazione del 99.71%. Tutti i nove disinfettanti testati sono stati completamente discriminati.

La tabella 4b mostra le percentuali di previsione corrette suddivise per ogni classe (disinfettanti testati) per i due modelli analizzati ($\lambda_{\max 420}$ ed escludendo i dati $\lambda_{\max 420}$).

I dati relativi alla variabile $\lambda_{\max 420}$ hanno aumentato le percentuali delle previsioni corrette totali del 16.05%. Le classi che hanno mostrato il maggiore aumento nelle previsioni corrette sono state BAC 1% (aumento del 55.55%), iodio povidone 10% (33.33%) e isopropanolo 70% (22.22%). ipoclorito di sodio 0,1%, perossido di idrogeno 3% ed etanolo 70% hanno avuto un aumento modesto (11.11%), mentre PBS, clorexidina 1% e isopropanolo 95% non hanno avuto alcun aumento

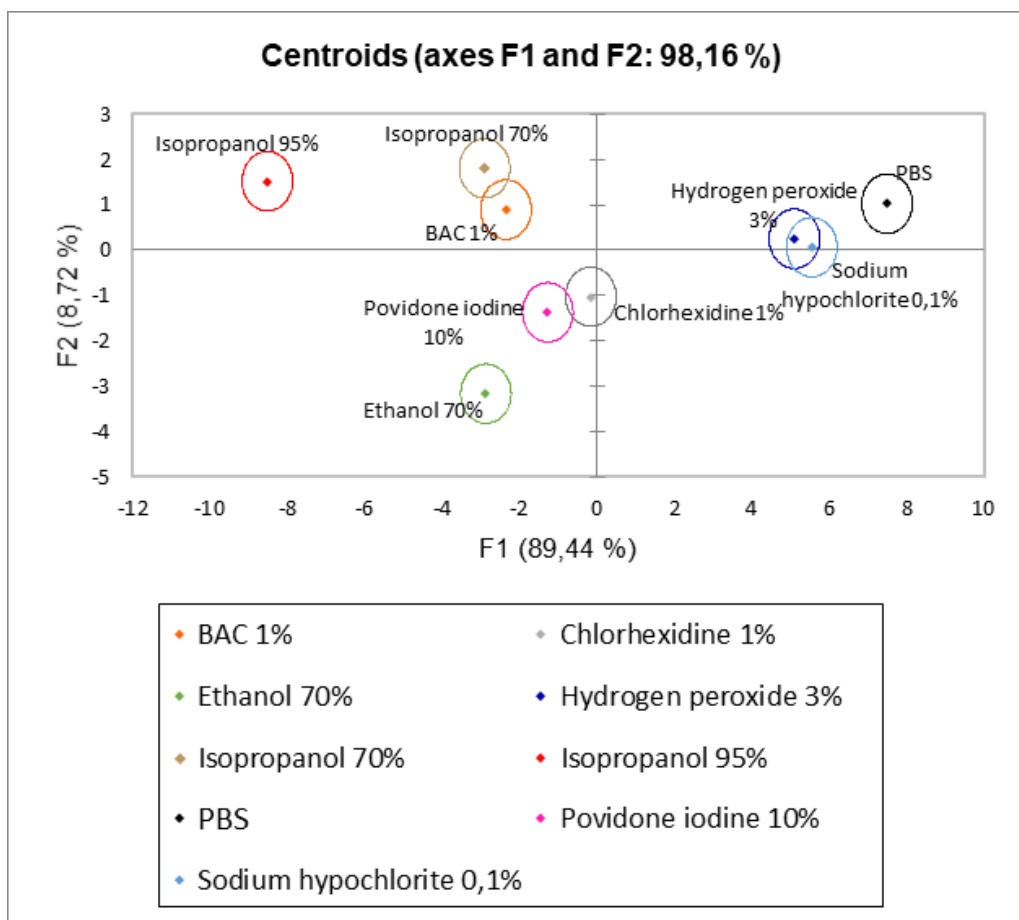


Figura 4l: Grafico dei centroidi analisi LDA escludendo i valori $\lambda_{max420nm}$. F1 (asse x) e F2 (asse y) sono gli assi dei fattori estratti dalle variabili originali. Per ogni fattore, la percentuale di discriminazione, sia individuale che cumulativa, è riportata tra parentesi.

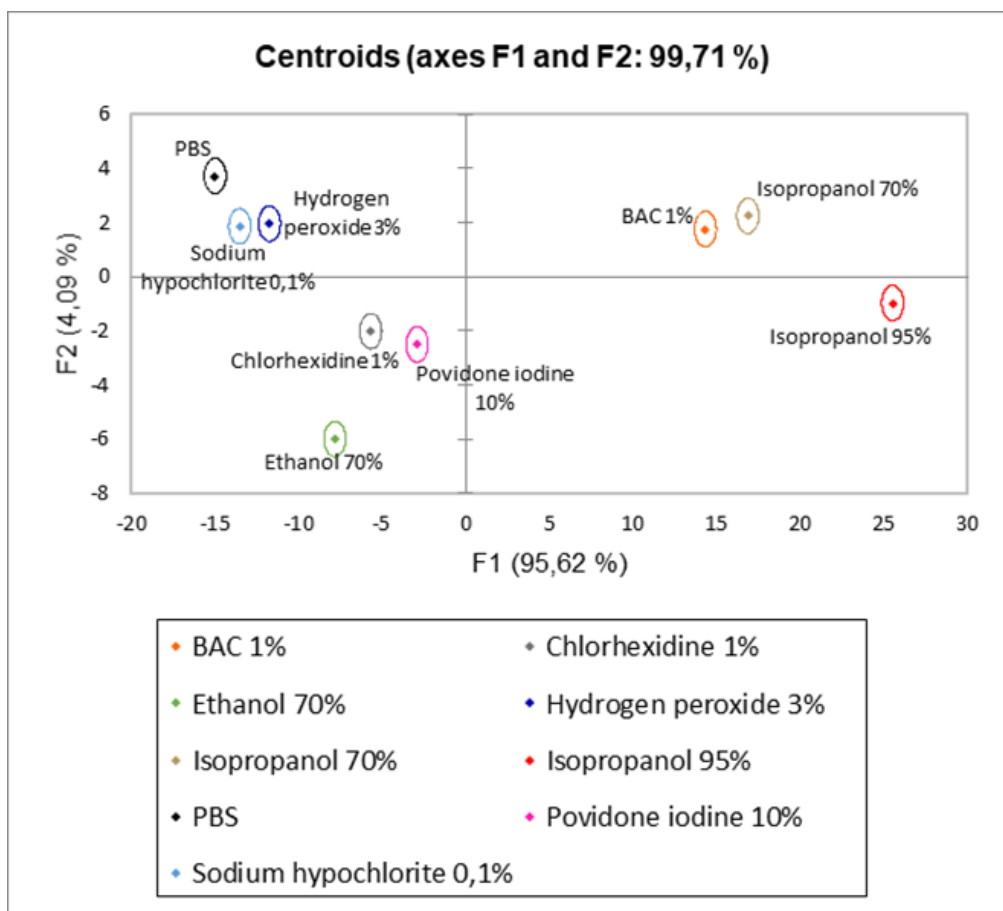


Figura 4m: Grafico dei centroidi analisi LDA includendo i valori $\lambda_{\max 420\text{nm}}$. F1 (asse x) e F2 (asse y) sono gli assi dei fattori estratti dalle variabili originali. Per ogni fattore, la percentuale di discriminazione, sia individuale che cumulativa, è riportata tra parentesi.

CHEMICALS	% CORRECT LDA Λ_{MAX420}	% CORRECT LDA W/O Λ_{MAX420}	Δ (% CORRECT DA Λ_{MAX420} – % CORRECT LDA W/O Λ_{MAX420})
PBS	100	100	0
SODIUM HYPOCHLORITE 0,1%	88.89	77.78	11.11
HYDROGEN PEROXIDE 3%	77.77	66.67	11.11
CHLORHEXIDINE 1%	88.89	88.89	0
POVIDONE IODINE 10%	100	66.67	33.33
ETHANOL 70%	100	88.89	11.11
BAC 1%	77.78	22,22	55.55
ISOPROPANOL 70%	100	77.78	22.22
ISOPROPANOL 95%	100	100	0
TOTALE	92,59%	76,54%	16,05

Tabella 3b: % di accuratezza della matrice di confusione dei campioni testati.

4.2.4 Discussione

Le principali vie di trasmissione della SARS-CoV-2 sono quelle interumane per via aerea e il contatto con le superfici contaminate, di conseguenza le misure di prevenzione sanitarie e comunitarie includono l'uso regolare di disinfettanti per superfici e disinfettanti per le mani [258]. La persistenza del coronavirus in forma infettiva sulle superfici ha determinato l'uso intensivo di disinfettanti chimici sia dalle professioni sanitarie che dal pubblico in generale [259]. Numerosi studi hanno riportato un uso improprio, non conforme alle indicazioni dei produttori, dei disinfettanti chimici per superfici prescritti contro la diffusione della SARS-CoV-2 [260], ciò ha causato un aumento del tasso di rischio di avvelenamento [261]. Inoltre, un lavoro condotto da Casey *et al.*, aveva già stabilito una correlazione tra l'uso di routine di disinfettanti chimici e gli effetti irritanti sulle mucose e sulle vie respiratorie [262]. Secondo questo lavoro i rischi di irritazione sulle mucose sono più alti negli operatori sanitari, quindi l'esposizione ripetuta ai

disinfettanti dovrebbe essere valutata come fattore di rischio per le malattie professionali nella stesura dei protocolli di disinfezione sanitaria.

In questo scenario, lo scopo dello studio è stato discriminare, utilizzando un modello alternativo *in vivo* di mucosa, il potenziale irritante di nove disinfettanti usati per oggetti e superfici contro la diffusione della SARS-CoV-2.

A tal fine, la lumaca di terra *L. flavus* è stata impiegata come modello di mucosa invece della *A. lusitanicus* specie comunemente utilizzata nel test SMI (slug mucosal irritation) [242]. Oltre alle caratteristiche in comune tra la specie *A. lusitanicus* (epitelio mucoso, effetto irritante facilmente osservabile, vulnerabilità ai danni meccanici o chimici) e la *L. flavus*, quest'ultima possiede caratteristiche uniche che la rendono un candidato adatto alla valutazione del potenziale irritante di sostanze chimiche.

Come nel modello di mucosa che utilizza la specie *A. lusitanicus*, la produzione di muco, i cambiamenti di peso, il contenuto proteico e l'attività dell'enzima lattato deidrogenasi sono stati valutati come principali *readout* [229].

Per la prima volta in questo studio, la colorazione del muco è stata utilizzata come parametro per la valutazione del potenziale irritante dei disinfettanti testati. Anche se la natura chimica del pigmento che conferisce al muco la colorazione è sconosciuta, questo fenomeno è già stato descritto in altre specie di lumache di terra [263, 264].

Gli spettri UV-Vis dei campioni di muco recuperati dalla lumaca trattata con disinfettante (figura 4h) hanno rivelato un picco massimo di assorbanza a 420nm (λ_{max}). Questi valori di assorbanza sono stati correlati con i rispettivi dati ottenuti dalla quantificazione delle proteine del muco (figura 4i). L'analisi di correlazione lineare ha dimostrato una proporzionalità diretta tra le due variabili ($R^2 = 0.96$). Questi risultati supportano l'ipotesi che, come le proteine (figura 4f), il pigmento viene rilasciato in condizioni di stress.

La valutazione del potenziale irritante delle mucose basata sul confronto delle singole letture ha fornito una difficile interpretazione dei risultati (Tabella 4a). Sebbene sia stata dimostrata una correlazione tra la pigmentazione gialla e il rilascio di proteine (figura 3i), lo stesso non è stato osservato per le variazioni di peso %, la produzione di muco % e il rilascio della lattato deidrogenasi.

Per questo motivo, la discriminazione del potenziale di irritazione mucosale dei disinfettanti in esame è stata valutata mediante un modello di previsione di classificazione (LDA) che ha tenuto conto sia delle singole letture (osservazioni) sia della combinazione tra tutti i parametri.

Sono state eseguite due diverse analisi LDA, nella prima (LDA w/o $\lambda_{\max 420}$) sono state prese in considerazione quattro osservazioni comuni ad entrambe le specie di lumache (% variazioni di peso, % produzione di muco, deidrogenasi lattata e quantificazione delle proteine). Il tasso di discriminazione totale per questo modello, definito come la somma delle combinazioni lineari delle osservazioni (assi F1 e F2) era del 98.16%. Tuttavia, solo tre delle nove osservazioni sono state completamente discriminate (Figura 4l).

Nel secondo modello (LDA $\lambda_{\max 420}$), è stata inclusa la pigmentazione gialla del muco ($\lambda_{\max 420}$). I dati relativi all'assorbanza hanno aumentato il suo potere discriminatorio (assi F1 e F2 99.71%) che la capacità predittiva. Infatti, tutte le nove osservazioni sono state discriminate (Figura 4m).

La capacità predittiva di entrambi i modelli è stata riportata in tabella 4b. Le previsioni corrette (% corrette) sono riassunte in percentuale e divise sia per ogni classe (disinfettanti testati) che come previsione totale. Il confronto dei modelli elaborati ($\Delta\%$ corretto) ha mostrato un aumento della capacità predittiva sia per le classi totali (16.05%) che per sei dei nove prodotti chimici testati.

Questi risultati dimostrano il contributo dei dati ottenuti dall'analisi spettrofotometrica nella discriminazione delle classi secondo il loro potenziale di irritazione delle mucose.

A causa della migliore discriminazione e capacità predittiva del modello LDA $\lambda_{\max 420}$, i suoi dati D^2 (distanza Mahalanobis) dal PBS (D^2 PBS LDA $\lambda_{\max 420}$) sono stati utilizzati per classificare i disinfettanti testati secondo il potenziale di irritazione delle mucose (Tabella 4c).

Questo parametro è stato scelto per il suo significato statistico. I valori di d^2 permettono l'assegnazione dei gruppi per ogni osservazione.

Infatti, quando il valore D^2 tra un'osservazione (*readout*) e il centro del gruppo (calcolato come media) era più piccolo, allora quell'osservazione poteva essere classificata in quel gruppo. La LDA ha fornito valori D^2 per ogni gruppo, chiamati funzione discriminante lineare. Per ogni osservazione, il gruppo con la D^2 più piccola aveva la funzione discriminante lineare più grande, pertanto l'osservazione è stata classificata in quel gruppo [265]. Poiché il PBS è stato usato come controllo (nessun potenziale di irritazione), i suoi valori di distanza Mahalanobis sono stati scelti per la classificazione.

Utilizzando i valori dell'intervallo D^2 , è stata stabilita una classificazione dei disinfettanti testati (Tabella 4c) secondo un punteggio numerico (da 0 a 7) e un grado di effetti (da non irritante a estremamente elevato).

CHEMICALS	D ² PBS LDA Λ_{MAX420}	RANGE	SCORE	GRADE
PBS	5	0 to 5	0	none
SODIUM HYPOCHLORITE 0.1%	11	11 to 20	1	low
HYDROGEN PEROXIDE 3%	20			
CHLORHEXIDINE 1%	132	20 to 132	2	mild
POVIDONE IODINE 10%	155	132 to 155	3	average
ETHANOL 70%	196	155 to 196	4	average-high
BAC 1%	878	196 to 878	5	high
ISOPROPANOL 70%	1031	878 to 1031	6	very high
ISOPROPANOL 95%	1676	1031 to 1676	7	extremely high

Tabella 4c: Discriminazione del potenziale di irritazione sulle mucose dei biocidi comunemente utilizzati nella disinfezione

Il modello di irritazione mucosale che utilizza la lumaca come surrogato ai mammiferi si è dimostrato un valido strumento per discriminare il potenziale di irritazione di sostanze chimiche, formulazioni farmaceutiche e cosmetiche [251, 266].

L'elevata predittività dell'SMI *assay* è stata dimostrata anche in studi di comparazione con il modello di mucosa di coniglio dove sono stati osservati risultati sovrapponibili tra i due modelli [267, 268].

Nel nostro studio abbiamo utilizzato la specie *L. flavus* invece della più utilizzata *A. lusitanicus* inoltre abbiamo testato concentrazioni e sostanze diverse rispetto a quelle dei precedenti SMI *assay*. Basandoci sui precedenti test abbiamo ottimizzato il protocollo al fine di testare le sostanze disinfettanti alle concentrazioni prescritte dai protocolli internazionali di disinfezione e per introdurre un nuovo *readout* che ci ha consentito di aumentare il potere discriminante del test SMI.

La validità della specie *L. flavus* nell'SMI test è stata appurata anche in alcuni precedenti studi [256, 269].

Nello studio condotto da Dhont *et al.*, è stato dimostrato che la specie di lumaca *L. flavus* può essere utilizzata per valutare il potenziale irritante delle sostanze chimiche utilizzando gli stessi *end-points*, senza influire sulla concordanza e sulla specificità del test condotto con la specie *A. lusitanicus* [256]. A nostra conoscenza, tra le sostanze utilizzate nel presente studio solo l'etanolo la clorexidina e l'isopropanolo sono state testate precedentemente in studi di tossicità condotti sulle lumache (escludendo il PBS e il BAC utilizzati nell'SMI come sostanza controllo) [228, 229, 242, 251, 270].

Tuttavia queste sostanze sono state utilizzate a concentrazioni differenti rispetto a quelle utilizzate in questo studio (ad eccezione del benzalconio cloruro). Il benzalconio cloruro testato in precedenti SMI *assay* alla concentrazione dell'1% è stato classificato come molto irritante per le mucose [242]. Anche nel presente lavoro il benzalconio cloruro 1% (w/V) si è rilevato tra i disinfettanti più irritanti. L'etanolo in studi precedenti è stato testato mediante l'SMI test alla concentrazione dell'1%, 3.5% e 10%, la clorexidina alla concentrazione del 3.5% e l'isopropanolo alla concentrazione del 10%. L'etanolo testato alla concentrazione del 10% è stato classificato non irritante [270]. Mentre, l'isopropanolo testato alla concentrazione del 10% è stato classificato come irritante [251]. Ciò conferma l'elevata tossicità dell'isopropanolo sulla mucosa della lumaca come rilevato anche nel nostro saggio. La clorexidina testata in precedenti studi alla concentrazione del 3.5% si è rilevata tossica sulla mucosa dell'*A. lusitanicus* pertanto è stata classificata come irritante [229]. Da questi dati emerge che la concentrazione delle sostanze chimiche è molto importante ed influenza in maniera determinante l'esito del test. A differenza dei precedenti studi in cui le concentrazioni delle sostanze chimiche testate erano tutte uguali tra loro, in quanto lo scopo era quello di caratterizzare in maniera assoluta la tossicità delle sostanze, in questo lavoro abbiamo testato le sostanze

utilizzando concentrazioni differenti tra loro. Questo per discriminare il potenziale irritante delle sostanze utilizzate comunemente nella disinfezione alle concentrazioni prescritte dalle linee guida internazionali. In conclusione, sebbene siano necessari ulteriori studi sulla composizione chimica e sui meccanismi di rilascio del muco in relazione agli stimoli chimici, la specie *L. flavus* si è rivelata una valida alternativa alla specie *A. lusitanicus* nel discriminare il potenziale irritante sulle mucose di nove disinfettanti utilizzati per contrastare la diffusione della SARS-CoV-2. Visti i promettenti risultati ottenuti, ulteriori studi verranno effettuati al fine di ottimizzare la traslabilità del modello e la sua applicabilità anche per lo screening di formulazioni farmaceutiche ad uso topico, medical device e cosmetici.

5.0 Conclusioni

I modelli comunemente impiegati nella ricerca scientifica per gli studi *in vivo* sono i mammiferi e in particolare i modelli murini. Tuttavia, il loro uso è spesso ostacolato da motivi etici, di bilancio e logistici ciò comporta un rallentamento del progresso scientifico. Lo sviluppo di approcci alternativi utilizzando specie invertebrate offre vantaggi economici ed etici rispetto ai mammiferi, inoltre non richiedendo approvazioni etiche e limitazioni sul numero di animali che possono essere utilizzati sono adatti per condurre esperimenti di screening permettendo di ridurre l'utilizzo dei mammiferi.

Nonostante i numerosi vantaggi nel condurre test *in vivo* utilizzando specie invertebrate bisogna sottolineare che questi modelli, ad eccezione della *Drosophila* e del *C. elegans*, sono ancora in una fase di sviluppo iniziale. Tra i principali limiti che impediscono la piena espansione di questi modelli vi sono la mancanza di centri di allevamento che forniscono ceppi allevati in condizioni standard e la disponibilità limitata di informazioni sul genoma.

Nel presente lavoro sono stati proposti alcuni modelli preclinici non convenzionali per condurre studi sull'attività e sulla tossicità *in vivo* di sostanze chimiche e biologiche. Risultati promettenti sono stati ottenuti dal lepidottero *Galleria mellonella* che si è dimostrato un modello preclinico affidabile sia per lo screening di sostanze antimicrobiche naturali, probiotici che per lo studio del rapporto ospite-parassita. Infatti, lo studio dell'attività della berberina, *in vitro* e *in vivo* utilizzando le larve di *G. mellonella*, ha fornito dei risultati promettenti nei confronti di ceppi patogeni di *E. coli* urinari aprendo a nuove possibili applicazioni di questo alcaloide nel trattamento e nella prevenzione delle infezioni urinarie. Data la sovrapposizione tra i meccanismi dell'immunità innata di *G. mellonella* con quelli dei mammiferi è stata valutata l'attività

del desametasone 21-fosfato disodico sulla dinamica dell'infezione delle larve infettate con ceppi patogeni di *E. coli* e *S. aureus* e la variazione dell'espressione di alcuni geni del pathway immunitario. I dati mostrati implementano le nostre conoscenze su questo modello e offrono numerosi spunti di ricerca per lo studio dell'attività degli immunosoppressori sul decorso dell'infezione in *G. mellonella*.

L'*host G. mellonella* è stato adottato anche per lo studio di ceppi potenzialmente probiotici. Per la prima volta, è stata valutata *in vivo* l'attività protettiva di *A. muciniphila* nei confronti di ceppi di *E. coli* patogeni, confermando le potenzialità del modello *G. mellonella* per valutare l'interazione e la competizione *in vivo* tra i microrganismi. Inoltre è stato ipotizzato un innovativo modello *in vivo* per lo screening e la valutazione della capacità di adesione nell'intestino di ceppi probiotici somministrati per via orale nelle larve. I dati ottenuti in questo studio documentano che i ceppi di *L. plantarum* esaminati sono in grado di aderire nell'intestino di *G. mellonella* con una capacità di adesione ceppo dipendente.

Il tratto intestinale degli insetti presenta un elevato grado di conservazione evolutiva con quello dei mammiferi sia strutturale che funzionale. Partendo da questa considerazione, al fine di sviluppare un nuovo modello di infiammazione intestinale, è stato indotto un danno tissutale al midgut della specie di coleottero *Tenebrio molitor* mediante somministrazione di destrano sodio solfato (DSS). Il danno intestinale è stato rilevato mediante analisi macroscopica, istologica e valutazione del rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi. Sebbene questo modello non possa riflettere tutti gli aspetti della patologia umana, data la mancanza dell'immunità adattiva, potenzialmente potrà essere utilizzato come strumento per lo studio della rigenerazione tissutale e per lo screening iniziale dell'attività di sostanze e probiotici sull'epitelio intestinale.

Infine è stato messo a punto un modello di mucosa per determinare il potenziale irritante di sostanze chimiche e in particolare dei biocidi. Il modello utilizza la specie di lumaca *Limacus flavus*, che presenta, un tessuto mucoso esterno, simile a quello umano, non cheratinizzato e costituito da un epitelio monostratificato. Rispetto allo slug mucosal irritation assay (SMI), è stato proposto un nuovo *readout*, misurando per via spettrofotometrica la colorazione del muco, che ha aumentato il potere di discriminazione del potenziale tossicità mucosale di sostanze chimiche. Questo test ha permesso di classificare il potenziale irritante dei biocidi utilizzati comunemente nella disinfezione alle concentrazioni prescritte dalle linee guida internazionali.

In conclusione, questi modelli nonostante alcune limitazioni si sono dimostrati idonei per effettuare screening rapidi e riproducibili che non richiedono strumenti sofisticati e che sono in linea con le normative vigenti sulla tutela della sperimentazione animale.

Bibliografia

1. Denayer, T.; Stöhr, T.; Van Roy, M., Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine* **2014**, 2, (1), 5-11.
2. Clark, R. E.; Squire, L. R., An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia* **2010**, 48, (8), 2234-2244.
3. Wojda, I., Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect science* **2017**, 24, (3), 342-357.
4. Graham, M. L.; Prescott, M. J., The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *European journal of pharmacology* **2015**, 759, 19-29.
5. Ignasiak, K.; Maxwell, A., *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC research notes* **2017**, 10, (1), 428.
6. Glavis-Bloom, J.; Muhammed, M.; Mylonakis, E., Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. In *Recent Advances on Model Hosts*, Springer: 2012; pp 11-17.
7. Adamski, Z.; Bufo, S. A.; Chowański, S.; Falabella, P.; Lubawy, J.; Marciniak, P.; Pacholska-Bogalska, J.; Salvia, R.; Scrano, L.; Słocińska, M., Beetles as model organisms in physiological, biomedical and environmental studies—a review. *Frontiers in physiology* **2019**, 10, 319.
8. Tsai, C. J.-Y.; Loh, J. M. S.; Proft, T., *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* **2016**, 7, (3), 214-229.
9. Scully, L. R.; Bidochka, M. J., Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens. *FEMS microbiology letters* **2006**, 263, (1), 1-9.
10. Conery, A. L.; Larkins-Ford, J.; Ausubel, F. M.; Kirienko, N. V., High-throughput screening for novel anti-infectives using a *C. elegans* pathogenesis model. *Current protocols in chemical biology* **2014**, 6, (1), 25-37.
11. Festing, S.; Wilkinson, R., The ethics of animal research: talking point on the use of animals in scientific research. *EMBO reports* **2007**, 8, (6), 526-530.
12. Guillén, J.; Prins, J.-B.; Howard, B.; Degryse, A.-D.; Gyger, M., The European framework on research animal welfare regulations and guidelines. In *Laboratory Animals*, Elsevier: 2018; pp 117-202.
13. Sneddon, L. U.; Halsey, L. G.; Bury, N. R., Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *Journal of Experimental Biology* **2017**, 220, (17), 3007-3016.
14. Botta, G., SIGNIFICATO E CONSEGUENZE DELLA DIRETTIVA EUROPEA 2010/63/UE PER L'ITALIA. *Francesca Zoratto (b), Igor Branchi (b) e Alessandra Berry (b)* 11, 14.
15. http://www.salute.gov.it/portale/ministro/p4_8_0.jsp?lingua=italiano&label=servizionline&idMat=SA&idAmb=PA&idSrv=SPE&flag=P Autorizzazione di progetti di ricerca con l'impiego di animali a fini scientifici.
16. Irazoqui, J. E.; Urbach, J. M.; Ausubel, F. M., Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nature Reviews Immunology* **2010**, 10, (1), 47-58.

17. Browne, N.; Heelan, M.; Kavanagh, K., An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* **2013**, *4*, (7), 597-603.
18. Kavanagh, K.; Reeves, E. P., Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews* **2004**, *28*, (1), 101-112.
19. Cutuli, M. A.; Petronio Petronio, G.; Vergalito, F.; Magnifico, I.; Pietrangelo, L.; Venditti, N.; Di Marco, R., Galleria mellonella as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence* **2019**, *10*, (1), 527-541.
20. Piatek, M.; Sheehan, G.; Kavanagh, K., Utilising Galleria mellonella larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. *Pathogens and Disease* **2020**, *78*, (8), ftaa059.
21. Kwadha, C. A.; Ong'amo, G. O.; Ndegwa, P. N.; Raina, S. K.; Fombong, A. T., The biology and control of the greater wax moth, Galleria mellonella. *Insects* **2017**, *8*, (2), 61.
22. Nathan, S., New to Galleria mellonella: modeling an ExPEC infection. *Virulence* **2014**, *5*, (3), 371-374.
23. Kemp, M.; Massey, R. C., The use of insect models to study human pathogens. *Drug Discovery Today: Disease Models* **2007**, *4*, (3), 105-110.
24. Cooper, D.; Eleftherianos, I., Memory and specificity in the insect immune system: current perspectives and future challenges. *Frontiers in Immunology* **2017**, *8*, 539.
25. Brunke, S.; Quintin, J.; Kasper, L.; Jacobsen, I. D.; Richter, M. E.; Hiller, E.; Schwarzmüller, T.; d'Enfert, C.; Kuchler, K.; Rupp, S., Of mice, flies—and men? Comparing fungal infection models for large-scale screening efforts. *Disease models & mechanisms* **2015**, *8*, (5), 473-486.
26. Pereira, M. F.; Rossi, C. C., Overview of rearing and testing conditions and a guide for optimizing Galleria mellonella breeding and use in the laboratory for scientific purposes. *Apmis* **2020**, *128*, (12), 607-620.
27. Wrońska, A. K.; Boguś, M. I.; Włóka, E.; Kazek, M.; Kaczmarek, A.; Zalewska, K., Cuticular fatty acids of Galleria mellonella (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic Conidiobolus coronatus. *PLoS One* **2018**, *13*, (3), e0192715.
28. Sheehan, G.; Garvey, A.; Croke, M.; Kavanagh, K., Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence* **2018**, *9*, (1), 1625-1639.
29. Vilmos, P.; Kurucz, E., Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology letters* **1998**, *62*, (2), 59-66.
30. Vallet-Gely, I.; Lemaitre, B.; Boccard, F., Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology* **2008**, *6*, (4), 302-313.
31. Pereira, T. C.; De Barros, P. P.; Fugisaki, L. R. d. O.; Rossoni, R. D.; Ribeiro, F. d. C.; De Menezes, R. T.; Junqueira, J. C.; Scorzoni, L., Recent advances in the use of Galleria mellonella model to study immune responses against human pathogens. *Journal of Fungi* **2018**, *4*, (4), 128.
32. MELLANBY, K., The functions of insect blood. *Biological reviews* **1939**, *14*, (3), 243-260.
33. Grizanov, E.; Dubovskiy, I.; Whitten, M.; Glupov, V., Contributions of cellular and humoral immunity of Galleria mellonella larvae in defence against oral infection by Bacillus thuringiensis. *Journal of invertebrate pathology* **2014**, *119*, 40-46.
34. Wu, G.; Liu, Y.; Ding, Y.; Yi, Y., Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from Galleria mellonella larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell* **2016**, *48*, (4), 297-304.
35. Tojo, S.; Naganuma, F.; Arakawa, K.; Yokoo, S., Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, Galleria mellonella. *Journal of Insect Physiology* **2000**, *46*, (7), 1129-1135.

36. Kim, C. H.; Shin, Y. P.; Noh, M. Y.; Jo, Y. H.; Han, Y. S.; Seong, Y. S.; Lee, I. H., An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, (33), 25243-25250.
37. Vogel, H.; Altincicek, B.; Glöckner, G.; Vilcinskas, A., A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC genomics* **2011**, 12, (1), 308.
38. Dziarski, R.; Gupta, D., The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome biology* **2006**, 7, (8), 232.
39. Halwani, A.; Niven, D.; Dunphy, G., Apolipophorin-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **2000**, 76, (4), 233-241.
40. Niere, M.; Meißlitzer, C.; Dettloff, M.; Weise, C.; Ziegler, M.; Wiesner, A., Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipophorin III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1999**, 1433, (1-2), 16-26.
41. Park, S. Y.; Kim, C. H.; Jeong, W. H.; Lee, J. H.; Seo, S. J.; Han, Y. S.; Lee, I. H., Effects of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*. *Developmental & Comparative Immunology* **2005**, 29, (1), 43-51.
42. Li, D.; Scherfer, C.; Korayem, A. M.; Zhao, Z.; Schmidt, O.; Theopold, U., Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect biochemistry and molecular biology* **2002**, 32, (8), 919-928.
43. Bergin, D.; Reeves, E. P.; Renwick, J.; Wientjes, F. B.; Kavanagh, K., Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infection and immunity* **2005**, 73, (7), 4161-4170.
44. Pech, L. L.; Strand, M. R., Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of cell science* **1996**, 109, (8), 2053-2060.
45. Büyükgüzel, E.; Tunaz, H.; Stanley, D.; Büyükgüzel, K., Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *Journal of insect physiology* **2007**, 53, (1), 99-105.
46. Mukherjee, K.; Amsel, D.; Kalsy, M.; Billion, A.; Dobrindt, U.; Vilcinskas, A., MicroRNAs regulate innate immunity against uropathogenic and commensal-like *Escherichia coli* infections in the surrogate insect model *Galleria mellonella*. *Scientific reports* **2020**, 10, (1), 1-11.
47. Mak, P.; Zdybicka-Barabas, A.; Cytryńska, M., A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Developmental & Comparative Immunology* **2010**, 34, (10), 1129-1136.
48. Vilcinskas, A.; Wedde, M., Insect inhibitors of metalloproteinases. *IUBMB life* **2002**, 54, (6), 339-343.
49. Brown, S. E.; Howard, A.; Kasprzak, A. B.; Gordon, K. H.; East, P. D., A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect biochemistry and molecular biology* **2009**, 39, (11), 792-800.
50. Eisenhardt, M.; Schlupp, P.; Höfer, F.; Schmidts, T.; Hoffmann, D.; Czermak, P.; Pöppel, A. K.; Vilcinskas, A.; Runkel, F., The therapeutic potential of the insect metalloproteinase inhibitor against infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2019**, 71, (3), 316-328.
51. Kopáček, P.; Weise, C.; Götz, P., The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect biochemistry and molecular biology* **1995**, 25, (10), 1081-1091.

52. Söderhäll, K.; Cerenius, L., Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology* **1998**, 10, (1), 23-28.
53. Lu, A.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Yang, B.; Wu, K.; Xie, W.; Luan, Y.-X.; Ling, E., Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in physiology* **2014**, 5, 252.
54. Eleftherianos, I.; Revenis, C., Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Journal of innate immunity* **2011**, 3, (1), 28-33.
55. ANWAR mohamed, A.; Ansari, M. J.; Al-Ghamdi, A.; Mohamed, M. O.; Kaur, M., Effect of larval nutrition on the development and mortality of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Revista Colombiana de Entomología* **2014**, 40, (1), 49-54.
56. Mowlds, P.; Kavanagh, K., Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia* **2008**, 165, (1), 5-12.
57. Champion, O. L.; Wagley, S.; Titball, R. W., *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence* **2016**, 7, (7), 840-845.
58. Li, Y.; Spiropoulos, J.; Cooley, W.; Khara, J. S.; Gladstone, C. A.; Asai, M.; Bossé, J. T.; Robertson, B. D.; Newton, S. M.; Langford, P. R., *Galleria mellonella*-a novel infection model for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **2018**, 9, (1), 1126-1137.
59. Petronio Petronio, G.; Cutuli, M. A.; Magnifico, I.; Venditti, N.; Pietrangelo, L.; Vergalito, F.; Pane, A.; Scapagnini, G.; Di Marco, R., In Vitro and In Vivo Biological Activity of Berberine Chloride against Uropathogenic *E. coli* Strains Using *Galleria mellonella* as a Host Model. *Molecules* **2020**, 25, (21), 5010.
60. Fedhila, S.; Buisson, C.; Dussurget, O.; Serror, P.; Glomski, I.; Liehl, P.; Lereclus, D.; Nielsen-LeRoux, C., Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *Journal of invertebrate pathology* **2010**, 103, (1), 24-29.
61. Konkel, M. E.; Tilly, K., Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes and Infection* **2000**, 2, (2), 157-166.
62. Kamal, F.; Peters, D. L.; McCutcheon, J. G.; Dunphy, G. B.; Dennis, J. J., Use of Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella*) as an Alternative Animal Infection Model for Analysis of Bacterial Pathogenesis. In *Bacteriophages*, Springer: 2019; pp 163-171.
63. Loh, J. M.; Adenwalla, N.; Wiles, S.; Proft, T., *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* **2013**, 4, (5), 419-428.
64. Mead, G. P.; Ratcliffe, N. A.; Renwantz, L. R., The separation of insect haemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. *Journal of Insect Physiology* **1986**, 32, (2), 167-177.
65. Bergin, D.; Brennan, M.; Kavanagh, K., Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes and infection* **2003**, 5, (15), 1389-1395.
66. Maguire, R.; Kunc, M.; Hyrs, P.; Kavanagh, K., Analysis of the acute response of *Galleria mellonella* larvae to potassium nitrate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2017**, 195, 44-51.
67. Vergis, J.; Malik, S.; Pathak, R.; Kumar, M.; Ramanjaneya, S.; Kurkure, N. V.; Barbudhe, S. B.; Rawool, D. B., Antimicrobial efficacy of Indolicidin against multi-drug resistant enteroaggregative *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in microbiology* **2019**, 10, 2723.
68. Pereira, M. F.; Rossi, C. C.; de Queiroz, M. V.; Martins, G. F.; Isaac, C.; Bosse, J. T.; Li, Y.; Wren, B. W.; Terra, V. S.; Cuccui, J., *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Microbiology* **2015**, 161, (2), 387-400.

69. de Melo, N. R.; Abdrahman, A.; Greig, C.; Mukherjee, K.; Thornton, C.; Ratcliffe, N. A.; Vilcinskis, A.; Butt, T. M., Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida* pathogenesis. *PLoS One* **2013**, *8*, (11), e78905.
70. Sheehan, G.; Kavanagh, K., Proteomic analysis of the responses of *Candida albicans* during infection of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Fungi* **2019**, *5*, (1), 7.
71. Perdoni, F.; Falleni, M.; Tosi, D.; Cirasola, D.; Romagnoli, S.; Braidotti, P.; Clementi, E.; Bulfamante, G.; Borghi, E., A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *European journal of histochemistry: EJH* **2014**, *58*, (3).
72. Wu, H.-J.; Wang, A. H.; Jennings, M. P., Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current opinion in chemical biology* **2008**, *12*, (1), 93-101.
73. Pereira, M. F.; Rossi, C. C.; da Silva, G. C.; Rosa, J. N.; Bazzolli, D. M. S., *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathogens and Disease* **2020**, *78*, (8), ftaa056.
74. Santos, A. C. M.; Silva, R. M.; Valiatti, T. B.; Santos, F. F.; Santos-Neto, J. F.; Cayô, R.; Streling, A. P.; Nodari, C. S.; Gales, A. C.; Carvalho, E., Virulence potential of a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain belonging to the emerging clonal group ST101-B1 isolated from bloodstream infection. *Microorganisms* **2020**, *8*, (6), 827.
75. Brennan, M.; Thomas, D. Y.; Whiteway, M.; Kavanagh, K., Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **2002**, *34*, (2), 153-157.
76. Betts, J. W.; Hornsey, M.; Wareham, D. W.; La Ragione, R. M., In vitro and in vivo activity of theaflavin–epicatechin combinations versus multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infectious Diseases and Therapy* **2017**, *6*, (3), 435-442.
77. Regeimbal, J. M.; Jacobs, A. C.; Corey, B. W.; Henry, M. S.; Thompson, M. G.; Pavlicek, R. L.; Quinones, J.; Hannah, R. M.; Ghebremedhin, M.; Crane, N. J., Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from *Acinetobacter baumannii* wound infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2016**, *60*, (10), 5806-5816.
78. McGillivray, S. M.; Malmquist, J. A.; Rogan, M. R., *Galleria mellonella* as an Infection Model for *Bacillus anthracis* Sterne. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2019**, *9*, 360.
79. Sheehan, G.; Dixon, A.; Kavanagh, K., Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology* **2019**, *165*, (8), 863-875.
80. Meir, M.; Grosfeld, T.; Barkan, D., Establishment and validation of *Galleria mellonella* as a novel model organism to study *Mycobacterium abscessus* infection, pathogenesis, and treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2018**, *62*, (4).
81. Cotter, G.; Doyle, S.; Kavanagh, K., Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **2000**, *27*, (2), 163-169.
82. Kavanagh, K.; Fallon, J. P., *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews* **2010**, *24*, (1-2), 79-83.
83. Bonev, B. B.; Brown, N. M., *Bacterial resistance to antibiotics: from molecules to man*. Wiley Online Library: 2019.
84. Normark, B. H.; Normark, S., Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine* **2002**, *252*, (2), 91-106.
85. Kelly, J.; Kavanagh, K., Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *Journal of medical microbiology* **2011**, *60*, (2), 189-196.

86. Pineiro, M.; Stanton, C., Probiotic bacteria: legislative framework—requirements to evidence basis. *The Journal of nutrition* **2007**, *137*, (3), 850S-853S.
87. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S., Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **2014**, *11*, (8), 506.
88. Papadimitriou, K.; Zoumpopoulou, G.; Foligné, B.; Alexandraki, V.; Kazou, M.; Pot, B.; Tsakalidou, E., Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology* **2015**, *6*, 58.
89. Grounta, A.; Harizanis, P.; Mylonakis, E.; Nychas, G.-J. E.; Panagou, E. Z., Investigating the effect of different treatments with lactic acid bacteria on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* infection in *Galleria mellonella* larvae. *PLoS one* **2016**, *11*, (9), e0161263.
90. Vilela, S. F.; Barbosa, J. O.; Rossoni, R. D.; Santos, J. D.; Prata, M. C.; Anbinder, A. L.; Jorge, A. O.; Junqueira, J. C., *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence* **2015**, *6*, (1), 29-39.
91. Rossoni, R. D.; dos Santos Velloso, M.; Figueiredo, L. M. A.; Martins, C. P.; Jorge, A. O. C.; Junqueira, J. C., Clinical strains of *Lactobacillus* reduce the filamentation of *Candida albicans* and protect *Galleria mellonella* against experimental candidiasis. *Folia microbiologica* **2018**, *63*, (3), 307-314.
92. Rossoni, R. D.; Fuchs, B. B.; De Barros, P. P.; Velloso, M. d. S.; Jorge, A. O. C.; Junqueira, J. C.; Mylonakis, E., *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS One* **2017**, *12*, (3), e0173332.
93. Santhoshkumar, K.; Mathur, C.; Mandal, A.; Dutta, T. K., A toxin complex protein from *Photobacterium akhurstii* conferred oral insecticidal activity against *Galleria mellonella* by targeting the midgut epithelium. *Microbiological Research* **2020**, *242*, 126642.
94. Fallon, J. P.; Reeves, E. P.; Kavanagh, K., The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. *Microbiology* **2011**, *157*, (5), 1481-1488.
95. Park, S. Y.; Kim, K. M.; Lee, J. H.; Seo, S. J.; Lee, I. H., Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infection and immunity* **2007**, *75*, (4), 1861-1869.
96. Wojtyczka, R. D.; Dziedzic, A.; Kępa, M.; Kubina, R.; Kabała-Dzik, A.; Mularz, T.; Idzik, D., Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative *Staphylococcus* strains in vitro. *Molecules* **2014**, *19*, (5), 6583-6596.
97. Chu, M.; Zhang, M.-b.; Liu, Y.-c.; Kang, J.-r.; Chu, Z.-y.; Yin, K.-l.; Ding, L.-y.; Ding, R.; Xiao, R.-x.; Yin, Y.-n., Role of berberine in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Scientific reports* **2016**, *6*, 24748.
98. Zuo, G.-Y.; Li, Y.; Han, J.; Wang, G.-C.; Zhang, Y.-L.; Bian, Z.-Q., Antibacterial and synergy of berberines with antibacterial agents against clinical multi-drug resistant isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Molecules* **2012**, *17*, (9), 10322-10330.
99. Liang, R.-m.; Yong, X.-l.; Duan, Y.-q.; Tan, Y.-h.; Zeng, P.; Zhou, Z.-y.; Jiang, Y.; Wang, S.-h.; Jiang, Y.-p.; Huang, X.-c., Potent in vitro synergism of fusidic acid (FA) and berberine chloride (BBR) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2014**, *30*, (11), 2861-2869.

100. Budeyri Gokgoz, N.; Avci, F. G.; Yoneten, K. K.; Alaybeyoglu, B.; Ozkirimli, E.; Sayar, N. A.; Kazan, D.; Sariyar Akbulut, B., Response of Escherichia coli to prolonged berberine exposure. *Microbial Drug Resistance* **2017**, *23*, (5), 531-544.
101. Boberek, J. M.; Stach, J.; Good, L., Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. *PloS one* **2010**, *5*, (10).
102. Sun, D.; Abraham, S. N.; Beachey, E. H., Influence of berberine sulfate on synthesis and expression of Pap fimbrial adhesin in uropathogenic Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1988**, *32*, (8), 1274-1277.
103. Sun, T.; Li, X.-D.; Hong, J.; Liu, C.; Zhang, X.-L.; Zheng, J.-P.; Xu, Y.-J.; Ou, Z.-Y.; Zheng, J.-L.; Yu, D.-J., Inhibitory Effect of Two Traditional Chinese Medicine Monomers, Berberine and Matrine, on the Quorum Sensing System of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*.
104. Karaosmanoglu, K.; Sayar, N. A.; Kurnaz, I. A.; Akbulut, B. S., Assessment of Berberine as a multi-target antimicrobial: a multi-omics study for drug discovery and repositioning. *Omics: a journal of integrative biology* **2014**, *18*, (1), 42-53.
105. Jin, J.; Hua, G.; Meng, Z.; Gao, P., Antibacterial mechanisms of berberine and reasons for little resistance of bacteria. *Chin. Herb. Med* **2010**, *3*, 27-35.
106. Imenshahidi, M.; Hosseinzadeh, H., Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phytotherapy Research* **2019**, *33*, (3), 504-523.
107. Abraham, S. N.; Miao, Y., The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nature Reviews Immunology* **2015**, *15*, (10), 655.
108. Stamm, W. E.; Hooton, T. M., Management of urinary tract infections in adults. *New England journal of medicine* **1993**, *329*, (18), 1328-1334.
109. Foxman, B., The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology* **2010**, *7*, (12), 653.
110. G. Bonkat, R. R. B., F. Bruyère, T. Cai,; S.E. Geerlings, B. K., S. Schubert, F. Wagenlehner, T. Mezei, A. Pilatz, B. Pradere,; Veeratterapillay, R., *EAU guidelines on urological infections*. European Association of Urology: 2019.
111. Medina, M.; Castillo-Pino, E., An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic advances in urology* **2019**, *11*, 1756287219832172.
112. Jacobsen, S.; Stickler, D.; Mobley, H.; Shirtliff, M., Complicated catheter-associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis. *Clinical microbiology reviews* **2008**, *21*, (1), 26-59.
113. Najar, M.; Saldanha, C.; Banday, K., Approach to urinary tract infections. *Indian journal of nephrology* **2009**, *19*, (4), 129.
114. Laupland, K.; Ross, T.; Pitout, J.; Church, D.; Gregson, D., Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection* **2007**, *35*, (3), 150.
115. Flores-Mireles, A. L.; Walker, J. N.; Caparon, M.; Hultgren, S. J., Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology* **2015**, *13*, (5), 269-284.
116. Bonkat, G.; Pilatz, A.; Wagenlehner, F., Time to adapt our practice? The European Commission has restricted the use of Fluoroquinolones since march 2019. *Eur Urol* **2019**, *76*, (3), 273-275.
117. Bader, M. S.; Loeb, M.; Leto, D.; Brooks, A. A., Treatment of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance and new antimicrobial agents. *Postgraduate medicine* **2019**, 1-17.
118. Shaheen, G.; Akram, M.; Jabeen, F.; Ali Shah, S. M.; Munir, N.; Daniyal, M.; Riaz, M.; Tahir, I. M.; Ghauri, A. O.; Sultana, S., Therapeutic potential of medicinal plants for the

- management of urinary tract infection: A systematic review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2019**, 46, (7), 613-624.
119. Geetha, R.; Roy, A.; Lakshmi, T., Nature's weapon against urinary tract infections. *Int. J. Drug Dev. Res* **2011**, 3, (3), 85-100.
 120. *CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2020.
 121. Mohanty, S.; Kamolvit, W.; Zambrana, S.; Sandström, C.; Gonzales, E.; Östenson, C.-G.; Brauner, A., Extract of *Clinopodium bolivianum* protects against *E. coli* invasion of uroepithelial cells. *Journal of ethnopharmacology* **2017**, 198, 214-220.
 122. Ignasiak, K.; Maxwell, A., *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC research notes* **2017**, 10, (1), 1-8.
 123. Furneri, P. M.; Fuochi, V.; Lissandrello, E.; Petroniox, G. P.; Petronio, P.; Fresta, M.; Paolino, D., The Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Multi-Drug-Resistance Microorganisms: A Review. **2017**.
 124. Zöllner, T.; Schwarz, M., Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, 23, (1), 1-21.
 125. Mukherjee, P. K., *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs: Evaluating Natural Products and Traditional Medicine*. Elsevier: 2019.
 126. Ozbalci, Ç.; Unsal, Ç.; Kazan, D.; Sariyar-Akbulut, B., Proteomic response of *Escherichia coli* to the alkaloid extract of *Papaver polychaetum*. *Annals of microbiology* **2010**, 60, (4), 709-717.
 127. Zhang, X.; Sun, X.; Wu, J.; Wu, Y.; Wang, Y.; Hu, X.; Wang, X., Berberine Damages the Cell Surface of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology* **2020**, 11.
 128. Pierpaoli, E.; Cirioni, O.; Simonetti, O.; Orlando, F.; Giacometti, A.; Lombardi, P.; Provinciali, M., Potential application of berberine in the treatment of *Escherichia coli* sepsis. *Natural Product Research* **2020**, 1-6.
 129. Mahdavi Siuki, M.; Fazel Nasab, N.; Barati, E.; Nezafat Firizi, M.; Jalilvand, T.; Namdar Ahmadabad, H., The protective effect of berberine against lipopolysaccharide-induced abortion by modulation of inflammatory/immune responses. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **2018**, 40, (4), 333-337.
 130. Chu, M.; Ding, R.; Chu, Z.-y.; Zhang, M.-b.; Liu, X.-y.; Xie, S.-h.; Zhai, Y.-j.; Wang, Y.-d., Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor. *BMC complementary and alternative medicine* **2014**, 14, (1), 89.
 131. Yu, H.-H.; Kim, K.-J.; Cha, J.-D.; Kim, H.-K.; Lee, Y.-E.; Choi, N.-Y.; You, Y.-O., Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of medicinal food* **2005**, 8, (4), 454-461.
 132. Kim, Y.; Ahmed, S.; Stanley, D.; An, C., Eicosanoid-mediated immunity in insects. *Developmental & Comparative Immunology* **2018**, 83, 130-143.
 133. Stanley-Samuelson, D. W.; Jensen, E.; Nickerson, K. W.; Tiebel, K.; Ogg, C. L.; Howard, R. W., Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, 88, (3), 1064-1068.
 134. Torres, M. P.; Entwistle, F.; Coote, P. J., Effective immunosuppression with dexamethasone phosphate in the *Galleria mellonella* larva infection model resulting in enhanced virulence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Medical Microbiology and Immunology* **2016**, 205, (4), 333-343.

135. Yi, Y.; Wu, G.; Lv, J.; Li, M., Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* immune response to hemocoel injection of entomopathogenic nematode cuticles. *Parasitology research* **2016**, 115, (2), 597-608.
136. Ligoxygakis, P.; Bulet, P.; Reichhart, J. M., Critical evaluation of the role of the Toll-like receptor 18-Wheeler in the host defense of *Drosophila*. *EMBO reports* **2002**, 3, (7), 666-673.
137. Annane, D., Corticosteroids for severe sepsis: an evidence-based guide for physicians. *Annals of intensive care* **2011**, 1, (1), 1-7.
138. Minneci, P.; Deans, K.; Eichacker, P.; Natanson, C., The effects of steroids during sepsis depend on dose and severity of illness: an updated meta-analysis. *Clinical microbiology and infection* **2009**, 15, (4), 308-318.
139. Vandewalle, J.; Libert, C., Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be. *Frontiers in Immunology* **2020**, 11.
140. Rackaityte, E.; Lynch, S. V., The human microbiome in the 21 st century. *Nature communications* **2020**, 11, (1), 1-3.
141. Derrien, M.; Vaughan, E. E.; Plugge, C. M.; de Vos, W. M., *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **2004**, 54, (5), 1469-1476.
142. Everard, A.; Belzer, C.; Geurts, L.; Ouwerkerk, J. P.; Druart, C.; Bindels, L. B.; Guiot, Y.; Derrien, M.; Muccioli, G. G.; Delzenne, N. M., Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the national academy of sciences* **2013**, 110, (22), 9066-9071.
143. Corazzari, E. S., Intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **2009**, 48, S54-S55.
144. Derrien, M.; Belzer, C.; de Vos, W. M., *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microbial pathogenesis* **2017**, 106, 171-181.
145. Zhang, T.; Li, Q.; Cheng, L.; Buch, H.; Zhang, F., *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microbial biotechnology* **2019**, 12, (6), 1109-1125.
146. FAO/WHO Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Available online: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
147. Cozzolino, A.; Vergalito, F.; Tremonte, P.; Iorizzo, M.; Lombardi, S. J.; Sorrentino, E.; Luongo, D.; Coppola, R.; Marco, R. D.; Succi, M., Preliminary Evaluation of the Safety and Probiotic Potential of *Akkermansia muciniphila* DSM 22959 in Comparison with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microorganisms* **2020**, 8, (2), 189.
148. Köhler, G., Probiotics research in *Galleria mellonella*. Taylor & Francis: 2015.
149. Russo, V., Potenzialità immunomodulanti di *Akkermansia muciniphila* in modelli animali di inflammatory bowel disease (IBD). **2016**.
150. Reunanen, J.; Kainulainen, V.; Huuskonen, L.; Ottman, N.; Belzer, C.; Huhtinen, H.; de Vos, W. M.; Satokari, R., *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. *Applied and environmental microbiology* **2015**, 81, (11), 3655-3662.
151. Depommier, C.; Everard, A.; Druart, C.; Plovier, H.; Van Hul, M.; Vieira-Silva, S.; Falony, G.; Raes, J.; Maiter, D.; Delzenne, N. M., Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature medicine* **2019**, 25, (7), 1096-1103.
152. Plovier, H.; Cani, P. D., Optimization and safety assessment of *Akkermansia muciniphila* for human administration. *Medecine sciences: M/S* **2017**, 33, (4), 373-375.
153. Hazards, E. P. o. B.; Koutsoumanis, K.; Allende, A.; Alvarez-Ordóñez, A.; Bolton, D.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; De Cesare, A.; Hilbert, F., Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to

- EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. *EFSA Journal* **2020**, 18, (7), e06174.
154. Koutsoumanis, K.; Allende, A.; Alvarez-Ordóñez, A.; Bolton, D.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; De Cesare, A.; Hilbert, F.; Lindqvist, R., Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 10: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2019. *EFSA Journal* **2019**, 17, (7).
 155. Radisavljevic, N.; Cirstea, M.; Brett Finlay, B., Bottoms up: the role of gut microbiota in brain health. *Environmental microbiology* **2019**, 21, (9), 3197-3211.
 156. Jorjão, A. L.; de Oliveira, F. E.; Leão, M. V. P.; Jorge, A. O. C.; de Oliveira, L. D., Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the response of *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections. *Archives of microbiology* **2018**, 200, (3), 383-389.
 157. Rescigno, M., The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends in immunology* **2011**, 32, (6), 256-264.
 158. García-Cayuela, T.; Korany, A. M.; Bustos, I.; de Cadiñanos, L. P. G.; Requena, T.; Peláez, C.; Martínez-Cuesta, M. C., Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International* **2014**, 57, 44-50.
 159. Monteagudo-Mera, A.; Rastall, R. A.; Gibson, G. R.; Charalampopoulos, D.; Chatzifragkou, A., Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology* **2019**, 103, (16), 6463-6472.
 160. Maguire, R.; Kunc, M.; Hyrs, P.; Kavanagh, K., Caffeine administration alters the behaviour and development of *Galleria mellonella* larvae. *Neurotoxicology and teratology* **2017**, 64, 37-44.
 161. Mukherjee, K.; Raju, R.; Fischer, R.; Vilcinskis, A., *Galleria mellonella* as a model host to study gut microbe homeostasis and brain infection by the human pathogen *Listeria monocytogenes*. In *Yellow Biotechnology I*, Springer: 2013; pp 27-39.
 162. Berthier, F.; Ehrlich, S. D., Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS microbiology letters* **1998**, 161, (1), 97-106.
 163. Maguire, R.; Duggan, O.; Kavanagh, K., Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. *Cell biology and toxicology* **2016**, 32, (3), 209-216.
 164. Emery, H.; Johnston, R.; Rowley, A. F.; Coates, C. J., Indomethacin-induced gut damage in a surrogate insect model, *Galleria mellonella*. *Archives of toxicology* **2019**, 93, (8), 2347-2360.
 165. Linser, P. J.; Dinglasan, R. R., Insect gut structure, function, development and target of biological toxins. *Advances in insect physiology* **2014**, 47, 1-37.
 166. García-Ruiz, A.; de Llano, D. G.; Esteban-Fernández, A.; Requena, T.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M. V., Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food microbiology* **2014**, 44, 220-225.
 167. Tallon, R.; Arias, S.; Bressollier, P.; Urdaci, M., Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *Journal of applied microbiology* **2007**, 102, (2), 442-451.
 168. Johnston, P. R.; Rolff, J., Host and symbiont jointly control gut microbiota during complete metamorphosis. *PLoS Pathog* **2015**, 11, (11), e1005246.
 169. Canteri de Souza, P.; Custódio Caloni, C.; Wilson, D.; Sergio Almeida, R., An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. *Journal of Fungi* **2018**, 4, (4), 125.

170. Stork, N. E.; McBroom, J.; Gely, C.; Hamilton, A. J., New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, 112, (24), 7519-7523.
171. Consortium, T. G. S., The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* **2008**, 452, (7190), 949.
172. Caccia, S.; Casartelli, M.; Tettamanti, G., The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and tissue research* **2019**, 377, (3), 505-525.
173. Chapman, R. F.; Chapman, R. F., *The insects: structure and function*. Cambridge university press: 1998.
174. Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; Toprak, U., New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual review of entomology* **2009**, 54, 285-302.
175. Holtof, M.; Lenaerts, C.; Cullen, D.; Broeck, J. V., Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. *Cell and tissue research* **2019**, 377, (3), 397-414.
176. Elpidina, E. N.; Goptar, I. A., Digestive peptidases in *Tenebrio molitor* and possibility of use to treat celiac disease. *Entomological Research* **2007**, 37, (3), 139-147.
177. Prabhakar, S.; Chen, M. S.; Elpidina, E.; Vinokurov, K.; Smith, C.; Marshall, J.; Oppert, B., Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Insect molecular biology* **2007**, 16, (4), 455-468.
178. Sehnal, F.; Žitňan, D., Midgut endocrine cells. In *Biology of the insect midgut*, Springer: 1996; pp 55-85.
179. Apidianakis, Y.; Rahme, L. G., *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Disease models & mechanisms* **2011**, 4, (1), 21-30.
180. Azuma, M.; Harvey, W. R.; Wieczorek, H., Stoichiometry of K⁺/H⁺ antiport helps to explain extracellular pH 11 in a model epithelium. *FEBS letters* **1995**, 361, (2-3), 153-156.
181. Shanbhag, S.; Tripathi, S., Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *Journal of Experimental Biology* **2009**, 212, (11), 1731-1744.
182. Büyükgüzel, E.; Büyükgüzel, K.; Snela, M.; Erdem, M.; Radtke, K.; Ziemnicki, K.; Adamski, Z., Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell biology and toxicology* **2013**, 29, (2), 117-129.
183. Coelho, A.; Fraichard, S.; Le Goff, G.; Faure, P.; Artur, Y.; Ferveur, J.-F.; Heydel, J.-M., Cytochrome P450-dependent metabolism of caffeine in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **2015**, 10, (2), e0117328.
184. Luque, T.; Okano, K.; O'Reilly, D. R., Characterization of a novel silkworm (*Bombyx mori*) phenol UDP-glucosyltransferase. *European journal of biochemistry* **2002**, 269, (3), 819-825.
185. De Loof, A.; Schoofs, L., Intraluminal Farnesol and Farnesal in the Mealworm's Alimentary Canal: An Unusual Storage Site Uncovering Hidden Eukaryote Ca²⁺-Homeostasis-Dependent "Golgicrine" Activities. *Frontiers in endocrinology* **2019**, 10, 885.
186. Kuraishi, T.; Hori, A.; Kurata, S., Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in physiology* **2013**, 4, 375.
187. Loddo, I.; Romano, C., Inflammatory bowel disease: genetics, epigenetics, and pathogenesis. *Frontiers in immunology* **2015**, 6, 551.
188. Xavier, R.; Podolsky, D., Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **2007**, 448, (7152), 427-434.

189. Bramhall, M.; Flórez-Vargas, O.; Stevens, R.; Brass, A.; Cruickshank, S., Quality of methods reporting in animal models of colitis. *Inflammatory bowel diseases* **2015**, *21*, (6), 1248-1259.
190. Low, D.; Nguyen, D. D.; Mizoguchi, E., Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug design, development and therapy* **2013**, *7*, 1341.
191. Celasco, G.; Moro, L.; Bozzella, R.; Mangano, K.; Quattrocchi, C.; Aiello, C.; Donia, M.; Fagone, P.; Di Marco, R., Efficacy of intracolonic administration of low-molecular-weight heparin CB-01-05, compared to other low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin, in experimentally induced colitis in rat. *Digestive diseases and sciences* **2008**, *53*, (12), 3170-3175.
192. Jiminez, J. A.; Uwiera, T. C.; Inglis, G. D.; Uwiera, R. R., Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut pathogens* **2015**, *7*, (1), 1-31.
193. Lin, J.; Hackam, D. J., Worms, flies and four-legged friends: the applicability of biological models to the understanding of intestinal inflammatory diseases. *Disease models & mechanisms* **2011**, *4*, (4), 447-456.
194. Randhawa, P. K.; Singh, K.; Singh, N.; Jaggi, A. S., A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* **2014**, *18*, (4), 279.
195. Di Marco, R.; Mangano, K.; Quattrocchi, C.; Musumeci, R.; Speciale, A. M.; Papaccio, G.; Buschard, K.; Bendtzen, K.; Nicoletti, F., Curative effects of sodium fusidate on the development of dinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Clinical Immunology* **2003**, *109*, (3), 266-271.
196. Wirtz, S.; Neufert, C.; Weigmann, B.; Neurath, M. F., Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols* **2007**, *2*, (3), 541.
197. Perše, M.; Cerar, A., Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, 2012.
198. Kawada, M.; Arihiro, A.; Mizoguchi, E., Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG* **2007**, *13*, (42), 5581.
199. Howard, A. M.; LaFever, K. S.; Fenix, A. M.; Cherie'R, S.; Lau, K. S.; Burnette, D. T.; Bhave, G.; Ferrell, N.; Page-McCaw, A., DSS-induced damage to basement membranes is repaired by matrix replacement and crosslinking. *Journal of cell science* **2019**, *132*, (7).
200. Young, D.; Ibuki, M.; Nakamori, T.; Fan, M.; Mine, Y., Soy-derived di- and tripeptides alleviate colon and ileum inflammation in pigs with dextran sodium sulfate-induced colitis. *The Journal of nutrition* **2012**, *142*, (2), 363-368.
201. Mukhopadhyay, S.; Aich, P., Comparative severity analysis of colitis in C57BL/6 than BALB/c mice: A novel and rapid model of DSS induced colitis. *bioRxiv* **2020**.
202. DeVoss, J.; Diehl, L., Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD) Challenges of Modeling Human Disease. *Toxicologic pathology* **2014**, *42*, (1), 99-110.
203. Barone, M.; Chain, F.; Sokol, H.; Brigidi, P.; Bermúdez-Humarán, L. G.; Langella, P.; Martín, R., A versatile new model of chemically induced chronic colitis using an outbred murine strain. *Frontiers in microbiology* **2018**, *9*, 565.
204. Raz, E., Mucosal immunity: aliment and ailments. *Mucosal immunology* **2010**, *3*, (1), 4-7.
205. Ohlstein, B.; Spradling, A., Multipotent Drosophila intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* **2007**, *315*, (5814), 988-992.

206. Buchon, N.; Broderick, N. A.; Poidevin, M.; Pradervand, S.; Lemaitre, B., *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell host & microbe* **2009**, 5, (2), 200-211.
207. Ohlstein, B.; Spradling, A., The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **2006**, 439, (7075), 470-474.
208. Capo, F.; Wilson, A.; Di Cara, F., The intestine of *Drosophila melanogaster*: an emerging versatile model system to study intestinal epithelial homeostasis and host-microbial interactions in humans. *Microorganisms* **2019**, 7, (9), 336.
209. Araki, Y.; Mukaisyo, K.-I.; Sugihara, H.; Fujiyama, Y.; Hattori, T., Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncology reports* **2010**, 24, (4), 869-874.
210. Overend, G.; Luo, Y.; Henderson, L.; Douglas, A. E.; Davies, S. A.; Dow, J. A., Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut. *Scientific reports* **2016**, 6, (1), 1-11.
211. Vinokurov, K.; Elpidina, E.; Oppert, B.; Prabhakar, S.; Zhuzhikov, D.; Dunaevsky, Y. E.; Belozersky, M., Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2006**, 145, (2), 126-137.
212. Silva, A. P. R.; Valério, A. D.; Viana, R. O.; dos Santos Ricoy, A. C.; Johann, S.; de Souza Alves, V., *Caenorhabditis elegans* and *Tenebrio molitor*-New tools to investigate *Malassezia* species. **2018**.
213. Hamilos, G.; Samonis, G.; Kontoyiannis, D. P., Recent advances in the use of *Drosophila melanogaster* as a model to study immunopathogenesis of medically important filamentous fungi. *International journal of microbiology* **2012**, 2012.
214. Vergis, J.; Malik, S. S.; Pathak, R.; Kumar, M.; Ramanjaneya, S.; Kurkure, N. V.; Barbuddhe, S. B.; Rawool, D. B., Antimicrobial efficacy of indolicidin against multi-drug resistant enteroaggregative *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in microbiology* **2019**, 10, 2723.
215. Amcheslavsky, A.; Jiang, J.; Ip, Y. T., Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell stem cell* **2009**, 4, (1), 49-61.
216. Miles, J. P.; Zou, J.; Kumar, M.-V.; Pellizzon, M.; Ulman, E.; Ricci, M.; Gewirtz, A. T.; Chassaing, B., Supplementation of low-and high-fat diets with fermentable fiber exacerbates severity of DSS-induced acute colitis. *Inflammatory bowel diseases* **2017**, 23, (7), 1133-1143.
217. Chassaing, B.; Aitken, J. D.; Malleshappa, M.; Vijay-Kumar, M., Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology* **2014**, 104, (1), 15.25. 1-15.25. 14.
218. Rajendiran, V.; Natarajan, V.; Devaraj, S. N., Anti-inflammatory activity of *Alpinia officinarum* Hance on rat colon inflammation and tissue damage in DSS induced acute and chronic colitis models. *Food Science and Human Wellness* **2018**, 7, (4), 273-281.
219. Andres, P. G.; Beck, P. L.; Mizoguchi, E.; Mizoguchi, A.; Bhan, A. K.; Dawson, T.; Kuziel, W. A.; Maeda, N.; MacDermott, R. P.; Podolsky, D. K., Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1. 1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine. *The Journal of Immunology* **2000**, 164, (12), 6303-6312.
220. Williams, M. J., *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *The Journal of Immunology* **2007**, 178, (8), 4711-4716.

221. Costin, G.-E.; Raabe, H. A.; Priston, R.; Evans, E.; Curren, R. D., Vaginal irritation models: the current status of available alternative and in vitro tests. *Alternatives to Laboratory Animals* **2011**, 39, (4), 317-337.
222. Dhondt, M. Optimisation and validation of an alternative mucosal irritation test. Ghent University, 2005.
223. Boutrand, J.-P., *Biocompatibility and performance of medical devices*. Woodhead Publishing: 2019.
224. Petit, J.-Y.; Doré, V.; Marignac, G.; Perrot, S., Assessment of ocular discomfort caused by 5 shampoos using the Slug Mucosal Irritation test. *Toxicology in Vitro* **2017**, 40, 243-247.
225. Vinardell, M.; Mitjans, M., Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *Journal of pharmaceutical sciences* **2008**, 97, (1), 46-59.
226. Priston, R.; Evans, E.; Costin, G.-E.; Raabe, H. A.; Curren, R. D., Current status of available in vitro tests for vaginal irritation assessment. *Toxicology Letters* **2011**, 205, S172.
227. Anadon, A.; Martínez, M. A.; Castellano, V.; Martínez-Larrañaga, M. R., The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2014**, 10, (1), 67-79.
228. Adriaens, E.; Remon, J. P., Mucosal irritation potential of personal lubricants relates to product osmolality as detected by the slug mucosal irritation assay. *Sexually transmitted diseases* **2008**, 35, (5), 512-516.
229. Adriaens, E.; Bytheway, H.; De Wever, B.; Eschrich, D.; Guest, R.; Hansen, E.; Vanparys, P.; Schoeters, G.; Warren, N.; Weltens, R., Successful prevalidation of the slug mucosal irritation test to assess the eye irritation potency of chemicals. *Toxicology in Vitro* **2008**, 22, (5), 1285-1296.
230. Lenoir, J.; Adriaens, E.; Remon, J. P., New aspects of the Slug Mucosal Irritation assay: predicting nasal stinging, itching and burning sensations. *Journal of Applied Toxicology* **2011**, 31, (7), 640-648.
231. Drexler, M., What you need to know about infectious disease. **2014**.
232. Malik, Y. A., Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology* **2020**, 42, (1), 3-11.
233. Carraturo, F.; Del Giudice, C.; Morelli, M.; Cerullo, V.; Libralato, G.; Galdiero, E.; Guida, M., Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. *Environmental pollution* **2020**, 115010.
234. García-Ávila, F.; Valdiviezo-Gonzales, L.; Cadme-Galabay, M.; Gutiérrez-Ortega, H.; Altamirano-Cárdenas, L.; Zhindón-Arévalo, C.; del Pino, L. F., Considerations on water quality and the use of chlorine in times of SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in the community. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* **2020**, 100049.
235. Gruppo di Lavoro, I.; delle Infezioni, C., Indicazioni ad interim per la sanificazione degli ambienti interni nel contesto sanitario e assistenziale per prevenire la trasmissione di SARS-CoV 2.
236. List, N., Disinfectants for use against SARS-CoV-2 (COVID-19). Available in: <https://www.epa.gov/pesticide-registration/list-n-disinfectants-use-against-sars-cov-2-covid-19>.
237. Organization, W. H. *Infection prevention and control guidance for long-term care facilities in the context of COVID-19: interim guidance, 8 January 2021*; World Health Organization: 2021.
238. Maris, P., Modes of action of disinfectants. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **1995**, 14, (1), 47-55.

239. Aiello, A. E.; Coulborn, R. M.; Perez, V.; Larson, E. L., Effect of hand hygiene on infectious disease risk in the community setting: a meta-analysis. *American journal of public health* **2008**, *98*, (8), 1372-1381.
240. Rutala, W. A.; Weber, D. J., Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. **2008**.
241. Lai, X.; Wang, X.; Yang, Q.; Xu, X.; Tang, Y.; Liu, C.; Tan, L.; Lai, R.; Wang, H.; Zhang, X., Will healthcare workers improve infection prevention and control behaviors as COVID-19 risk emerges and increases, in China? *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **2020**, *9*, (1), 1-9.
242. Adriaens, E.; Remon, J. P., Evaluation of an alternative mucosal irritation test using slugs. *Toxicology and applied pharmacology* **2002**, *182*, (2), 169-175.
243. Olsson, I. A. S.; Silva, S. P. d.; Townend, D.; Sandøe, P., Protecting animals and enabling research in the European Union: An overview of development and implementation of directive 2010/63/EU. *ILAR journal* **2017**, *57*, (3), 347-357.
244. Adriaens, E. De ontwikkeling van een alternatieve mucosale irritatietest. Thesis, Ghent University, Belgium, 129 cit. Dhondt, M., 2005, Optimization ..., 2000.
245. Jensen, K.; Engelke, S.; Simpson, S. J.; Mayntz, D.; Hunt, J., Balancing of specific nutrients and subsequent growth and body composition in the slug *Arion lusitanicus*. *Physiology & behavior* **2013**, *122*, 84-92.
246. South, A., *Terrestrial slugs: biology, ecology and control*. Springer Science & Business Media: 2012.
247. Deyrup-Olsen, I.; Martin, A. W., Surface exudation in terrestrial slugs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **1982**, *72*, (1), 45-51.
248. Verdugo, P.; Deyrup-Olsen, I.; Aitken, M.; Villalon, M.; Johnson, D., Molecular mechanism of mucin secretion: I. The role of intragranular charge shielding. *Journal of dental research* **1987**, *66*, (2), 506-508.
249. Lenoir, J.; Bachert, C.; Remon, J.-P.; Adriaens, E., The slug mucosal irritation (SMI) assay: A tool for the evaluation of nasal discomfort. *Toxicology in Vitro* **2013**, *27*, (6), 1954-1961.
250. Kendall, R.; Lenoir, J.; Gerrard, S.; Scheuerle, R. L.; Slater, N. K.; Tuleu, C., Using the Slug Mucosal Irritation assay to investigate the tolerability of tablet excipients on human skin in the context of the use of a nipple shield delivery system. *Pharmaceutical research* **2017**, *34*, (4), 687-695.
251. Adriaens, E.; Guest, R.; Willoughby Sr, J.; Fochtman, P.; Kandarova, H.; Verstraelen, S.; Van Rompay, A., CON4EI: Slug Mucosal Irritation (SMI) test method for hazard identification and labelling of serious eye damaging and eye irritating chemicals. *Toxicology in Vitro* **2018**, *49*, 77-89.
252. Forcart, L., *Limacus maculatus* (Kaleniczenko) und *Limacus flavus* (Linnaeus). *Mitteilungen der deutschen malakozoologischen Gesellschaft* **1986**, *38*, 21-23.
253. Chelazzi, G.; Le Voci, G.; Parpagnoli, D., Relative importance of airborne odours and trails in the group homing of *Limacus flavus* (Linnaeus)(Gastropoda, Pulmonata). *Journal of molluscan studies* **1988**, *54*, (2), 173-180.
254. Cook, A.; Shirbhate, R., The mucus producing glands and the distribution of the cilia of the pulmonate slug *Limax pseudoflavus*. *Journal of Zoology* **1983**, *201*, (1), 97-116.
255. Chang, N.-S., Ultrastructural and Histochemical Studies on the Epithelial Cells and Mucus-producing Cells of Korean Slug (*Limax flavus* L.). *Applied Microscopy* **1988**, *18*, (2), 1-20.
256. Dhondt, M. M.; Adriaens, E.; Pinceel, J.; Jordaens, K.; Backeljau, T.; Remon, J. P., Slug species-and population-specific effects on the end points of the Slug Mucosal Irritation test. *Toxicology in vitro* **2006**, *20*, (4), 448-457.

257. Castillo, V. M., *Limacus flavus* (Linnaeus, 1758 Linnaeus, 1758 Linnaeus, 1758): Antecedentes de la especie Antecedentes de la especie.
258. Organization, W. H. *Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19: interim guidance, 15 May 2020*; World Health Organization: 2020.
259. Van Doremalen, N.; Bushmaker, T.; Morris, D. H.; Holbrook, M. G.; Gamble, A.; Williamson, B. N.; Tamin, A.; Harcourt, J. L.; Thornburg, N. J.; Gerber, S. I., Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England journal of medicine* **2020**, *382*, (16), 1564-1567.
260. Chang, A.; Schnall, A. H.; Law, R.; Bronstein, A. C.; Marraffa, J. M.; Spiller, H. A.; Hays, H. L.; Funk, A. R.; Mercurio-Zappala, M.; Calello, D. P., Cleaning and disinfectant chemical exposures and temporal associations with COVID-19—national poison data system, United States, January 1, 2020–March 31, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **2020**, *69*, (16), 496.
261. Babić, Ž.; Turk, R.; Macan, J., Toxicological aspects of increased use of surface and hand disinfectants in Croatia during the COVID-19 pandemic: a preliminary report. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **2020**, *71*, (3), 261-264.
262. Casey, M. L.; Hawley, B.; Edwards, N.; Cox-Ganser, J. M.; Cummings, K. J., Health problems and disinfectant product exposure among staff at a large multispecialty hospital. *American journal of infection control* **2017**, *45*, (10), 1133-1138.
263. JORDAENS, K.; RIEL, P. V.; GEENEN, S.; VERHAGEN, R.; BACKELJAU, T., Food-induced body pigmentation questions the taxonomic value of colour in the self-fertilizing slug *Carinarion* spp. *Journal of Molluscan Studies* **2001**, *67*, (2), 161-167.
264. Gordon, D. G., *Field guide to the slug*. Sasquatch Books: 1994.
265. Izenman, A., Linear discriminant analysis. Modern multivariate statistical techniques. New York: Springer: 2013.
266. Ceulemans, J.; Vermeire, A.; Adriaens, E.; Remon, J. P.; Ludwig, A., Evaluation of a mucoadhesive tablet for ocular use. *Journal of controlled release* **2001**, *77*, (3), 333-344.
267. Callens, C.; Adriaens, E.; Dierckens, K.; Remon, J. P., Toxicological evaluation of a bioadhesive nasal powder containing a starch and Carbopol® 974 P on rabbit nasal mucosa and slug mucosa. *Journal of controlled release* **2001**, *76*, (1-2), 81-91.
268. Dhondt, M. M.; Adriaens, E.; Van Roey, J.; Remon, J. P., The evaluation of the local tolerance of vaginal formulations containing dapivirine using the Slug Mucosal Irritation test and the rabbit vaginal irritation test. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, *60*, (3), 419-425.
269. Porfiriyeva, N. N.; Nasibullin, S. F.; Abdullina, S. G.; Tukhbatullina, I. K.; Moustafine, R. I.; Khutoryanskiy, V. V., Acrylated Eudragit® E PO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **2019**, *562*, 241-248.
270. Adriaens, E.; Dhondt, M.; Remon, J. P., Refinement of the Slug Mucosal Irritation test as an alternative screening test for eye irritation. *Toxicology in vitro* **2005**, *19*, (1), 79-89.