

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Università degli Studi di Milano – Dipartimento di Scienze della Salute

Caratterizzazione delle vescicole extracellulari prodotte da *Candida albicans* in condizioni di crescita planctonica e sessile e valutazione del loro ruolo nella formazione del biofilm

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa Marinella Rodolfi

Correlatore:
Chiar.ma Prof.ssa Elisa Borghi

Tesi Sperimentale di
Jlenia Monetti

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

RIASSUNTO **5**

1. INTRODUZIONE **7**

1.1 IL GENERE *CANDIDA* **8**

1.2 *CANDIDA ALBICANS* **11**

1.2.1 Struttura e organizzazione cellulare ***11***

1.2.2 Manifestazioni cliniche ***17***

1.3 FATTORI DI VIRULENZA **20**

1.4 FORMAZIONE DEL BIOFILM DI *C. ALBICANS* **23**

1.5 VESCICOLE EXTRACELLULARI **26**

1.5.1 Vescicole extracellulari fungine ***28***

1.5.2. Implicazioni biologiche delle EV fungine ***30***

1.5.3. Caratteristiche delle vescicole extracellulari di Candida albicans ***32***

1.6 FARMACI ANTIFUNGINI **34**

2. SCOPO DEL LAVORO **36**

3. MATERIALI E METODI **37**

3.1 *CANDIDA ALBICANS*: CEPPI E CONDIZIONI DI COLTURA **37**

3.1.1 Terreni di coltura ***37***

3.2 PREPARAZIONE E INOCULO DI *C. ALBICANS* **38**

3.3 ISOLAMENTO E CONSERVAZIONE DELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI **38**

3.4 CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO **40**

3.5 ANALISI DI TRACCIAMENTO DELLE NANOPARTICELLE **41**

3.6 FORMAZIONE DEL BIOFILM E QUANTIFICAZIONE CON SAGGIO AL CRISTALVIOLETTO **42**

3.7 FISSAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER MICROSCOPIA CONFOCALE **44**

3.8 ESPERIMENTI DI DOSE-DIPENDENZA SULLE VESCICOLE EXTRACELLULARI **45**

3.9. ANALISI DEI DATI E ANALISI STATISTICA **47**

4. RISULTATI E DISCUSSIONE **48**

4.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE EV **48**

4.2 CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO **52**

4.3 EFFETTO DELLE EV SULLA FORMAZIONE DI BIOFILM **54**

4.4 ANALISI MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCALE 57

5. CONCLUSIONI 60

BIBLIOGRAFIA 63

RIASSUNTO

Candida albicans è un importante patogeno opportunista, responsabile di infezioni che possono manifestarsi con diverse gravità, soprattutto nei soggetti con un sistema immunitario compromesso. Tra i principali fattori che contribuiscono alla sua patogenicità vi è la capacità di produrre biofilm, una struttura ben organizzata nella quale le cellule crescono in modalità sessile e sono immerse all'interno di una matrice extracellulare. La formazione del biofilm permette al microrganismo di sopravvivere e gli conferisce una maggior tolleranza ai trattamenti antifungini, motivo per cui è importante comprendere i meccanismi coinvolti nella sua formazione e regolazione.

In questo contesto, le vescicole extracellulari (EV) sembrano svolgere un possibile ruolo nella comunicazione tra le cellule e nei processi associati alla formazione del biofilm. Le EV sono piccole strutture rilasciate dalle cellule e contenenti diverse componenti, quali proteine, lipidi, carboidrati ed acidi nucleici, che possono essere trasferite nell'ambiente extracellulare. La loro composizione e le loro caratteristiche possono variare in base alle condizioni fisiologiche e di crescita della cellula da cui derivano. Infatti, il confronto tra le EV prodotte durante la crescita planctonica e sessile può fornire informazioni sulla loro possibile implicazione nei processi associati alla crescita di tipo sessile.

A partire da queste considerazioni, il presente lavoro di tesi ha avuto l'obiettivo di caratterizzare le vescicole extracellulari prodotte dal ceppo di *C. albicans* CAF2.1-dTomato in condizione di crescita planctonica e sessile, valutando sia le loro caratteristiche fisiche sia il loro possibile ruolo nella formazione del biofilm. Nello specifico, sono state analizzate le EV ottenute nelle due condizioni di crescita sia in termini di concentrazione sia in termini di dimensione mediante l'analisi di tracciamento delle particelle (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA). La presenza del segnale fluorescente associato alle EV è stata, invece, valutata mediante citofluorimetria a flusso sfruttando la fluorescenza propria del ceppo CAF2.1-dTomato ed è stata anche studiata la capacità delle vescicole extracellulari derivanti da *C. albicans* SC5314 di influenzare la formazione del biofilm in ceppi clinici caratterizzati da una ridotta capacità di crescita sessile (USBA21 e USVR40).

L'analisi mediante NTA ha mostrato la presenza di particelle nanometriche in entrambe le condizioni di crescita. Il confronto tra EV planctoniche e sessili non ha evidenziato differenze statisticamente significative né nel caso del diametro D50 né nel caso della loro concentrazione (p = 0,30, t-test di Welch). Con i dati ottenuti, quindi, non sono state

osservate variazioni nelle principali caratteristiche fisiche delle particelle associate alla condizione di crescita.

La citofluorimetria ha evidenziato la presenza del segnale fluorescente dTomato nelle preparazioni ottenute da *C. albicans* CAF2.1-dTomato in entrambe le condizioni. Il risultato supporta la presenza del segnale associato al costrutto fluorescente ENO1-dTomato nelle preparazioni analizzate, fornendo un ulteriore elemento di caratterizzazione delle EV. Per valutare il loro possibile ruolo funzionale, le preparazioni ottenute dal ceppo ingegnerizzato CAF2.1-dTomato sono state aggiunte al ceppo biofilm produttore SC5314 e ai ceppi clinici USBA21 e USVR40, caratterizzati da una ridotta capacità di produrre biofilm. Ad una concentrazione di 4×10^8 EV/mL, le EV derivanti dalla condizione sessile hanno determinato nei ceppi USBA21 e USVR40 un aumento della biomassa significativamente maggiore rispetto alle EV planctoniche ($p < 0,05$). L'effetto, invece, è risultato meno evidente nel ceppo SC5314. Gli esperimenti condotti con quantità crescenti di EV hanno mostrato delle variazioni della biomassa in seguito al trattamento e l'analisi mediante microscopia confocale ha inoltre evidenziato, nei ceppi con ridotta capacità di formare biofilm, una maggior presenza di strutture filamentose ed un aumento dello spessore in seguito al trattamento con EV, soprattutto con quelle derivanti dalla condizione sessile. Anche in questo caso, nel ceppo SC5314 l'effetto è risultato meno evidente essendo già caratterizzato da un biofilm più sviluppato.

I risultati mostrano che le vescicole extracellulari prodotte da *C. albicans* CAF2.1-dTomato presentano caratteristiche fisiche comparabili tra le condizioni di crescita planctonica e sessile; il loro effetto biologico, invece, può variare in funzione delle condizioni di origine e del ceppo ricevente. Nello specifico, l'effetto delle EV sessili è risultato più evidente nei ceppi clinici USBA21 e USVR40.

I dati ottenuti da questo studio suggeriscono un possibile ruolo delle vescicole extracellulari nella modulazione del biofilm, ruolo che dovrà essere ulteriormente approfondito attraverso lo studio del loro contenuto molecolare e dei meccanismi che sono alla base degli effetti osservati.

1. INTRODUZIONE

Per lungo tempo, le infezioni fungine hanno ricevuto minore attenzione rispetto a quelle batteriche e virali a causa della loro minor frequenza nella popolazione.
Attualmente, si stima che esistano tra 1,5 e 5 milioni di specie fungine, di cui 300 sono note per causare infezioni nell'uomo. Il numero dei funghi coinvolti nelle infezioni negli esseri umani, così come nelle piante e negli animali, è in continuo aumento sia per l'impiego di terapie immunosoppressive, di procedure chirurgiche invasive e dispositive medici, sia per i progressi nelle tecniche molecolari e nelle analisi filogenetiche. Negli ultimi anni è stato, inoltre, riscontrato un aumento nella resistenza agli antimicotici disponibili in ambito clinico ed anche un maggior impatto delle coinfezioni fungine con altri microbi, spesso corellati a peggiori esiti clinici per i pazienti (Henriques e Williams, 2020; Wiederhold, 2021).

Tra i patogeni fungini più comuni responsabili per le infezioni invasive nell'uomo, abbiamo *Candida, Aspergillus* e *Cryptococcus,* seguiti dai funghi dimorfi *Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides* e *Paracoccidioides,* responsabili di micosi endemiche in diverse regioni del mondo (Parsons e Diekema, 2023). Fra questi, il genere *Candida* occupa un ruolo di rilievo essendo responsabile sia di infezioni superficiali, come onicomicosi, e mucosali, come le candidosi orali o vaginali, sia di infezioni invasive come candidemie, endocarditi, meningiti o patologie che colpiscono gli organi profondi (Polvi *et al.,* 2015).

Gli individui con fattori di rischio, quali patologie di base importanti, immunocompromissione o immunosoppressione, terapie chemioterapiche, sono particolarmente a rischio di sviluppare infezioni fungine gravi, responsabili ogni anno di oltre 2,5 milioni di decessi. Tra queste, la candidosi invasiva rappresenta la principale causa di mortalità a livello globale, arrivando a rappresentare l'88% delle infezioni fungine nosocomiali negli Stati Uniti. Queste infezioni sono attribuibili principalmente alla *Candida albicans* e ad altre specie, insieme chiamate *Candida non albicans*, tra cui *C. auris* multiresistente ai farmaci. Sia *C. albicans* sia *C. auris* sono considerate una minaccia emergente per la salute pubblica, motivo per cui l'Organizzazione Mondiale della Sanità le ha classificate come "patogeni di priorità critica" (Robbins e Cowen, 2025).

1.1 Il genere *Candida*

Il genere *Candida* comprende circa 200 specie appartenenti al phylum degli Ascomiceti e alla classe dei Saccharomycetes (Eggimann *et al.,* 2003).
I lieviti appartenenti a tale genere si presentano come organismi eucarioti unicellulari ed eterotrofi, che si riproducono per gemmazione. Durante questo processo, sulla superficie della cellula madre si forma una piccola protuberanza, chiamata gemma, che si accresce progressivamente fino a separarsi, dando origine a una cellula figlia.
Le caratteristiche morfologiche possono variare tra le diverse specie e in risposta alle condizioni ambientali. Le cellule hanno tipicamente una forma ovale o sferica, ma alcune specie possono sviluppare strutture allungate come pseudoife ed ife vere e proprie. Per questo motivo, diverse specie del genere *Candida* sono considerate pleomorfe e tale variabilità contribuisce alla capacitò di adattarsi a molteplici condizioni ambientali e di crescita.

In condizioni fisiologiche, diverse specie di *Candida* possono essere presenti come commensali sulla cute e sulle superfici mucosali dell'uomo, quali quelle della cavità orale, il tratto gastrointestinale e l'apparato riproduttivo. Si stima che *Candida* colonizzi il cavo orale del 25–50% degli individui sani e che *C. albicans* costituisca il 70–80% degli isolati (Murray *et al.,* 2017; Dadar *et al.,* 2018).
Questi microrganismi possono, tuttavia, comportarsi da patogeni opportunisti e causare infezioni in seguito alla traslocazione in un distretto sterile o in presenza di fattori di rischio dell'ospite, come l'immunocompromissione o patologie che compromettono l'equilibrio uomo-microrganismi. In condizioni di disbiosi o di indebolimento delle difese immunitarie, possono raggiungere la circolazione sanguigna e disseminare nei tessuti profondi di diversi organi come fegato, milza, reni, cuore e cervello.

Dal punto di vista epidemiologico, l'impatto clinico delle candidosi è estremamente variabile poichè i funghi del genere *Candida* possono causare un ampio range di patologie che include anche infezioni mortali. Negli ultimi dieci anni, è stato osservato un aumento dell'incidenza delle infezioni fungine. Nella popolazione adulta degli Stati Uniti sono stati registrati circa 25.000 casi di candidemia, mentre stime recenti hanno evidenziato che ogni anno si verificano nel mondo circa 1,5 milioni di casi di candidemia e/o candidosi invasive. Il tasso di mortalità riportato per i pazienti con candidemia varia dal 40 al 60% (Antonelli *et al.,* 2017; Denning, 2024). L'incidenza delle candidosi invasive e la distribuzione delle specie

responsabili possono variare in base all'area geografica, all'età e alle condizioni cliniche del paziente. I soggetti che sono più inclini a sviluppare infezioni di questo tipo, sono i pazienti ospedalizzati e soggetti che presentano condizioni di rischio come l'immunocompromissione, neutropenia, neoplasie, interventi chirurgici e impiego di antibiotici ad ampio spettro (Sardi *et al.*, 2013; Bays *et al.*, 2024).

La maggior parte delle infezioni da *Candida* ha un'origine endogena in quanto i microrganismi residenti nell'ospite possono comportarsi da patogeni opportunisti e causare infezioni (Murray *et al.*, 2017). Sono frequenti anche le infezioni di origine esogena, soprattutto in ambito ospedaliero, dove la trasmissione può avvenire tramite il personale sanitario, altri pazienti o dispositivi medici contaminati (Polvi *et al.,* 2015). I lieviti appartenenti al genere Candida sono, infatti, tra i microrganismi più frequentemente isolati nelle infezioni associate all'impiego di dispositivi medici, inclusi cateteri urinari e venosi centrali, pacemaker, valvole cardiache, protesi articolari e dentarie e lenti a contatto.

Tra le specie più comuni associate alle infezioni umane, figurano *C. albicans*, *C. glabrata, C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, responsabili del 95% dei casi di candidosi invasiva. Sebbene *C. albicans* sia la specie che viene più frequentemente riscontrata negli isolati clinici con un tasso di mortalità fino al 40%, studi recenti hanno evidenziato un aumento delle infezioni causate dalle specie note come *Candida non albicans* (NCAC), tra cui *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. auris*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (Robbins e Cowen, 2025; Silva *et al*., 2012).

C. glabrata è una specie non polimorfica in quanto cresce esclusivamente come blastoconidi. È una delle cause più comuni di candidosi nei pazienti immunocompromessi e riveste particolare interesse clinico a causa della sua ridotta sensibilità ad alcuni farmaci azolici, come il fluconazolo; *C. parapsilosis*, invece, non produce ife vere e proprie ma pseudoife ricurve, definite "cellule giganti". È frequentemente associata all'ambiente ospedaliero in quanto la sua capacità di aderire alle superfici e di formare biofilm, ne favorisce il coinvolgimento nelle infezioni correlate ai diversi dispositivi medici. La specie è stata inoltre ritrovata come causa di infezioni ematiche nei neonati. Anche *C. tropicalis* è in grado di aderire ai tessuti dell'ospite e formare biofilm in quanto può sviluppare non solo blastoconidi, ma anche pseudoife ed ife. È associata soprattutto a infezioni invasive nei pazienti immunocompromessi ed è la seconda specie più isolata dopo *C. albicans* in alcune aree geografiche, come Africa e Medio Oriente. *C. krusei*, invece, è una specie che desta

preoccupazione per la sua resistenza agli azoli e ad altri farmaci antifungini e la sua presenza negli individui sani risulta tuttavia più bassa rispetto alle altre specie del genere (Gómez-Gaviria *et al.,* 2022; Turner e Butler, 2014; Silva *et al*, 2012).

Infine, una specie di particolare rilevanza clinica è rappresentata da *C. auris*, in quanto è in grado di persistere sulle superfici, diffondersi all'interno delle strutture sanitarie e resistere a diverse classi di antifungini. È considerata una minaccia per la salute umana a causa della sua capacità di trasmettersi tra pazienti e causare infezioni invasive potenzialmente mortali. Inoltre, studi precedenti hanno dimostrato che questa specie può eludere la risposta immunitaria mediata dai neutrofili. Questi svolgono generalmente un ruolo importante nel controllo delle infezioni fungine, attraverso il riconoscimento del microrganismo e l'inibizione della sua crescita. Tuttavia, nei confronti di *C. auris* questo meccanismo non è stato osservato (Johnson *et al.*, 2018).

Oltre alla crescente diffusione delle infezioni causate dalle specie *non albicans*, preoccupa anche l'aumento delle infezioni fungine causate da ceppi resistenti agli antimicotici. La resistenza ai farmaci può essere intrinseca, quando è naturalmente presente in alcuni ceppi fungini, o acquisita quando si sviluppa in seguito all'esposizione del fungo ai farmaci impiegati in ambito medico e veterinario, in agricoltura o nelle industrie.

Attualmente, la disponibilità di antimicotici per il trattamento delle infezioni da *Candida* è limitata, soprattutto nel caso delle forme invasive e il loro trattamento risulta sempre più complesso a causa della resistenza nei confronti di uno o più farmaci antifungini (CDC, 2025). Le principali classi di farmaci antifungini e i rispettivi bersagli cellulari sono riportati nella **Figura 1**.

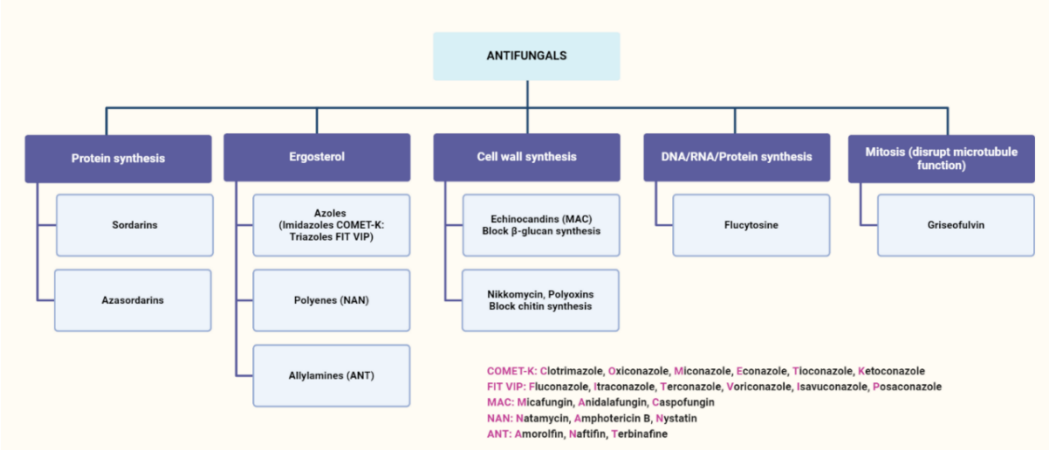


Figura 1 – Principali classi di farmaci antifungini e relativi bersagli cellulari. Gli antimicotici attualmente disponibili interferiscono con differenti processi cellulari, tra cui la sintesi proteica, la biosintesi

dell'ergosterolo e della parete cellulare, la sintesi degli acidi nucleici e la funzione dei microtubuli (Sikora, 2025).

1.2 *Candida albicans*

Tra le specie appartenenti al genere *Candida*, *C. albicans* è quella più frequentemente associata alle infezioni fungine nell'uomo. Può causare numerose forme cliniche, sia superficiali sia invasive, ed è responsabile di un impatto sanitario ed economico significativo a livello globale.

C. albicans è un lievito diploide normalmente presente come microrganismo commensale nel microbiota umano e colonizza principalmente le superfici mucosali della cavità orale, del tratto gastrointestinale e dell'apparato genitale. Può essere inoltre isolato dal tratto respiratorio, dove il suo riscontro indica generalmente una colonizzazione piuttosto che un'infezione (Dadar *et al.,* 2018). Negli individui immunocompetenti, si trova generalmente in una condizione di equilibrio con gli altri microrganismi. Tuttavia, alterazione del microbiota, delle barriere epiteliali o della risposta immunitaria dell'ospite possono favorirne la proliferazione e il passaggio da commensale a patogeno. Tra i fattori predisponenti figurano l'impiego di antibiotici, le variazioni nella disponibilità dei nutrienti e le alterazioni del sistema immunitario. In presenza di specifici fattori di rischio, il microrganismo può attraversare le barriere dell'ospite, invadere i tessuti profondi e raggiungere il circolo sanguigno (Gulati e Nobile, 2016).

La capacità di *C. albicans* di colonizzare diversi distretti corporei e di passare da commensale a patogeno è legata alle sue caratteristiche strutturali e biologiche e alla presenta di diversi fattori di virulenza.

1.2.1 Struttura e organizzazione cellulare

Candida albicans è un lievito polimorfico, le cui cellule lievitiformi presentano dimensioni generalmente comprese tra i 2 e 10 μm. Si riproduce prevalentemente asessualmente per gemmazione, un processo durante il quale dalla superficie della cellula madre si forma una gemma, che aumenta progressivamente di volume e infine si separa, originando una cellula figlia o blastoconidi. La morfologia può cambiare in risposta alle condizioni ambientali, determinando il passaggio dalla forma lievitiforme alle forme filamentose (Antonelli *et al.,* 2017; Deacon, 2006). Può assumere tre principali forme morfologiche: cellule lievitiformi, pseudoife ed ife vere e proprie. Sia le ife sia le pseudoife possono svilupparsi *in vivo* e *in vitro* a seconda delle condizioni ambientali. Le ife sono la forma vegetativa dei funghi

filamentosi, invece, le pseudoife sono catene di cellule allungate che rimangono unite dopo la gemmazione e presentano delle costrizioni a livello dei setti (Sachivkina *et al.,* 2021).

Le cellule lievitiformi, le ife e le pseudoife si differenziano per morfologia cellulare, funzione e condizioni di crescita (**Figura 2**). Le cellule di lievito sono rotonde o ovali, sono unicellulari e possono essere coinvolte nella formazione del biofilm. In condizioni fisiologiche possono comportarsi da commensali, mentre, in presenza di fattori predisponenti, possono contribuire allo sviluppo dell'infezione. Le pseudoife hanno una forma ellittica allungata, sono multicellulari, possono variare sia in larghezza che in lunghezza e presentano un restringimento a livello dei setti; le ife, invece, sono forme tubulari e multicellulari e si sviluppano a partire da una cellula di lievito non germinata (Chen *et al.*, 2020). La transizione dalla forma lievitiforme alla crescita ifale può essere indotta da diversi segnali ambientali, tra cui la temperatura di 37°C, la presenza di siero, concentrazioni elevate di CO_2, un pH neutro o alcalino e la disponibilità di specifici nutrienti, come la N-acetilglucosammina. Anche condizioni di limitazione nutrizionale possono favorire lo sviluppo filamentoso, sebbene la risposta dipenda dalla combinazione dei segnali ambientali e dalla composizione del mezzo di crescita. Le ife possono essere distinte dalle pseudoife soprattutto in base alla morfologia: le prime presentano pareti laterali pressocché parallele e non mostrano costrizioni evidenti in corrispondenza dei setti, mentre le seconde sono costituite da cellule allungate con costrizioni ben riconoscibili nelle zone di giunzione (Talapko *et al.,* 2021).

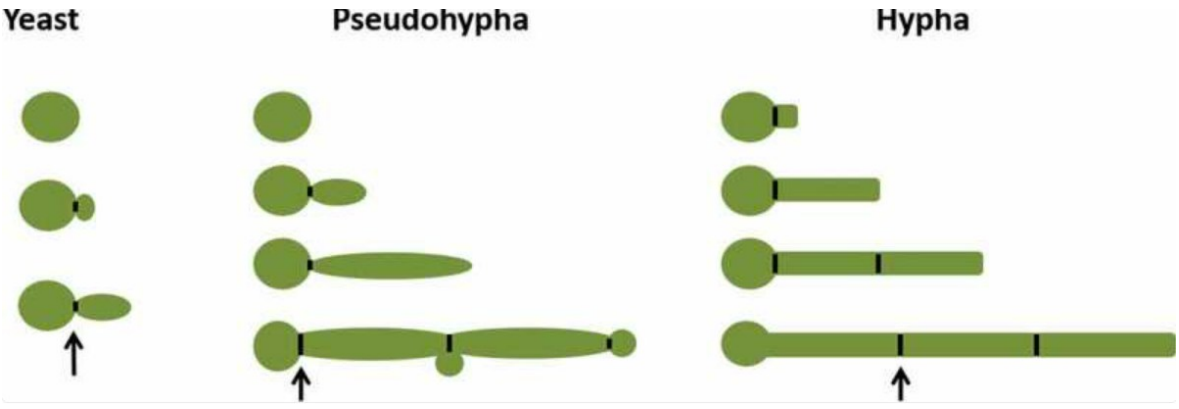


Figura 2 – Rappresentazione grafica degli aspetti morfologici di *C. albicans* (Chen *et al.,* 2020). A seconda delle condizioni ambientali, è in grado di cambiare conformazione: cellule di lievito, pseuoife ed ife. Le frecce nere indicano gli anelli di costrizione che si formano.

Il passaggio dalla forma lievitiforme a quella filamentosa è regolato da diversi segnali che includono molti fattori di trascrizione. La composizione e l'organizzazione della parete cellulare variano durante la transizione morfologica; in particolare, le forme ifali presentano generalmente un contenuto di chitina maggiore rispetto alle cellule lievitiformi (Talapko *et al.*, 2021).

Macroscopicamente, le colonie di *C. albicans* possono variare in funzione del terreno di coltura e delle condizioni ambientali di crescita, tra cui la disponibilità di nutrienti, la temperatura e pH. In condizioni di coltura che favoriscono la crescita lievitiforme, *C. albicans* forma generalmente delle colonie lisce, di colore bianco-crema, cremose e convesse. Il microrganismo può essere coltivato a temperature diverse; l'incubazione a 37°C, soprattutto in presenza di ulteriori segnali ambientali, può favorire la crescita filamentosa (**Figura 3**).

C. albicans può inoltre andare incontro a fenomeni reversibili di switching fenotipico, attraverso i quali cellule geneticamente identiche assumono stati fenotipici differenti. Tra i fenomeni meglio caratterizzati rientra lo *switching white–opaque*, che determina il passaggio reversibile tra cellule "white", generalmente rotonde e gemmanti, e cellule "opaque", più allungate e caratterizzate da differenti proprietà fisiologiche, antigeniche e riproduttive. Tale processo è distinto dalla transizione tra crescita lievitiforme e filamentosa, sebbene entrambi siano regolati da segnali ambientali e da specifiche reti trascrizionali (Murray *et al.*, 2017). Lo switching fenotipico contribuisce alla capacità di *C. albicans* di adattarsi ai diversi microambienti dell'ospite e può influenzarne il metabolismo, l'interazione con il sistema immunitario, la capacità di colonizzazione e il comportamento riproduttivo.

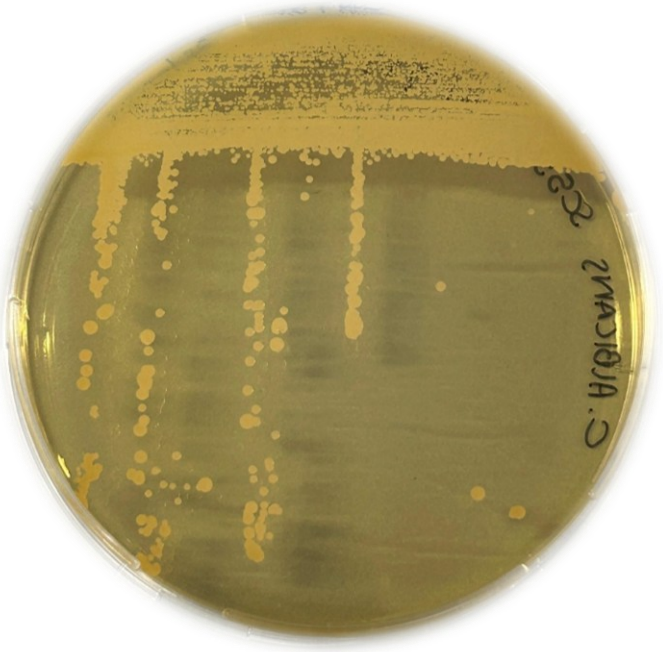


Figura 3 – Colonie di *Candida albicans* cresciute su terreno SAB+CAF a 37°C in 24h. Le colonie appaiono rotonde, lisce e color crema.

Un elemento fondamentale della cellula fungina è la parete cellulare, una struttura dinamica e altamente organizzata, formata da polisaccaridi e proteine collegati prevalentemente mediante legami covalenti e interazioni non covalenti. La parete svolge un ruolo essenziale nella morfologia e nel mantenimento dell'integrità cellulare. Inoltre, protegge la cellula dalle sollecitazioni ambientali e osmotiche e partecipa all'interazione con l'ospite. Le componenti esposte sulla sua superficie possono mediare l'adesione ai tessuti e ai materiali abiotici, ma possono anche essere riconosciute dai recettori del sistema immunitario (Antonelli *et al.,* 2017).

A differenza della parete batterica, la parete della cellula fungina è priva di peptidoglicano e di lipopolisaccaride. In *C. albicans* è costituita principalmente da β-glucani, chitina e mannoproteine. I β-glucani e la chitina formano la componente strutturale interna, mentre le mannoproteine costituiscono prevalentemente la regione esterna. Sono inoltre presenti componenti meno abbondanti, tra cui alcuni lipidi e glicolipidi. Le sue caratteristiche, compreso lo spessore, possono variare in relazione alla fase del ciclo cellulare, alla morfologia e alle condizioni ambientali. La sintesi e il rimodellamento richiedono un'azione controllata da diversi enzimi biosintetici ed idrolitici, quali chitinasi, chitin-sintetasi, glucanasi e glucan-sintetasi. Sono inoltre presenti, anche se in minor misura, lipidi ricchi di fosforo, come i fosfolipomannani (Bendinelli *et al.*, 2017).

Dal punto di vista ultrastrutturale, nella parete di *C. albicans* si distinguono una regione esterna ricca di mannoproteine, mentre la regione più interna contiene polisaccaridi strutturali, come i β-glucani e la chitina. Questi polimeri microfibrillari formano uno scheletro rigido che conferisce resistenza meccanica e stabilità alla cellula (**Figura 4**). Dal punto di vista quantitativo, i β-glucani costituiscono la componente polisaccaridica strutturale più abbondante della parete. La chitina, nonostante sia presente in quantità minori, svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della resistenza meccanica e nella formazione dei setti e delle cicatrici di gemmazione. Nello strato esterno, sono presenti le mannoproteine che contribuiscono alle proprietà antigeniche della superficie cellulare e mediano numerose interazioni con l'ambiente e con le cellule dell'ospite (Chaffin *et al.,* 1998).

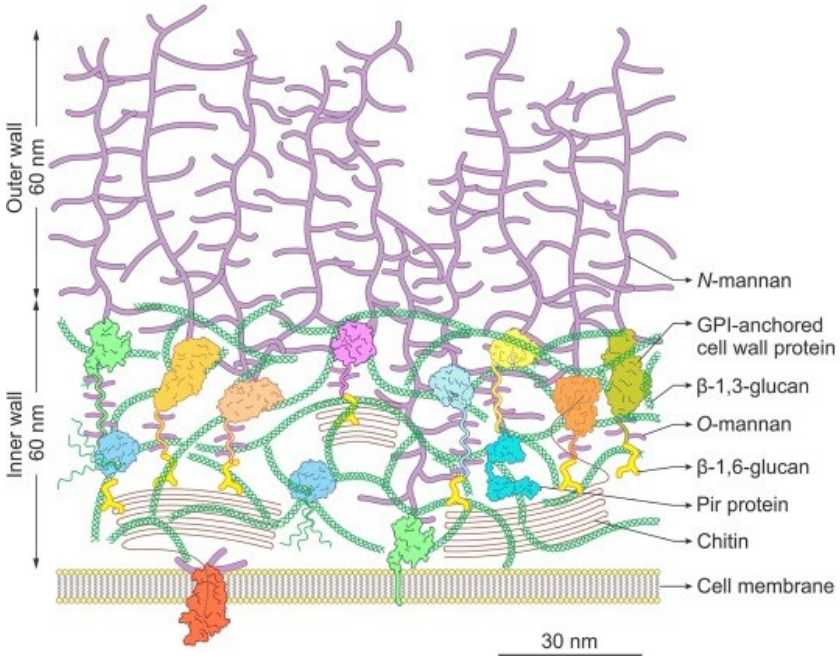


Figura 4 – Parete cellulare di Candida albicans, formata internamente da uno scheletro di catene di β (1,3) - e β (1,6) -glucani e chitina e da uno strato esterno fibrillare caratterizzato da proteine mannosilate (Lenardon *et al.,* 2020).

Le proteine associate alla parete sono divise in tre gruppi in base alla modalità con cui interagiscono con i polisaccaridi parietali:

- Il primo gruppo comprende proteine dotate di un ancora glicosil-fosfatidil inositolo (GPI). Queste proteine sono inizialmente ancorate alla membrana plasmatica mediante il GPI; durante il loro trasferimento alla parete, una porzione dell'ancora

viene utilizzata per formare un legame covalente con β- (1,6)-glucano (Poulain, 2015);

- il secondo è costituito da proteine Pir (proteins with internal repeats) legate al β-1,3 tramite legami covalenti labili agli alcali (Poulain, 2015);
- il terzo gruppo è formato da proteine associate alla parete mediante interazioni non covalenti e, pertanto, più facilmente solubilizzabili. Tra le proteine identificate nelle frazioni di parete figurano anche enzimi metabolici e altre proteine prive di una sequenza segnale convenzionale per la secrezione, tra cui l'enolasi. Queste proteine, comunemente definite *moonlighting proteins,* possono svolgere sulla superficie cellulare funzioni differenti da quelle esercitate nel citoplasma (Pitarch *et al.,* 2002). Nelle frazioni associate alla parete sono state rilevate anche proteine chaperone. Tra queste, Hsp90 è una proteina prevalentemente citoplasmatica che regola numerose vie di segnalazione coinvolte nella risposta agli stress ambientali. Studi successivi ne hanno dimostrato il coinvolgimento nella risposta allo stress termico e nel rimodellamento della parete cellulare mediato dalle vie MAPK (Leach *et al.,* 2012).

L'architettura della parete cellulare è fondamentale sia per il mantenimento dell'integrità strutturale del fungo sia per la modulazione della sua virulenza. Attraverso modifiche della composizione e dell'esposizione delle componenti parietali, *C. albicans* è in grado di modulare il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite e di adattarsi a diversi ambienti fisiologici, favorendo la colonizzazione la persistenza dell'infezione (Lenardon *et al.,* 2020).
Questa struttura, inoltre, continua ad essere ampliamente studiata in quanto rappresenta una fonte di bersagli per i farmaci antifungini e di biomarcatori utilizzabili a scopo diagnostico. Poiché alcune sue componenti sono assenti nelle cellule umane, la parete costituisce anche un potenziale bersaglio per nuove strategie terapeutiche e preventive (Poulain, 2015).

Al di sotto della parete cellulare, si trova la membrana plasmatica, costituita da un doppio strato lipidico, che svolge funzioni strutturali, di trasporto e di segnalazione e regola gli scambi tra la cellula e l'ambiente esterno. L'ergosterolo è il principale sterolo della membrana plasmatica fungina ed è sintetizzato nel reticolo endoplasmatico; i lipidi sterolici possono inoltre essere immagazzinati, sotto forma esterificata, nei corpi lipidici e successivamente mobilizzati (Bendinelli *et al.*, 2017). L'ergosterolo contribuisce a regolare l'organizzazione, la fluidità e la permabilità della membrana, nonché l'attività di numerose

proteine di membrana, partecipando alla risposta agli stress ambientali. La membrana plasmatica è anche coinvolta enzimaticamente nella sintesi della parete cellulare, ospitando diversi complessi enzimatici, tra cui le β-(1,3)-glucano sintasi e alcune chitina sintasi (Talapko *et al.,* 2021).

1.2.2 Manifestazioni cliniche

Candida albicans è un membro del microbiota e colonizza in modo asintomatico diverse nicchie dell'organismo umano. Negli individui immunocompetenti, si comporta generalmente da commensale, mantenendosi in equilibrio con gli altri membri del microbiota. Questo equilibrio può essere compromesso da variazioni nella disponibilità di nutrienti o di pH, dall'uso prolungato di antibiotici o da alterazioni del sistema immunitario, favorendo la proliferazione del microrganismo e, in determinate condizioni, lo sviluppo di infezioni (Gulati e Nobile, 2016).
C. albicans è storicamente la specie del genere più frequentemente isolata nei campioni clinici; tuttavia, la sua prevalenza varia considerevolmente in funzione della sede anatomica, dell'area geografica e della popolazione considerata. Inoltre, negli ultimi decenni è aumentana la proporzione delle infezioni causate dalle specie *non-albicans.* Nei dati di sorveglianza statunitensi relativi al periodo 2017-2021, *C. albicans* è risultata responsabile del 37,1% dei casi di candiemia (Murray *et al.*, 2017; Jenkins et al., 2025).

Sebbene sia in grado di infettare sia individui immunocompetenti sia immunocompromessi, le infezioni invasive si manifestano prevalentemente nei soggetti che presentano specifici fattori predisponenti. Tra questi figurano l'immunodeficienza avanzata, alcune neoplasie, la neutropenia, i trattamenti chemioterapici o immunosoppressivi, gli interventi chirurgici maggiori, l'impiego di antibiotici ad ampio spettro e la presenza di dispositivi invasivi, in particolare dei cateteri venosi centrali. La formazione di biofilm di *C. albicans* sui dispositivi medici favorisce la persistenza del microrganismo e ne riduce la sensibilità ai farmaci antifungini e ai meccanismi di difesa dell'ospite. Le cellule che si distaccano dal biofilm possono raggiungere il circolo sanguigno e contribuire allo sviluppo della candidemia e alla successiva disseminazione dell'infezione (Gulati e Nobile, 2016).

Le infezioni di *C. albicans* comprendono forme superficiali, che interessano la cute e le mucose, e forme invasive. Queste ultime includono la candidemia e le infezioni profonde o disseminate, che possono interessare diversi organi e tessuti, tra cui reni, fegato, milza, cuore, sistema nervoso centrale, occhi, ossa e articolazioni. La candidemia e le altre forme

invasive sono associate a una mortalità elevata, la cui entità varia in funzione della popolazione, delle patologie concomitanti, della tempestività della diagnosi e dell'efficacia del trattamento (Murray *et al.*, 2017).

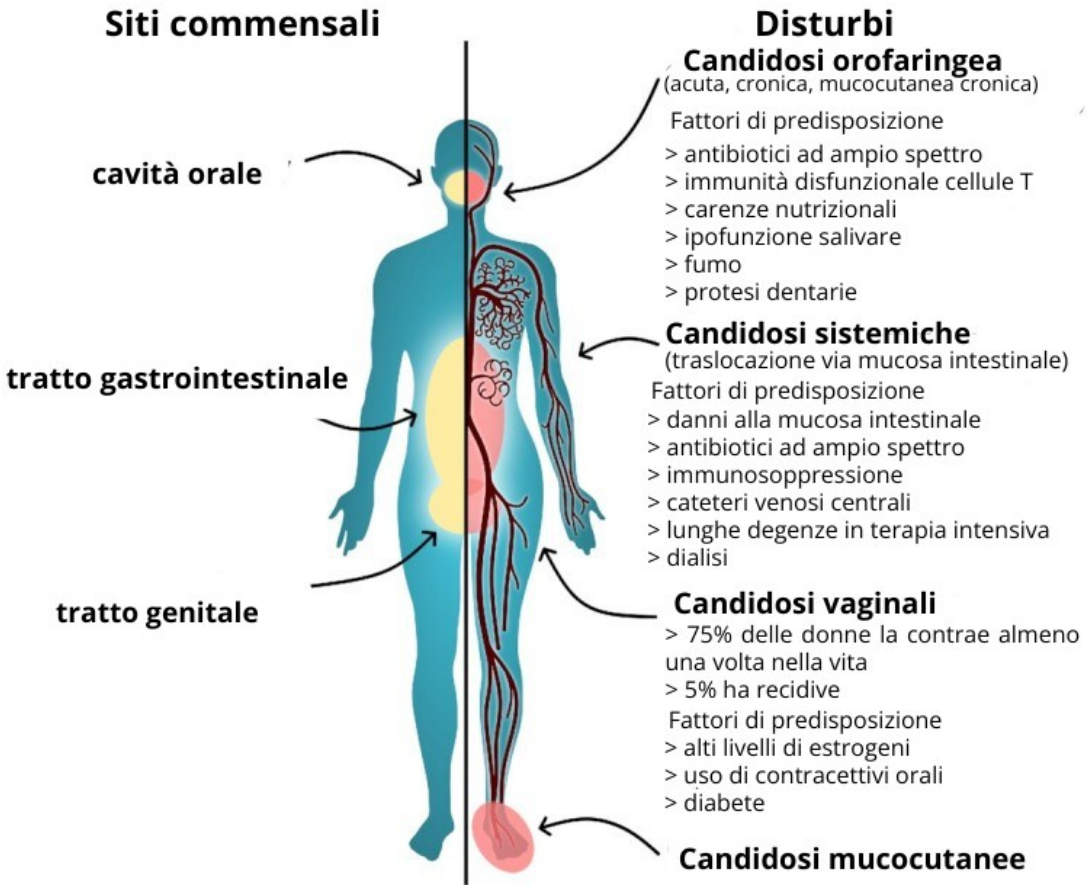


Figura 5 – A sinistra vi è la raffigurazione delle nicchie in cui *Candida albicans* è presente come commensale, a destra l'elenco di tutte i disturbi che può causare: da infezioni superficiali ad infezioni sistemiche profonde (immagine adattata, D'Enfert *et al*., 2021).

Le infezioni mucosali possono essere limitate all'oro-faringe o estendersi. Nelle donne, anche la mucosa vaginale rappresenta una sede frequente (**Figura 5**). Le candidosi orali possono presentarsi con caratteristiche cliniche differenti. Tra le principali forme si distinguono la candidosi pseudomembranosa, la candidosi iperplastica cronica e quella eritematosa (Millsop e Fazel, 2016):

- Candidosi pseudomembranosa: manifestazione più classica, nota come mughetto. Si manifesta con placche bianche sulla lingua, sulla mucosa buccale, sul palato duro e/o

molle e sulla faringe. In genere i pazienti sono asintomatici ma possono sviluppare sintomi quali bruciore, alterazione nella percezione del gusto e difficoltà nella deglutizione. Questo tipo di infezione, oltre ad interessare i pazienti affetti da HIV, è stata anche osservata nei neonati, negli anziani, nei pazienti affetti da cancro e/o sottoposti a chemioterapia. Tra gli ulteriori fattori predisponenti figurano il diabete non controllato, l'impiego di antibiotici, l'uso di corticosteroidi inalatori e la presenza di protesi dentarie (Millsop e Fazel, 2016);

- Candidosi iperplastica cronica: le lesioni si presentano sotto forma di placche bianche ben circoscritte. Le placche possono essere traslucide o opache e possono avere un aspetto nodulare o maculato (Millsop e Fazel, 2016);
- Candidosi eritematosa: si manifesta con aree eritematose, generalmente prive delle placche bianche tipiche della forma pseudomembranosa. Può essere associata a bruciore e dolore del cavo orale, soprattutto a livello della lingua. La diagnosi clinica può risultare meno immediata rispetto a quella della forma pseudomembranosa. È più difficile da diagnosticare ed è stata riportata principalmente nei pazienti HIV-positivi (Antonelli *et al.,* 2017).

Candida albicans è in grado di provocare infezioni anche a livello del tratto gastrointestinale e dell'apparato genitale:

- Candidosi esofagea: è un'infezione caratterizzata dalla comparsa di ulcere ed erosioni sull'esofago, disfagia e dolore retrosternale. È prevalentemente associata a una compromissione dell'immunità cellulo-mediata. Tra i principali fattori di rischio figurano l'infezione avanzata da HIV, le neoplasie, la chemioterapia, il diabete, l'impiego di antibiotici o corticosteroidi e la radioterapia della regione cervicale o toracica (Mohamed *et al.,* 2019);
- Candidosi vulvovaginale: infezione mucosale che interessa soprattutto le donne in età fertile. I fattori predisponenti comprendono la gravidanza o altre situazioni in cui i livelli di estrogeni sono elevati, il diabete mellito, l'immunosoppressione e gli antibiotici. La candidosi vulvovaginale, insieme alla vaginosi batterica e alla tricomoniasi, rientra le cause più comuni di sintomi vaginali (Lopez, 2015).

Le candidosi invasive, invece, comprendono la candidemia e le infezioni profonde o disseminate. Oltre alla diffusione ematogena, possono manifestarsi forme focali, tra cui endocardite, peritonite, meningite, osteomielite, artrite ed endoftalmite. Queste infezioni

costituiscono un rilevante problema sanitario, soprattutto nei pazienti critici, nei soggetti immunocompromessi e nelle unità di terapia intensiva (Pappas *et al.,* 2016).

1.3 Fattori di virulenza

La patogenicità di *C. albicans* è favorita dalla presenza di numerosi fattori di virulenza che contribuiscono alle diverse fasi dell'infezione fungina. Tra questi figurano la capacità di adesione ai tessuti, la plasticità morfologica, l'idrofobicità della superficie cellulare, la secrezione enzimi idrolitici, la produzione di candidalisina, la formazione di biofilm e lo switching fenotipo (Murray *et al.,* 2017).

Oltre alla presenza dei fattori di virulenza, anche specifici attributi di fitness contribuiscono al potenziale patogeno, consentendo al microrganismo di sopravvivere alla disponibilità di nutrienti, alle variazioni di pH e agli stress incontrati nei diversi distretti dell'ospite (Talapko *et al.,* 2021).

I fattori che favoriscono il potenziale patogenico di *C. albicans* sono (**Figura 6**):

- Pleomorfismo: è la capacità del fungo di passare da una forma lievitiforme ad una forma filamentosa di ife o pseudoife (muffa) in risposta a stimoli ambientali o fattori di stress. Le diverse morfologie svolgono funzioni complementari durante l'infezione: la crescita ifale favorisce l'adesione, il danneggiamento e la penetrazione dei tessuti, mentre la forma lievitiforme facilita la dispersione e la colonizzazione di nuove sedi. La capacità di passare da una forma all'altra contribuisce inoltre all'interazione con le difese immunitarie dell'ospite (D'Enfert *et al.*, 2021).
- Adesine: rappresentano fattori essenziali per la colonizzazione del fungo sui tessuti dell'ospite. Queste proteine di superficie permettono l'adesione del lievito ad altri microrganismi, a superfici biotiche e abiotiche, come cateteri o impianti dentali, e alle cellule dell'ospite. Le adesine maggiormente studiate sono le proteine della sequenza simile all'agglutinina (Als) (Mayer *et al.*, 2013). Alcune proteine associatr alla crescita ifale, tra cui Als3 e Hwp1 (*Hyphal wall protein 1*) sono espresse principalmente durante la filamentazione e svolgono un ruolo fondamentale per l'adesione del fungo alle cellule dell'ospite e nella formazione dle biofilm (Talapko *et al.,* 2021).
- Invasione tissutale: *C. albicans* può attraversare le barriere epiteliali mediante due meccanismi principali: l'edocitosi indotta e la penetrazione attiva. Nell'endocitosi indotta sono espresse specifiche proteine (come Als3 e Ssa1) chiamate invasine

fungine, interagiscono con recettori presenti sulla superficie delle cellule dell'ospite, inducendo queste ultime a internalizzare il microrganismo. Al contrario, la penetrazione attiva dipende dalla combinazione tra crescita direzionale, forza meccanica e fattori che danneggiano i tessuti. I meccanismi coinvolti non sono tuttavia ancora completamente chiariti (Mayer *et al.*, 2013).

- Formazione di biofilm: è una struttura tridimensionale complessa formata da cellule microbiche incorporate in una matrice extracellulare. *C. albicans* è in grado di produrre biofilm sia su superfici biotiche (superfici cellulari delle mucose) che su superfici abiotiche (cateteri o protesi dentarie). Le cellule presenti nei biofilm mostrano una maggiore tolleranza ai farmaci antifungini e ai meccanismi di difesa dell'ospite rispetto alle cellule planctoniche. Di conseguenza, le infezioni associate a biofilm risultano spesso persistenti e difficili da eradicare (Mayer *et al.*, 2013).
- Enzimi idrolitici: la secrezione enzimi idrolitici contribuisce all'acquisizione dei nutrienti, al danneggiamento delle cellule dell'ospite e all'invasione dei tessuti. Le principali classi comprendono le aspartil proteasi secrete (Sap), le fosfolipasi e le lipasi. Alcune Sap possono inoltre degradare componenti della risposta immunitaria, contribuendo all'evasione delle difese dell'ospite. L'attività emolitica, pur potendo favorire l'acquisizione del ferro dall'eme, non costituisce una classe di enzimi idrolitici (Macias-Paz *et al.*, 2023).
- Candidalisina: è un peptide citolitico prodotto durante la crescita ifale e derivato dal processamento della proteina Ece1. La candidalisina è una molecola anfipatica con una struttura ad alfa-elica, che danneggia le membrane cellulari dell'ospite, porta all'attivazione di diverse vie di segnalazione di risposta al pericolo e contribuisce alla risposta infiammatoria (Moyes *et al.*, 2016).
- Acquisizione di metalli: i metalli, quali ferro, zinco, maganese e rame sono fondamentali per la crescita e la sopravvivenza. Nel caso di *C. albicans* il ferro è il metallo più studiato. Il lievito acquisisce questo metallo tramite diverse strategie, quali il sistema di assorbimento dei siderofori ed il sistema di assorbimento eme-ferro. *C. albicans*, infatti, non sintetizza siderofori propri, ma è in grado di utilizzare siderofori esogeni (Mayer *et al.*, 2013).
- Tigmotropismo: consiste nella capacità delle ife di percepire il contatto con una superficie e di modificare di conseguenza la direzione della propria crescita. Questo processo favorisce la formazione del biofilm sulle superfici abiotiche e la conseguente diffusione dell'organismo nel tessuto dell'ospite (Talapko *et al.*, 2021).

La resistenza agli antifungini, seppur non propriamente un fattore di virulenza rappresenta un importante determinante della persistenza dell'infezione e dell'insuccesso terapeutico, con un notevole impatto sulla salute umana. Può essere causato dall'uso eccessivo o improprio di farmaci antifungini ed ha favorito, nei ceppi di *C. albicans*, lo sviluppo di resistenze nei confronti di molteplici molecole terapeutiche, rendendo più difficile il trattamento delle infezioni fungine (Cannon *et al.,*2007).

Gli attributi di fitness contribuiscono indirettamente al potenziale patogeno, aumentando la capacità del microrganismo di sopravvivere e proliferare nelle diverse nicchie dell'ospite. Nel caso di *C. albicans*, tali attributi comprendono la variabilità genetica, la capacità di adattamento ambientale, la risposta agli stress e la plasticità metabolica. La variabilità genetica e genomica può produrre differenze fenotipiche che favoriscono l'adattamento a specifiche condizioni ambientali o pressioni selettive (Poulain, 2015).
La capacità di adattarsi all'ambiente ospite si manifesta nella capacità di rispondere ai cambiamenti di pH, alla presenza di siero e alla disponibilità di nutrienti. Inoltre, la risposta agli stress ambientali favorisce la sopravvivenza del fungo in condizioni ostili, proteggendolo da stress derivanti dall'ospite, come l'esposizione a composti tossici o a temperature estramente basse o elevate. La plasticità metabolica, è un ulteriore attributo di fitness sostenuto da diversi sistemi di acquisizione dei nutrienti e dall'utilizzo di diverse fonti di carbonio e di azoto. Queste proprietà favoriscono la colonizzazione, la crescita e la persistenza di *C. albicans* nell'organismo umano (Mayer *et al.,* 2013; Gulati e Nobile, 2016).

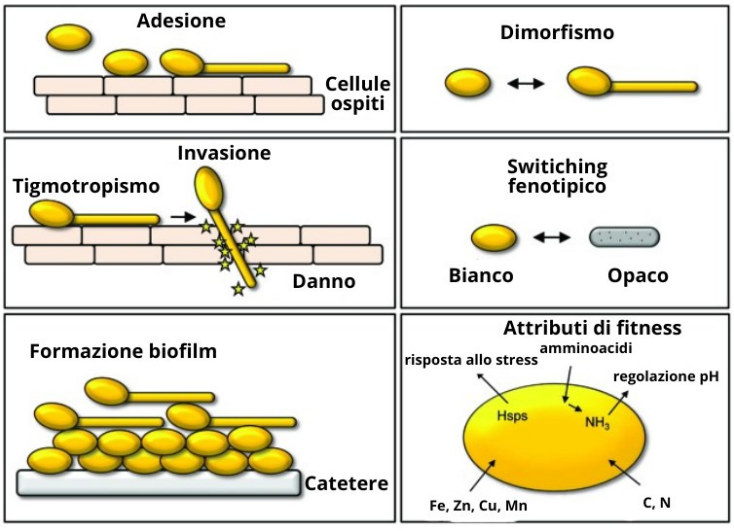


Figura 6 – Panoramica dei meccanismi di patogenicità di *Candida albicans*. Le cellule di lievito aderiscono alle cellule ospiti tramite le adesine favorendo il passaggio da cellula di lievito a cellula ifale. Invadono l'ospite

tramite endocitosi e penetrazione attiva e formano biofilm sulle superfici abiotiche e biotiche. La patogenicità è ulteriormente influenzata dalle risposte allo stress, dalla flessibilità metabolica e dall'assorbimento di nutrienti e metalli essenziali alla sua sopravvivenza (immagine adattata da Mayer *et al*., 2013).

Oltre ai classici fattori di virulenza, più di recente è emerso il ruolo delle vescicole extracellulari in diversi processi fisiologici e patologici. Queste strutture partecipano al trasporto di molecole, alla comunicazione tra cellule fungine e alle interazioni tra il microrganismo e l'ospite, contribuendo così a diversi aspetti della patogenicità. Le vescicole extracellulari (EV) sono particelle delimitate da un doppio strato lipidico, secrete dalle cellule e contenenti un carico eterogeneo di proteine, lipidi, polisaccaridi, acidi nucleici e metaboliti. Il loro contenuto può essere trasferito ad altre cellule fungine o interagire con le cellule dell'ospite, modulandone la risposta immunitaria. In particolare, le EV prodotte da biofilm di *C. albicans* contribuiscono alla formazione e all'organizzazione della matrice extracellulare mediante il trasporto di proteine e polisaccaridi. La matrice così prodotta può sequestrare alcuni farmaci antifungini, aumentando la tolleranza del biofilm al trattamento. Ulteriori studi hanno associato le EV anche al distacco delle cellule dal biofilm e alla modulazione dell'attività proteolitica; tuttavia, il loro ruolo complessivo nelle diverse fasi del ciclo del biofilm non è ancora completamente definito (Zarnowski *et al.,*2018).

1.4 Formazione del biofilm di *C. albicans*

Il biofilm è una comunità organizzata di cellule microbiche adese a un substrato biotico o abiotico all'interno di una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) prodotta alle cellule stesse. I biofilm possono svilupparsi su superfici biotiche, come le mucose e altri tessuti dell'ospite, oppure su superfici abiotiche. In ambito clinico, possono formarsi sui materiali sintetici impiegati per la produzione di cateteri, protesi, dispositivi cardiaci e altri dispositivi medic (Pereira *et al.*, 2021).
Il trattamento di infezioni associate a biofilm può richiedere una terapia antifungina sistemica e, quando possibili e clinicamente indicato, la rimozione del dispositivo infetto. La ridotta sensibilità dei biofilm ai trattamenti, la possibile tossicità degli antifungini, la difficoltà o l'impossibilità di rimuovere alcuni dispositivi e il rischio di recidiva rendono queste infezioni complesse da trattare. Ciò può comportare un prolungamento del ricovero, un aumento dei costi sanitari e un peggioramento degli esiti clinici (Ponde *et al.*, 2021).

Il processo di formazione di un biofilm è caratterizzato da 4 fasi principali:

1. Adesione
2. Proliferazione – filamentazione
3. Maturazione
4. Dispersione

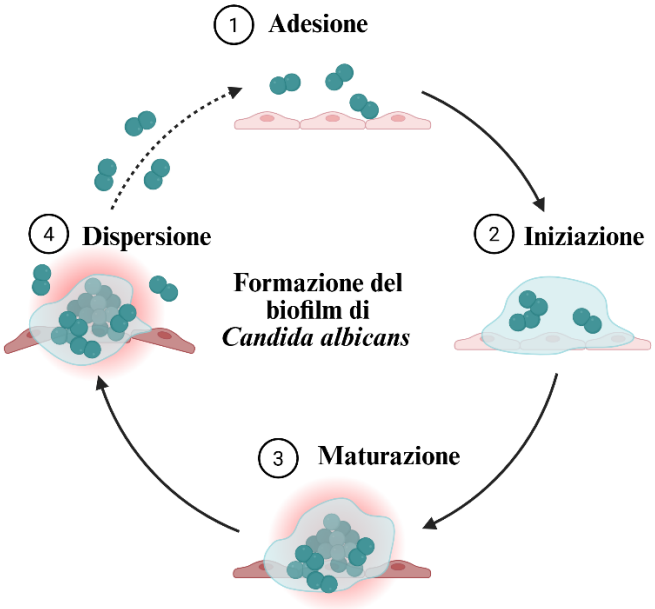


Figura 7 – Fasi di formazione del biofilm: 1) assorbimento e adesione delle cellule del lievito ad un substrato; 2) formazione di microcolonie e produzione di una matrice extracellulare; 3) maturazione; 4) dispersione delle cellule dal biofilm maturo che migrano nel circolo sanguigno o in altri siti anatomici (Ponde *et al.*, 2021) (immagine adattata da Biorender.com).

La prima fase del processo prevede l'adesione delle singole cellule di *C. albicans* al substrato, mediata principalmente da proteine di superficie, tra cui le adesine. Questo processo consente la formazione dello strato basale del biofilm. Durante la successiva fase di proliferazione e filamentazione, le cellule di lievito le cellule adese si moltiplicano e una parte della popolazione dà origine a pseudoife e ife, determinando un aumento della biomassa e lo sviluppo tridimensionale della comunità. Le ife rappresentano una componente essenziale dell'architettura del biofilm perché contribuiscono alla sua stabilità e costituiscono un'impalcatura rigida per l'adesione di ulteriori cellule fungine o, in biofilm polimicrobici, di batteri. Nella terza fase, ossia quella di maturazione, oltre alla continua produzione di ife, si ha anche la secrezione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS). Quest'ultima contiene proteine, lipidi, acidi nucleici, α-mannani, β-1,6 glucani e β-1,3-glucani che, nonostante siano in minor quantità, rappresentano il polisaccaride principale

legato alla resistenza agli antimicotici (Mitchell *et al*., 2016; Pereira *et al.*, 2021). Infine, durante la fase di dispersione, le cellule si distaccano dal biofilm maturo. Queste cellule possono raggiungere nuove sedi e contribuire alla colonizzazione o, in determinate condizioni, alla disseminazione dell'infezione. È stato osservato che le cellule disperse dal biofilm maturo presentano caratteristiche fenotipiche e trascrizionali che le distinguono dalle cellule planctoniche. In modelli sperimentali, infatti, mostrano una maggiore capacità maggiore di aderire ai substrati biotici ed abiotici, una minor suscettibilità agli antimicotici ed anche una maggior capacità di danneggiare le cellule (Ponde *et al*., 2021).

I biofilm di *C. albicans* sono spesso associati ad infezioni e persistenti e difficili da eradicare. La loro formazione costituisce pertanto un importante fattore di virulenza e può contribuire all'elevato tasso di mortalità associato alle candidosi correlate ai dispositivi medici. Le infezioni causate da biofilm misti risultano particolarmente difficili da trattare poiché un trattamento attivo soltanto contro uno dei microrganismi presenti può non eliminare gli altri membri della comunità. Inoltre, le interazioni tra specie diverse possono modificare la sensibilità ai farmaci e le proprietà del biofilm. Ad esempio, in modelli *in vitro* di biofilm composti da *S. aureus* e *C. albicans*, l'efficacia del miconazolo risulta ridotta e sono necessari concentrazioni maggiori rispetto a quelle efficaci contro biofilm monospecifici. Questo risultato evidenzia la difficoltà di individuare trattamenti efficaci contro i biofilm polimicrobici; tuttavia, trattandosi di evidenze sperimentali in vitro, tali concentrazioni non possono essere direttamente trasferite alla pratica clinica (Ponde *et al.,* 2021). La ridotta sensibilità di *C. albicans* ai farmaci antifungini tradizionali è multifattoriale e dipende principalmente da tre fattori: la sovraregolazione delle pompe di efflusso, la presenza della matrice extracellulare. È stata inoltre proposta la presenza di "*cellule persister*", ossia una sottopopolazione di cellule metabolicamente inattive. Tali cellule sono fenotipicamente tolleranti e capaci di sopravvivere all'esposizione a concentrazioni elevate di antifungini senza possedere una resistenza genetica stabile (Gulati e Nobile, 2016).

Per sviluppare terapie efficaci contro le infezioni associate a biofilm, è importante comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base della formazione, maturazione e persistenza. Particolare importanza assumono i meccanismi di adesione tra le cellule di *C. albicans* e le superfici, nonché le interazioni tra le cellule all'interno del biofilm. L'identificazione di questi meccanismi potrebbe portare allo sviluppo di strategie farmacologiche che potrebbero interferire con le cellule del biofilm, limitando la dispersione cellulare (Gulati e Nobile, 2016).

1.5 Vescicole extracellulari

I funghi, e in particolare i lieviti, sono ampiamente utilizzati come modelli sperimentali nella ricerca scientifica, poiché, essendo eucarioti semplici, possono essere utilizzati per studiare la fisiologia cellulare e la biologia molecolare di eucarioti più complessi. Analogamente a molti batteri, le cellule fungine sono protette da una parete cellulare. Nonostante questo, la comunicazione intra- ed intercellulare nei funghi è possibile grazie a diversi meccanismi, uno dei quali è svolto dalle vescicole extracellulari (Liebana *et al*., 2021).

Le EV, infatti, sono rilasciate, sia da cellule eucariotiche che procariotiche, durante i normali processi fisiologici, e hanno un'importanza biologica elevata in quanto permettono la comunicazione fra le cellule. La loro composizione, tuttavia, varia in funzione del tipo cellulare, dello stato fisiologico e delle condizioni ambientali (Liebana *et al*., 2021; Ronquist, 2019).

Le vescicole extracellulari (EV) sono state studiate soprattutto nelle cellule dei mammiferi. In passato venivano classificate in esosomi, microvescicole e corpi apoptotici in base alla presunta origine subcellulare e, in parte, alle dimensioni. Poiché queste popolazioni presentano intervalli dimensionali e composizioni molecolari sovrapposti, tali criteri non permettono però una distinzione univoca. Le linee guida MISEV2023 raccomandano quindi di utilizzare il termine generale "vescicole extracellulari", specificando, quando necessario, caratteristiche operative come dimensioni, densità, composizione o origine cellulare (Welsh et al., 2024). Gli esosomi sono EV di origine endosomiale. Si formano all'interno degli endosomi tardivi attraverso l'invaginazione della loro membrana, che genera vescicole intraluminali e porta alla formazione dei corpi multivescicolari. Quando questi si fondono con la membrana plasmatica, le vescicole vengono rilasciate nello spazio extracellulare. Gli esosomi sono generalmente descritti come particelle di dimensioni nanometriche, spesso inferiori a 200 nm, ma il loro intervallo dimensionale si sovrappone a quello di altre EV. Nelle preparazioni di EV di origine endosomiale sono spesso arricchite le tetraspanine CD9, CD63 e CD81, insieme a proteine coinvolte nella biogenesi endosomiale, come TSG101 e ALIX. Anche Hsp70 e Hsp90 possono essere presenti nel carico delle EV, ma non sono marcatori di superficie specifici ed esclusivi degli esosomi (Kalluri & LeBleu, 2020; Welsh *et al.,* 2024). Le microvescicole, chiamate anche ectosomi, si formano invece per gemmazione e distacco diretto dalla membrana plasmatica. Le loro dimensioni sono spesso comprese tra circa 100 nm e 1 μm, sebbene non esistano limiti universalmente riconosciuti.

La composizione varia in funzione della cellula di origine e delle condizioni di produzione. In alcune EV, la fosfatidilserina può essere esposta sul foglietto esterno della membrana; si tratta tuttavia di un fosfolipide, non di una proteina. Anche CD40 e i fattori di ADP-ribosilazione possono essere rilevati in determinate preparazioni, ma non rappresentano marcatori universali delle microvescicole. I corpi apoptotici si formano durante l'apoptosi, in seguito alla comparsa di estroflessioni della membrana plasmatica e alla frammentazione cellulare. In genere sono più grandi delle piccole EV e misurano circa 1–5 µm, anche se possono esistere particelle apoptotiche di dimensioni inferiori. Possono contenere proteine, acidi nucleici, frammenti di cromatina e porzioni di organelli cellulari. I prostasomi, infine, non costituiscono una quarta classe generale di EV. Sono una popolazione eterogenea di vescicole rilasciate dalle cellule epiteliali della prostata nel liquido seminale. Interagiscono con gli spermatozoi e sono coinvolti nella regolazione della motilità, della capacitazione e della reazione acrosomiale, oltre che nella loro protezione immunologica. Il contributo dei prostasomi alla fertilità è documentato, anche se alcuni dei meccanismi coinvolti non sono ancora del tutto chiari (Urabe et al., 2020; Yang et al., 2024; Liebana et al., 2021).

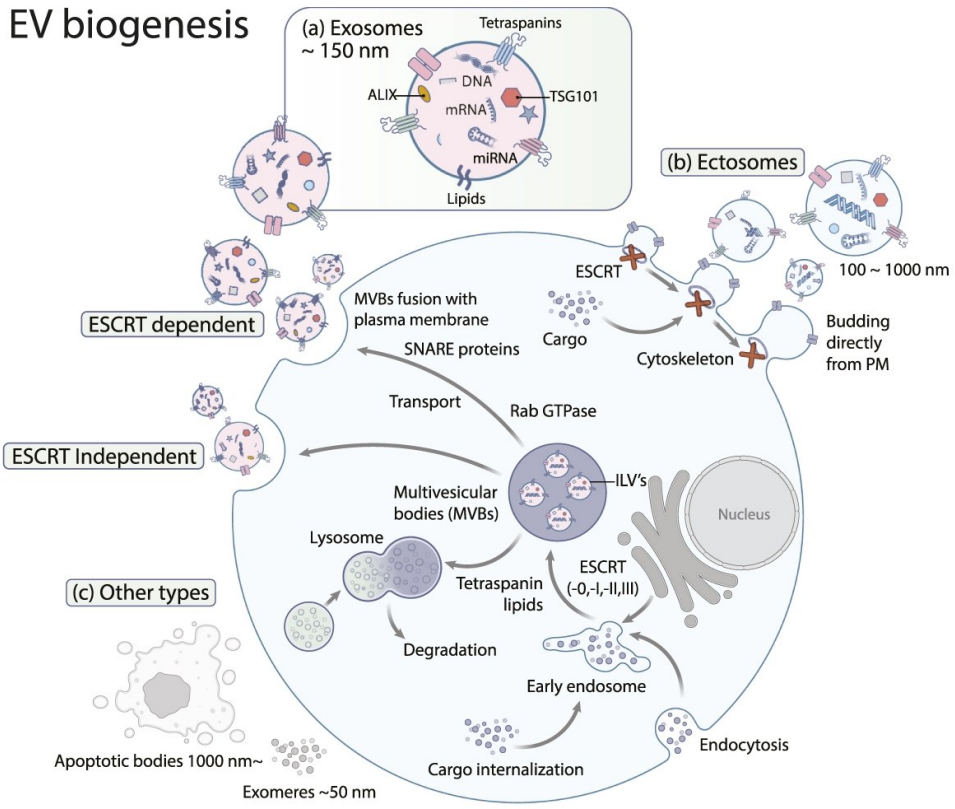


Figura 8 – Suddivisione delle vescicole extracellulari in base alla loro biogenesi: esosomi, ectosomi e corpi apoptotici (Yu *et al.,* 2024).

1.5.1 Vescicole extracellulari fungine

Le vescicole extracellulari di origine fungina sono state osservate per la prima volta nei primi anni Settanta, ma tuttavia, sono state descritte e caratterizzate solo nel 2007, grazie agli studi condotti sulle macromolecole in grado di attraversare la parete cellulare di *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues *et al.,* 2007). A partire da questa osservazione, le vescicole sono state successivamente identificate e analizzate in diverse specie fungine, come i funghi dimorfi *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, o *Malassezia sympodialis* e *Candida albicans* (Imparato *et al.,* 2024; Liebana *et al.*, 2021).

Da un punto di vista molecolare, le EV fungine presentano delle similarità con quelle di mammifero. Entrambe trasportano RNA funzionali, come gli RNA messaggeri (mRNA), gli RNA transfer (tRNA), gli RNA ribosomiali (rRNA) ed altre molecole di RNA non codificanti (miRNA, snRNA). La composizione del carico varia, tuttavia, in funzione della specie, del tipo cellulare e delle condizioni ambientali. Una volta trasferite alle cellule bersaglio, queste molecole possono contribuire alla comunicazione intercellulare e alla regolazione dell'espressione genica. La caratterizzazione degli RNA associati alle EV potrebbe quindi favorire lo sviluppo di nuovi biomarcatori e strumenti diagnostici.
La membrana delle EV protegge gli acidi nucleici dalla degradazione da parte delle RNasi extracellulari, aumentandone la stabilità e facilitandone il trasferimento tra le cellule Gli RNA trasportati possono modulare l'espressione genica delle cellule riceventi e influenzare l'interazione tra il fungo e l'ospite. A seconda del contesto, questo meccanismo può contribuire alla risposta immunitaria, alla persistenza dell'infezione e alla regolazione dei fattori di virulenza.
Dal punto di vista del loro contenuto – *cargo* –, le EV fungine sono eterogenee sia nel contenuto proteico sia lipidico. Analisi proteomiche hanno dimostrato la presenza di diverse proteine coinvolte nella patogenesi, nella risposta immunitaria e nel metabolismo. In ambito lipidico, invece, è stata osservata la presenza di ergosterolo e lanosterolo e di glicosfingolipidi tra cui il glucosilceramide. Sono stati inoltre identificati diversi fosfolipidi, come fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerolo (PG) (Liebana *et al.*, 2021; Brandt *et al.,* 2024).

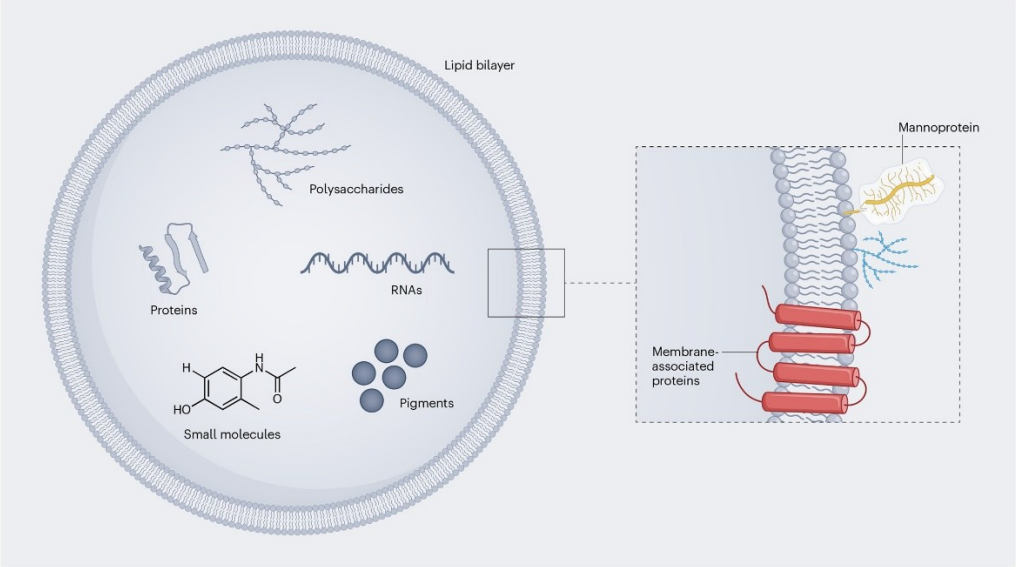


Figura 9 – Le vescicole extracellulari possono trasportare numerose biomolecole, tra cui proteine, polisaccaridi, RNA, pigmenti e piccole molecole. Come possiamo vedere dall'immagine, la membrana di queste strutture sembra essere caratterizzata da un doppio strato fosfolipidico con l'aggiunta di proteine associate alla membrana e mannoproteine (Rodrigues *et al.,* 2025).

Le vescicole extracellulari fungine e la loro composizione variano in funzione della specie, della disponibilità di nutrienti, delle condizioni di crescita e dell'interazione con le cellule dell'ospite. Grazie all'eterogeneità del loro contenuto, le EV possono partecipare a diversi processi biologici, tra cui la formazione del biofilm, il trasporto dei fattori di virulenza e la modulazione della risposta immunitaria dell'ospite (Freitas *et al.,* 2019).

Nonostante la struttura e la composizione della parete cellulare fungina siano state ampiamente studiate, i meccanismi che consentono alle EV di attraversarla non sono ancora del tutto chiari. Le evidenze disponibili suggeriscono che la parete sia una struttura molto più dinamica soggetta a continuo rimodellamento durante la crescita e la divisione cellulare. La presenza di pori e la temporanea riorganizzazione dei componenti parietali potrebbero creare spazi sufficienti al passaggio delle vescicole. È stato anche ipotizzato che le EV possano sfruttare aperture preesistenti oppure essere trasportate gradualmente verso gli strati più esterni durante la deposizione di nuovo materiale nella parete (Rodrigues *et al.*, 2025; Zamith *et al.,* 2018).

Un'altra ipotesi, supportata dagli studi proteomici che dimostrano la presenza di enzimi idrolitici, suggerisce una degradazione localizzata della parete. Enzimi idrolitici in grado di degradare localmente i glucani, la chitina e gli altri componenti strutturali della parete potrebbero facilitare il transito delle EV. Anche il citoscheletro potrebbe contribuire al

trasporto delle EV verso la superficie cellulare, mentre forze fisiche come la pressione di turgore potrebbero facilitarne il movimento attraverso la parete. Il contributo preciso di questi processi rimane tuttavia da chiarire (Makarova e May, 2021).

Non è possibile infine escludere che il contenuto delle vescicole si liberi tramite meccanismi diversi da quelli finora descritti. Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che le EV possano rrompersi e ilasciare il loro contenuto nello spazio periplasmatico, permettendo così al contenuto di diffondersi attraverso la parete cellulare. Allo stesso modo, anche i processi di lisi cellulare controllata sembrano avere un ruolo importante per la liberazione di materiale vescicolare nell'ambiente esterno della cellula (Rodrigues *et al.*, 2025).

Nel complesso, le attuali evidenze suggeriscono che il passaggio delle EVs attraverso la parete fungina sia un fenomeno multifattoriale poiché dipendente dall'insieme di diversi processi di rimodellamento della parete, attività enzimatica e forze fisiche generate dalla cellula stessa.

1.5.2. Implicazioni biologiche delle EV fungine

Le funzioni biologiche delle vescicole extracellulari fungine comprendono diverse risposte sia a stimoli interni sia esterni. Sono implicate nella biogenesi e nell'organizzazione della matrice extracellulare del biofilm, nell'adattamento alle condizioni nutrizionali, nella virulenza e nella modulazione della risposta immunitaria dell'ospite.

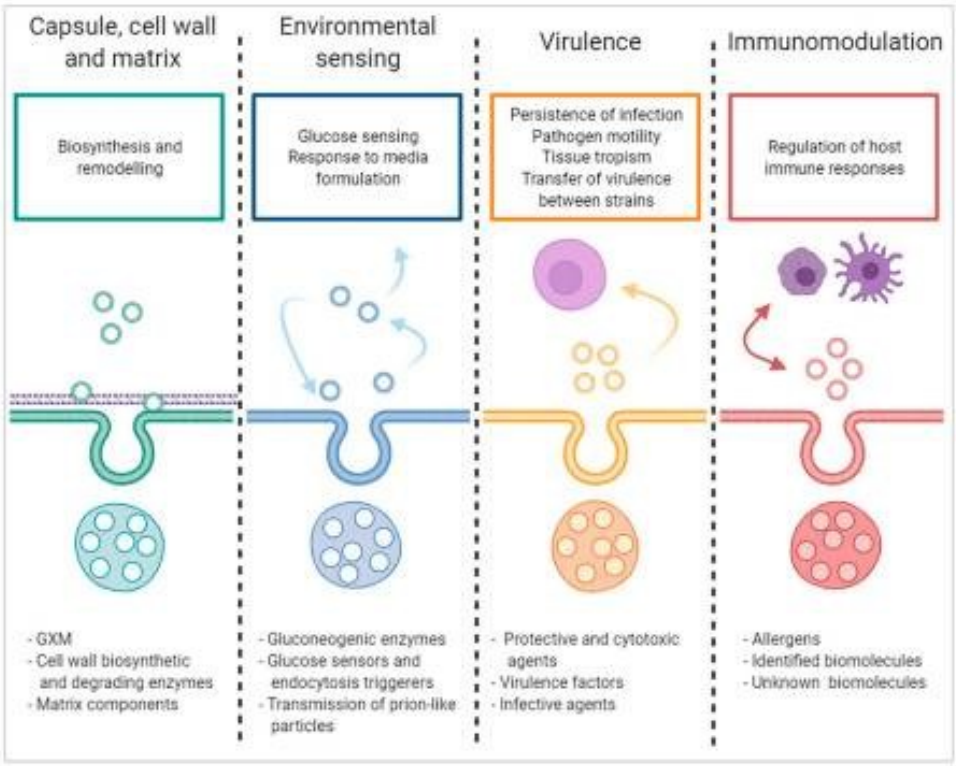


Figura 10 – ruoli biologici delle vescicole extracellulari fungine (Liebana-Jordan *et al.,* 2021).

Una delle funzioni più rilevanti è proprio la capacità di interagire con il sistema immunitario. Le EV trasportano diverse molecole potenzialmente immunogene, tra cui polisaccaridi, lipidi e proteine, che possono attivare o alterare la risposta immunitaria. Gli effetti dipendono dalla specie fungina, dal tipo di cellula bersaglio e dalla composizione del *cargo*: possono sia stimolare la risposta immunitaria tramite il rilascio di molecole immunogeniche, sia favorire l'evasione fungina attraverso fattori che sono in grado di interferire con i meccanismi di difesa dell'ospite. Ad esempio, le EV di *Paracoccidioides brasiliensis*, le contengono α-Gal, una molecola molto immunogenica, e lipidi come l'ergosterolo o il glucosilceramide che possono agire come immunomodulatori (Vallejo *et al.,* 2011). Le EV di *Histoplasma capsulatum*, invece, inibiscono la fagocitosi e il *killing* macrofagico, favorendo la sopravvivenza del fungo (Kenno *et al.,* 2019). Nel complesso, questi meccanismi possono contribuire all'evasione delle difese immunitarie, alla formazione del biofilm e alla persistenza dell'infezione (Liebana-Jordan *et al.*, 2021).

Oltre all'immunomodulazione, le EV svolgono un ruolo fondamentale nella comunicazione tra cellule e nei processi di adattamento ambientale e metabolico. Studi proteomici hanno dimostrato che nel loro *cargo* possono trasportare enzimi coinvolti nel metabolismo del

glucosio, del ferro e del fosfato, suggerendo il loro probabile ruolo nei processi di adattamento ambientale. È stato anche suggerito che le EV possano partecipare al monitoraggio delle condizioni nutrizionali esterne. A sostegno di questa ipotesi in *Saccharomyces cerevisiae* è stato osservato che, in carenza di carenza di glucosio, vengono secrete vescicole periplasmatiche contenenti enzimi gluconeogenici, successivamente internalizzate in seguito all'aggiunta di glucosio (Giardina *et al.,* 2014). In *C. albicans,* il trasportatore del glucosio ad alta affinità Hgt1p è stato individuato in associazione con le vescicole extracellulari. Questa osservazione suggerisce, dunque, un possibile coinvolgimento delle EV nella risposta alla biodisponibilità del glucosio extracellulare e nell'adattamente alle condizioni nutrizionali ambientali (Kenno *et al.,* 2019; Liebana-Jordan *et al.*, 2021).

1.5.3. Caratteristiche delle vescicole extracellulari di *Candida albicans*

Le vescicole extracellulari fungine non sono attualmente suddivise in sottogruppi definiti, nonostante la loro caratterizzazione abbia rilevato un importante eterogeneità in termini di dimensioni, morfologia, contenuto e funzione. Il loro diametro può variare dai 10 ai 1000 nm in relazione alle specie e alla loro modalità di crescita, ad esempio planctonica o in biofilm (Brandt *et al.,* 2024). Un esempio significativo è rappresentato da *C. albicans* che produce popolazioni di EV diverse in funzione delle condizioni di crescita a seconda della loro morfologia. Le EV derivanti da biofilm hanno un diametro compreso tra i 30-200 nm, mentre quelle di derivazione planctonica sono state osservate due popolazioni principali, rispettivamente di 30–200 nm e 200–1.000 nm. È stato, inoltre, osservato che le EV prodotte da cellule lievitoidi sono, in termine di dimensioni, molto più grandi rispetto a quelle che vengono prodotte dalle cellule ifali. Le prime hanno un diametro di 400-500 nm, le altre invece vanno dai 100 ai 200 nm (Martínez-López *et al.,* 2022; Brandt *et al.*, 2024).

Le condizioni di crescita e la morfologia influenzano anche il cargo delle EV. Secondo alcuni studi proteomici, è stato osservato che contengono numerose proteine, tra cui alcune appartenenti alla famiglia Sur7, specifiche dei funghi e proposte come potenziali marcatori delle vescicole di *C.* albicans. possono essere usate come marcatori per lo studio delle vescicole stesse. Anche in questo caso, il contenuto proteico cambia in base alla loro condizione di crescita. Le EV derivate da biofilm sono più grandi e sono ricche in polisaccaridi, tra cui mannani e glucani, che rappresentano dei componenti importanti della matrice extracellulare del biofilm stesso e che suggeriscono un probabile coinvolgimento

delle vescicole nella sua formazione. Al contrario, le vescicole derivate dalla crescita planctonica presentano un contenuto proteico ben diversificato, in quanto sono ricche di fattori di virulenza, enzimi metabolici e proteine di trasporto (Martínez-López *et al.,* 2022; Brandt *et al.,* 2024).

In *C. albicans* la biosintesi delle vescicole extracellulari e la loro composizione sono dei processi regolati dall'endocitosi associata al complesso ESCRT. Infatti, mutanti privi di questa via endosomiale hanno mostrato una significativa diminuzione della produzione di EV e, in alcuni casi, difetti nella formazione del biofilm e nella resistenza al fluconazolo. L'aggiunta di EV ottenute da ceppi *wild-type* ripristina la struttura della matrice extracellulare e la resistenza ai farmaci in alcuni mutanti, dimostrando così che le vescicole trasportano dei componenti biologicamente attivi coinvolti nella formazione del biofilm (Zarnowski *et al.,* 2021; Brandt *et al.,* 2024).
La matrice extracellulare, come descritto nel paragrafo 1.4, è una componente essenziale del biofilm in quanto favorisce l'adesione delle cellule alle superfici, mantiene l'organizzazione della comunità microbica e protegge le cellule dagli stress ambientali e dai farmaci. È costituita da proteine, polisaccaridi, lipidi ed acidi nucleici, componenti che caratterizzano anche il cargo delle EV prodotte durante la crescita in biofilm. Queste somiglianze, insieme ai risultati degli esperimenti di complementazione, sostengono il contributo diretto delle EV alla costruzione e al mantenimento della matrice (Heredia & Andes, 2021; Zarnowski *et al,* 2021)

Infine, è stato dimostrato che i glucani della matrice conferiscono alle cellule del biofilm resistenza agli antifungini perché sono in grado di sequestrare i farmaci limitandone la loro diffusione ed efficacia. Questo meccanismo è condiviso da diverse specie di *Candida* ed è associato alla presenza del complesso mannano-glucano della matrice extracellulare, costituito da α-mannano, β-1,3-glucano e β-1,6-glucano, che rappresenta un componente chiave nella tolleranza farmacologica che caratterizza il biofilm (Brandt *et al.*, 2024; Heredia e Andes, 2021).

1.6 Farmaci antifungini

La disponibilità di farmaci antifungini è limitata. Perché i funghi, come l'essere umano, sono organismi eucarioti e condividono con le cellule dell'ospite numerose strutture e vie metaboliche. Di conseguenza, è importante identificare bersagli selettivi capaci di colpire i patogeni senza provocare una tossicità significativa nell'ospite (Lopes e Lionakis, 2022).
Le tre classi tradizionalmente più utilizzate per il trattamento delle infezioni causate da *Candida albicans* sono i polieni, gli azoli e le echinocandine. Questi farmaci si distinguono per il bersaglio molecolare e per il meccanismo d'azione (Lee *et al.*, 2021).

I polieni sono la più antica classe di farmaci antifungini. Sono composti fungicidi che si legano principalmente all'ergosterolo presente nella membrana citoplasmatica fungina, alterandone l'organizzazione, la permeabilità e le funzioni cellulari. L'amfotericina B (AmB) è il composto più importante di questa classe e un ampio spettro di attività contro funghi clinicamente rilevanti, tra cui *Candida, Aspergillus* e *Cryptococcus.* È impiegata soprattutto nel trattamento di infezioni invasive gravi, in particolare quando altri antifungini non sono indicati o risultano inefficaci. Il suo utilizzo è tuttavia limitato dalla nefrotossicità, dalle reazioni associate all'infusione e dalla scarsa biodisponibilità orale. Le formulazioni lipidiche ne hanno migliorato la tollerabilità, ma non hanno eliminato completamente il rischio di effetti avversi (Lee *et al.*, 2021).
Gli azoli sono generalmente farmaci fungistatici, ossia composti che inibiscono la crescita e la riproduzione del fungo. Possono essere suddivisi in due categorie in base alla loro struttura chimica: gli imidazoli, come il ketoconazolo ed il miconazolo, ed i triazoli, come fluconazolo, itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo. Questi composti bloccano la sintesi dell'ergosterolo inibendo l'enzima lanosterolo 14-α-demetilasi, enzima dipendente dal citocromo P450, legandosi al gruppo eme nel suo sito attivo ed influenzando negativamente la crescita del fungo e causando instabilità della membrana (Lee *et al.*, 2021; Lopes e Lionakis, 2022). Gli imidazoli vengono perlopiù impiegati per il trattamento delle candidosi a livello delle mucose, mentre i triazoli sono usati comunemente per trattare sia candidosi sistemiche sia infezioni mucosali causate da *C. albicans* (Roemer e Krysan, 2014).
Le echinocandine tra cui caspofungina, micafungina, anidulafungina e rezafungina, inibiscono l'enzima β-(1,3)-glucano sintasi coinvolto nella sintesi del β-(1,3)-glucano della parete cellulare fungina, rende la cellula fungina più vulnerabile allo stress osmotico favorendone la lisi. (Gao *et al.,* 2024; Lee Yunjin *et al.*, 2021; Lopes e Lionakis, 2022).

Le attuali linee guida internazionali raccomandano generalmente le echinocandine come farmaci di prima linea per la candidemia e di molte forme di candidosi invasiva. La scelta deve comunque tenere conto della sede dell'infezione, delle condizioni del paziente, della specie coinvolta e dei risultati dei test di sensibilità (Cornely *et al.,* 2025).

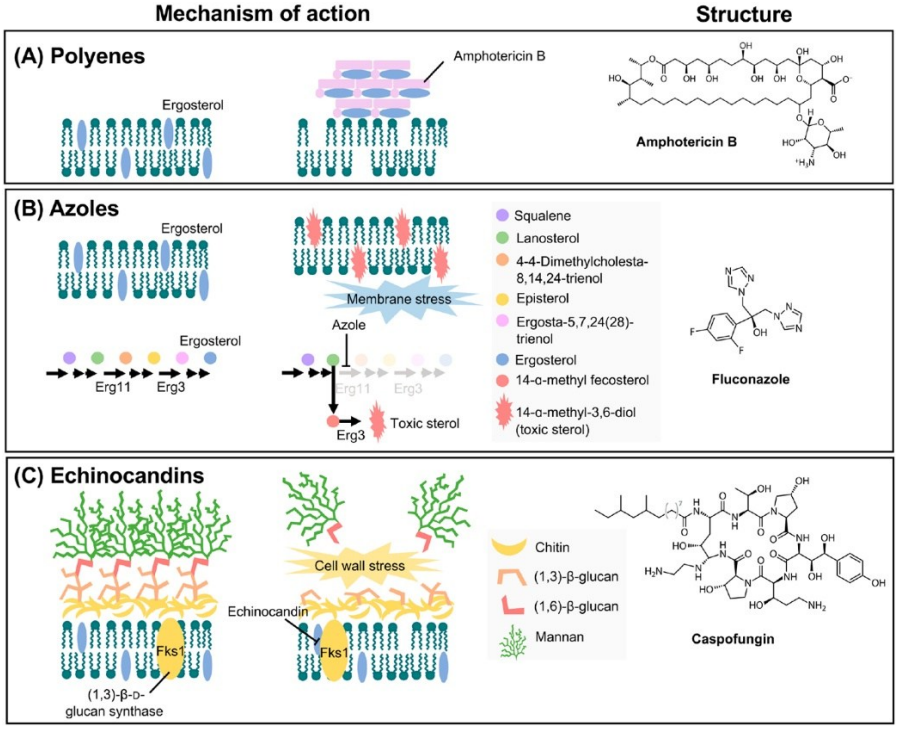


Figura 11 – Meccanismo d'azione e struttura dei principali antifungini utilizzati per il trattamento delle infezioni da *Candida* (Lee *et al*., 2021).

È stato dimostrato che le diverse specie di *Candida* mostrano vari gradi di sensibilità agli antifungini comunemente usati in terapia.

Candida krusei, oggi denominata *Pichia kudriavzevii*, è considerata intrinsecamente resistente al fluconazolo, mentre *Candida glabrata*, oggi *Nakaseomyces glabratus*, presenta una sensibilità ridotta e una maggiore probabilità di sviluppare resistenza (Pfaller *et al.,* 2010).

La resistenza alle echinocandine rimane sempre meno frequente di quella agli azoli, ma è clinicamente rilevante e può essere associata a mutazioni nei geni *FKS*. *Candida parapsilosis* presenta naturalmente valori di concentrazione minima inibente (MIC) più elevati per le echinocandine rispetto ad altre specie di *Candida.* Questo dato non equivale necessariamente a una resistenza clinica ma richiede un'attenta interpretazione dei risultati microbiologici e della risposta terapeutica (Sanguinetti *et al.*, 2015).

2. SCOPO DEL LAVORO

Le vescicole extracellulari (EV) prodotte da *Candida albicans* possono variare per quantità, dimensioni e composizione in funzione delle condizioni di crescita. In particolare, il confronto tra crescita planctonica e sessile può contribuire a chiarire il coinvolgimento delle EV nella formazione del biofilm e, più in generale, nei processi associati alla virulenza fungina.

Lo scopo del presente lavoro di tesi, svolto presso il Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Milano, è stata la caratterizzazione delle vescicole extracellulari prodotte da un ceppo fluorescente di *C. albicans* dTomato, noto per la sua grande propensione a formare biofilm, in condizioni di crescita planctonica e sessile, al fine di comprenderne le principali caratteristiche fisiche e funzionali e di valutarne il suo ruolo nella formazione del biofilm.

In particolare, il lavoro si è proposto di confrontare la concentrazione e la distribuzione dimensionale delle EV prodotte da *C. albicans* nelle condizioni planctonica e sessile e di verificare mediante citofluorimetria, sfruttando la fluorescenza del ceppo e delle vescicole da esso prodotte, la localizzazione e l'intensità di segnale nelle due condizioni sperimentali. Infine, è stata saggiata la capacità delle EV, isolate dal ceppo biofilm produttore, di influenzare la formazione del biofilm in ceppi clinici di *Candida* caratterizzati da una ridotta capacità di produrlo.

Nel complesso, lo studio è stato finalizzato a definire le principali caratteristiche fisiche e molecolari delle EV prodotte da *C. albicans* dTomato e a ottenere indicazioni preliminari sulla loro possibile attività nella comunicazione tra cellule fungine e nella regolazione del biofilm.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Candida albicans*: ceppi e condizioni di coltura

Gli esperimenti sono condotti utilizzando il ceppo fluorescente *C. albicans* CAF2.1-dTomato (dTom) contenente il plasmide pENO 1-dTom-NATr che esprime il gene dTomato sotto il controllo del promotore costitutivo ENO1 gentilmente donato dal Prof. Robert T. Wheeler, conservato a una temperatura di -80° in YPD e 10% di glicerolo (Gratacap R. *et al.*, 2013).

Sono stati inoltre impiegati due isolati clinici di *C. albicans,* identificati come USBA21 e USVR40, provenienti dalla collezione dello studio multicentrico italiano GISIA3 (Morace *et al.,* 2011). I due isolati sono stati precedentemente caratterizzati per valutare l'effetto delle EV prodotte da *C. albicans* CAF2.1-dTomato sulla formazione del biofilm (Borghi *et al.,* 2014; Sherry *et al.,* 2014).

Dopo scongelamento, i ceppi sono stati coltivati e mantenuti utilizzando il terreno Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) (Sigma – Aldrich, Missouri, Stati Uniti) e il terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Sigma - Aldrich).

3.1.1 Terreni di coltura

Per la coltura dei ceppi in condizioni planctoniche è stato utilizzato il terreno YPD contenente 20 g/L di destrosio come fonte di carbonio, 20 g/L di peptone come fonte proteica e 10 g/L di estratto di lievito come fonte di aminoacidi, vitamine e nutrienti essenziali. Per prevenire eventuali contaminazioni batteriche, al terreno è stato aggiunto il cloramfenicolo. Il terreno è stato quindi sterilizzato mediante autoclave.

Per la crescita in condizioni favorenti la formazione del biofilm è stato impiegato il terreno RPMI 1640. Il terreno è stato preparato sciogliendo 10 g/L di polvere RPMI 1640 in acqua distillata e aggiungendo 34,53 g/L di 3-(N-morfolino)propansolfonico (MOPS) e 20 g/L di glucosio. Il pH è stato portato a 7,0 mediante aggiunta di una soluzione di NaOH 10 N. Il terreno è stato quindi sterilizzato per filtrazione.

3.2 Preparazione e inoculo di *C. albicans*

Prima di ciascun esperimento, i ceppi di *C. albicans* sono stati scongelati e inoculati in tubi areati a fondo conico (Corning™ Falcon™), in 3 mL di terreno liquido YPD. Le colture sono state incubate a 37°C per 24 ore in agitazione per consentire la ripresa metabolica e la crescita delle cellule.
Al termine dell'incubazione, le cellule vengono raccolte per centrifugazione a 1250 rpm per 10 minuti a 4°C. Dopo la rimozione del surnatante, il pellet contenente le cellule di *C. albicans* è stato lavato due volte con PBS sterile 1x (tampone fosfato salino) (AppliChem, Germany) per eliminare eventuali residui di terreno di coltura. Per ciascun lavaggio, le cellule sono state risospese mediante agitazione al vortex e centrifugate alle stesse condizioni (1250 rpm per 10 minuti). Al termine del secondo lavaggio, il pellet è stato risospeso nuovamente in 3 mL di PBS.

3.3 Isolamento e conservazione delle vescicole extracellulari

Per la produzione e l'isolamento delle vescicole extracellulari, è stato utilizzato l'inoculo di *C. albicans* preparato come descritto al paragrafo 3.2.

Parallelamente, sono stati predisposti i sistemi di coltura per la crescita planctonica e sessile. Per ciascuna condizione sono state preparate due repliche biologiche: due beute per la crescita planctonica e due flask da coltura per la formazione del biofilm. Ciascun recipiente conteneva 46 mL di terreno RPMI 1640.
Al termine dei lavaggi, il pellet è stato risospeso in 4,6 mL e 2,3 mL della sospensione ottenuta (diluizione 1:20) sono stati inoculati in ciascuna flask/beuta. Le colture planctoniche sono state incubate a 37°C in agitazione a 250 rpm, mentre quelle destinate alla formazione del biofilm sono state incubate a 37° in condizioni statiche.

Al termine dell'incubazione, i terreni condizionati delle colture planctoniche (P) e sessile (S) sono stati raccolti separatamente e trasferiti in provette da 50 mL. I campioni sono stati centrifugati a 2300g per 45 minuti a temperatura ambiente con la centrifuga HERMLE Z 300 K con rotore 220.72 V04, allo scopo di rimuovere le cellule e i detriti cellulari. I surnatanti sono stati recuperati con cautela, evitando di risospendere il pellet, e trasferiti in provette compatibili con il rotore utilizzato per l'ultracentrifugazione (tubi Beckman 70Ti – Beckman Coulter Life Sciences).

Per l'isolamento delle vescicole è stata utilizzata l'ultracentrifuga Optima XPN-100 ultracentrifuge (Beckman Coulter Life Sciences) (**Figura 12**). Il processo avviene tramite tre cicli di ultracentrifuga sequenziali con un rotore di tipo 45 Ti (**Figura 13**): le prime due centrifughe sono di 30 minuti a 20.000g, seguite da una centrifuga finale di 90 minuti a 100.000g. Dopo ciascun ciclo, il surnatante è stato trasferito in nuovi tubi, facendo attenzione a non prelevare il pellet, nuovamente bilanciati prima della centrifugazione successiva.



Figura 12 – Ultracentrifuga Optima XPN-100 *(Beckman Coulter Life Sciences, s.d.)*



Figura 13 – Tipologia di rotore utilizzato per le ultracentrifughe.

Al termine dell'ultima centrifugazione, il surnatante è stato rimosso, il pellet contenente è stato risospeso aggiungendo 100 µl di DPBS 1x filtrato (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), trasferito in tubi sterili da 1,5mL e conservate a -80°C per le successive analisi.

3.4 Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso consente di analizzare particelle in sospensione attraverso la misura della luce diffusa e dell'eventuale fluorescenza emessa durante il passaggio attraverso un fascio laser. La diffusione frontale, o forward scatter (FSC), e quella laterale, o side scatter (SSC), dipendono da diversi fattori, tra cui dimensioni, struttura e indice di rifrazione della particella. Nel caso delle vescicole extracellulari, tuttavia, questi parametri non consentono una stima diretta e accurata delle dimensioni, poiché la maggior parte delle EV si colloca vicino al limite di rilevazione dei citofluorimetri convenzionali (McKinnon, 2018; Welsh *et al.,* 2024).

Nel presente studio, la citofluorimetria è stata impiegata per valutare se le vescicole extracellulari di *C. albicans* d-Tomato, cresciute sia in condizioni sessili sia planctoniche, esprimessero il segnale fluorescente. Come controllo negativo sono state analizzate, nelle medesime condizioni sperimentali, le preparazioni di EV ottenute dal ceppo non fluorescente

C. albicans SC5314 (ceppo parentale del costrutto in uso). Il controllo è stato utilizzato per definire il limite della fluorescenza di fondo e distinguere gli eventi dTomato-positivi da quelli negativi.

Prima dell'acquisizione dei campioni, nello strumento è stata iniettata una soluzione di DPBS (AppliChem, Germany) sterile filtrato a 0,22 µm per rimuovere e valutare eventuali segnali di fondo dovuti alla presenza di particolato presente nel buffer stesso che potesse, confondersi con le vescicole, essendo queste risospese in DPBS. Una volta acquisiti questi segnali, sono state analizzate le vescicole per valutare la presenza o assenza del segnale fluorescente. Prima dell'acquisizione dei campioni è stato analizzato DPBS sterile (AppliChem, Germania), precedentemente filtrato mediante una membrana con porosità di 0,22 µm. Questo controllo ha permesso di rilevare gli eventi di fondo eventualmente associati al buffer o alla presenza di particolato contaminante. Le preparazioni di EV, risospese nello stesso DPBS, sono state quindi acquisite utilizzando i medesimi parametri strumentali. La fluorescenza rilevata nei campioni CAF2.1-dTomato è stata confrontata con quella delle EV ottenute dal ceppo SC5314 e con il controllo costituito dal solo buffer.

3.5 Analisi di tracciamento delle nanoparticelle

L'analisi di tracciamento delle nanoparticelle (*Nanoparticle Tracking Analysis,* NTA) è una tecnica analitica diretta impiegata per la visualizzazione e lo studio di particelle nanometriche in sospensione, come vescicole extracellulari, nanoparticelle e virus. Tra le varie tecniche di caratterizzazione, l'NTA è uno dei metodi più utili per lo studio delle vescicole extracellulari in quanto fornisce informazioni sulle loro dimensioni, sulla distribuzione dimensionale e sulla concentrazione in soluzione (Bachurski *et al.*, 2019).

Questa tecnica si basa sull'osservazione del moto browniano delle nanoparticelle sospese in un mezzo liquido. Per osservare il movimento viene utilizzata una telecamera ad alta sensibilità che cattura la luce diffusa dalle particelle in tempo reale. La traiettoria di queste ultime viene analizzata fotogramma per fotogramma da un software di analisi specifico, che associa la velocità con la quale si muovono le particelle alle loro dimensioni, alla viscosità e alla temperatura del liquido (Longjohn e Christian, 2022).

Inoltre, tramite l'equazione di Stokes-Einstein è possibile anche calcolare il diametro idrodinamico in base al coefficiente di diffusione di ciascuna particella (Kowkabany G. e Bao, 2024). L'analisi di tracciamento delle nanoparticelle risulta, quindi, uno strumento importante per la caratterizzazione fisica delle vescicole extracellulari poiché permette di

valutare la popolazione cellulare per quanto riguarda l'omogeneità, la concentrazione e la stabilità.



Figura 14 – NanoSight NS300 (Panalytical, 2025).

Per determinare la concentrazione e la distribuzione dimensionale delle EV prodotte da *C. albicans* CAF2.1-dTomato è stato utilizzato lo strumento Nanosight NS300 (Malvern Panalytical (**Figura 14**). Sono state analizzate sia le vescicole isolate dalle condizioni planctoniche sia dalle condizioni sessili.

Prima dell'analisi, ciascun campione è stato diluito in 1:20 in DPBS sterile e filtrato, miscelando una parte di sospensione di EV con 19 parti di DBPS. La diluizione è stata effettuata per ottenere una concentrazione di particelle compatibile con l'intervallo di rilevazione dello strumento. I campioni diluiti sono stati quindi introdotti nella camera di analisi e acquisiti mediante le medesime impostazioni strumentali.

3.6 Formazione del biofilm e quantificazione con saggio al cristalvioletto

La formazione del biofilm è stata valutata mediante il saggio colorimetrico cristalvioletto, utilizzando micropiastre da 48 pozzetti con fondo piatto. Questo metodo consente di stimare la biomassa aderente complessiva, costituita dalle cellule e dai componenti della matrice extracellulare.

Dopo crescita in terreno liquido YPD per 24 ore a 37°C in agitatore orbitale, le cellule di *Candida* sono state raccolte mediante centrifugazione e lavate per tre volte, come descritto nel paragrafo 3.2). Al termine dei lavaggi, il pellet è stato risospeso in 1 mL di PBS 1x e diluito serialmente per la conta nella camera di Neubauer (**Figura 15**).

Per calcolare la concentrazione cellulare è stata applicata la seguente formula:

$$\frac{\text{n° cellule totali x fattore di diluizione}}{0{,}4} = \text{cell/µL}$$

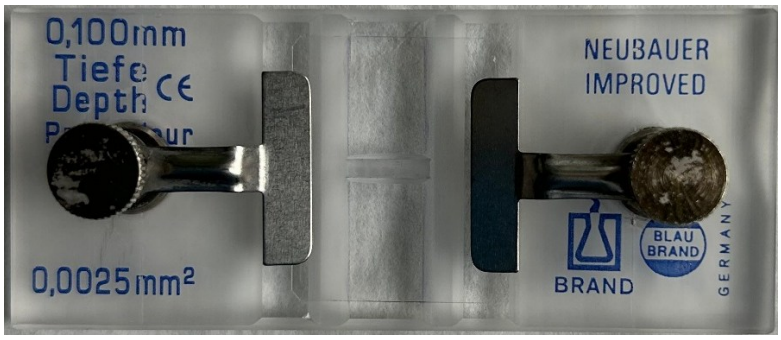


Figura 15 – Camera di Neubauer. Usata per contare le cellule in una soluzione liquida al microscopio in modo tale da ottenere la concentrazione cellulare.

Sulla base della concentrazione ottenuta, la sospensione cellulare è stata diluita in terreno RPMI 1640 fino a ottenere una concentrazione finale di $1x10^6$ cell/mL. Successivamente, 500 µl della sospensione standardizzata sono stati dispensati in ciascun pozzetto e la piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore per permettere la crescita del biofilm. Al termine dell'incubazione, la biomassa aderente è stata quantificata mediante colorazione con cristalvioletto.



Figura 16 – Micropiastra da 48 pozzetti inoculata con terreno RPMI 1640 e cellule di *Candida* per effettuare la crescita del biofilm in incubatore statico per 24h a 37°C.

Per il saggio con cristalvioletto (AppliChem Gmbh, Germania) è stata preparata una soluzione allo 0,1% (p/v). Al termine dell'incubazione, il terreno di coltura è stato rimosso delicatamente e ciascun pozzetto lavato tre volte con 100µL di PBS 1x a temperatura ambiente, evitando di danneggiare la biomassa aderente. Il biofilm è stato fissato con 100µL di metanolo per 15 minuti. Dopo aver rimosso il metanolo e lasciato asciugare il biofilm per 10 minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 100 µL di cristalvioletto 0,1% per 15 minuti a temperatura ambiente. Sono stati quindi effettuati due lavaggi con acqua distillata e aggiunti 100 µL di acido acetico glaciale al 33% al fine di sciogliere il colorante. La piastra è stata letta ad una lunghezza d'onda di 540 nm utilizzando il lettore multimodale Ensight Multimode Plate Reader (PerkinElmer) (Ottaviano *et al.,* 2021).

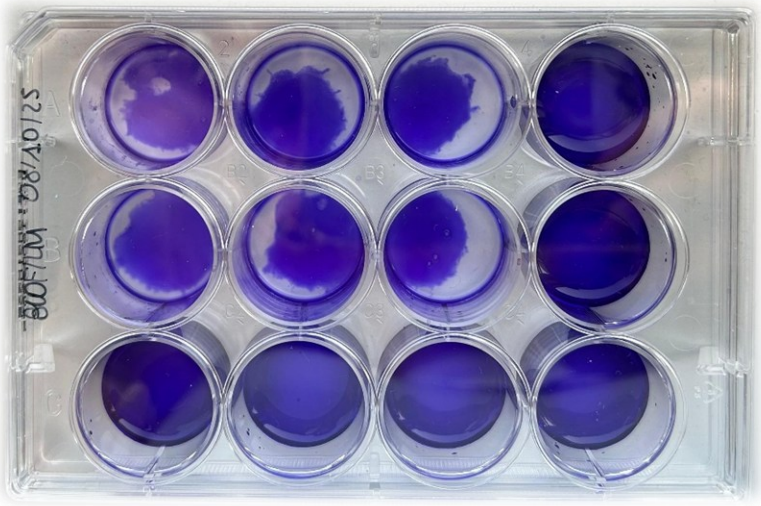


Figura 17 – Piastra pronta per essere letta allo spettrofotometro in seguito al saggio con il cristalvioletto.

3.7 Fissazione e preparazione dei campioni per microscopia confocale

Per l'analisi mediante microscopio confocale, i biofilm sono stati preparati in piastre da 24 pozzetti, contenenti supporti in PET-G per colture sterili del diametro di 13mm (Starstedt), seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 3.6. In questo caso, al termine dell'incubazione, i campioni non sono stati sottoposti a colorazione con cristalvioletto di cristallo, ma sono stati fissati per preservare la struttura e consentire la successiva osservazione microscopica.

Il terreno di coltura è stato rimosso con due lavaggi con PBS sterile, evitando di alterare la biomassa aderente. I campioni sono stati quindi fissati con 200 µL di metanolo freddo per 10 minuti. Al termine della fissazione, il metanolo è stato rimosso e i campioni sono stati lavati tre volte con PBS sterile 1× per 5 minuti a ogni lavaggio. La colorazione è stata effettuata con 200 µL di Calcofluor White allo 0,05% ed è stato lasciato agire per 5 minuti. Il colorante in eccesso è stato rimosso mediante aspirazione, seguita da un lavaggio con 200 µL di PBS 1x. I vetrini coprioggetto contenenti i biofilm fissati sono stati prelevati dai pozzetti e montati su vetrini portaoggetti utilizzando una goccia di soluzione di montaggio, il Mowiol (Sigma – Aldrich, Missouri, Stati Uniti). I preparati sono stati sigillati e conservati al buio a 4 °C fino all'acquisizione delle immagini.
Le immagini sono state acquisite mediante un microscopio confocale Nikon A1R invertito con SIM-Super Resolution, 115 nm X, Y; 270 nm Z, utilizzando un obiettivo di 40x. Per ciascun campione sono state acquisite serie di sezioni ottiche lungo l'asse z (z-stack) e le immagini sono state successivamente elaborate con il software NIS Viewer (Nikon) per ricostruire tridimensionalmente il biofilm e determinarne lo spessore.

3.8 Esperimenti di dose-dipendenza sulle vescicole extracellulari

Per valutare l'effetto delle vescicole extracellulari sulla formazione del biofilm, sono stati utilizzati due isolati clinici di *Candida* precedentemente caratterizzati come ceppi con ridotta capacità di produrre biofilm (USBA22 e UVR40). Sono stati condotti degli esperimenti di dose-dipendenza impiegando le EV isolate da *C. albicans* d-Tomato cresciuta sia in condizioni planctoniche sia sessili.

I due isolati clinici sono stati preparati e standardizzati come descritto nel paragrafo 3.6. Le sospensioni cellulari, mantenute alla medesima concentrazione in tutte le condizioni sperimentali, sono state inoculate in piastre da 48 pozzetti, utilizzando un volume finale di 500 µL per pozzetto.

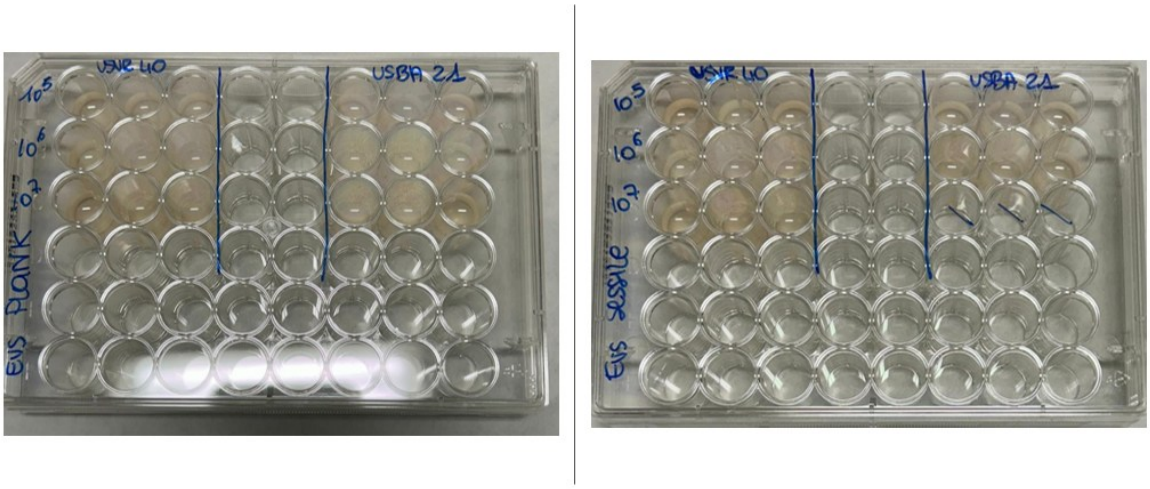


Figura 18 – Inoculo dei ceppi di *Candida* con minor capacità di produrre biofilm con le EVs isolate da *C. albicans* CAF.2.1-dTomato a diverse concentrazioni.

Per ciascun esperimento, le EV precedentemente isolate e quantificate mediante Nanosight NS300 (Malvern Panalytical), sia in condizioni planctoniche e sessili, sono state diluite in DPBS sterile e aggiunte alle sospensioni cellulari in quantità crescenti.

In una prima fase, sono state valutate dosi di EV pari a10^5, 10^6 e 10^7 vescicole per pozzetto. In seguito, l'intervallo è stato esteso includendo dosi inferiori, pari a 10^3 e 10^4 EVs per pozzetto, per verificare se l'effetto delle vescicole sulla formazione del biofilm fosse osservabile anche a dosi inferiori.

Il volume di sospensione aggiunto a ciascun pozzetto è stato calcolato in base alla concentrazione delle EV misurata mediante NTA ed espresso come EV/mL. In funzione della concentrazione iniziale, il volume aggiunto variava da 2 a 12,5 µL per pozzetto. Quando necessario, le preparazioni sono state opportunamente diluite in DPBS sterile. Il volume finale è stato mantenuto costante a 500 µL in tutte le condizioni mediante l'aggiunta di DPBS.

Per ogni condizione sperimentale sono state effettuate tre repliche tecniche e sono stati anche inclusi un controllo non trattato, costituito dalle cellule in assenza di EV, è un controllo del veicolo contenente un volume di DPBS equivalente al volume massimo utilizzato nei campioni trattati. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore e al termine il biofilm è stato valutato mediante l'uso della colorazione con cristalvioletto, secondo quanto descritto nel paragrafo 3.6.

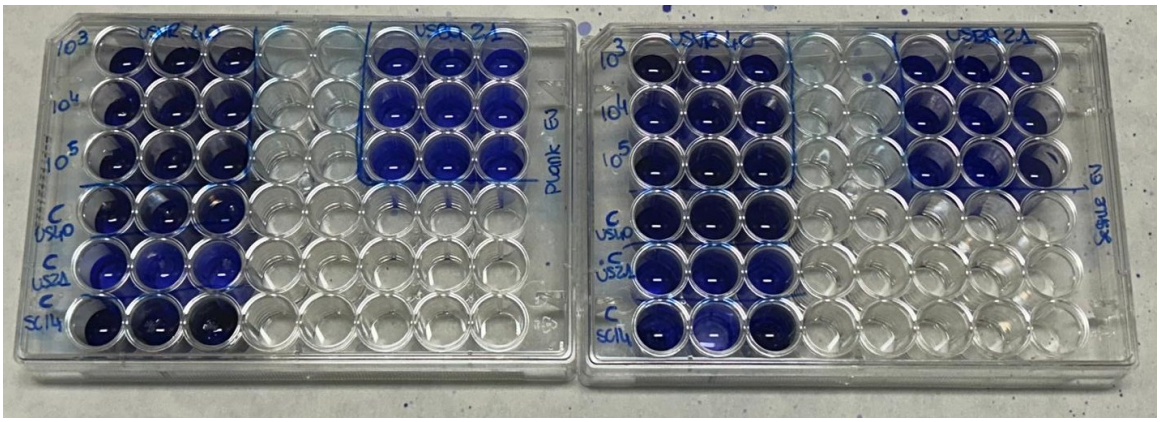


Figura 19 – Campioni di USBA21 e USVR40 (ceppi selezionati di *Candida* con una ridotta capacità di produrre biofilm) sottoposti a colorazione con il cristalvioletto per quantificare l'assorbanza.

3.9. Analisi dei dati e analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante software Graphpad Prism, versione 11.1.0 (218). I dati ottenuti sono stati espressi come media ± deviazione standard. Per il confronto tra due gruppi indipendenti è stato utilizzato il t-test di Welch, appropriato in presenza di varianze non omogenee. Per il confronto tra più di due gruppi indipendenti è stata utilizzata l'ANOVA a una via (one-way ANOVA), seguita, in caso di significatività, dal test post-hoc di Dunnett. I valori di *p value* < 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Caratterizzazione delle EV

Le preparazioni arricchite in vescicole extracellulari (EV) sono state ottenute mediante ultracentrifugazione differenziale dai surnatanti di colture planctoniche e sessili di *C. albicans* CAF2.1-dTomato. Con la stessa procedura sono state preparate, come riferimento, le frazioni derivate dal ceppo *wild-type* SC5314. Le particelle recuperate sono state analizzate mediante Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) per determinarne il diametro idrodinamico e la concentrazione.

Per il ceppo CAF2.1-dTomato sono state analizzate quattro repliche biologiche per ciascuna condizione. I profili NTA (**Figura 20**) hanno evidenziato popolazioni prevalentemente nanometriche in entrambe le condizioni. Le preparazioni planctoniche hanno mostrato una maggiore variabilità tra le repliche, mentre quelle sessili hanno presentato valori di D50 più ravvicinati. Poiché l'intervallo inizialmente riportato per i campioni sessili non è compatibile con il valore medio indicato nella **Tabella 1**, i valori delle singole repliche devono essere verificati sui dati originali prima della versione definitiva.

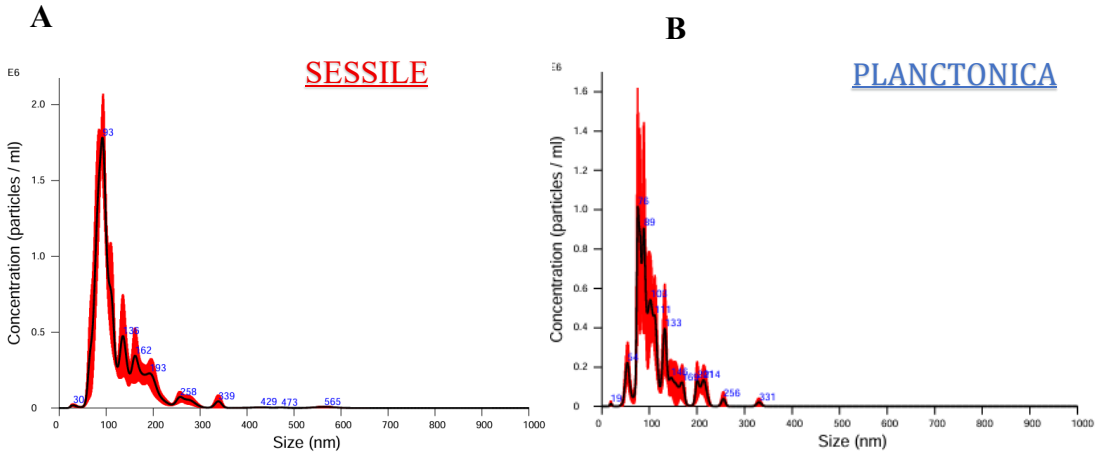


Figura 20 – Distribuzione dimensionale rappresentativa delle particelle presenti nelle preparazioni arricchite in EV ottenute da colture sessili (A) e planctoniche (B) di *C. albicans* CAF2.1-dTomato, analizzate mediante NTA. Le scale dell'asse delle ordinate differiscono tra i due pannelli.

Tabella 1 – D50 e concentrazione delle particelle rilevate mediante NTA nelle preparazioni arricchite in EV. I valori relativi a CAF2.1-dTomato sono espressi come media ± deviazione standard (SD) di quattro repliche biologiche (n=4). Per SC5314 è stata analizzata una sola replica per condizione; i relativi valori sono pertanto riportati esclusivamente a scopo descrittivo. La concentrazione è espressa in particelle/mL.

Ceppo	Condizione	N. di repliche	D50 (nm)	Concentrazione (particelle/mL)
dTomato	Planctonica	4	116,3 ± 29,24	$1.93 \times 10^9 \pm 1.74 \times 10^9$
dTomato	Sessile	4	107 ± 7,21	$8,26 \times 10^8 \pm 3,62 \times 10^8$
SC5314	Planctonica	1	127,3	$2,23 \times 10^9$
SC5314	Sessile	1	113,8	$2,08 \times 10^9$

Come riportato nella **Tabella 1** e nella **Figura 21**, il D50 medio delle particelle ottenute dalle colture planctoniche è risultato pari a 116,3 ± 29,24 nm, mentre quello delle particelle derivate dalle colture sessili è risultato pari a 107,0 ± 7,21 nm. Il D50 corrisponde al diametro al di sotto del quale ricade il 50% delle particelle della distribuzione.
Il confronto tra le due condizioni mediante *t*-test di Welch non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa (*p = 0,579)*.

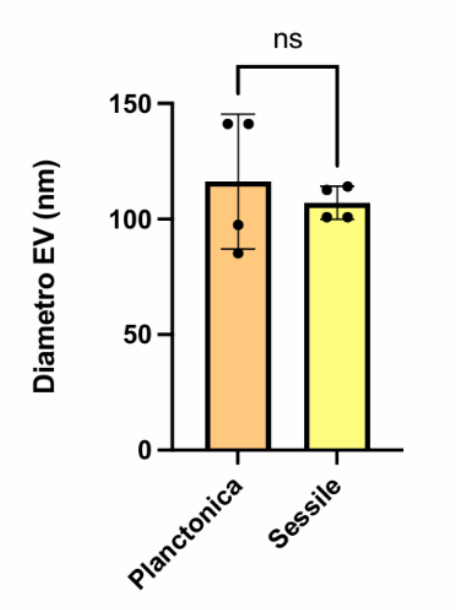


Figura 21 – Confronto del D50 delle particelle rilevate nelle preparazioni planctoniche e sessili di CAF2.1-dTomato. I dati sono espressi come media ± SD di quattro repliche biologiche (n = 4). Il confronto non ha evidenziato differenze statisticamente significative (p = 0,579; *t*-test di Welch).

I valori ottenuti, che ricadono nell'ordine delle centinaia di nanometri, sono compatibili con le dimensioni delle EV riportate per *C. albicans,* che comprendono popolazioni eterogenee e parzialmente sovrapposte (Zarnowski *et al.*, 2018; Martínez-López *et al.*, 2022). In particolare, nello studio di Zarnowski *et al.* (2018) sono state evidenziate delle differenze nelle dimensioni in base alle condizioni di crescita del microrganismo. Gli autori hanno osservato la presenza di due tipologie di popolazioni di EVs collegate alla crescita planctonica: una con diametro tra i 20-300 nm ed un'altra il cui diametro è compreso tra 200 – 1000 nm. Per le particelle ottenute da una crescita di tipo sessile, il diametro è risultato compreso tra 30 – 200 nm. Nel presente studio, nonostante la maggior variabilità osservata tra le singole repliche planctoniche, il confronto statistico del D50 non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le condizioni. Il risultato indica che, con la numerosità e il protocollo utilizzati, non è stata rilevata una variazione del diametro mediano delle particelle associata alla modalità di crescita. Non consente tuttavia di dimostrare l'equivalenza delle due popolazioni. Inoltre, dimensioni e distribuzione misurate mediante NTA possono essere influenzate dalle condizioni colturali, dal procedimento di isolamento e dai parametri di acquisizione.

La concentrazione delle particelle ha mostrato una variabilità marcata tra le repliche. Nelle preparazioni planctoniche i valori erano compresi tra $8{,}5 \times 10^8$ e $4{,}5 \times 10^9$ particelle/mL, con una media di $1{,}93 \times 10^9 \pm 1{,}74 \times 10^9$ particelle/mL. Nelle preparazioni sessili i valori variano tra $3{,}3 \times 10^8$ e $1{,}2 \times 10^9$ particelle/mL. Le EVs isolate da colture planctoniche hanno mostrato una concentrazione media di $1{,}93 \times 10^9 \pm 1{,}74 \times 10^9$ particelle/mL, mentre nelle colture sessili la concentrazione media è risultata pari a $8{,}26 \times 10^8 \pm 3{,}62 \times 10^8$ particelle/mL, con una media di $8{,}26 \times 10^8 \pm 3{,}62 \times 10^8$ particelle/mL. Nonostante la media fosse più elevata nei campioni planctonici, il confronto statistico con il *t*-test di Welch non è risultato significativo ($p= 0{,}30$).

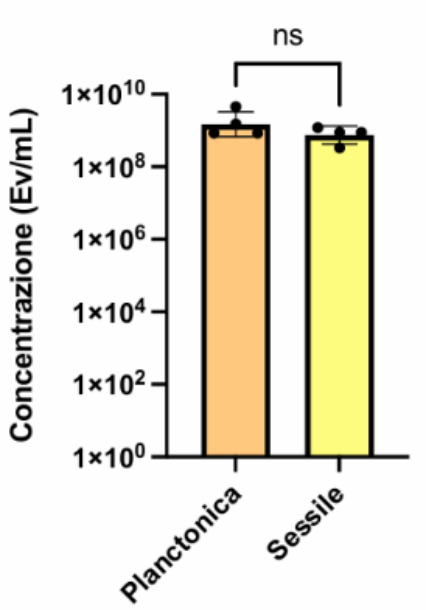


Figura 22 – Confronto della concentrazione di particelle nelle preparazioni planctoniche e sessili di CAF2.1-dTomato. I dati sono espressi come media ± SD di quattro repliche biologiche (n = 4). Il confronto non ha evidenziato differenze statisticamente significative (p = 0,30; *t*-test di Welch).

L'elevata dispersione dei valori planctonici e il numero limitato di repliche riducono la precisione del confronto. Inoltre, la concentrazione misurata nella sospensione finale dipende dal volume di risospensione e dall'efficienza del recupero. In assenza di una normalizzazione rispetto al volume iniziale e alla biomassa cellulare, questi dati non consentono di confrontare direttamente la produzione di EV nelle due condizioni.
Nella singola preparazione di riferimento del ceppo *wild-type* SC5314, la concentrazione è risultata pari a 2,23 × 10⁹ particelle/mL in condizioni planctoniche e a 2,08 × 10⁹ particelle/mL in condizioni sessili; i rispettivi D50 erano 127,3 e 113,8 nm. Poiché è stata analizzata una sola replica per condizione, questi valori hanno esclusivamente funzione descrittiva e non permettono confronti statistici con CAF2.1-dTomato.

Nel complesso, la NTA ha rilevato particelle prevalentemente nanometriche in entrambe le preparazioni. Non sono state osservate differenze statisticamente significative nel D50 o nella concentrazione, mentre le repliche planctoniche hanno mostrato una maggiore variabilità, soprattutto per la concentrazione. Poiché la NTA non identifica in modo specifico la natura delle particelle, i risultati descrivono preparazioni arricchite in EV e devono essere integrati con marcatori molecolari e metodi morfologici.

4.2 Caratterizzazione mediante citofluorimetria a flusso

Per la valutazione della presenza del segnale fluorescente dTomato nelle vescicole extracellulari prodotte da *C. albicans*, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica delle EV isolate da colture in condizioni sia planctoniche che sessili. Le preparazioni ottenute dal ceppo *wild-type* SC5314, privo di dTomato, sono state utilizzate come controllo negativo per definire la regione di positività.

L'analisi delle vescicole ottenute da CAF2.1-dTomato ha mostrato il segnale di fluorescenza dTomato sia in condizione planctonica sia sessile (**Figura 23**). La percentuale di eventi inclusi nella regione P2 era pari al 95,83% per il campione planctonico e al 98,52% per quello sessile, rispetto allo 0,56% e al 3,19% osservati nei corrispondenti controlli SC5314. Il risultato documenta la presenza di materiale fluorescente nelle preparazioni di CAF2.1-dTomato, ma non dimostra, in assenza di controlli aggiuntivi, che ogni evento corrisponda a una singola EV integra.

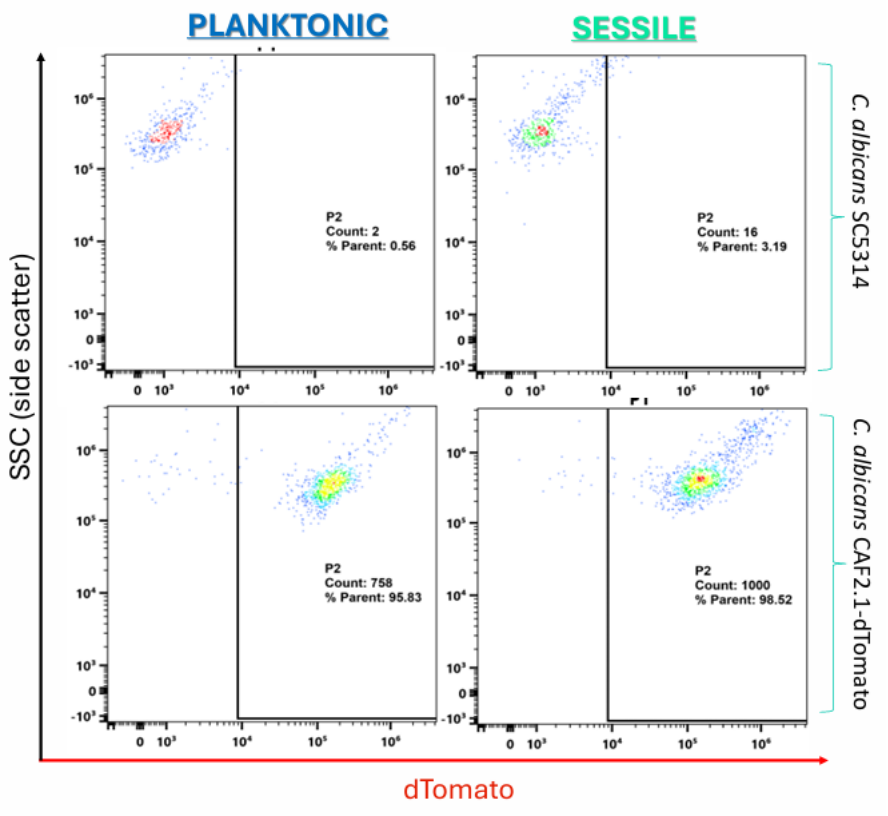


Figura 23 – Analisi citofluorimetrica delle preparazioni arricchite in EV ottenute da *C. albicans* SC5314 (pannelli superiori) e CAF2.1-dTomato (pannelli inferiori) in condizioni planctoniche (sinistra) e sessili (destra). La regione P2 è stata definita utilizzando SC5314 come controllo negativo. L'asse delle ordinate rappresenta il side scatter (SSC), mentre l'asse delle ascisse rappresenta l'intensità di fluorescenza dTomato. Sono indicati il numero e la percentuale di eventi compresi in P2.

Il controllo SC5314 ha consentito di stimare il segnale di fondo e di definire la regione P2. La netta separazione delle preparazioni CAF2.1-dTomato indica che il segnale dTomato è rilevabile nelle frazioni ottenute da entrambe le modalità di crescita.
Il plasmide pENO1-dTom-NATr esprime dTomato sotto il controllo del promotore costitutivo ENO1, ma non codifica una proteina di fusione Eno1-dTomato. La fluorescenza non può quindi essere utilizzata come dimostrazione della presenza di Eno1p nelle EV. Tuttavia, studi proteomici precedenti hanno identificato Eno1p nelle preparazioni di EV di *C. albicans* (Zamith-Miranda *et al.*, 2021).

Le informazioni ottenute tramite l'analisi con la citofluorimetria a flusso risultano complementari a quelle derivanti dalla caratterizzazione mediante NTA. Mentre la NTA ha permesso di valutare le caratteristiche fisiche delle particelle, la citofluorimetria ha fornito un'informazione relativa alla presenza del segnale fluorescente. L'impiego delle due metodiche per la caratterizzazione è in accordo con le raccomandazioni MISEV2023, che sottolineano l'importanza di combinare approcci complementari nella caratterizzazione delle EVs, tenendo conto dei limiti propri di ciascuna tecnica, in particolare nell'analisi citofluorimetrica di particelle di piccole dimensioni (Welsh *et al.*, 2024).
Nel complesso, i risultati ottenuti con l'analisi citofluorimetrica supportano la presenza del segnale associato al costrutto ENO1-dTomato nelle preparazioni delle EV testate. Sulla base dei dati disponibili, non è possibile stabilire se esistano delle differenze quantitative nell'espressione di Eno1p nelle due diverse popolazioni di vescicole. Ulteriori analisi, infatti, potrebbero essere utili per approfondire eventuali differenze nella composizione del cargo molecolare, che potrebbero riflettersi anche sulle proprietà biologiche delle vescicole.

4.3 Effetto delle EV sulla formazione di biofilm

Per verificare l'ipotesi che le EV prodotte da cellule sessili possano promuovere la formazione di biofilm, le vescicole di *C. albicans* CAF2.1-dTomato alla concentrazione di 4×10^8 EV/mL sono state addizionate a due isolati *C. albicans* a ridotta capacità alla crescita sessile (USBA21 e USVR40) e al ceppo biofilm-produttore SC5314 (**Figura 24**).

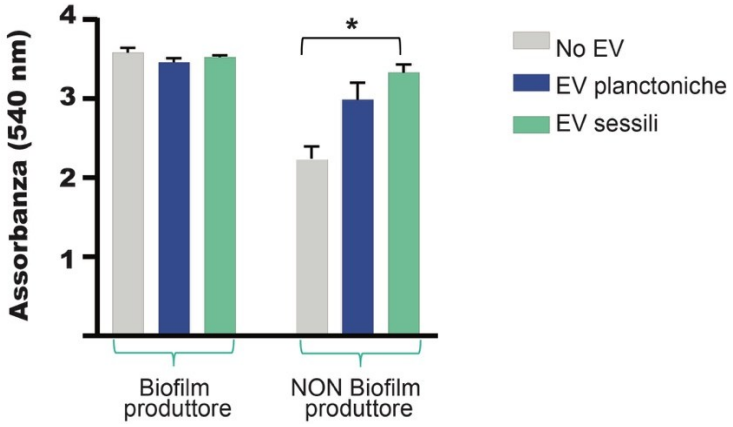


Figura 24 – Effetto delle vescicole extracellulari sulla formazione del biofilm. La biomassa del biofilm è stata quantificata mediante saggio con cristalvioletto e misurazione dell'assorbanza a 540nm nel ceppo produttore di biofilm SC5314 e nei ceppi a ridotta capacità di crescita sessile USBA22 e USVR40. I ceppi sono stati analizzati in assenza di trattamento (no EV) e dopo l'aggiunta di EV derivanti da colture planctoniche o sessili di *C. albicans* CAF2.1-dTomato alla concentrazione di 4×10^8 EV/mL. Nei ceppi non produttori di biofilm, le EV sessili hanno determinato un aumento della biomassa significativamente maggiore rispetto alle EV planctoniche (*p = <0,05).

Le EV derivanti da colture planctoniche e sessili hanno indotto la formazione di biofilm in ceppi di *C. albicans* incapaci di formarlo. In particolare, le EV provenienti da condizioni sessili sembrano essere più efficaci rispetto a quelle derivanti da condizioni planctoniche, suggerendo la presenza di cargo differenti. L'effetto sui ceppi già produttori di biofilm, invece, non è evidente ed è probabilmente legato alla produzione endogena di EV durante le fasi di formazione del biofilm.

Per valutare l'eventuale effetto dose-dipendente delle vescicole extracellulari sulla formazione del biofilm, i ceppi USBA21 e USVR40 sono stati trattati con quantità crescenti di particelle, comprese tra 10^3 e 10^7 EV per pozzetto, ottenute da colture planctoniche o sessili di C. albicans CAF2.1-dTomato (**Figura 25).** La biomassa aderente è stata quindi quantificata mediante colorazione con cristallo violetto e misurazione dell'assorbanza a 540

nm. Nel ceppo USBA21, le EV planctoniche non hanno prodotto variazioni rilevanti alle dosi più basse, mentre alle dosi di 10^6 e 10^7 EV per pozzetto è stato osservato un aumento dell'assorbanza rispetto al controllo non trattato. Le EV sessili sono state associate a valori superiori al controllo a tutte le dosi analizzate, con il valore medio più elevato alla dose di 10^7 EV per pozzetto.

Per USVR40, sia le EV planctoniche sia quelle sessili hanno determinato valori di assorbanza superiori al controllo in tutte le condizioni. Le EV planctoniche hanno mostrato il valore medio più elevato a 10^4 EV per pozzetto, seguito da una lieve riduzione alle dosi maggiori; le EV sessili hanno invece prodotto valori relativamente elevati nell'intero intervallo, con un massimo apparente a 10^6 EV per pozzetto. Nel complesso, i risultati mostrano un aumento della biomassa aderente associato al trattamento con EV, ma non evidenziano una relazione dose-risposta monotona. L'effetto osservato sembra dipendere sia dal ceppo ricevente sia dalla condizione di crescita da cui derivano le preparazioni. In assenza di un'analisi statistica basata su repliche biologiche indipendenti, tali differenze devono tuttavia essere considerate descrittive e non consentono di stabilire un effetto significativo delle EV sulla formazione del biofilm.

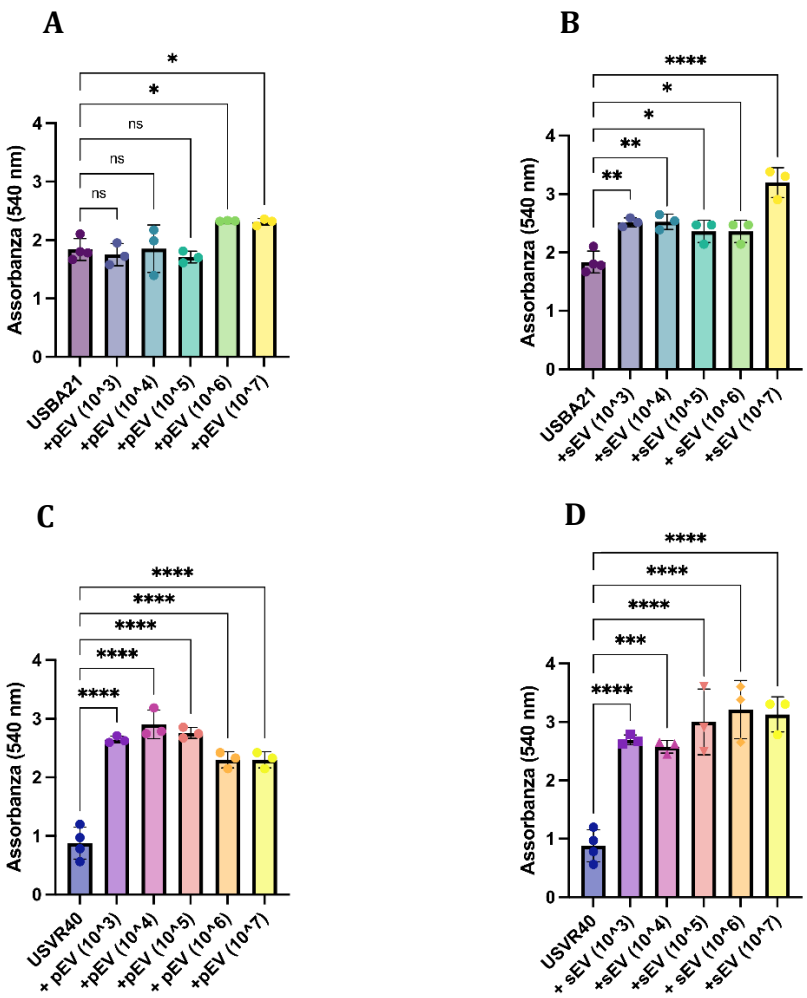


Figura 25 – Effetto dose-dipendente delle vescicole extracellulari sulla biomassa del biofilm di USBA21 e USVR40. I ceppi USBA21 (pannelli superiori A e B) e USVR40 (pannelli inferiori C e D) sono stati trattati con quantità crescenti di EV ottenute da colture planctoniche (pEV; pannelli a sinistra) o sessili (sEV; pannelli a destra) di C. albicans CAF2.1-dTomato. Le barre rappresentano la media e le barre di errore la deviazione standard; i simboli mostrano i valori delle singole repliche. Le colture non trattate di ciascun ceppo sono state utilizzate come controllo. I risultati sono riportati a scopo descrittivo.

Gli andamenti osservati suggeriscono che l'effetto delle preparazioni arricchite in EV sulla biomassa aderente possa dipendere sia dalla condizione di crescita delle cellule produttrici sia dal ceppo ricevente. In particolare, le preparazioni planctoniche e sessili hanno prodotto profili differenti nei ceppi USBA21 e USVR40. Tuttavia, non è emersa una relazione dose-risposta monotona: l'aumento del numero di particelle somministrate non è stato accompagnato da un incremento progressivo dell'assorbanza. Questo risultato indica che, nell'intervallo analizzato, la quantità di particelle non rappresenta l'unico elemento potenzialmente coinvolto nell'effetto osservato.

Le differenze tra le due preparazioni potrebbero essere associate a variazioni nella composizione molecolare delle EV prodotte nelle diverse condizioni di crescita. Zarnowski *et al.* (2018) hanno mostrato che le EV associate al biofilm di *C. albicans* contribuiscono alla formazione della matrice extracellulare e alla resistenza agli antifungini, evidenziando il loro ruolo funzionale nella crescita sessile. Analogamente, Martínez-López *et al.* (2022) hanno descritto differenze nelle caratteristiche e nel contenuto proteico delle EV prodotte dalle forme lievitiformi e ifali di *C. albicans*. Sebbene il confronto tra forme lievitiformi e ifali non sia direttamente sovrapponibile a quello tra crescita planctonica e sessile, queste evidenze indicano che lo stato fisiologico e morfologico delle cellule produttrici può influenzare la composizione e le proprietà biologiche delle EV.
Anche la diversa risposta di USBA21 e USVR40 suggerisce un possibile contributo delle caratteristiche del ceppo ricevente. I dati disponibili non consentono però di stabilire se gli andamenti osservati siano dovuti alla composizione del cargo vescicolare, a una diversa capacità di interazione con le cellule bersaglio o alla variabilità sperimentale. Inoltre, poiché il saggio con cristallo violetto quantifica complessivamente cellule aderenti e matrice extracellulare, non è possibile determinare se le variazioni dell'assorbanza derivino da una maggiore proliferazione, adesione o produzione di matrice.

Nel complesso, i risultati non dimostrano un effetto dose-dipendente delle EV, ma evidenziano tendenze differenti in funzione dell'origine delle preparazioni e del ceppo trattato. Tali osservazioni devono essere considerate preliminari e richiedono conferma mediante esperimenti biologicamente indipendenti, controlli adeguati e analisi statistiche. Ulteriori studi sulla composizione molecolare delle preparazioni potrebbero inoltre chiarire quali componenti siano coinvolti nella modulazione della biomassa del biofilm.

4.4 Analisi mediante microscopia confocale

La morfologia dei biofilm formati dal ceppo di riferimento SC5314 e dai ceppi USBA21 e USVR40 è stata osservata mediante microscopia confocale in assenza e in presenza di trattamento con EV. I ceppi sono stati trattati con EV provenienti dal ceppo di *C. albicans* CAF.2,1-dTomato isolate sia in condizioni planctoniche sia sessili alla concentrazione di $4x10^8$.

Le immagini riportate nel pannello in **figura 26** rappresentano le proiezioni degli z-stack acquisiti. La colorazione con Calcofluor White, un colorante fluorescente che si lega

saldamente alla chitina, ha permesso di visualizzare in blu le strutture cellulari del biofilm, mentre nei campioni trattati con le vescicole extracellulari è stato rilevato, in diverse aree, un segnale rosso che potrebbe essere riconducibile alla fluorescenza dTomato.

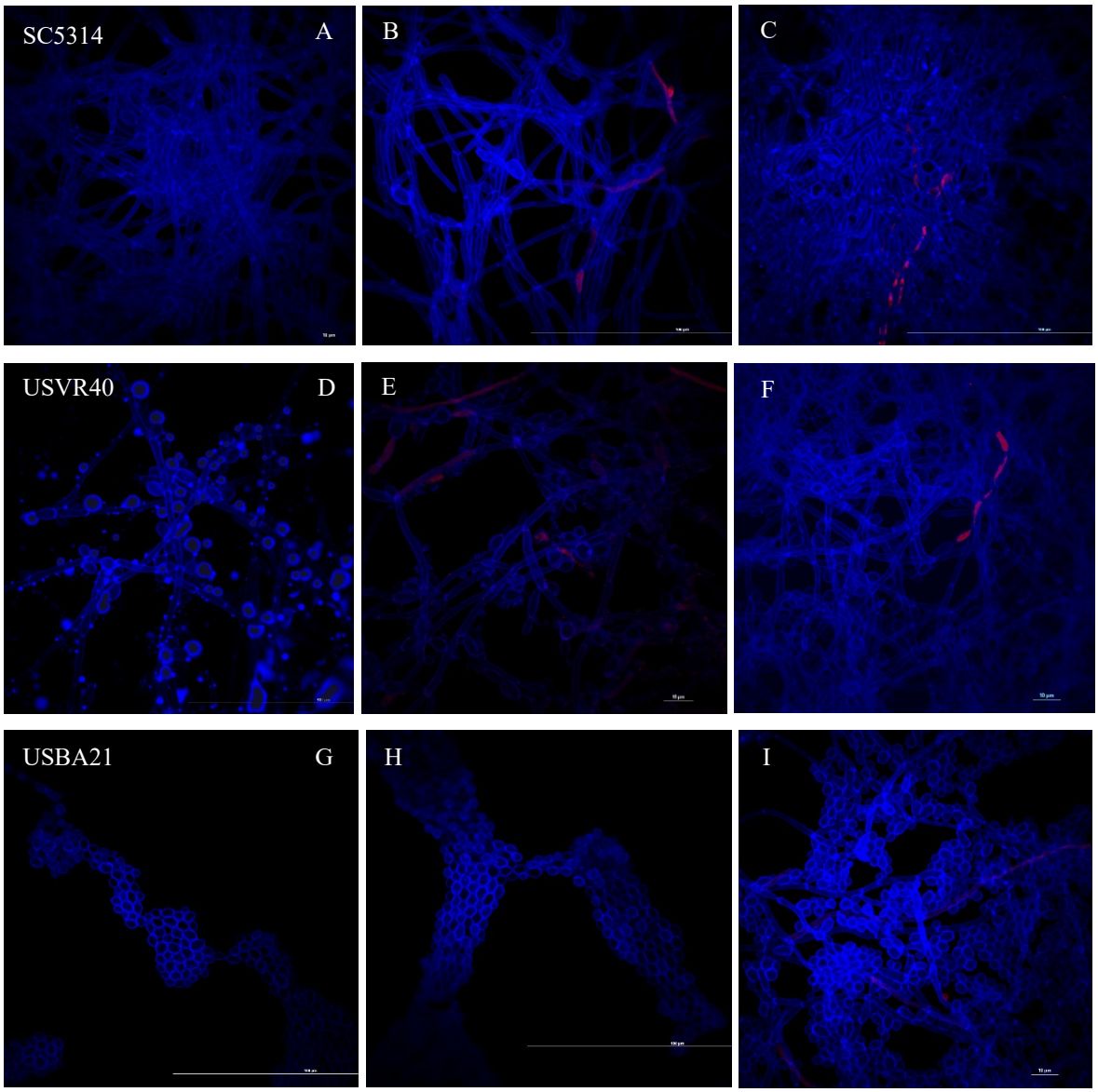


Figura 26 – Proiezioni degli z-stack dei biofilm formati dal ceppo di riferimento SC5314 (A-C) e dai ceppi USVR40 (D-F) e USBA21 (G-I). Per ciascun ceppo sono mostrati il controllo non trattato (A-D-G), il campione trattato con EV di origine planctoniche (B-E-H) ed il campione trattato con EV derivanti da colture sessili (C-F-I). Le barre di scala sono riportate nei singoli pannelli.

Il ceppo SC5314 mostra in tutte le condizioni una struttura articolata, caratterizzata dalla presenza di numerose forme filamentose (**Figura 26**, A – B – C). Nei campi analizzati, il biofilm non trattato presenta uno spessore compreso tra 18 e 26,8 µm, con un valore medio

di 21,67 ± 4,58 µm. Nei campioni trattati con EV planctoniche lo spessore è compreso tra 11,8 e 14,82 µm, con una media di 13,31 ± 2,14 µm, mentre in presenza di EV sessili varia tra 9,24 e 16,3 µm, con un valore medio di 11,87 ± 3,86 µm.

Nel caso di USVR40, ceppo non produttore, le immagini evidenziano differenze morfologiche tra il controllo e i campioni trattati (**Figura 26**, D – E – F). Nel controllo, lo spessore varia tra 3,84 e 5,40 µm, con un valore medio di 4,62 ± 1,10 µm. Nei campioni analizzati con le colture di EV planctoniche sono stati misurati valori compresi tra 11,40 e 11,82 µm, con una media di 11,61 ± 0,30 µm; in presenza di colture di EV sessili lo spessore varia tra 13,06 e 15,32 µm, con un valore medio pari a 14,37 ± 1,17 µm.
Le immagini in cui viene rappresentato il ceppo USBA21, invece, nel caso del controllo e del campione con EV planctoniche mostrano prevalentemente aggregati di cellule lievitiformi e presentano entrambi uno spessore pari a 3,64 µm (**Figura 26**, G – H). In seguito al trattamento con EV sessili invece è possibile osservare una struttura più articolata, con una maggior presenza di forme allungate e filamentose; gli spessori misurati nei campi disponibili sono pari a 7,62 e 9,36 µm, corrispondenti a un valore medio pari a 8,49 ± 1,23 µm (**Figura 26**, I).

Le misurazioni dello spessore sono state effettuate su differenti campi appartenenti allo stesso biofilm e sono state utilizzate esclusivamente come supporto alla descrizione delle immagini. Pertanto, tali valori non sono stati sottoposti ad analisi statistica.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo principale la caratterizzazione delle vescicole extracellulari (EV) prodotte da *C. albicans* CAF2.1-dTomato sia in condizioni planctoniche sia sessili e la valutazione del loro possibile effetto nella formazione del biofilm. Nello specifico, è stato studiato se le vescicole extracellulari prodotte in condizioni sessili potessero presentare delle caratteristiche e proprietà biologiche diverse rispetto alle EV prodotte in condizioni planctoniche, ponendo particolare attenzione al loro effetto su ceppi di *Candida albicans* caratterizzati da una ridotta capacità di formare biofilm.

L'analisi mediante Nanoparticle Tracking Analysis ha mostrato, in entrambe le condizioni, la presenza di popolazioni di particelle prevalentemente nanometriche. Il confronto tra EV planctoniche e sessili non ha mostrato differenze significative né nella dimensione né nella concentrazione delle particelle. Tuttavia, per le preparazioni derivanti dalle colture planctoniche è stata osservata una maggior variabilità tra le repliche, soprattutto nella concentrazione. Il confronto tra le due condizioni non ha evidenziato differenze significative nel diametro delle particelle, che è risultato complessivamente comparabile tra le preparazioni planctoniche e sessili. La limitata numerosità campionaria e la mancata normalizzazione rispetto alla biomassa delle colture non consentono però di escludere differenze nella produzione o nel rilascio delle EV. Inoltre, poiché la NTA rileva tutte le particelle presenti nella sospensione senza determinarne l'identità biologica, i risultati descrivono preparazioni arricchite in EV e devono essere interpretati insieme alle altre analisi effettuate. L'analisi effettuata tramite citofluorimetria a flusso sul ceppo ingegnerizzato di *C. albicans* CAF2.1-dTomato ha evidenziato la presenza del segnale fluorescente dTomato sia nelle preparazioni ottenute da condizioni planctoniche sia sessili. Il ceppo SC5314, utilizzato come controllo negativo, invece non ha mostrato alcun segnale. I risultati sostengono la presenza di materiale fluorescente ma, considerando le caratteristiche della metodica e dei controlli disponibili, il dato non consente di stabilire che ogni evento rilevato corrisponda effettivamente ad una singola EV, né di dimostrare eventuali differenze quantitative nella presenza di Eno1p tra le due condizioni.
La caratterizzazione mediante NTA e citofluorimetria ha, quindi, fornito delle informazioni complementari sui campioni analizzati, evidenziando, però, la necessità di utilizzare ulteriori approcci per ottenere una caratterizzazione più approfondita del loro contenuto molecolare.

Un aspetto rilevante del lavoro riguarda la valutazione dell'effetto biologico delle EV sulla formazione del biofilm. A una concentrazione di 4×10^8 particelle/mL, le vescicole extracellulari ottenute dalle colture sessili hanno determinato, nei ceppi USBA21 e USVR40 a ridotta capacità di produrre biofilm, un aumento della biomassa significativamente maggiore rispetto alle vescicole provenienti dalle colture planctoniche. Questi dati suggeriscono che le condizioni di crescita della cellula produttrice possano influenzare il *cargo*, e di conseguenza le proprietà biologiche delle EV. Nel ceppo SC5314, caratterizzato già da una buona capacità di formare biofilm, l'effetto del trattamento è risultato meno evidente se non assente.

L'analisi dose-risposta effettuata sui ceppi USBA21 e USVR40 ha fornito ulteriori informazioni sulla capacità delle vescicole extracellulari di influenzare la crescita sessile. Infatti, sono state osservate delle variazioni della biomassa in funzione della quantità di vescicole aggiunte nei ceppi clinici testati ed è emerso che le vescicole isolate da colture cresciute in condizioni sessili sono nettamente più efficaci rispetto a quelle di origine planctonica. Tuttavia, l'andamento osservato non è risultato univoco, ma diverso in funzione del ceppo ricevente e dell'origine delle particelle, ma non un effetto strettamente dose-dipendente. Studi futuri con l'utilizzo di un numero maggiore di isolati clinici potranno dare maggiori informazioni in merito.

Le osservazioni ottenute mediante microscopia confocale risultano coerenti con la possibilità che il trattamento influenzi non soltanto la quantità di biomassa aderente, ma anche l'organizzazione del biofilm. Le immagini hanno infatti mostrato che il trattamento con le vescicole di origine sessile non si limita ad aumentare quantitativamente la massa cellulare, ma induce una vera e propria transizione morfologica, stimolando la formazione di strutture allungate e filamentose, incrementando in modo netto lo spessore tridimensionale del biofilm nei ceppi USBA21 e USVR40.

Nel complesso, i risultati mostrano che le vescicole extracellulari di *C. albicans* rappresentano un importante sistema di comunicazione intercellulare. Le EV prodotte in condizioni planctoniche e sessili presentano caratteristiche fisiche comparabili ma possono essere associate a risposte biologiche diverse quando vengono inoculate in ceppi con una ridotta capacità di formare biofilm. In particolare, l'effetto osservato con le vescicole extracellulari di origine sessile, suggerisce che le condizioni fisiologiche della cellula produttrice possono influenzare il contenuto, la composizione e le proprietà biologiche delle EV.

I risultati di questa ricerca possono rappresentare un punto di partenza per studi futuri sulla composizione molecolare delle vescicole extracellulari. Infatti, sarà necessario effettuare approfondimenti con analisi del cargo proteico, lipidico e nucleico, e verificare se eventuali differenze qualitative o quantitative possano essere collegate agli effetti osservati sulla formazione del biofilm. La comprensione dei meccanismi di biogenesi e di comunicazione delle vescicole potrà, inoltre, essere anche un punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche e molecole capaci di inibire la formazione del biofilm e di contrastare con maggior efficacia le infezioni fungine.

BIBLIOGRAFIA

Abels E.R. e Breakefield X.O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301-312. doi: 10.1007/s10571-016-0366-z

Antonelli G., Clementi M., Pozzi G. e Rossolini G.M. (2017). *Microbiologia medica* (3ª ed.). Casa Editrice Ambrosiana.

Bachurski D., Schuldner M., Nguyen P.H., Malz A., Reiners K.S., Grenzi P.C., et al. (2019). Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1596016. doi: 10.1080/20013078.2019.1596016

Baer A., Wawra S.E., Bielmeier K., Uttinger M.J., Smith D.M., Peukert W., et al. (2024). The Stokes–Einstein–Sutherland Equation at the Nanoscale Revisited. *Small*, 20(6), 2304670. doi: 10.1002/smll.202304670

Bays D., Jenkins E., Lyman M., Chiller T., Strong N., Ostrosky-Zeichner L., et al. (2024). Epidemiology of Invasive Candidiasis. *Clinical Epidemiology*, 16, 549-566. doi: 10.2147/CLEP.S459600

Bendinelli M., Chezzi C., Dettori G., Manca N., Morace G., Polonelli L. e Tufano M.A. (2017). *Microbiologia medica: gli agenti infettivi dell'uomo. Biologia, azione patogena, laboratorio*. Monduzzi Editore.

Brandt P., Singha R. e Ene I.V. (2024). Hidden allies: how extracellular vesicles drive biofilm formation, stress adaptation, and host–immune interactions in human fungal pathogens. *mBio*, 15(12), e03045-23. doi: 10.1128/mbio.03045-23

Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Tanabe K., Niimi M., et al. (2007). *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology*, 153(10), 3211-3217. doi: 10.1099/mic.0.2007/010405-0

Chaffin W.L., López-Ribot J.L., Casanova M., Gozalbo D. e Martínez J.P. (1998). Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 130-180. doi: 10.1128/MMBR.62.1.130-180.1998

Chen H., Zhou X., Ren B. e Cheng L. (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), 337-348. doi: 10.1080/21505594.2020.1748930

Dadar M., Tiwari R., Karthik K., Chakraborty S., Shahali Y. e Dhama K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128-138. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.028

Deacon J.W. (2006). *Fungal Biology* (4ª ed.). Blackwell Publishing.

D'Enfert C., Kaune A.K., Alaban L.R., Chakraborty S., Cole N., Delavy M., et al. (2021). The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3), fuaa060. doi: 10.1093/femsre/fuaa060

Denning D.W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(7), e428-e438. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8

Eggimann P., Garbino J. e Pittet D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(11), 685-702. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00801-6

Freitas M.S., Bonato V.L.D., Pessoni A.M., Rodrigues M.L., Casadevall A. e Almeida F. (2019). Fungal Extracellular Vesicles as Potential Targets for Immune Interventions. *mSphere*, 4(6), e00747-19. doi: 10.1128/mSphere.00747-19

Gao Y., Cao Q., Xiao Y., Wu Y., Ding L., Huang H., et al. (2024). The progress and future of the treatment of *Candida albicans* infections based on nanotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 568. doi: 10.1186/s12951-024-02841-6

Giardina B.J., Stein K. e Chiang H.L. (2014). The endocytosis gene END3 is essential for the glucose-induced rapid decline of small vesicles in the extracellular fraction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23497. doi: 10.3402/jev. v3.23497

Gómez-Gaviria M., Ramírez-Sotelo U. e Mora-Montes H.M. (2022). Non-albicans Candida Species: Immune Response, Evasion Mechanisms, and New Plant-Derived Alternative Therapies. *Journal of Fungi*, 9(1), 11. doi: 10.3390/jof9010011

Gow N.A.R., Latge J.P. e Munro C.A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 5.3.01. doi: 10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016

Gratacap R.L., Rawls J.F. e Wheeler R.T. (2013). Mucosal candidiasis elicits NF-κB activation, proinflammatory gene expression and localized neutrophilia in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms*, 6(5):1260-70, dmm.012039. doi: 10.1242/dmm.012039

Gulati M. e Nobile C.J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310-321. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002

Henriques M. e Williams D. (2020). Pathogenesis and Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Pathogens*, 9(9), 752. doi: 10.3390/pathogens9090752

Heredia M. e Andes D. (2021). Contributions of Extracellular Vesicles to Fungal Biofilm Pathogenesis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 67-79). Springer. doi: 10.1007/978-3-030-83391-6_7

Honorato L., de Araujo J.F.D., Ellis C.C., Piffer A.C., Pereira Y., Frases S., et al. (2022). Extracellular Vesicles Regulate Biofilm Formation and Yeast-to-Hypha Differentiation in *Candida albicans*. *mBio*, 13(3), e00301-22. doi: 10.1128/mbio.00301-22

Imparato M., Maione A., Buonanno A., Gesuele R., Gallucci N., Corsaro M.M., et al. (2024). Extracellular Vesicles from a Biofilm of a Clinical Isolate of *Candida albicans* Negatively Impact on *Klebsiella pneumoniae* Adherence and Biofilm Formation. *Antibiotics*, 13(1), 80. doi: 10.3390/antibiotics13010080

Johnson C.J., Davis J.M., Huttenlocher A., Kernien J.F. e Nett J.E. (2018). Emerging Fungal Pathogen *Candida auris* Evades Neutrophil Attack. *mBio*, 9(4), e01403-18. doi: 10.1128/mBio.01403-18

Karkowska-Kuleta J., Kulig K., Bras G., Stelmaszczyk K., Surowiec M., Kozik A., et al. (2023). *Candida albicans* Biofilm-Derived Extracellular Vesicles Are Involved in the Tolerance to Caspofungin, Biofilm Detachment, and Fungal Proteolytic Activity. *Journal of Fungi*, 9(11), 1078. doi: 10.3390/jof9111078

Karkowska-Kuleta J., Kulig K., Karnas E., Zuba-Surma E., Woznicka O., Pyza E., et al. (2020). Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. *Cells*, 9(7), 1722. doi: 10.3390/cells9071722

Kenno S., Speth C., Rambach G., Binder U., Chatterjee S., Caramalho R., et al. (2019). *Candida albicans* Factor H Binding Molecule Hgt1p – A Low Glucose-Induced Transmembrane Protein Is Trafficked to the Cell Wall and Impairs Phagocytosis and Killing by Human Neutrophils. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3319. doi: 10.3389/fmicb.2018.03319

Kowkabany G. e Bao Y. (2024). Nanoparticle Tracking Analysis: An Effective Tool to Characterize Extracellular Vesicles. *Molecules*, 29(19), 4672. doi: 10.3390/molecules29194672

Lass-Flörl C., Kanj S.S., Govender N.P., Thompson G.R., Ostrosky- Zeichner L. e Govrins M.A. (2024). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 10(1), 20. doi: 10.1038/s41572-024-00503-3

Lee Y., Puumala E., Robbins N. e Cowen L.E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chemical Reviews*, 121(6), 3390-3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199

Lenardon M.D., Sood P., Dorfmueller H.C., Brown A.J.P. e Gow N.A.R. (2020). Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. *The Cell Surface*, 6, 100047. doi: 10.1016/j.tcsw.2020.100047

Liebana-Jordan M., Brotons B., Falcon-Perez J.M. e Gonzalez E. (2021). Extracellular Vesicles in the Fungi Kingdom. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7221. doi: 10.3390/ijms22137221

Longjohn M.N. e Christian S.L. (2022). Characterizing Extracellular Vesicles Using Nanoparticle-Tracking Analysis. *Methods in Molecular Biology*, 2508, 353–373. doi: 10.1007/978-1-0716-2376-3_23

Lopes J.P. e Lionakis M.S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89-121. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950

Lopez J.E.M. (2015). Candidiasis (vulvovaginal). *BMJ Clinical Evidence*, 2015, 0815. PMCID: PMC4360556

Macias-Paz I.U., Pérez-Hernández S., Tavera-Tapia A., Luna-Arias J.P., Guerra-Cárdenas J.E. e Reyna-Beltrán E. (2023). *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(2), 189-198. doi: 10.1016/j.ram.2022.08.003

Makarova M. e May R.C. (2021). Fungal Extracellular Vesicles in Interkingdom Communication. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 81-88). Springer. doi: 10.1007/978-3-030-83391-6_8

Manohar S.M., Shah P. e Nair A. (2021). Flow Cytometry: Principles, Applications and Recent Advances. *Bioanalysis*, 13(3), 181-198. doi: 10.4155/bio-2020-0267

Marar C., Starich B. e Wirtz D. (2021). Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nature Immunology*, 22(5), 560-570. doi: 10.1038/s41590-021-00899-0

Martínez-López R., Hernáez M.L., Redondo E., Calvo G., Radau S., Pardo M., et al. (2022). *Candida albicans* Hyphal Extracellular Vesicles Are Different from Yeast Ones, Carrying an Active Proteasome Complex and Showing a Different Role in Host Immune Response. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e00698-22. doi: 10.1128/spectrum.00698-22

Mayer F.L., Wilson D. e Hube B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128. doi: 10.4161/viru.22913

McKinnon K.M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1), 120:5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40

Millsop J.W. e Fazel N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487-494. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022

Mitchell K.F., Zarnowski R. e Andes D.R. (2016). Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLOS Pathogens*, 12(9), e1005828. doi: 10.1371/journal.ppat.1005828

Mohamed A.A., Lu X.L. e Mounmin F.A. (2019). Diagnosis and Treatment of Esophageal Candidiasis: Current Updates. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 1-6. doi: 10.1155/2019/3585136

Moyes D.L., Wilson D., Richardson J.P., Mogavero S., Tang S.X., Wernecke J., et al. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532(7597), 64-68. doi: 10.1038/nature17625

Murray P.R., Rosenthal K.S. e Pfaller M.A. (2017). *Microbiologia medica* (8ª ed.). Edra.

Nowak M., Górczyńska J., Kołodzińska K., Rubin J. e Choromańska A. (2023). Extracellular Vesicles as Drug Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10267. doi: 10.3390/ijms241210267

Pappas P.G. (2006). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20(3), 485-506. doi: 10.1016/j.idc.2006.07.004

Pappas P.G., Lionakis M.S., Arendrup M.C., Ostrosky-Zeichner L. e Kullberg B.J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26

Parsons M.G. e Diekema D.J. (2023). What Is New in Fungal Infections? *Modern Pathology*, 36(6), 100187. doi: 10.1016/j.modpat.2023.100187

Pereira R., Santos Fontenelle R.O., Brito E.H.S. e Morais S.M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11-22. doi: 10.1111/jam.14949

Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., Newell V.A., Ellis D., Tullio V., et al. (2010). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Candida Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1366-1377. doi: 10.1128/JCM.02117-09

Pitarch A., Sánchez M., Nombela C. e Gil C. (2002). Sequential Fractionation and Two-dimensional Gel Analysis Unravels the Complexity of the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Cell Wall Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(12), 967-982. doi: 10.1074/mcp.m200062-mcp200

Polvi E.J., Li X., O'Meara T.R., Leach M.D. e Cowen L.E. (2015). Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(12), 2261-2287. doi: 10.1007/s00018-015-1860-z

Ponde N.O., Lortal L., Ramage G., Naglik J.R. e Richardson J.P. (2021). *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(1), 91-111. doi: 10.1080/1040841X.2020.1843400

Poulain D. (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 208-217. doi: 10.3109/1040841X.2013.813904

Robbins N. e Cowen L.E. (2025). Candida. *Current Biology*, 35(11), R522-R526. doi: 10.1016/j.cub.2025.01.063

Rodrigues M.L., Janbon G., O'Connell R.J., Chu T.T.H., May R.C., Jin H., et al. (2025). Characterizing extracellular vesicles of human fungal pathogens. *Nature Microbiology*, 10(4), 825-835. doi: 10.1038/s41564-025-01962-4

Roemer T. e Krysan D.J. (2014). Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(5), a019703-a019703. doi: 10.1101/cshperspect.a019703

Ronquist G. (2019). Extracellular vesicles and energy metabolism. *Clinica Chimica Acta*, 488, 116-121. doi: 10.1016/j.cca.2018.10.044

Sachivkina N., Podoprigora I. e Bokov D. (2021). Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Veterinary World*, 14(6), 1608–1614. doi: 10.14202/vetworld.2021.1608-1614

Sanguinetti M., Posteraro B. e Lass-Flörl C. (2015). Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58(S2), 2-13. doi: 10.1111/myc.12330

Sardi J.C.O., Scorzoni L., Bernardi T., Fusco-Almeida A.M. e Mendes Giannini M.J.S. (2013). Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0

Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W. e Azeredo J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288-305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x

Talapko J., Juzbašić M., Matijević T., Pustijanac E., Bekić S., Kotris I., et al. (2021). *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79. doi: 10.3390/jof7020079

Turner S.A. e Butler G. (2014). The Candida Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(9), a019778-a019778. doi: 10.1101/cshperspect.a019778

Urabe F., Kosaka N., Ito K., Kimura T., Egawa S. e Ochiya T. (2020). Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 318(1), C29-C39. doi: 10.1152/ajpcell.00280.2019

Vallejo M.C., Matsuo A.L., Ganiko L., Medeiros L.C.S., Miranda K., Silva L.S., et al. (2011). The Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* Exports Extracellular Vesicles Containing Highly Immunogenic α-Galactosyl Epitopes. *Eukaryotic Cell*, 10(3), 343-351. doi: 10.1128/EC.00227-10

Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., Buzas E.I., Blenkiron C., Bussolati B., et al. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, 13(2), e12404. doi: 10.1002/jev2.12404

Wiederhold N.P. (2021). Emerging Fungal Infections: New Species, New Names, and Antifungal Resistance. *Clinical Chemistry*, 68(1), 83-90. doi: 10.1093/clinchem/hvab217

Yang C., Xue Y., Duan Y., Mao C. e Wan M. (2024). Extracellular vesicles and their engineering strategies, delivery systems, and biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 365, 1089-1123. doi: 10.1016/j.jconrel.2023.11.057

Yu J., Sane S., Kim J.E., Yun S., Kim H.J., Jo K.B., et al. (2024). Biogenesis and delivery of extracellular vesicles: harnessing the power of EVs for diagnostics and therapeutics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1330400. doi: 10.3389/fmolb.2023.1330400

Zamith-Miranda D., Heyman H.M., Couvillion S.P., Cordero R.J.B., Rodrigues M.L., Nimrichter L., et al. (2021). Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *mSystems*, 6(4), e00822-21. doi: 10.1128/mSystems.00822-21

Zamith-Miranda D., Nimrichter L., Rodrigues M.L. e Nosanchuk J.D. (2018). Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host. *Microbes and Infection*, 20(9-10), 501-504. doi: 10.1016/j.micinf.2018.01.011

Zarnowski R., Noll A., Chevrette M.G., Sanchez H., Jones R., Anhalt H., et al. (2021). Coordination of fungal biofilm development by extracellular vesicle cargo. *Nature Communications*, 12(1), 6235. doi: 10.1038/s41467-021-26525-z

Zarnowski R., Sanchez H., Covelli A.S., Dominguez E., Jaromin A., Bernhardt J., et al. (2018). *Candida albicans* biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLOS Biology*, 16(10), e2006872. doi: 10.1371/journal.pbio.2006872

Sitografia

Beckman Coulter Life Sciences (s.d.). Optima XPN Ultracentrifuge. https://www.beckman.it/centrifuges/ultracentrifuges/optima-xpn

BioRender (2025). Antifungal Drugs [template grafico]. https://app.biorender.com/biorender-templates/details/t-6435b2d04e6826d93ea6437f-antifungal-drugs

Centers for Disease Control and Prevention (2025). Antimicrobial-Resistant Fungal Diseases. https://www.cdc.gov/fungal/antimicrobial-resistant-fungi/index.html

Malvern Panalytical (2025). NanoSight Pro. https://www.malvernpanalytical.com/en