



Dottorato di ricerca in
Biologia dei Sistemi
XI ciclo nuova serie
2009-2012

Nuove strategie per l'identificazione di molecole ad attività antifungina

Dottoranda

Elena Concetta Calabrese

Tutor

Ch.mo Prof. Bruno Maresca

Coordinatore

Ch.mo Prof. Antonietta Leone

INDICE

RIASSUNTO	pag 1
ABSTRACT	pag 3
INTRODUZIONE	pag 5
SCOPO DELLA TESI	pag 6
Capitolo 1 <i>Candida albicans</i>	pag 9
1.1 Biologia di <i>Candida albicans</i>	pag 9
1.2 Segnali ambientali e morfogenesi	pag 14
1.3 Fattori di virulenza	pag 15
Capitolo 2 Candidosi e Diagnosi	pag 18
2.1 Candidosi	pag 18
2.2 Epidemiologia	pag 20
2.3 Risposta immunitaria	pag 21
2.3.1 La fagocitosi e l'ambiente all'interno dei macrofagi	pag 23
2.4 Identificazione e diagnosi di <i>Candida albicans</i>	pag 23
Capitolo 3 Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza	pag 26
3.1 Terapia farmacologica	pag 26
3.1.1 Gli antifungini azolici	pag 30
3.2 Resistenza agli antifungini	pag 34
3.2.1 Resistenza di <i>Candida albicans</i> agli azoli	pag 35

Capitolo 4	
Risultati	pag 40
4.1 Attività antimicotica degli azoli in esame	pag 40
4.2 Test di diffusione su piastra	pag 43
4.3 Degradazione del biofilm fungino	pag 44
4.4 Analisi morfologica	pag 45
4.5 Inibizione della formazione delle ife	pag 47
4.6 Effetto degli azoli sulla polarizzazione della membrana durante il processo di germinazione	pag 49
4.7 Effetto degli azoli sulla composizione lipidica della membrana	pag 51
4.8 Infezione <i>in vitro</i>	pag 53
4.9 Curva di <i>Killing</i>	pag 55
4.10 Affinità dei composti azolici per ERG11p di <i>Candida albicans</i>	pag 56
4.11 Interazione degli azoli in esame con il fluconazolo	pag 58
4.12 Curva di <i>Killing</i> ottenuta dall'associazione dei nuovi azoli con il fluconazolo	pag 60
4.13 Attività antimicotica su ceppi di <i>C.albicans</i> resistenti al fluconazolo	pag 61
4.14 Effetto fungicida di AF13 su ceppi di <i>C.albicans</i> resistenti al fluconazolo	pag 63
Capitolo 5	
Conclusioni	pag 66
Capitolo 6	
Materiali e metodi	pag 73
6.1 Terreni di coltura	pag 73
6.2 Linee cellulari e condizioni di crescita	pag 73
6.2.1 <i>Candida albicans</i>	pag 73
6.2.2 Macrofagi	pag 74
6.3 Libreria degli azoli in esame	pag 74
6.4 Analisi dell'attività antimicotica	pag 76
6.5 Test di diffusione su piastra	pag 78

6.6 Test di degradazione del biofilm	pag 78
6.7 Studio del fenotipo	pag 79
6.8 Test dei tubi germinativi	pag 79
6.9 Colorazione con Filipin	pag 80
6.10 Estrazione dei microsomi dalla membrana plasmatica	pag 80
6.11 Estrazione e separazione dei lipidi	pag 81
6.12 Analisi degli steroli	pag 81
6.13 Infezione dei macrofagi con <i>Candida albicans</i>	pag 82
6.14 Colorazione di Hotchkiss-Macmanus	pag 82
6.15 Analisi dell'attività fungicida: <i>Time Killing assay</i>	pag 83
6.16 Affinità degli azoli in esame per ERG11p	pag 84
6.17 Sinergismo	pag 84
6.18 <i>Time Killing</i> e sinergismo	pag 85
BIBLIOGRAFIA	pag I-VII

Riassunto

Con l'incremento del numero di persone affette da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), dell'uso di terapie immunosoppressive e del numero di pazienti affetti da varie forme di cancro e, dunque, fortemente debilitati si è avuto un concomitante incremento delle infezioni opportuniste sorrette da funghi. Alcune di queste infezioni, come quelle causate da *Candida albicans*, sono malattie generalmente non letali, ma croniche e persistenti, che riducono notevolmente la qualità della vita dei pazienti. Queste malattie sono difficilmente curabili con gli attuali presidi terapeutici, i quali, la maggior parte delle volte, sono di per sé tossici nel caso di prolungato e massivo utilizzo. Negli ultimi anni si è presentata, dunque, sempre più l'esigenza di trovare nuove ed efficaci strategie terapeutiche per debellare queste patologie.

In questo progetto di tesi l'attenzione è stata focalizzata sull'individuazione di nuovi composti azolici in grado di diminuire o abolire specificamente la capacità germinativa ed infettiva di *C. albicans*.

Le sostanze in esame sono state, quindi, analizzate per determinarne l'attività antimicotica correlata alla capacità del fungo di invadere i macrofagi, nei quali manifesta la sua resistenza a fattori antimicrobici (defensine, basso valore di pH, metaboliti reattivi dell'ossigeno ed altri metaboliti tossici) ed a stress fisici (temperatura) eludendo, in tal modo, i meccanismi di difesa primari dell'ospite.

I test di suscettibilità sono stati svolti attraverso il metodo delle microdiluizioni in brodo, seguendo le linee guida suggerite dalla CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), utilizzando come farmaci di riferimento il fluconazolo ed il miconazolo. In particolare, le sostanze AF13 e AF23 hanno mostrato una forte attività antimicotica che si manifesta con la comparsa di un fenotipo particolarmente alterato di *C.albicans*. Il fungo, infatti, non solo non riesce a germinare, ma non porta a termine il processo di gemmazione, poiché non si ha la formazione del setto di divisione tra la cellula madre e le gemme che quindi non riescono a separarsi.

Inoltre è stata dimostrata la selettività di queste nuove molecole che non risultano essere citotossiche per cellule di mammifero quali macrofagi murini. Infatti durante un'infezione "in vitro" le sostanze in esame inibiscono totalmente la germinazione dei lieviti ma non danneggiano i macrofagi che svolgono la loro attività di fagocitosi,

Riassunto

con formazione del fagolisosoma e digestione delle cellule di *Candida*.

L'inibizione totale del processo di germinazione è stata messa in evidenza mediante esperimenti con il Filipin, un colorante specifico per gli steroli di membrana: le molecole in esame impediscono la formazione dei domini ricchi in steroli, fondamentali per lo sviluppo del tubo germinativo.

A questo punto, è stata indagata la capacità di tali molecole di inibire ERG11p, l'enzima che catalizza la rimozione del gruppo metilico in posizione 14- α del lanosterolo, passaggio chiave per ottenere l'ergosterolo. Esperimenti di *Binding*, hanno dimostrato che gli azoli di nuova sintesi si legano all'enzima con un livello di affinità paragonabile a quello riscontrato per il fluconazolo.

Esperimenti di "*Time Killing*" hanno dimostrato che, a differenza del fluconazolo ad attività fungistatica, le sostanze in esame esplicano un'azione fungicida su *C.albicans*.

L'insieme di questi risultati ha permesso di ipotizzare la presenza di un meccanismo d'azione aggiuntivo rispetto a quello dei classici azoli, che è alla base dell'effetto fungicida da parte di questi composti.

Per confermare la presenza di tale meccanismo d'azione addizionale sono stati effettuati esperimenti di sinergismo, i quali hanno dimostrato che il trattamento con le molecole AF13 o AF23 in combinazione con il fluconazolo dà luogo ad una maggiore inibizione della crescita cellulare rispetto a quando gli azoli sono utilizzati singolarmente. Questi risultati sono di fondamentale importanza, poiché la possibilità di effettuare una terapia di due farmaci in combinazione significa poter ridurre le dosi di entrambi i farmaci, rendendo la terapia delle micosi molto più breve ed efficace con conseguente riduzione sia degli effetti collaterali che del manifestarsi di fenomeni di resistenza e, quindi, consente di migliorare la qualità della vita del paziente.

Infine, in questo progetto di tesi è stata anche valutata l'attività dei composti in esame su due ceppi di *Candida albicans* resistenti al trattamento con il fluconazolo per la presenza di una *up*-regolazione delle pompe di efflusso o per modifiche a carico del target (*ERG11*). I risultati ottenuti sono stati molto incoraggianti, in quanto gli azoli in studio sono attivi su entrambi i ceppi; questo vuol dire avere a disposizione molecole da utilizzare quando le terapie con i classici azoli risultano fallimentari.

Abstract

Disseminated candidiasis is a serious life-threatening infection that causes significant mortality and morbidity in critically ill patients. In particular, oropharyngeal infection is very common in immunodrepressed individuals, particularly in patients with AIDS, while deep-seated infections are frequent in neutropenic patients. The incidence of candidiasis has increased 5-fold over the past ten years due to the widespread use of broad-spectrum antibiotics to the growing population of immunocompromised patients, as a consequence of immunosuppressive agents, radiotherapy and antitumoral drugs.

The current guidelines for treating invasive candidiasis by the Infectious Diseases Society of America recommend the use of an azole derivative (fluconazole, miconazole). Concentrations of these drugs (or active metabolites) in cerebrospinal fluid (CSF) and urine are minimal, thus limit their clinical utility in treating urinary and CSF infections. In addition, the high cost of these drugs cannot be ignored. Although not devoid of side effects and drug–drug interactions, azole antifungal agents, particularly fluconazole, exhibit a good profile of tolerance in the range of doses recommended in invasive candidiasis and are still considered the drug of choice to treat most *Candida* infections due to their broad-spectrum activities and improved safety profiles.

Azole antifungals competitively inhibit the activity of sterol 14 α -demethylase (ERG11p), the key enzyme in sterol biosynthesis in yeast and fungi. Since ergosterol maintains the integrity and fluidity of cell membranes, inhibition of ERG11p would cause depletion of ergosterol and accumulation of lanosterol and other 14-methyl sterols resulting in the growth inhibition of fungal cells. Azole antifungals are generally fungistatic and their intensive clinical use for both therapy and prophylaxis has favored the emergence of resistant strains. Several mechanisms govern resistance to azole antifungal agents in *C. albicans* and the over-expression of the gene encoding efflux pumps and/or upregulation or amino acid substitutions of *ERG11* are among the most significant and intensively studied.

In light of these findings, there is an urgent need for new antifungal agents exhibiting broad-spectrum activities, low toxicity and different mechanisms of action. In particular, identification of new therapeutically useful azoles that have a synergic effect and that do not exhibit cross-resistance with current antifungals might

Abstract

overcome antifungal drug resistance and/or reduce side effects associated with high doses of drugs.

We selected compounds from our chemical library based on their *in vitro* antifungal potential. After a preliminary screening, we chosen two compounds, 1-(1-(biphenyl-4-yl)-3-(4-fluorophenyl)propan-2-yl)-1*H*-imidazole (AF13) and 1-(1-(biphenyl-4-yl)-3-(5-chlorothiophen-2-yl)propan-2-yl)-1*H*-imidazole (AF23) .

In this study, the antifungal activity of twoazole compounds was examined alone and in combination with fluconazole. We investigated their effect on membrane lipid composition and fungal morphology. Our findings suggest that the activity of fluconazole against *C.albicans* can be enhanced by these compounds. Thus AF13 and AF23 can be further studied for their potential role in combination therapy with other azoles.

Introduzione

Negli ultimi anni l'incidenza delle micosi, ed in particolare di quelle sistemiche è aumentata drammaticamente. Le ragioni sono da ricondurre principalmente all'aumentato numero di individui a rischio: i soggetti con un sistema immunitario compromesso (AIDS); i malati oncologici sottoposti a radioterapia e chemioterapia; i trapiantati trattati con farmaci immunosoppressivi. Altri fattori predisponenti sono rappresentati dall'aumentato impiego di dispositivi intravenosi,, la prolungata degenza nelle unità di cura intensiva e la somministrazione di terapie antibatteriche, che alterano il normale microbiota umano.

La grave compromissione del sistema immunitario priva l'organismo degli strumenti naturali che controllano la virulenza di molti patogeni ed organismi opportunisti diffusi nell'ambiente (Rodriguez *et al.*, 1995). In particolare, le infezioni causate da microorganismi opportunisti, ben sopportate da individui sani, possono essere letali se si sviluppano in soggetti immunocompromessi.

Tra le patologie causate da organismi opportunisti, molto comuni sono le micosi provocate dal fungo *C. albicans*, responsabile di infezioni a livello cutaneo, mucocutaneo e sistemico. Questo fungo rappresenta il quarto agente di infezione nosocomiale ed è associato ad una mortalità del 30-50%.

La terapia farmacologica prevista per il trattamento di queste infezioni si avvale di farmaci ad azione fungistatica con elevata tossicità, soprattutto nel caso di prolungato e massivo utilizzo. Inoltre, l'insorgenza di resistenze e di effetti collaterali, ha sollecitato la ricerca di nuovi agenti antifungini con maggiore selettività e minore citotossicità nei confronti delle cellule di mammifero (Lupetti *et al.*, 2002; Bostert *et al.*, 2001).

Scopo della tesi

I funghi sono un gruppo di microrganismi che occupano numerose nicchie ambientali e frequentemente sono ritrovati, come commensali saprofiti, sull'epidermide e sulle mucose esterne dell'uomo. In condizioni normali la proliferazione di questi microrganismi è tenuta sotto controllo dall'ospite, ma negli ultimi anni un particolare allarme è stato suscitato dall'aumentato numero di micosi opportunistiche sostenute proprio da tali funghi.

L'incremento delle infezioni opportunistiche sorrette da funghi viene attribuita a problemi associati con l'aumento dell'invecchiamento della popolazione, all'applicazione diffusa ed eccessiva di terapie antibatteriche a largo spettro, all'aumento del numero di soggetti affetti da cancro, e dell'incidenza di malattie fortemente debilitanti, come la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). La grave compromissione del sistema immunitario priva tali soggetti dei naturali strumenti di reazione attraverso i quali l'organismo riesce a controllare la potenziale virulenza di molti patogeni ed organismi opportunisti diffusi nell'ambiente. Il risultato complessivo è che, all'interno di questi gruppi di pazienti, le infezioni fungine rappresentano una delle principali cause di malattia e di mortalità. Tra le malattie da patogeni opportunistici, la candidosi orale e quella esofagea sono quelle riscontrate più frequentemente, in special modo nei pazienti affetti da AIDS, tanto da rappresentarne uno dei fattori diagnostici.

Questo tipo di infezioni peggiorano notevolmente la qualità della vita dei pazienti, infatti sono difficilmente curabili con gli attuali strumenti terapeutici, che inoltre risultano essere di per sé tossici, soprattutto nel caso di prolungato e massivo utilizzo.

La terapia farmacologica per le candidosi si avvale dell'utilizzo di diverse classi di farmaci tra cui quella più spesso impiegata degli azoli, di cui il fluconazolo ne rappresenta il farmaco di elezione. Il meccanismo d'azione di questi farmaci prevede l'inibizione della ERG11p, un enzima che catalizza una delle fasi della reazione che porta alla sintesi dell'ergosterolo. Dalla deplezione di questo sterolo a livello della membrana plasmatica del fungo ne consegue un'alterazione della permeabilità della stessa e, quindi, fuoriuscita dei metaboliti attivi nell'ambiente esterno, un blocco della replicazione ed, inoltre, inibizione della transizione da lievito ad ifa.

Vi sono, però, una serie di motivi che rendono l'impiego di questi farmaci sempre più difficoltoso e meno efficace e che, quindi, portano al fallimento terapeutico. Questi farmaci risultano, infatti, essere tossici quando utilizzati per lunghi periodi di tempo, in

Scopo della tesi

quanto non possiedono una selettività tale da discriminare tra il target fungino e il corrispondente enzima nelle cellule di mammifero. Presentano solo un'attività di tipo fungistatico, per cui nel caso di soggetti immunodepressi la terapia non risulta essere sufficiente a debellare l'infezione che può disseminare a livello sistemico e risultare letale per il paziente. Inoltre proprio il loro prolungato e massivo utilizzo ha determinato l'insorgenza di fenomeni di resistenza dovuti principalmente ad una *up*-regolazione delle pompe di efflusso e a modificazioni a carico del target (*ERG11*). Per questo motivo, negli ultimi anni, si è presentata sempre più l'esigenza di trovare nuove e più efficaci strategie terapeutiche. In particolare, la ricerca di nuovi farmaci ad attività antifungina si prefigge come obiettivo l'individuazione di molecole con una maggiore selettività, minore citotossicità e minore possibilità di sviluppare fenomeni di resistenza.

CAPITOLO 1

Candida albicans

1.1. Biologia di *Candida albicans*

Candida albicans è un fungo appartenente alla normale flora microbica, infatti è presente come commensale a livello della mucosa orale, del tratto ano-rettale, genito-urinario e dell'epidermide sia dell'uomo che di vari animali a sangue caldo.

Nella maggior parte dei casi non provoca malattia in soggetti immunocompetenti, in quanto questi sono in grado di evocare una corretta risposta immunitaria sia cellulo-mediata che umorale, determinando la produzione di anticorpi contro specifici antigeni prodotti dal fungo. Di contro, condizioni di immunosoppressione inducono la popolazione di lieviti a moltiplicarsi sovrastando la normale competizione dei batteri residenti e causando affezioni del cavo orale, della pelle e del tratto vaginale.

Quindi, nonostante non sia un fungo patogeno, si registrano delle infezioni da *Candida* che si presentano come transienti infezioni opportuniste o come infezioni disseminate in individui immunocompromessi (Kwon-Chung and Bennett, 1992).

La tassonomia di *C.albicans* può essere così riassunta:

Regno: Funghi

Phylum: Deuteromiceti (funghi imperfetti)

Classe: Ascomiceti

Ordine: Saccharomiceti/Emiascomiceti

Famiglia: Saccharomicetacei/Candidacee

Genere: *Candida*

Specie: *albicans*

Candida albicans, essendo un organismo eterotrofo, assimila il nutrimento per diffusione attraverso le pareti cellulari, perciò per la sua propagazione *in vitro* occorre un mezzo di coltura che sia ricco in carboidrati, in azoto (in forma organica od inorganica) e che contenga tracce di elementi minerali come fosfato, potassio, magnesio, zinco e zolfo. Inoltre è necessaria una temperatura

compresa tra i 20° e i 40°C ed un ambiente con un pH compreso tra 2.0 e 8.0.

Cresciuta ad una temperatura tra 20°C e 32°C su piastre di *Agar Sabouraud* le colonie appaiono inizialmente lisce, di colore bianco, cremose (da questa caratteristica deriva il nome latino *albicans*, che significa biancastro), mentre le colonie più vecchie si presentano più grandi, rugose e scanalate (Fig.1) (Boyd *et al.*, 1992).



Figura 1- Colonie di *C. albicans* (da sinistra verso destra): colonie fresche, comparsa di ife periferiche in colonie vecchie.

C. albicans è un organismo eucariotico e come tale ne presenta la caratteristica struttura. Il nucleo è delimitato da una doppia membrana nucleare, contenente al suo interno uno spazio perinucleare. La membrana nucleare esterna è associata ad organuli citoplasmatici, ribosomi, reticolo endoplasmatico; mentre la membrana nucleare interna mostra connessioni con strutture intranucleari, placche cromatidiche e nucleoli.

E' circondato esternamente da una parete cellulare, una struttura rigida che conferisce stabilità morfologica alla cellula fungina e media sia le interazioni con l'ambiente esterno che i contatti con l'ospite infetto. E' indispensabile affinché il fungo eserciti con successo la sua virulenza, in quanto non solo è in grado di stabilire il contatto con la cellula ospite mediante la presenza di adesine di superficie, ma anche di eludere il sistema immunitario mediante la presenza di recettori per il CD3 del complemento. La parete è costituita da polisaccaridi complessi, proteine e glicoproteine. I polisaccaridi, che rappresentano circa l'80% della parete cellulare, sono polimeri di zuccheri semplici ed includono: la chitina, costituita da residui di *N*-acetilglucosammina

legati tra loro da ponti β -1,4-glicosidici simili ai residui di glucosio della cellulosa; un glucano, costituito da residui di *D*-glucosio legati con legami β -1,6 e con diramazioni β -1,3 ed un mannano, un polimero del *D*-mannosio unito da legami α -1,6 e con diramazioni α -1,2 e α -1,3, (Fig.2). Nella parete sono inoltre presenti alcune glicoproteine, ricche di residui cisteinici, che hanno funzione di importanti determinanti antigenici.

Al di sotto della parete è presente la membrana citoplasmatica, dalle dimensioni di 8 nm, che riveste il citoplasma con tutti i suoi componenti e funge da barriera tra la cellula e l'ambiente esterno. La sua integrità è fondamentale affinché non si verifichi la deplezione dei componenti citoplasmatici, causa di morte cellulare. A differenza delle membrane dei mammiferi, che contengono colesterolo, la membrana cellulare del fungo contiene ergosterolo.

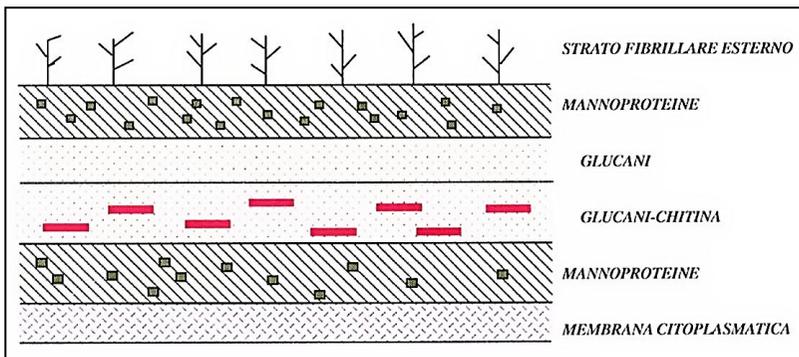


Figura 2- Struttura della parete cellulare.

C. albicans è un organismo diploide con 8 paia di cromosomi ed un genoma di circa 32Mb. Una particolarità del suo codice genetico è che, a differenza della maggioranza degli organismi viventi, utilizza il codone CUG per la serina anziché per la leucina (*C. albicans* genome at the Stanford Database; Scherer e Magee, 1990).

È un fungo dimorfico e in quanto tale, a seconda delle condizioni di crescita, può presentarsi sia come lievito che come muffa. In particolare, il fungo si presenta sotto forma di cellule lievitoformi ovali gemmanti (diametro che varia dai 3 ai 5 μ m)

quando cresce sulla superficie di un terreno ricco, in presenza di un pH acido e di temperature comprese tra 20°-30°C, mentre negli strati più profondi o in ambiente anaerobio viene indotta la formazione del micelio, (Fig.3) (Davis *et al.*, 1995).

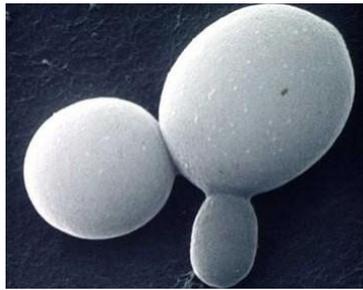


Figura 3- Cellule lieviforni (a sinistra), tubi germinativi (al centro), forma miceliale costituita da vere ife (a destra).

Candida albicans presenta una riproduzione asexuata che comporta la produzione di spore derivanti da divisioni mitotiche, (Fig.4). Nei tessuti infettati da *Candida albicans* possono coesistere ambedue le forme di questo micete dimorfico. Ritroviamo infatti sia le caratteristiche blastospore di forma ovoidale capaci di riprodursi per gemmazione, sia formazioni di pseudoife, anche molto lunghe, che possono portare alla produzione di clamidospore. Le clamidospore sono una forma riproduttiva che si origina per rigonfiamento e ispessimento di una struttura tallica preesistente in condizioni ambientali sfavorevoli, rappresentando così la forma di resistenza del fungo.



Figura 4- Cellule lieviforni durante il processo di gemmazione.

In particolari condizioni ambientali, le cellule lieviformi, attraverso il processo di germinazione, danno luogo alla formazione dei cosiddetti "tubi germinativi". Questi ultimi, attraverso il prolungamento delle loro estremità (estensione apicale), danno origine a cellule allungate dette "pseudoife" che, a loro volta, si sviluppano in strutture tubulari e ramificate con dimensioni che variano dai 2 ai 10 μm dette "vere e proprie ife", (Fig.5). Le pseudoife possono essere distinte dalle vere ife per la presenza di costrizioni tra le diverse cellule. In *C.albicans*, così come in altre specie di funghi, le ife sono dette "settate" in quanto separate da pareti trasversali dette setti. Al microscopio elettronico le ife, in attiva fase di crescita, si presentano come un raggruppamento di vescicole originate dal reticolo endoplasmatico e ricche in enzimi e composti utili per la formazione della parete e della membrana del fungo.

In una colonia fungina le ife si allungano, si ramificano ripetutamente, si intrecciano, si anastomizzano tra loro per dare origine ad un feltro fitto e compatto: il micelio (Kwon-Chung and Bennett, 1992). Il micelio che aderisce al substrato e assorbe da questo le sostanze è detto vegetativo, mentre la porzione che cresce al di sopra è chiamata micelio riproduttivo.

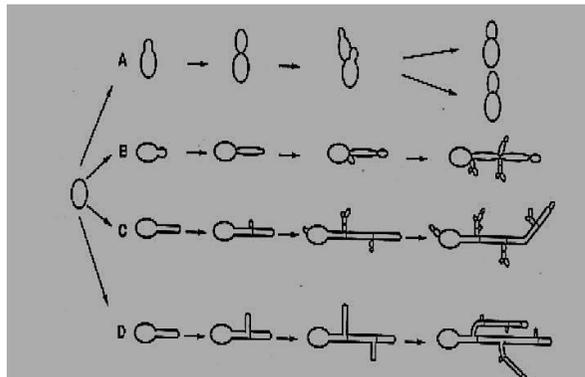


Figura 5- Morfogenesi di *C.albicans*: A) gemmazione di lieviti, B) pseudoife in cui si notano le cellule allungate, C) il tubo germinativo prodotto inizialmente si estende a formare un'ifa che presenta vari setti, D) formazione di ife con ramificazioni laterali.

1.2. Segnali ambientali e morfogenesi

La transizione da lievito ad ifa, e viceversa, può essere indotta *in vitro* dalla combinazione di diversi fattori ambientali quali pH, temperatura di crescita e composizione chimica del terreno. Infatti, a temperature comprese tra i 20°e i 30°C ed a pH acido è favorita la crescita di cellule sottoforma di lievito; mentre a temperature più alte ed a pH basico viene indotta la formazione del micelio.

Il processo di induzione che porta alla formazione delle ife procede in tre fasi successive:

- ❖ I fase: i segnali extracellulari provenienti dall'ambiente esterno vengono percepiti da specifici recettori presenti sulla superficie cellulare;
- ❖ II fase: i segnali vengono trasdotti all'interno della cellula e si attivano specifiche vie metaboliche di trasduzione;
- ❖ III fase: sono prodotti i componenti regolativi (ciclo cellulare) e strutturali.

Un'efficiente processo di transizione morfologica richiede, inoltre, la presenza di molecole induttrici e l'assenza di sostanze inibenti (Ernst *et al.*, 2000).

L'induttore fisiologico più potente è il siero (in una concentrazione che va dal 5 al 20%), le cui componenti attivano parallelamente differenti vie morfogenetiche, ma vi sono anche altre sostanze come *N*-acetilglucosammina (GlcNAc) e prolina, soprattutto se usate come uniche sorgenti di azoto e di carbonio. Nell'uomo sono state individuate molecole induttrici di ife *in vitro*, tra cui: estrogeni, nucleotidi, prostaglandine e ormone luteinizzante. Al contrario il glucosio, se presente ad elevate concentrazioni, inibisce la trasformazione in micelio.

In generale si può dire che terreni ricchi in fonti di carbonio ed azoto inibiscono la filamentazione e favoriscono la forma di lievito.

I meccanismi molecolari e cellulari responsabili della transizione morfologica comprendono: la cascata delle MAP chinasi e il pathway del cAMP che controllano la formazione delle ife e attivano i geni associati all'ifa (Berman J, 2002). Altri fattori cellulari quali Rho-GTPasi Cdc42 e la ciclina Hgc1 giocano, invece, un ruolo

importante nella regolazione della crescita dell'ifa. Inoltre è stato identificato il gene EED1 (Epithelial Escape and Dissemination 1) che codifica per una proteina che gioca un ruolo fondamentale nel processo di estensione dell'ifa sulle superfici e nell'interazione con la cellula ospite.

1.3. Fattori di virulenza

Per fattori di virulenza si intendono tutti quei meccanismi, genetici e non, che rendono un microrganismo capace di invadere un ospite, eludendo i meccanismi di difesa di quest'ultimo e, quindi, di provocare manifestazioni patologiche di varia entità. Si ritiene che questi fattori agiscano anche allo stadio non infettivo (commensalità o colonizzazione) oltre che a quello infettivo (candidosi).

Esempi di fattori di virulenza di *C.albicans* sono:

- ❖ **Parete cellulare** - spessa e resistente capace di resistere agli stress sia chimici che fisici. Essa modula selettivamente l'ingresso delle macromolecole all'interno della cellula, è responsabile dell'interazione con l'ambiente esterno e della morfologia cellulare. Promuove l'infezione attraverso l'interazione di proteine specifiche (adesine, integrine, ecc...) con i recettori presenti sulle cellule ospiti. Una variazione nelle proprietà adesive del fungo è accompagnata, in genere, ad una differente espressione degli antigeni di superficie e, quindi, ad una diminuzione dell'affinità per i tessuti (Haynes Ken, 2001).
- ❖ **Enzimi idrolitici** - non solo permettono al fungo di aderire alle cellule, ma anche di penetrare la superficie delle mucose. *C.albicans*, come molti funghi saprofiti, produce un largo spettro di idrolasi extracellulari, incluse proteinasi, secrete per ottenere nutrienti. Le proteinasi prodotte da questo fungo appartengono alla famiglia delle SAP (*aspartyl acid proteinase*); di queste ne sono state identificate 9 (SAP1 → SAP9) che sono associate a differenti compartimenti cellulari. Questi enzimi sono glicoproteine, ognuna con un pH ottimale di azione (Naglik *et al.*, 2003).

- ❖ **Dimorfismo** - permette al fungo di esistere sia sottoforma di lievito, normalmente presente nella flora di individui sani, sia nella forma di micelio ritrovato nella quasi totalità delle micosi.
- ❖ **Crescita a diversi pH** - ad un pH neutro, come nel sangue e nei tessuti, si ha l'espressione ottimale di *PHR1*, un gene la cui funzione è associata alla sintesi della parete cellulare, invece nel tratto vaginale caratterizzato da un pH acido si ha l'espressione del suo omologo *PHR2* (Porta *et al.*, 1999; Ramon *et al.*, 1999). All'interno del fagolisosoma il pH è di circa 4.0-4.7, in queste condizioni *Candida* è in grado di indurre l'attività di potenziali fattori di virulenza, come le SAP, che provocano la distruzione delle componenti intracellulari del macrofago.
- ❖ **Mannoproteine** - si tratta di complesse glicoproteine contenenti polimeri di mannosio. Rappresentano alcuni dei recettori di superficie che promuovono l'adesione alla cellula ospite, nonché la colonizzazione dei tessuti. In particolare, le glucomannoproteine sono differenzialmente espresse a seconda dello stato dimorfico di *Candida*. Inoltre, sono responsabili della variabilità antigenica tra specie diverse e tra biotipi appartenenti alla stessa specie.
- ❖ **Biofilm** – è costituito da una comunità strutturata di cellule fungine racchiuse in una matrice polimerica. I biofilm sono dotati di particolari funzioni adatte alla colonizzazione di superfici sia biotiche sia abiotiche. La struttura di un biofilm maturo varia con la localizzazione e la disponibilità dei nutrienti. Il biofilm fungino è una delle principali cause di mortalità per la sua resistenza ai farmaci e, spesso, richiede l'intervento chirurgico per la sua rimozione dai tessuti infetti.

Può essere considerato un fattore di virulenza anche la capacità di *Candida* di accumulare mutazioni genetiche spontanee. Le variazioni fenotipiche (**switching fenotipico**) corrispondenti a mutazioni genetiche sono naturalmente ereditabili, rendendo diversa la morfologia delle colonie, creando alterazioni del metabolismo e promuovendo fenomeni di resistenza acquisita nei confronti di agenti antifungini (Soll, *et al.*, 1993). I meccanismi molecolari di questi avvenimenti sono ancora sconosciuti, ma la

plasticità genetica di *Candida* rende questo organismo capace di adattarsi alle condizioni più avverse.

Sono stati identificati diversi geni i cui prodotti codificano per fattori di virulenza. Fra questi ricordiamo: Als1p (*agglutin-like*) membro di una famiglia di 7 proteine glicosilate con omologia con le proteine α -agglutinine di *Saccharomyces cerevisiae*; Hwp1p, una mannoproteina di superficie che stabilizza l'aderenza del fungo sulle membrane delle cellule ospiti; Int1p (*integrin-like protein*); Mnt1p α -1.2-mannosiltrasferasi (Calderone, 1993; Hostetter, 1994). Una rappresentazione schematica degli eventi finora descritti e che sono alla base del processo di patogenesi, è riportata in figura 6.

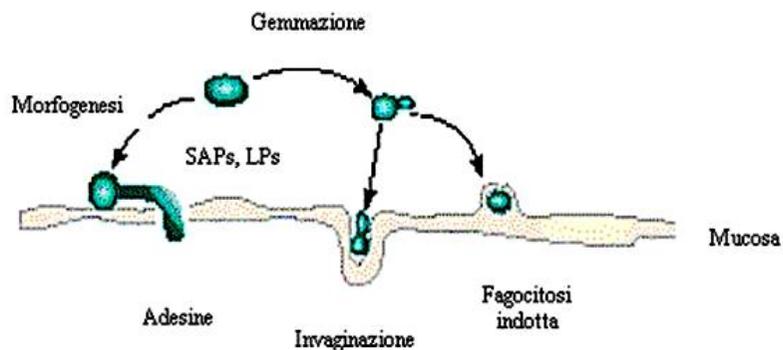


Figura 6- Sulla superficie della mucosa sono rappresentati i processi di patogenesi della candidosi. Le blastospore di *Candida* possono andare incontro a gemmazione (al centro), oppure moltiplicarsi e penetrare nella sottomucosa promuovendo la fagocitosi e l'invaginazione (a destra). In alternativa, possono invadere i tessuti sottostanti passando alla forma filamentosa durante la morfogenesi (a sinistra). Questi eventi sono tutti promossi da adesine ed enzimi degradativi (SAPs e LPs).

In sintesi si può dire che l'insieme di vari fattori di virulenza permette a *C. albicans* di aderire alla cellula ospite, penetrare, sopravvivere e proliferare nei tessuti colonizzati (Ernst *et al.*, 2000).

CAPITOLO 2

Candidosi e Diagnosi

2.1. Candidosi

I funghi del genere *Candida* provocano infezioni definite candidosi, o candidemie, le quali si possono presentare in forma acuta o cronica, superficiale o disseminata.

La malattia presenta le caratteristiche di un'infezione opportunistica, sviluppandosi solo in determinate circostanze, ovvero quando l'ospite è in condizioni di debilitazione (Kwon-Chung and Bennett, 1992). Generalmente è limitata ai loci di infezione, e solo raramente è in grado di diffondere in maniera disseminata all'interno dell'organismo.

Tuttavia vi sono dei fattori che comunemente predispongono alla malattia disseminata, infatti tutte quelle situazioni che determinano un abbassamento parziale o totale, duraturo o transitorio, delle normali difese dell'organismo e, quindi, un deficit della funzione del sistema immunitario favoriscono la proliferazione di questo organismo opportunistica.

In particolare, i fattori che portano alla debilitazione dell'ospite sono:

- ❖ Cause meccaniche: traumi od occlusioni, ustioni, utilizzi di cateteri intravascolari od urinari;
- ❖ Farmaci: terapie antibiotiche, soprattutto per lunghi periodi e con antibiotici ad ampio spettro; contraccettivi estro-progestinici, che alterano la normale flora batterica vaginale; farmaci immunosoppressori utilizzati come terapia antirigetto nei pazienti trapiantati; abuso di droghe endovenose;
- ❖ Patologie: malattie autoimmunitarie (Lupus, Artrite reumatoide), malattie endocrine (ipoparatiroidismo, iposurrenalismo, ipotiroidismo), leucemie, neutropenie, diabete mellito, carenze vitaminiche, AIDS (Sindrome da Immunodeficienza Acquisita);
- ❖ Situazioni di carattere fisiologico: infanzia, vecchiaia, gravidanza.

Lo spettro di infezioni causate da microrganismi del genere *Candida* include malattie localizzate della cute e delle unghie e malattie che colpiscono le superfici mucose di bocca, vagina, esofago ed albero bronchiale. Inoltre se l'infezione fungina non è diagnosticata precocemente e trattata aggressivamente, può diffondere a livello sistemico e divenire letale per il soggetto. Le candidosi sono convenzionalmente classificate in relazione alla profondità e gravità dell'infezione nei vari distretti anatomici, in:

- ❖ **Candidosi cutanea** - una patologia superficiale a carico della cute, delle unghie e delle mucose orali ed uro-genitali (Fig.7).
- ❖ **Candidosi muco-cutanea** - una micosi superficiale che comprende, oltre le candidosi sopraccitate, quella respiratoria e gastrointestinale. Insorge principalmente in bambini affetti da leucemia, da endocrinopatie, o da immunodeficienza con compromissione dei meccanismi immunitari T-dipendenti.
- ❖ **Candidosi sistemica** - una micosi che fa registrare il maggior numero di decessi, in quando il microrganismo diffonde per via ematica e, quindi si tratta di un'infezione che coinvolge molti organi (La Placa, 2005).



Figura 7- Candidosi cutanee. Onicomicosi a sinistra, mugugno al centro, piede d'atleta a destra.

Perché le infezioni da *C. albicans* possano aver luogo, è necessario che il fungo esprima i fattori di virulenza. Essi variano a seconda del sito, dello stadio dell'infezione, e delle condizioni dell'ospite. Infatti, lo stato fisiologico dell'ospite sembra essere la condizione primaria che governa l'eziologia delle candidosi.

2.2. Epidemiologia

La specie più frequentemente responsabile delle candidosi è *C.albicans*, trovata nei siti di infezione in circa il 60% dei casi, (Rodloff *et al.*, 2011) (Fig.8). Le candidemie presentano un tasso di infezione di 8-10 persone su 100 mila all'anno e sono associate ad una mortalità del 30-50% (Odds, 1988). Poiché la fonte di infezione nell'uomo è principalmente endogena, studi epidemiologici sono stati focalizzati sulla distribuzione dei lieviti sia negli individui sani che in quelli infetti. Gli individui che non manifestano la malattia presentano questo specifico fungo a livello del tratto orofaringeo (56%), della regione vulvo-vaginale (40%) e di quella anorettale (24%)

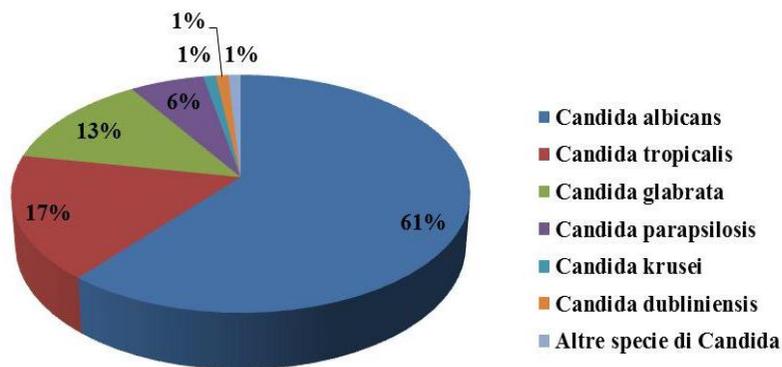


Figura 8- Incidenza delle infezioni causate dalle differenti specie di *Candida* .

In genere, la scarsa igiene favorisce lo sviluppo del fungo, inoltre piccole lesioni cutanee possono rappresentare focolai di infezione che tendono spesso a recidive ed anche a cronicizzazione.

Tamponi orali in soggetti sani hanno evidenziato che bambini in età compresa tra una settimana e diciotto mesi posseggono una percentuale maggiore del fungo rispetto a bambini più grandi e agli adulti. Ciò è dovuto al fatto che i neonati possono acquisire il fungo al loro passaggio attraverso il canale del parto, durante l'allattamento o con l'uso di bottiglie contaminate (mughetto).

Specifiche candidosi, come quella vaginale, possono comparire in seguito a trattamenti prolungati con antibiotici, all'uso di contraccettivi ormonali o durante le fasi del ciclo mestruale. La candidosi vaginale è più frequente nelle donne incinte (durante il terzo trimestre di gravidanza), in quanto durante la gravidanza l'aumento della concentrazione di progesterone ed estradiolo, l'abbassamento del pH e l'aumento della concentrazione di glicogeno vaginale predispongono l'epitelio vaginale alla colonizzazione da parte di *Candida* (La Placa, 2005).

Molte dermatiti che colpiscono le aree interstiziali delle dita delle mani e dei piedi (piede dell'atleta), delle natiche, delle aree inguinali e dell'ombelico dei bambini (area ricoperta dal pannolino) sono causate da funghi come *Candida*. In particolare sono dovute al contatto con particelle infettanti presenti in acque stagnanti, feci contaminate, etc.

C.albicans è frequentemente isolata da fonti ambientali come acqua, suolo, aria e piante a loro volta contaminate da escrementi umani od animali. Altre fonti legate alla contaminazione umana includono lenzuola, biancheria intima, vasche da bagno e corsie di ospedali.

2.3. Risposta immunitaria

C.albicans risulta essere un fungo innocuo nella maggior parte della popolazione, in quanto, come già detto, il suo sviluppo è tenuto sotto controllo dalle normali difese immunitarie dell'organismo ospite. Una qualsiasi alterazione di questo equilibrio porta inevitabilmente all'instaurarsi di un'infezione che, almeno inizialmente, si manifesta come candidosi superficiale.

L'infezione può in alcuni casi divenire "profonda", ed interessare organi come rene, intestino, cuore, articolazioni; o nei casi più gravi, come nei soggetti immunocompromessi, può instaurarsi una micosi disseminata.

Le candidosi sistemiche, pur non causando un elevato numero di decessi, come si riscontra spesso per altre infezioni fungine disseminate, sono comunque fortemente debilitanti e riducono notevolmente la qualità della vita del paziente infetto.

Nei soggetti immunocompetenti la resistenza all'infezione è garantita da una efficace risposta immunitaria "*cellulo-mediata*". I

linfociti T CD8⁺ (citotossici) coinvolti vengono attivati dagli antigeni superficiali del fungo e sono in grado di rilasciare:

- ❖ fattori chemiotattici (chemochine), che facilitano la migrazione di fagociti e macrofagi nel sito di infezione;
- ❖ fattori di attivazione (citochine) che favoriscono l'attività fagocitica e killer dei macrofagi e delle cellule NK.

Nella risposta all'infezione da *Candida* è coinvolta anche l'immunità "umorale" sia innata che acquisita. Gli anticorpi della classe IgG, ad esempio, riconoscono i determinanti antigenici di superficie del fungo, opsonizzando quest'ultimo. A questo punto, macrofagi e neutrofilii, che possiedono recettori in grado di legarsi alla regione Fc delle molecole IgG presenti sulla parete cellulare di *Candida* opsonizzata, sono in grado di fagocitare il fungo.

La fagocitosi è un processo che si evidenzia anche in assenza di opsonizzazione, in quanto i macrofagi sono in grado di riconoscere anche altri antigeni espressi sulla parete del fungo, fra i quali il mannano ed il glucano.

Indipendentemente dal tipo di recettore utilizzato per intercettare *Candida* (recettore per Fc, recettori per antigeni, recettori per il complemento) e dal tipo di meccanismo che induca la fagocitosi del fungo, i macrofagi si "attivano" ed inducono una serie di attività metaboliche che tendono alla distruzione dei lieviti fagocitati.

In particolare:

- ❖ produzione di anioni superossidi o altri intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI), perossidi di idrogeno e intermedi reattivi dell'azoto (NO), a cui molti microrganismi risultano essere sensibili;
- ❖ secrezione di citochine (IL-6, IL-8, TNF- α).

La propagazione di *C.albicans* viene tenuta sotto controllo da una complessa cooperazione tra diverse cellule del sistema immunitario e dai loro prodotti. Infatti in individui affetti da HIV, nei quali, il deficit in linfociti T CD4⁺ (helper) non permette ai macrofagi la distruzione del fungo, si ha lo svilupparsi di una candidosi di tipo cronico (Varquez-Torres e Balish, 1997).

2.3.1. La fagocitosi e l'ambiente all'interno dei macrofagi

Il processo di fagocitosi dei lieviti di *Candida* da parte dei macrofagi determina il loro confinamento all'interno di un fagosoma. Quest'ultimo, nel citoplasma, viene avvicinato ai lisosomi fino a fondersi con essi formando il fagolisosoma. Il materiale fagocitato viene così a contatto con vari enzimi contenuti nel lisosoma e digerito. L'azione digestiva è messa in atto da idrolasi acide, come nucleasi, proteasi, glicosidasi, lipasi, fosfatasi, solfatasi e fosfolipasi che si attivano quando poste in ambiente acido (pH~ 4.0), (Alberts *et al.*, 1994).

La capacità di adattamento è dovuta all'espressione di una serie di geni per la virulenza, ed il fenomeno del dimorfismo che la caratterizzano, ne permettono la crescita all'interno di un ambiente altamente ostile come quello del macrofago, con conseguente distruzione dello stesso. Infatti, la formazione delle ife non solo permette al fungo di penetrare, colonizzare e disseminare all'interno dell'organo infettato, ma a causa della loro dimensione e dell'azione meccanica di cui sono dotate impediscono il processo di fagocitosi (Davis *et al.*, 1995)

2.4. Identificazione e diagnosi di *Candida albicans*

Un aspetto della micologia ancora molto discusso è quello della diagnosi. Infatti per una prova assoluta della presenza di un'infezione fungina si richiede un esame istologico, ma talvolta tale metodo risulta troppo invasivo.

Una diagnosi rapida ed alternativa potrebbe essere rappresentata dall'uso dei metodi sierologici, ma nel campo delle micosi questi metodi presentano alcuni problemi.

Questo, associato alla mancanza di un antifungino sicuro con un ampio spettro d'azione, ha portato ad una situazione in cui gli antimicotici molto spesso vengono somministrati solo quando l'infezione sconosciuta non risponde ad un trattamento antibatterico, ma ciò per alcuni pazienti si risolve in un intervento ormai tardivo.

Pertanto l'efficacia di un intervento diagnostico, in un paziente in cui si sospetti un'infezione micotica, dipende dalla possibilità di mantenere un corretto rapporto informativo tra tre attività:

- ❖ esame clinico;
- ❖ esame istopatologico;
- ❖ esame microbiologico.

La natura micotica di un'afezione cutanea o di un'infezione sistemica, già sospettata in base ad elementi clinici, va sempre documentata attraverso la dimostrazione della presenza del micete. A tal proposito si effettuano esami macroscopici ed esami colturali.

Un saggio morfologico microscopico, che costituisce il modo più semplice di identificare la specie *albicans*, è quello della “**germinazione in siero**” o “**test dei tubi germinativi**”. Di norma, il test viene praticato stemperando una colonia di lievito in una provetta contenente siero di cavallo o siero umano ed incubando per 2-4 ore ad una temperatura di 37°C. Un'aliquota viene poi posta su un vetrino e osservata al microscopio. Il test risulta essere positivo se sono visibili tubi germinativi senza restringimento nel punto d'origine (Fig.9).

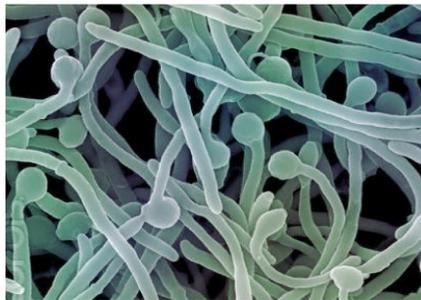


Figura 9- Tubi germinativi.

Un altro saggio morfologico è il “**test delle clamidospore**”, un particolare tipo di spore con funzione di sopravvivenza che si formano in condizioni ambientali sfavorevoli, in seguito all'ispessimento della parete delle cellule che costituiscono le ife. Il test viene eseguito prelevando una colonia di lievito da un terreno di crescita per funghi e strisciando su BD Rice Extract Agar (agar estratto di riso), incidendo la superficie dell'agar con un'ansa sterile.

L'area inoculata viene coperta con vetrini sterili, per creare un ambiente anaerobico ed incubata ad una temperatura di 23°C -28 °C per 18-48 ore. Si utilizza questo particolare terreno, in quanto l'estratto di riso rappresenta una fonte povera di sostanze nutritive che unitamente alle condizioni anaerobiche crea un ambiente ostile che induce la formazione delle clamidospore, (Fig.10).

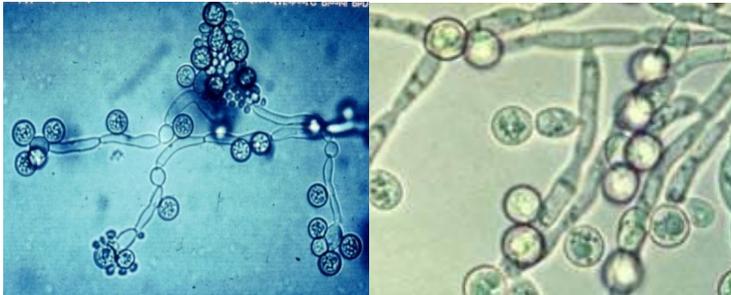


Figura 10. Clamidospore.

Inoltre come test di macroscopia possiamo utilizzare la “**colorazione di PAS**” che ci permette di rilevare lo sviluppo di pseudoife ed ife nei tessuti infettati, (Fig.11).

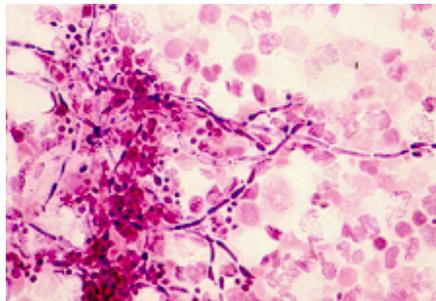


Figura 11. Pseudoife ed ife.

CAPITOLO 3

Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza

3.1. Terapia farmacologica

I problemi relativi alla messa a punto di farmaci antimicotici a tossicità selettiva sono stati in parte risolti adoperando sostanze che si legano ai componenti peculiari della parete o della membrana cellulare dei funghi o che inibiscono la sintesi di questi componenti.

La maggior parte dei farmaci antimicotici (Fluconazolo, Posaconazolo, Miconazolo, etc.), con provata efficacia, inibisce la sintesi di ergosterolo mentre sono pochi quelli che inibiscono la mitosi, la sintesi di glucano o di mannano e la sintesi proteica nei funghi, (Fig.12).

Antifungal drugs	Molecular targets
Polyenes	Membrane sterols especially ergosterols
Azoles	Cytochrome P450-14 α -demethylase (a key enzyme of ergosterol synthesis pathway)
Allylamines/Thiocarbamates	Squalene epoxidase (the enzyme which converts squalene to lanosterol along with oxido-squalene cyclase)
Morpholines/Amorolfine	C ¹⁴ -reductase and C ¹⁴ -C ¹³ isomerase enzymes which play their role in the conversion of lanosterol to ergosterol
5-Fluoropyrimidines	mRNA synthesis, thymidylate synthetase
Novel antifungal agents	
Echinocandins	1,6- β -glucan synthase, the major enzyme for fungal cell wall glucan synthesis
Pneumocandins	
Papulaocandins	
Nikkomycin Z, Polyoxins, Pradimicins	Chitin synthase Mannoproteins
Sordarins	EF-2

Figura 12- Meccanismo d'azione delle principali classi di farmaci utilizzate nella terapia delle candidosi.

Quasi tutti sono tossici per le cellule umane quando usati per lunghi periodi di tempo ed ad alte dosi, rendendo così difficile il trattamento delle malattie micotiche sistemiche che, invece, necessitano di cure prolungate. Inoltre tutti i farmaci utilizzati in terapia hanno un effetto di tipo fungistatico tanto che la loro interruzione comporta spesso la comparsa di recidive.

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

I farmaci correntemente in uso si dividono, a seconda del meccanismo d'azione, in quattro classi:

- ❖ I **Polieni** sono macrolidi ciclici la cui azione consiste nell'interazione con gli steroli di membrana, che porta alla formazione di pori acquosi responsabili della fuoriuscita di componenti citoplasmatici vitali, (Fig.13).

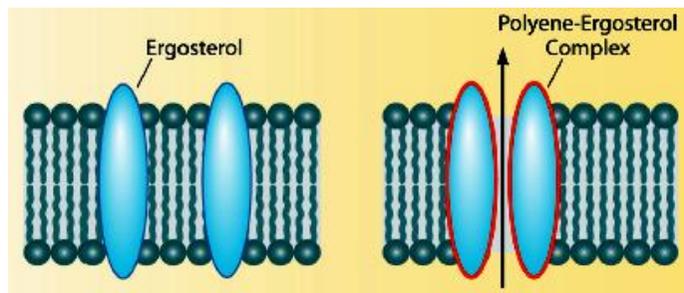


Figura 13- Meccanismo d'azione dei polieni.

Essi, però, sono anche in grado di legare anche il colesterolo, componente steroideo delle membrane cellulari dell'uomo. Per questo motivo l'amfotericina B, (Fig.14), valido rappresentante di questa classe di farmaci, risulta essere molto tossica quando è somministrata per via endovenosa e, in seguito ad una terapia a dosi elevate e/o per lunghi periodi di tempo, comporta danni irreversibili alla membrana basale del rene ed alle cellule epatiche.

Inoltre nel corso degli anni si è verificata l'insorgenza di fenomeni di resistenza a questa classe di farmaci che si è visto essere generata attraverso l'alterazione del sito bersaglio, rappresentato dagli steroli della membrana plasmatica, i quali possono cambiare sia qualitativamente che quantitativamente.

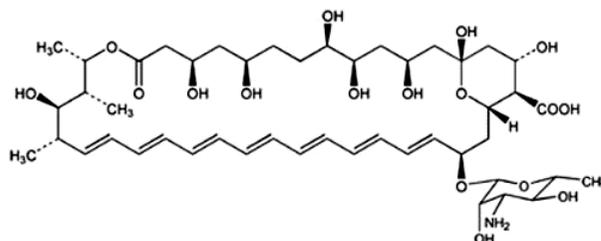


Figura 14- Amfotericina B.

❖ Gli **Azoli** costituiscono la classe di antimicotici più utilizzata, con oltre 20 farmaci presenti sul mercato. Alcuni di questi trovano impiego prevalentemente a livello topico per curare infezioni superficiali da dermatofiti e da lieviti, mentre altri sono somministrati per via orale o endovenosa per il trattamento di infezioni fungine sistemiche. Presentano buona biodisponibilità orale ed ampio spettro di azione.

Gli azoli interferiscono con la biosintesi degli steroli e di altri componenti lipidici della membrana, compromettendone quindi l'integrità. Essi inibiscono la lanosterolo-14- α -dimetilasi, un enzima responsabile della conversione del lanosterolo in ergosterolo; quest'ultimo rappresenta il principale componente della membrana cellulare dei funghi. Ciò causa un aumento della permeabilità della membrana cellulare ed una sua progressiva instabilità, (Fig.15).

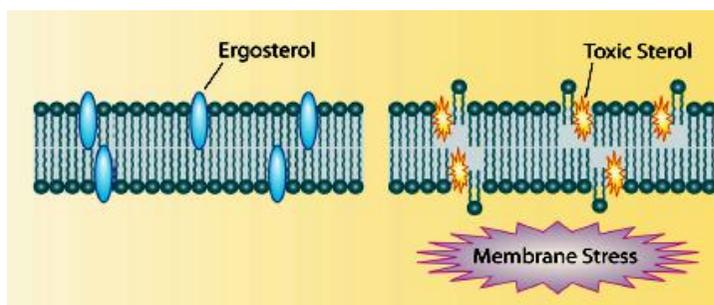


Figura 15- Meccanismo d'azione degli azoli.

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

Essi sono classificati dal punto di vista chimico in due classi: gli imidazoli, caratterizzati dalla presenza di un anello imidazolico e i triazoli, caratterizzati dalla presenza di un anello 1,2,4-triazolico legato attraverso l'N1 ad una catena laterale contenente almeno un anello aromatico.

- ❖ Le **Echinocandine** (caspofungina e micafungina) sono metaboliti secondari fungini costituiti da un nucleo ciclico esapeptidico legato ad una catena laterale lipofila responsabile dell'attività antimicotica. Questi composti agiscono inibendo specificamente la sintesi del polimero $\beta(1,3)$ -D-glucano, costituente fondamentale della parete cellulare del fungo. A seguito di questa inibizione, si ha deplezione di glucano a livello della parete stessa con conseguente instabilità osmotica e lisi delle cellule fungine, (Fig.16).

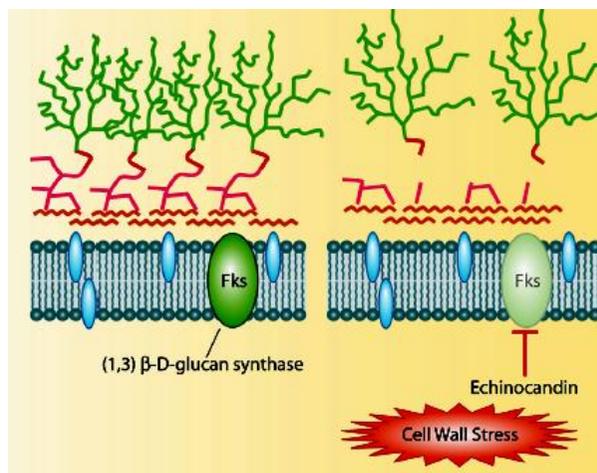


Figura 16- Meccanismo d'azione delle echinocandine.

Vi sono inoltre altre due classi di farmaci presenti in commercio, ma meno utilizzate delle precedenti che sono:

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

- ❖ Le **Allilammine** sono caratterizzate strutturalmente dalla presenza di un gruppo allilaminico, da cui il loro nome. La loro attività antimicotica è dovuta all'inibizione dell'enzima squalene epossidasi che interviene in uno stadio precoce della biosintesi dell'ergosterolo. Come conseguenze dell'inibizione di tale enzima, a livello della membrana cellulare del fungo si verifica una riduzione dei livelli di steroli (con alterazioni delle proprietà chimico-fisiche della membrana stessa) ed accumulo di squalene che, quando presente in concentrazioni troppo elevate, risulta tossico per il micete.

- ❖ Gli **Analoghi nucleosidici**, come la 5-fluorocitosina, hanno uno spettro di attività ristretto. Questo farmaco, in particolare, è utilizzato per via orale nella terapia di infezioni sistemiche causate da funghi specifici, soprattutto dai generi *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*. È ben assorbito nel tratto gastroenterico, si lega poco alle proteine e presenta elevata biodisponibilità nell'uomo. Di contro, ha un ristretto spettro di attività antifungina e rapidamente induce resistenza nei microorganismi sensibili. La 5-fluorocitosina è captata da una citosina permeasi e viene rapidamente deaminata a 5-fluorouracile. Tramite ulteriori reazioni, la 5-fluorouracile viene convertita in composti che inibiscono l'attività dell'RNA e la sintesi del DNA.

3.1.1. Gli antifungini azolici

L'era degli antifungini azolici ha avuto inizio nel 1969 con l'introduzione in terapia di tre derivati imidazolici: il clotrimazolo (Bayer), ed i due analoghi miconazolo (Fig.17) ed econazolo (Janssen Pharmaceutica). A questi hanno fatto seguito altri derivati imidazolici come il chetoconazolo (1981), il bifonazolo (1983), il flutrimazolo (1995).

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

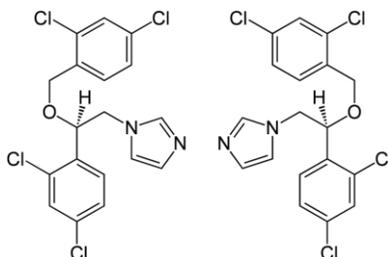


Figura 17- Miconazolo.

L'inattivazione metabolica a cui vanno incontro gli antifungini imidazolici si traduce in una scarsa biodisponibilità dopo somministrazione orale. La frazione di farmaco libera è ulteriormente ridotta dall'elevata liposolubilità di questi composti che fa sì che essi si leghino in altissima percentuale alle proteine plasmatiche.

Questi studi hanno portato all'introduzione in terapia degli antimicotici triazolici, come il terconazolo (1983) e l'itraconazolo (1988). E' importante sottolineare che i composti triazolici risultano anche meno teratogeni dei derivati imidazolici e pertanto di impiego più sicuro. Inoltre studi tossicologici hanno provato che composti contenenti la porzione clorofenilica formano metaboliti clorurati tossici, mentre i corrispondenti derivati fluorurati sono meno soggetti all'attacco degli enzimi CYP450-dipendenti. Tutto ciò spiega il successo dei più recenti farmaci antifungini triazolici e fluorurati (1988). Attualmente i farmaci presenti in commercio più utilizzati nella terapia delle infezioni sorrette da funghi sono quattro antifungini triazolici: fluconazolo (Fig.18), itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo. Tra questi il fluconazolo rappresenta il farmaco di elezione nella cura delle candidosi vaginali, ma anche orofaringee ed esofagee (Pappas *et al.*, 2009). Solo nei casi più gravi di infezione in pazienti immunocompromessi si utilizza il miconazolo per la terapia, poiché, nonostante determini un effetto fungicida quando utilizzato ad elevate concentrazioni, resta comunque un farmaco clorurato e quindi altamente citotossico.

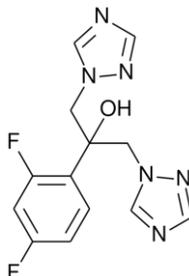


Figura 18- Fluconazolo.

In particolare, il fluconazolo è un solido di colore bianco cristallino, leggermente solubile in acqua ed in soluzione salina. E' prontamente assorbito per via orale, con una biodisponibilità del 90% e il legame con le proteine plasmatiche è basso (11-12%). L'assorbimento del fluconazolo non è modificato dal consumo di cibo, dal pH gastrico o da stati patologici intercorrenti. Tra i triazoli, il fluconazolo ha la massima penetrazione nel sistema nervoso centrale e nel vitreo, per cui è la prima scelta in caso di infezione in queste sedi. Tuttavia in seguito alla terapia con questo farmaco si riscontrano differenti effetti collaterali. I disturbi maggiormente segnalati sono cefalea, nausea, vomito, rash cutanei, prurito, vertigini e dolore addominale; più raramente è stato osservato un innalzamento delle transaminasi epatiche in pazienti già immunocompromessi.

Nella maggior parte delle specie fungine, i farmaci a struttura azolica penetrano la cellula attraverso un meccanismo di diffusione facilitata. Una volta all'interno, sono in grado di esplicare il loro meccanismo di azione, che si basa sull'inibizione della biosintesi dell'ergosterolo, costituente fondamentale della membrana cellulare dei funghi. In particolare gli antifungini azolici inibiscono la lanosterolo-14-alfa-demetilasi (ERG11p), un enzima codificato dal gene *ERG11*, che catalizza la rimozione del gruppo metilico in posizione 14-alfa del lanosterolo, passaggio chiave per ottenere l'ergosterolo, (Aoyama *et al.*, 1984) (Fig.19). L'inibizione della ERG11p provoca, a livello della membrana cellulare del fungo, un accumulo di steroli contenuti ancora il gruppo metilico ed aventi,

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

quindi, struttura tridimensionale e proprietà fisiche diverse da quelle dello sterolo normalmente presente, l'ergosterolo, (Lamb *et al.*, 1999). Questo causa un cambiamento nella permeabilità della membrana, in particolare si verifica fuoriuscita di ioni e piccole molecole organiche nell'ambiente esterno alla cellula ed, inoltre, viene ad essere alterato il buon funzionamento sia degli enzimi inglobati nella membrana stessa che delle proteine che costituiscono i canali ionici (Wolker *et al.*, 2001). Questi effetti sommati tra loro portano alla morte della cellula fungina.

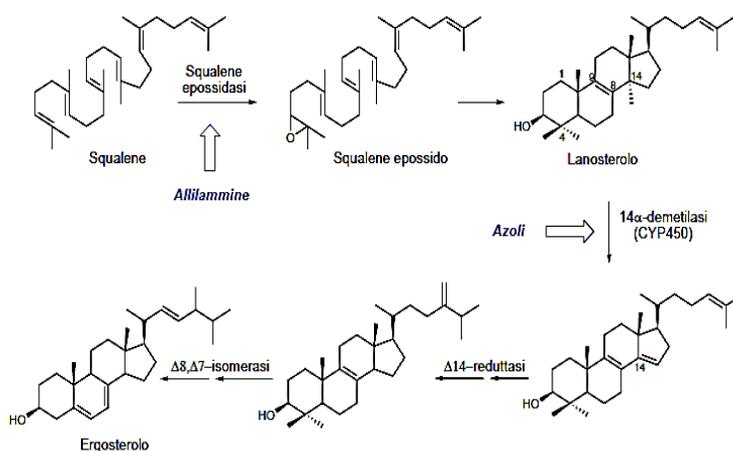


Figura 19- Schema semplificato della biosintesi dell'ergosterolo a partire dallo squalene.

Scendendo a livello molecolare, l'azoto N3 basico dell'eterociclo azolico forma un legame con il ferro acido dell'eme del gruppo prostetico della ERG11p nella posizione normalmente occupata dall'ossigeno. Non possono perciò avere luogo le tre successive ossidrilazioni del gruppo metilico 14-alfa seguite da eliminazione di acido formico per dare il doppio legame tra il C14 ed il C15 dell'anello D, tipico dell'ergosterolo, (Fig.20).

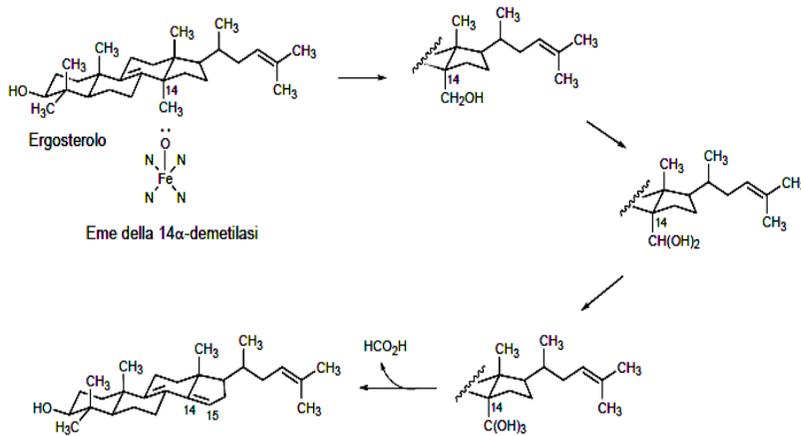


Figura 20- Rimozione ossidativa del gruppo metilico 14- α del lanosterolo catalizzata dall'enzima lanosterolo-14-alfa demetilasi. Il meccanismo consiste in tre successive inserzioni di ossigeno sul legame carbonio-idrogeno del gruppo metilico 14- α catalizzate dall'eme che aumentano lo stato di ossidazione del metile ad acido carbossilico. Alla fine il gruppo è eliminato come acido formico per dare il doppio legame tra gli atomi di carbonio 14 e 15.

Nonostante gli azoli risultino essere al momento i farmaci maggiormente utilizzati nella terapia delle infezioni da *Candida*, si riscontra spesso l'insorgenza di fenomeni di resistenza che rendono inefficace il trattamento farmacologico.

3.2. Resistenza agli antifungini

I microrganismi patogeni rappresentano una delle principali cause alla base dell'incremento del tasso di mortalità, ciò è dovuto alla loro capacità di contrastare il regime terapeutico e, quindi, di dare origine al fenomeno della resistenza.

In particolare, il concetto di "resistenza" applicato alle infezioni sostenute dai miceti è relativamente recente, e l'individuazione di un regime terapeutico appropriato per questo tipo di infezioni

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

rappresenta una sfida, poiché sia la cellula fungina che la cellula ospite sono entrambe di natura eucariotica.

La terapia antimicotica è efficace sul singolo evento della patogenesi, ma non è in grado di prevenire in modo consistente le recidive, di cui è possibile solo ridurre la frequenza aumentando l'intervallo di tempo tra un evento e l'altro. Inoltre, occorre tenere presente che i ripetuti trattamenti antimicotici possono indurre resistenza al farmaco. Con il termine di resistenza clinica si intende proprio la persistenza o la progressione dell'infezione nonostante la somministrazione di un "appropriato" trattamento farmacologico, essa equivale al fallimento terapeutico.

Differenti specie di funghi hanno mostrato un'intrinseca resistenza ai farmaci determinata dalla loro capacità di attivare specifici meccanismi. Anche in assenza di questi specifici meccanismi, specie e ceppi differiscono nella loro capacità di sopravvivere e riprodursi durante il periodo di esposizione al farmaco, in questo caso si parla di tolleranza.

Negli ultimi trent'anni, l'aumento dell'incidenza delle infezioni sorrette da funghi ha determinato un netto incremento nell'uso di farmaci a struttura azolica non solo a scopo terapeutico, ma anche a scopo profilattico per tutti quei soggetti ad alto rischio di infezione. Questo massivo utilizzo di azoli, unito al fatto che essi possiedono solo attività fungistatica, ha determinato un netto aumento del manifestarsi di resistenza negli isolati clinici, (Rogers *et al.*, 2006). La resistenza agli agenti antifungini correntemente in uso ha, quindi, assunto importanti implicazioni riguardo la morbilità, la mortalità e l'alto costo della degenza ospedaliera. L'attenzione si è perciò concentrata su un'accurata comprensione del fenomeno della resistenza, sullo studio dei meccanismi con cui essa si innesca, sui metodi per prevenirne la diffusione, sul miglioramento dei sistemi di analisi e sulla ricerca di nuovi antifungini.

3.2.1. Resistenza di *Candida albicans* agli azoli

I meccanismi sviluppati da *Candida albicans* che sono alla base della sua resistenza ai farmaci azolici sono vari. Tra questi ricordiamo mutazioni nel target *ERG11* e/o la sovraespressione delle pompe di efflusso ("*multidrug transporters*"), (Sanglard *et al.*, 2002). Questi due meccanismi sono esempi di come le cellule

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

sono capaci di rendere inefficace la terapia, bloccando il legame del farmaco al suo target e/o allontanandolo dalla cellula. Inoltre, lavori recenti hanno messo in evidenza come anche “*pathway*” coinvolti nella risposta a stress siano implicati nell’evoluzione e nel mantenimento del fenomeno della resistenza, (Shapiro *et al.*,2011)

In particolare i meccanismi responsabili del manifestarsi di fenomeni di resistenza possono essere così riassunti:

- ❖ **Alterazione dell’enzima bersaglio-** modifiche a carico del “*target*” possono essere legate sia ad una *up*-regolazione del gene che lo codifica sia a mutazioni del gene stesso. Nel primo caso si crea il bisogno di una più elevata concentrazione intracellulare di farmaco per poter complessare tutte le molecole enzimatiche presenti nella cellula, mentre nel secondo caso si assiste alla produzione di un enzima modificato nei confronti del quale l’azolo presenta una ridotta affinità, (Favre *et al.*, 1999 e Kakeya *et al.*, 2000) (Fig.21);

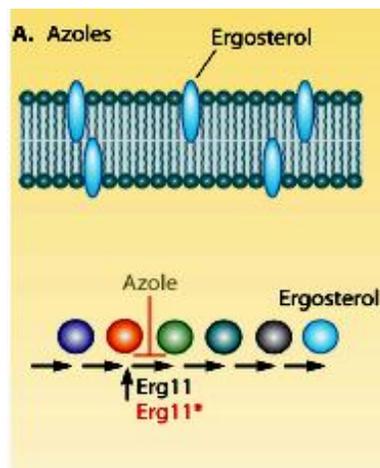


Figura 21- Resistenza determinata da alterazione del target.

CAPITOLO 3 *Terapia farmacologica e Farmaco-resistenza*

- ❖ **Up-regolazione dei “*Multidrug Transporters*”**- un’alterazione della funzionalità dei trasportatori presenti sulla membrana del fungo determina un aumento dell’efflusso dell’agente antifungino, il che riveste un ruolo critico nella limitazione dell’accumulo di diversi farmaci all’interno della cellula e può conferire una resistenza multipla (MDR), (Lupetti *et al.*, 2002) (Fig.22).

Analisi biochimiche hanno dimostrato, che gli azoli penetrano nella cellula fungina tramite un meccanismo di diffusione facilitata. Quando presente in basse concentrazioni il farmaco è trasferito dai trasportatori all’interno della cellula, ma ad alte concentrazioni si verifica la saturazione del sistema di trasporto e la quantità di farmaco che viene trasportata all’interno diminuisce.

Questa forma di resistenza crociata è un fenomeno complesso ed è stato a lungo studiato fino a quando è stato identificato un trasportatore, codificato dal gene MDR1, che è deputato al trasporto di un ampio spettro di substrati esogeni (xenobiotici). In particolare esso è *over*-espresso nei casi di resistenza al fluconazolo.

I trasportatori che hanno un ruolo nella MDR sono proteine codificate dai geni della famiglia delle *ATP-binding cassette* (ABC), un’ampia famiglia di proteine *trans*-membrana che legano ATP e usano l’energia per facilitare il trasporto di diverse molecole attraverso tutte le membrane.

In particolare il gene MDR1 codifica la proteina PgP o glicoproteina P, per un canale di membrana (PgP) la cui apertura e chiusura è regolata dall’ATP. Questo canale è costituito da 12 domini idrofobici e da due siti catalitici per l’ATP, che forniscono l’energia necessaria per il trasporto verso l’esterno della cellula oppure verso l’interno di organelli intracellulari. Se la PgP è difettosa, per effetto di un inibitore o perché è inattivata da una mutazione, si può avere un accumulo intracellulare del farmaco e un aumento degli effetti tossici. Spesso questa proteina è *over*-espressa nelle cellule neoplastiche, causando una marcata resistenza a molti chemioterapici proprio a livello delle cellule bersaglio, con il risultato che viene ridotta la loro efficacia

terapeutica, (Nishikawa *et al.*, 2010).

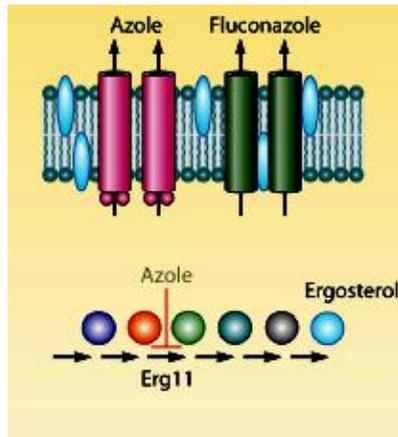


Figura 22- Resistenza determinata da alterazione dei “*multidrug trasporters*”.

- ❖ **Risposta a stress cellulari-** *Candida albicans* ha sviluppato “*pathways*” di risposta a stress ambientali necessari per la sopravvivenza alla terapia antifungina. Questi *pathways* sono alla base sia della tolleranza manifestata dagli isolati clinici, che della resistenza acquisita mediante l’instaurarsi di specifici meccanismi.

La mutazione dell’enzima Δ -5,6-desaturasi, codificato dal gene *ERG3*, rappresenta un meccanismo, ben investigato negli isolati clinici, che mitiga la tossicità dei farmaci e conferisce resistenza alla cellula fungina. In seguito ad una mutazione a carico del gene *ERG13*, infatti, si verifica un blocco nella produzione di uno sterolo alternativo che normalmente si accumula nella membrana plasmatica e che, quindi, risulta essere tossico, (Fig.23). Questo particolare sterolo viene prodotto quando il gene *ERG11* è inibito per azione del farmaco, quindi, in sua assenza, la membrana risulta essere perfettamente integra e in grado di svolgere la sua funzione. Ciò fa sì che la cellula fungina continui a crescere e dividersi anche in presenza degli azoli.

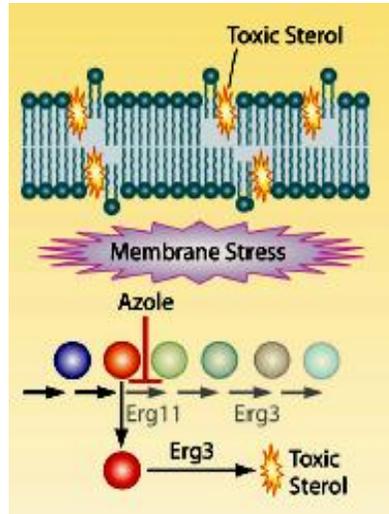


Figura 23- Resistenza determinata dalla risposta a condizioni di stress.

CAPITOLO 4

Risultati

4.1. Attività antimicotica degli azoli in esame

L'attività antimicotica delle sostanze in esame è stata determinata utilizzando il metodo delle microdiluizioni. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, le OD_{600nm} ottenute dai pozzetti in cui il ceppo di *C.albicans wild-type* è stata trattata con le diverse sostanze in esame, sono state confrontate con le OD_{600nm} ottenute dal trattamento con il solo veicolo dimetilsolfossido (DMSO). In tal modo per ogni azolo, compresi i farmaci utilizzati come riferimento fluconazolo e miconazolo, è stato possibile determinare la MIC₂, cioè la minima concentrazione inibente il 50% della crescita del fungo, (Tab.1). Si è deciso di utilizzare due diversi farmaci di riferimento, poichè il miconazolo presenta la stessa struttura chimica di base dei composti in esame, in quanto imidazolo, ma è il fluconazolo il farmaco di elezione utilizzato nella terapia delle candidosi perchè meno tossico.

Come si evince dalle immagini ottenute mediante microscopia Time Lapse, tutti i composti hanno manifestano un effetto antimicotico provocando un notevole rallentamento del processo di gemmazione e, quindi, della crescita di *Candida*. (Fig.1). Inoltre tutti gli azoli sono stati in grado di provocare un'inibizione parziale o totale della germinazione del fungo. Le sostanze AF13 e AF23 sono risultate essere particolarmente attive, infatti hanno presentato valori di MIC₂ paragonabili o addirittura inferiori a quelli riscontrati in seguito al trattamento con i farmaci di riferimento.

Visti i risultati ottenuti, si è deciso di continuare lo studio degli effetti su *Candida* solo per AF13 ed AF23. Queste molecole sono, dal punto di vista chimico, un 1-(1-(biphenyl-4-yl)-3-(4-fluorophenyl)propan-2-yl)-1*H*-imidazole (AF13) e un 1-(1-(biphenyl-4-yl)-3-(5-chlorothiophen-2-yl)propan-2-yl)-1*H*-imidazole (AF 23).

SOSTANZE	MIC₂ (µg/ml)
BR5	22
BR6	0.4
BR9	0.25
AF7	0.2
AF13	0.035
AF15	0.14
AF19	0.21
AF22	0.15
AF23	0.095
AF27	0.13
AF29	0.14
AF31	0.17
TS65	0.17
TS66	0.3
TS67	0.25
TS68	0.25
TS69	0.22
TS70	0.3
FLU	0.08
MICO	0.03

Tabella 1– Valori di MIC₂ degli azoli in esame dopo 24 ore di incubazione a 37°C. I valori riportati sono la media geometrica di tre esperimenti indipendenti.

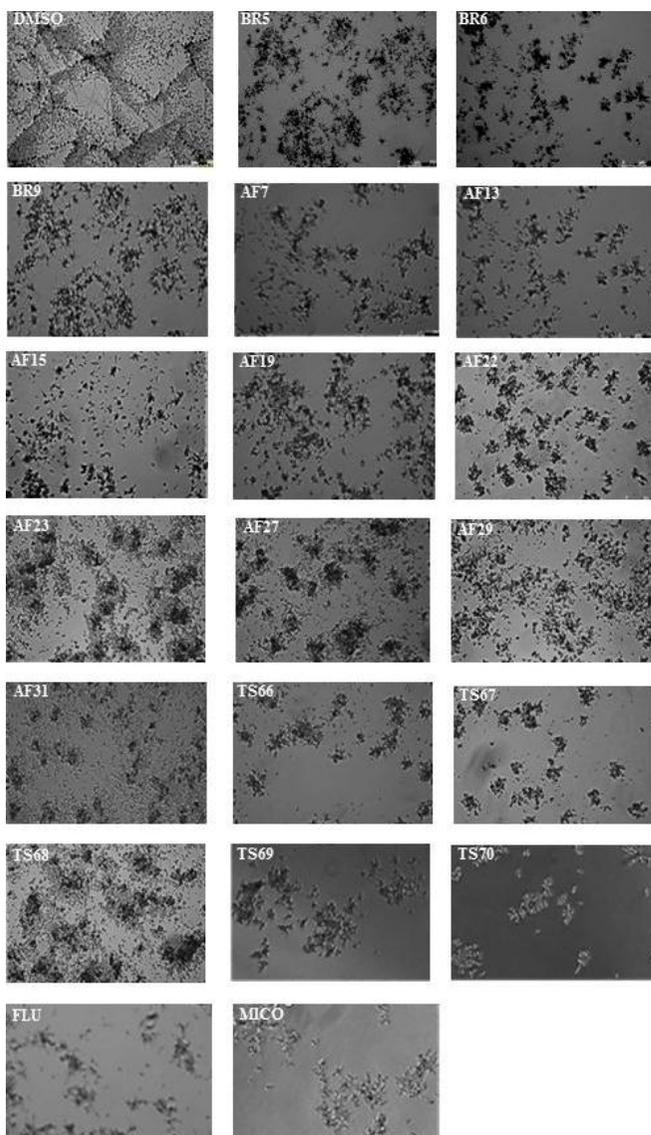


Figura 1– Immagini al Time Lapse di *Candida albicans* trattata con le sostanze in esame ad una concentrazione pari alla MIC₂.

4.2. Test di diffusione su piastra

Il grado di suscettibilità del fungo nei confronti dei composti AF13 e AF23 è stato valutato mediante la misura del diametro dell'alone di inibizione prodotto da ciascuno di essi e comparandolo con quello ottenuto in seguito al trattamento con il fluconazolo ed il miconazolo.

Dall'immagine riportata in figura 2 è stato possibile osservare, per gli azoli in esame, la formazione di una larga zona di *clearance*, indice dell'inibizione della crescita del fungo intorno al punto in cui sono stati aggiunti i composti.

In particolare, in questo esperimento, utilizzando per ogni sostanza concentrazioni corrispondenti a 10 volte la MIC₂, si è avuta la comparsa di un alone di inibizione solo intorno alle molecole AF13 ed AF23, mentre non è stata riscontrata alcuna inibizione della crescita in seguito all'aggiunta dei due farmaci di riferimento. Ciò sta a significare che, pur aumentando la concentrazione di fluconazolo e miconazolo, il danno da essi arrecato al fungo *Candida albicans* non aumenta così come invece succede per le sostanze in esame.

La misura del diametro dell'alone di inibizione è stata riportata in tabella 2.

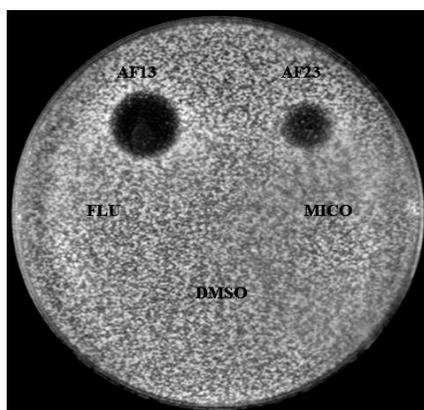


Figura 2– Test di diffusione su piastra. Il trattamento con le molecole AF13 e AF23 determina la comparsa di una zona di *clearance*, indice dell'inibizione della crescita indotta dalle sostanze sul fungo.

SOSTANZE	DIAMETRO (mm)
AF13	17
AF23	13
FLU	ND
MICO	ND
DMSO	ND

Tabella 2– Test di diffusione su piastra. Misura del diametro dell'alone di inibizione in seguito al trattamento con gli azoli in esame ed i farmaci di riferimento. I valori riportati sono la media geometrica di tre esperimenti indipendenti.

4.3. Degradazione del biofilm fungino

Il biofilm è un complesso formato da differenti tipi di cellule all'interno di una matrice extracellulare che si viene a formare in seguito al movimento delle cellule stesse su di una superficie. La produzione del biofilm è fondamentale affinché il fungo possa colonizzare nei tessuti dell'ospite. Inoltre i biofilms che *Candida albicans* è in grado di formare rappresentano un importante fattore di virulenza, in quanto risultano essere estremamente resistenti alla terapia farmacologica con la maggior parte degli antifungini.

Questo esperimento è stato effettuato al fine di valutare la capacità dei composti in studio di degradare il biofilm fungino preformato. E' risultato evidente come entrambe le sostanze AF13 e AF23 siano state in grado di svolgere questa funzione, al contrario di quanto è avvenuto utilizzando il fluconazolo e il miconazolo.

Infatti il numero delle "Colony Forming Unit" (CFU) recuperate in seguito al trattamento del biofilm di *Candida* con le suddette sostanze in esame è risultato essere di gran lunga più basso rispetto a quelle che sono state recuperate in seguito alla somministrazione dei farmaci di riferimento, (Fig.3).

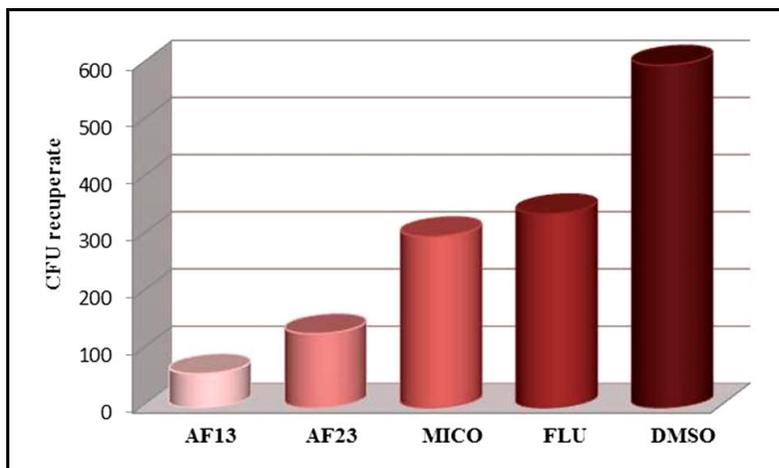


Figura 3– Il grafico è riportato il numero di CFU recuperate in seguito al test di degradazione del biofilm di *Candida albicans*. I dati rappresentano la media geometrica ottenuta da tre esperimenti indipendenti.

4.4. Analisi morfologica

Per poter constatare se le sostanze in esame, oltre ad inibire la crescita del fungo e a degradarne il biofilm, avessero un effetto sul fenotipo ed in particolare sul processo di germinazione, *C.albicans* è stata cresciuta in condizioni che inducono la formazione delle ife, quindi utilizzando il terreno RPMI a pH 7.0 ed una temperatura di 37°C.

In queste condizioni di crescita il trattamento di *Candida* con le sostanze in esame ha determinato variazioni fenotipiche molto evidenti. Infatti, mentre le cellule del controllo (*Candida* con il solo veicolo) sono state in grado di dare origine alla formazione di “vere ife”, le cellule trattate sono rimaste sottoforma di lievito, in quanto è stato inibito il processo di germinazione. Inoltre esse hanno presentato una morfologia alterata, caratterizzata dalla presenza di un ampio vacuolo centrale. Dalle immagini ottenute al microscopio (Axioplan 2 Imaging) si è potuto constatare che il fungo non solo non è riuscito a germinare, ma durante il processo di gemmazione non si è formato il setto di divisione e le gemme non sono riuscite a

separarsi dalla cellula madre, (Fig.4). Questo effetto è da imputare all'inibizione della sintesi di ergosterolo, quindi alla sua deplezione a livello della membrana plasmatica ed all'accumulo del suo precursore alfa-metilato, il lanosterolo. Tutto ciò ha determinato non solo un aumento della permeabilità della membrana con conseguente fuoriuscita dei metaboliti attivi nell'ambiente esterno, ma anche un blocco nella replicazione del micete.

E' stato interessante notare che le cellule trattate con fluconazolo e miconazolo hanno presentato una morfologia meno alterata rispetto a quella che si è osservata in seguito al trattamento con gli azoli in studio. Infatti sia AF13 che AF23 sono stati in grado di determinare il manifestarsi di un fenotipo estremamente alterato che potrebbe indicare il verificarsi di un danno a carico della parete cellulare, oltre che della membrana. Questo effetto potrebbe essere dovuto all'inibizione di qualche altro enzima coinvolto nella sintesi della parete fungina e, quindi, all'instaurarsi di un meccanismo d'azione sinergico. Inoltre tale alterazione della morfologia fa pensare ad un potenziale effetto fungicida degli azoli in esame.

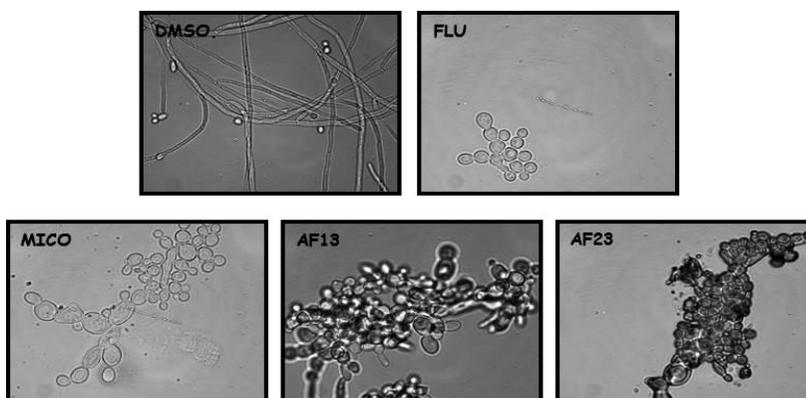


Figura 4– Analisi morfologica di *C. albicans* in seguito al trattamento con gli azoli in studio. La morfologia particolarmente alterata riscontrata in seguito al trattamento con AF13 e AF23, è indice di un potenziale effetto fungicida dovuto probabilmente ad un ulteriore meccanismo d'azione posseduto da tali sostanze.

4.5. Inibizione della formazione delle ife

L'alterazione che le sostanze azoliche inducono sul processo di germinazione è di fondamentale importanza, in quanto la formazione dapprima del tubo germinativo e poi delle vere e proprie ife rappresenta un importante fattore di virulenza di *Candida albicans*.

Dai risultati ottenuti, si è potuto notare come in assenza di trattamento il fungo è stato in grado di formare ife che, intrecciandosi tra loro, hanno dato origine ad un feltro fitto e compatto, il micelio, mentre i composti azolici hanno inibito la formazione delle ife in maniera dose-dipendente, (Fig.5). In particolare, anche se i valori di MIC₂ delle molecole in esame sono comparabili al fluconazolo, in presenza di AF13 e AF23 non solo è stata osservata una diminuzione del numero di cellule lieviformi, ma anche una netta riduzione della lunghezza media dei tubi germinativi.

L'effetto indotto dal trattamento con gli azoli in esame è stato, inoltre, di gran lunga superiore rispetto a quello indotto dal farmaco di riferimento. Esse hanno determinato una diminuzione nella lunghezza dei tubi germinativi di circa il 30%, quando utilizzate alla concentrazione di 0.04µg/ml fino ad arrivare ad una riduzione di circa l'80%, quando utilizzate alla concentrazione di 0.20µg/ml, (Fig.6).

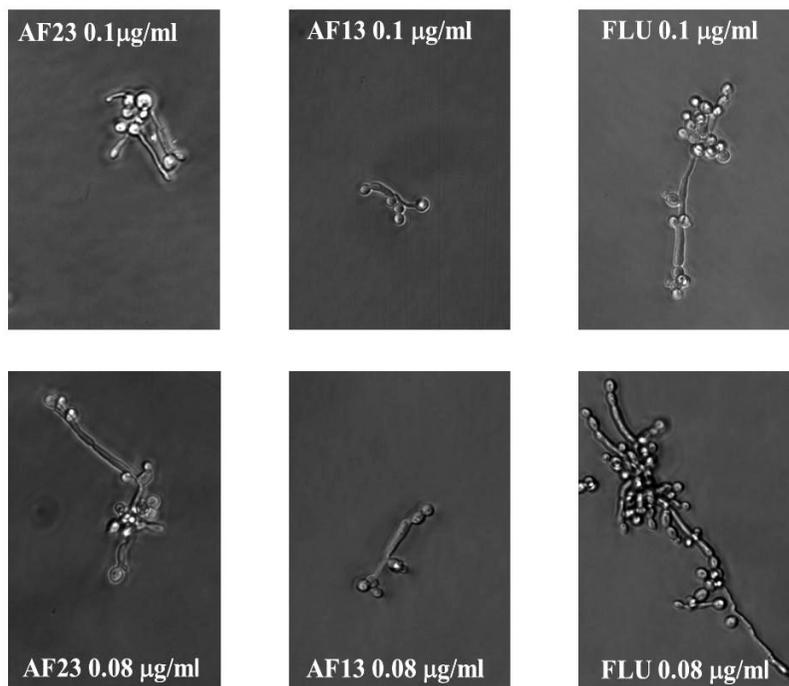


Figura 5- Inibizione del processo di germinazione indotta da AF13e AF23 paragonata a quella indotta dal fluconazolo (obiettivo 40X).

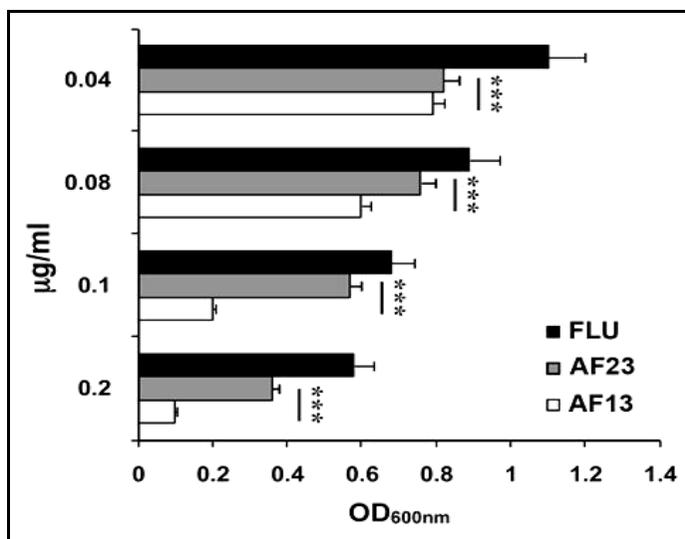


Figura 6- L'inibizione della formazione delle ife in *C. albicans* in seguito a trattamento con le sostanze AF13 e AF23 comparato al fluconazolo è stato statisticamente significativo a tutte le concentrazioni testate ($P < 0.001$). I dati riportati sono la media geometrica ottenuta da tre esperimenti indipendenti.

4.6. Effetto degli azoli sulla polarizzazione della membrana durante il processo di germinazione

Come dimostrato dagli esperimenti precedenti, il trattamento con le sostanze in esame ha determinato un'inibizione della formazione del tubo germinativo di *Candida*, a differenza del fluconazolo che ne ha solo rallentato la formazione. A partire da tali risultati, ed in considerazione del fatto che in letteratura la formazione del tubo germinativo è associato ad un accumulo di steroli (zattera di ergosterolo) nel sito di inizio della germinazione e/o nella parte apicale del tubo germinativo stesso, sono stati effettuati esperimenti con un colorante specifico per gli steroli: il Filipin.

Ad un'osservazione al microscopio a fluorescenza (filtro DAPI), le zattere di steroli marcate con il Filipin hanno mostrato un'intensa fluorescenza.

Le cellule di *Candida* sono state trattate con le sostanze AF13, AF23 ed il farmaco di riferimento ad una concentrazione pari a 0.15µg/ml e successivamente sono state colorate con Filipin. I risultati ottenuti hanno confermato le differenze di inibizione del processo germinativo di *Candida albicans*. Infatti in seguito al trattamento con il fluconazolo è stato possibile osservare un'intensa fluorescenza in prossimità del punto di germinazione e nella regione apicale del tubo germinativo, indice del fatto che questo farmaco non è stato in grado di prevenire la formazione dei domini ricchi in steroli (SRD), al contrario in presenza degli azoli in studio la fluorescenza è stata soltanto lieve e diffusa, in quanto essi sono stati in grado di inibire la formazione del SRD e, quindi, alterare sia la composizione degli steroli sia la loro distribuzione nella membrana, (Fig.7).

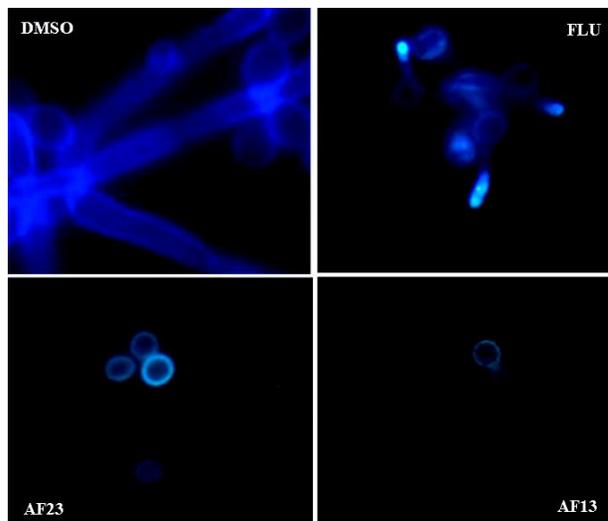


Figura 7- Localizzazione degli sterol mediante l'utilizzo del marker Filipin. *Candida* trattata con gli azoli in esame ad una concentrazione di 0.15µg/mL mostra un profilo di fluorescenza molto diverso da quello riscontrato in seguito a trattamento con il fluconazolo.

4.7. Effetto degli azoli sulla composizione lipidica della membrana

Allo scopo di determinare l'effetto degli azoli in studio sulla composizione lipidica della membrane di *Candida*, le cellule sono state cresciute in presenza di AF13, AF23 e del fluconazolo ad una concentrazione pari a 0.05µg/ml. Inoltre, come controllo, l'esperimento è stato condotto in assenza di trattamento (solo veicolo). In queste condizioni sperimentali sono stati analizzati i livelli di steroli liberi (FS) e di fosfolipidi (PL) nelle membrane microsomiali estratte dal controllo e dalle cellule trattate.

In presenza degli azoli si è osservata una forte riduzione del contenuto di ergosterolo nelle membrane di *C.albicans* (Tab.3), in particolare l'ergosterolo ha rappresentato circa il 13% dei lipidi totali nelle membrane delle cellule controllo, mentre la sua concentrazione è diminuita drasticamente fino a raggiungere livelli pari a circa l'1% dopo trattamento con le molecole in esame e circa lo 0.3% dopo trattamento con il fluconazolo.

Allo stesso tempo, si è osservato un incremento della concentrazione di lanosterolo in seguito a trattamento con tutte e tre le molecole, in quanto è stata proprio l'inibizione del CYP51 a determinare un accumulo di questo particolare sterolo a livello della membrana del fungo. Il maggiore livello di accumulo è stato riscontrato in presenza del farmaco di riferimento, (Tab.3). Nel complesso, i cambiamenti nella composizione lipidica indotti dal trattamento con AF13 e AF23 hanno determinato una riduzione notevole del rapporto FS/PL, il quale invece è rimasto pressoché inalterato dopo il trattamento delle cellule fungine con il fluconazolo, (Tab.3).

Parametri	Controllo	AF13	AF23	FLU
FS/PL	1.21	0.81	0.57	1.31
Ergosterol	13.1 ± 0.9	1.3 ± 0.02	0.9 ± 0.03	0.3 ± 0.04
Lanosterol	tracce	2.6 ± 0.28	3.1 ± 0.21	3.9 ± 0.39

Tabella 3- Rapporto tra sterol liberi e fosfolipidi, in termini di molarità, e quantità di ergosterolo a livello delle membrane microsomiali di *C.albicans* in assenza e in presenza del trattamento con AF13, AF23 ed il farmaco di riferimento. I risultati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti, ciascuno analizzato due volte \pm SD ($n = 3$). FS, sterol liberi; PL, fosfolipidi.

Inoltre, tutti i composti hanno causato un riarrangiamento generale della composizione dei fosfolipidi delle membrane di *C.albicans*, (Tab.4). Infatti, tutti e tre hanno provocato una diminuzione nei livelli dei due principali fosfolipi zwitterionici, cioè fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE), e un incremento di quelli a carica negative, cioè acido fosfatidico (PA), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositolo (PI) e fosfatidilglicerolo (PG), con la sola eccezione dei livelli di PG per le cellule trattate con il fluconazolo che sono rimasti invariati rispetto al controllo.

In particolare, si sono osservati incrementi di entità paragonabile per quanto riguarda i livelli di PA e PS dopo i differenti trattamenti, e un aumento molto più elevato nel contenuto di PI quando le cellule sono state trattate con AF23.

Nel loro insieme, i cambiamenti nella composizione lipidica della membrana hanno determinato un abbassamento del rapporto PC/PE, riduzione che è stata molto più evidente in seguito al trattamento con gli azoli in studio.

Phospholipid	Control	AF13	AF23	FLU
PC	52.5± 0.8	35.5± 2.1	32.5± 2.5	39.1± 1.4
PE	30.8± 0.9	27.3± 3.1	23.8± 0.9	26.0± 2.3
PS	6.2± 0.7	10.6± 0.7	11.7± 0.3	12.8± 0.9
PI	3.8± 0.2	9.2± 0.9	14.8± 1.7	11.1± 1.0
PG	3.3± 0.9	7.9± 0.4	8.2± 0.6	3.1± 0.7
PA	3.4± 0.9	9.4± 1.2	9.1± 0.9	8.0± 1.8
PC/PE	1.70	1.30	1.37	1.50

Tabella 4- Composizione fosfolipidica (mol%) e rapporto PC/PE in termini di molarità delle membrane microsomiali di *C. albicans* in assenza e in presenza di trattamento con gli azoli AF13, AF23 ed il farmaco di riferimento.

4.8. Infezione *in vitro*

Il dimorfismo, quindi la possibilità delle cellule di lievito di formare ife, è considerato uno dei principali fattori di virulenza di *C. albicans*. Considerando la capacità degli azoli in esame di inibire completamente il processo di germinazione, è stato deciso di pianificare degli esperimenti di infezione *in vitro* di macrofagi murini per valutare la capacità del fungo di crescere all'interno della cellula ospite in presenza di tali sostanze. Inoltre, nello stesso esperimento, si è potuto determinare la loro eventuale tossicità nei confronti delle cellule di mammifero, esponendo i macrofagi stessi a diverse concentrazioni di AF13 e AF23. Lo stesso esperimento di infezione è stato eseguito anche in presenza del solo veicolo e del farmaco di riferimento.

Per determinare se l'effetto sulla morfologia delle cellule di lievito, indotta dai differenti azoli, fosse in grado di influenzare il processo di infezione dei macrofagi, co-colture sono state fissate a

tempi diversi ed è stata effettuata la colorazione di Hotchkiss-MacManus.

Come è stato possibile notare dalle immagini riportate in figura 8, nel controllo in cui è presente solo il DMSO, *C. albicans* ha dato origine alla formazione di una fitta rete di ife che, con la loro azione meccanica, sono penetrate nella cellula macrofagica lisandola (Fig.8B).

L'attività delle azoli, così come è stato dimostrato negli esperimenti precedenti, ha determinato un'inibizione totale della germinazione, pertanto il fungo, sottoforma di lievito, è stato facilmente fagocitato da parte dei macrofagi, che sono stati in grado di svolgere la loro attività mediante la formazione del fagolisosoma e digestione del microrganismo (Fig.8D). In seguito a trattamento con il fluconazolo, invece, l'inibizione della germinazione è stata solo parziale e, quindi, il fungo è stato ancora in grado di formare i tubi germinativi che rappresentano un ostacolo al processo di fagocitosi (Fig.8C).

I risultati hanno, inoltre, evidenziato una tossicità selettiva nei confronti delle cellule di *Candida* rispetto ai macrofagi, per i quali anche concentrazioni corrispondenti alla MIC₀ sono risultate essere non tossiche (Fig.8A).

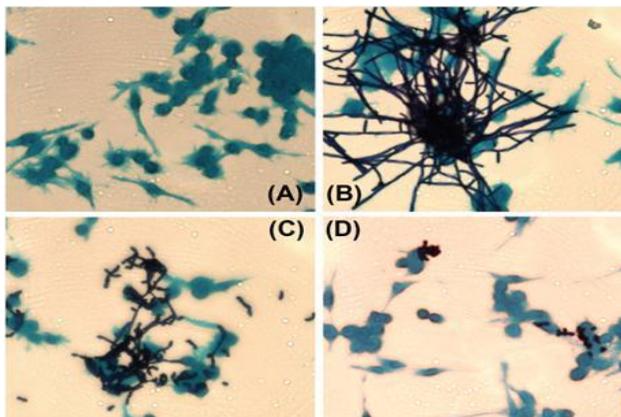


Figura 8- Fagocitosi di *Candida* dopo trattamento con gli azoli in esame. A) Macrofagi trattati con AF13 alla concentrazione di MIC₀; B) Iife di *Candida* wild-type penetrano nei macrofagi distruggendoli; C) *Candida* trattata con il fluconazolo ostacola la fagocitosi; D) Lieviti di *Candida* trattata con AF13 vengono facilmente fagocitati dai macrofagi.

4.9. Curva di Killing

Le molecole in studio sono state in grado di provocare alterazione morfologiche tali da far pensare non solo ad una perturbazione a livello della membrana, ma anche ad un danno a carico della parete del fungo. A partire da questa analisi del fenotipo, è stato deciso di proseguire lo studio investigando la loro potenziale attività fungicida. L'effetto dei nuovi azoli su *Candida albicans* è stato confrontato sia con quello ottenuto in presenza di fluconazolo che di miconazolo. Come è noto, infatti, quest'ultimo presenta attività di tipo fungicida, ma viene utilizzato solo nei casi più gravi di infezione in soggetti immunocompromessi, poiché risulta essere altamente tossico.

Dal grafico riportato in figura 9, si è potuto constatare come il fluconazolo abbia confermato la sua attività fungistatica, infatti è stata rilevata un'inibizione della crescita fungina nelle prime 4 ore di incubazione seguita poi da una rapida ripresa della crescita cellulare. Di contro, AF13 ha mostrato un andamento paragonabile al miconazolo, infatti già dopo 2 ore di trattamento ha indotto una diminuzione del numero delle CFU, che è divenuta drastica (> di 3 log) ed irreversibile dopo 24 ore di incubazione. Ciò ha permesso di affermare che questo nuovo azolo esercita un'attività di tipo fungicida su *Candida albicans*.

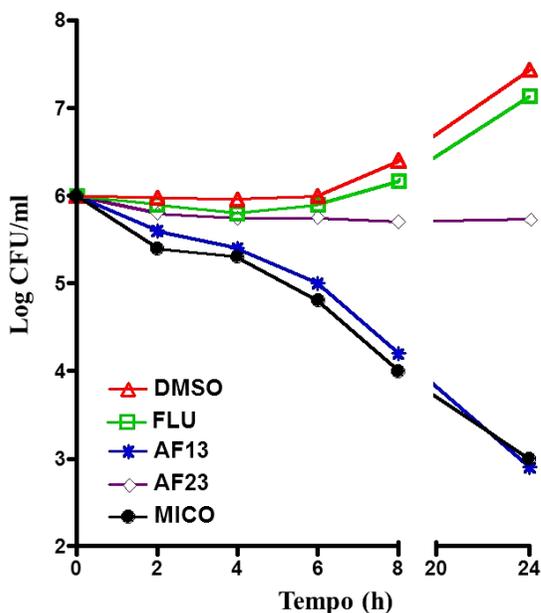


Figura 9- Curva di Killing. Comparazione dell'attività fungicida o fungistatica su *C. albicans* di AF13, AF23, fluconazolo e miconazolo (10 µg/ml). I dati riportati sono la media geometrica di tre esperimenti indipendenti.

4.10. Affinità dei composti azolici per ERG11p di *Candida albicans*

A questo punto, poichè gli azoli in esame sono stati in grado di esercitare un forte effetto di inibizione sia sul processo di gemmazione che su quello di germinazione di *Candida albicans* e provocare un'alterazione morfologica di gran lunga superiore rispetto a quella che si è ottenuta in seguito al trattamento con il fluconazolo, è stato deciso di valutare quale fosse l'interazione di tali molecole con la ERG11p. Da questi esperimenti è stato possibile notare che AF13, AF23 e il fluconazolo si sono legati all'enzima con un'affinità paragonabile, producendo spettri

caratteristici dei farmaci a struttura azolica. In particolare, dall'immagine riportata in figura 8, è stato possibile notare la presenza di un picco a 432 nm e uno a 412 nm per AF13 e AF23, mentre per il fluconazolo un picco a 430 nm e uno a 412 nm, indicativo del legame tra l'N-4 dell'anello triazolico e lo ione ferrico del gruppo eme della ERG11p, (Fig.10A.).

La curva di "binding saturation", (Fig.10B) ha evidenziato che sia le molecole in esame che il fluconazolo si sono legati all'enzima con elevata affinità. Attraverso l'equazione di Morrison è stato calcolato in maniera accurata il valore della Kd per tutti e tre gli azoli (56 (\pm 4) nM per AF13, 36 (\pm 12) nM per AF23 e 27 (\pm 6) nM per il fluconazolo). Questo ha suggerito che tutti e tre le molecole sono in grado di legare senza alcun ostacolo lo ione ferrico del gruppo prostetico mediante l'N dell'anello azolico.

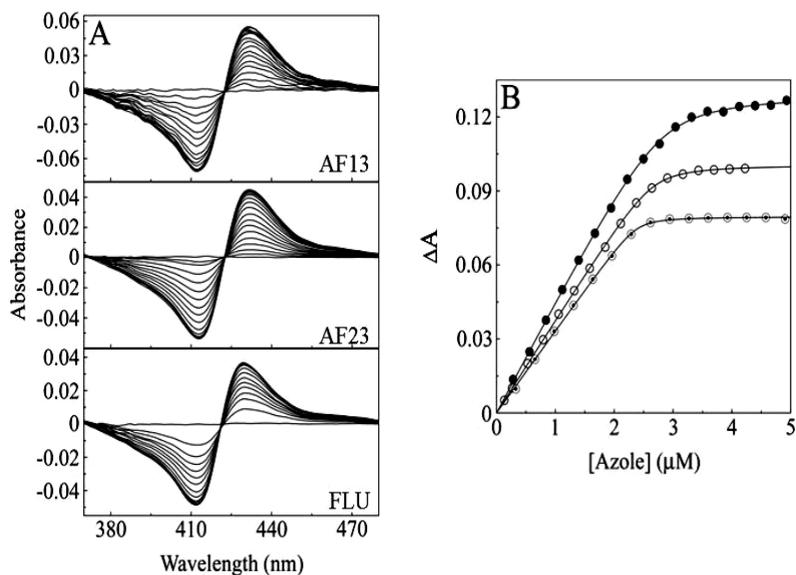


Figura 10- Affinità di legame di AF13 e AF23 al CYP51 di *C. albicans*.

A) Differenti spettri prodotti quando AF13, AF23 e il fluconazolo sono in presenza dell'enzima ad una concentrazione di 3 μM . B) Curva di saturazione degli azoli: cerchio pieno per AF13, cerchio vuoto per AF23 e doppio cerchio per il fluconazolo.

E' riportata una determinazione rappresentativa, derivante da tre esperimenti indipendenti, per ciascun composto.

4.11. Interazione degli azoli in esame con il fluconazolo

Dai risultati ottenuti dagli esperimenti precedenti è stato possibile constatare che entrambi gli azoli in esame inibiscono totalmente la formazione del tubo germinativo, impedendo la formazione delle “zattere di ergosterolo”; ciò ha provocato evidenti alterazioni morfologiche a carico del fungo. Inizialmente si era pensato che questo loro potente effetto fosse dovuto ad una maggiore interazione con la lanosterolo-14-alfa-demetilasi, ma dagli esperimenti di “*binding*” si è visto che la loro affinità all’enzima è paragonabile a quella del farmaco di elezione nella cura delle candidosi. Una possibile spiegazione è che danni di tale entità siano dovuti alla presenza di un meccanismo d’azione addizionale, differente da quello classico dei farmaci a struttura azolica, e quindi all’instaurarsi di una sinergia.

Al fine di confermare la presenza di tale meccanismo d’azione, è stato deciso di indagare l’effetto determinato dall’associazione tra gli azoli di nuova sintesi ed il fluconazolo, utilizzando l’indice di FICI, “*fractional inhibitory concentration index*”. Dall’analisi dei risultati ottenuti, (Tab.5) è stato messo in evidenza come la somministrazione in associazione, tra ciascuna delle molecole in studio con il farmaco di riferimento, abbia determinato un sinergismo di azione. In tabella 4 sono stati riportati i valori MIC₂ and MIC₀ per AF13 e AF23, i quali sono diminuiti significativamente quando i nuovi azoli sono utilizzati in combinazione con il fluconazolo.

Candida trattata con 0.01 µg/ml di AF13 in combinazione con 0.015µg/ml di fluconazolo (Fig.12) e *Candida* trattata con 0.015µg/ml di AF23 in combinazione con 0.02µg/ml di fluconazolo (Fig.11), hanno presentato la stessa morfologia e la stessa inibizione di crescita che si è ottenuta quando il trattamento è stato effettuato con i singoli azoli al valore della loro MIC₂. Ciò ha confermato che gli azoli in esame presentano un meccanismo d’azione aggiuntivo oltre a quello classico esercitato dai farmaci a struttura azolica.

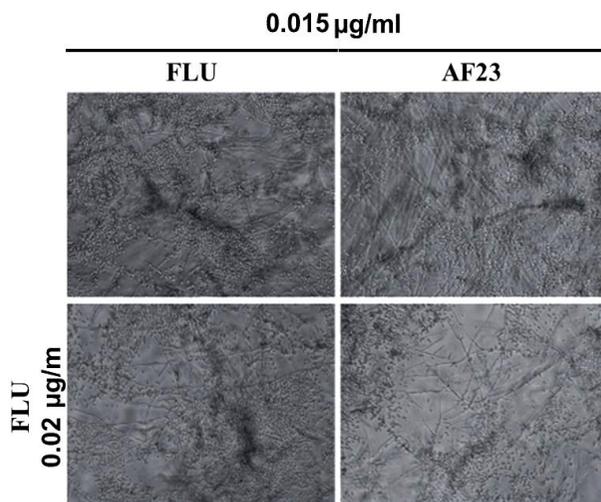


Figura 11- Immagini dell'effetto sinergico della molecole AF23 quando utilizzata in associazione al fluconazolo.

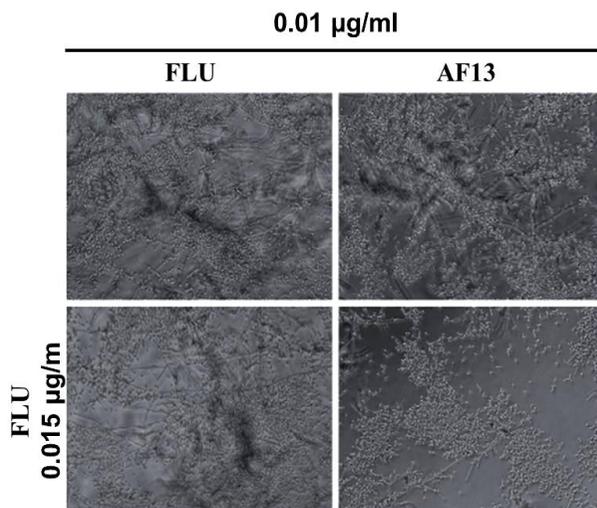


Figura 12- Immagini dell'effetto sinergico della molecole AF13 quando utilizzata in associazione al fluconazolo.

AZOLI	MIC ₂	MIC ₀	FICI			
FLU + AF13	0.015 + 0.01	0.03 + 0.02	0.47	SYN	0.38	SYN
FLU + AF23	0.02 + 0.015	0.03 + 0.02	0.4	SYN	0.23	SYN

Tabella 5- Valori dell'indice di FICI derivanti da tre esperimenti indipendenti ed espressi come media aritmetica. Il sinergismo (SYN) è definito da un $FICI \leq 0.5$; l'antagonismo è definito da un $FICI > 4.0$, e l'effetto indifferente è definito da un $0.5 < FICI < 4$.

4.12. Curva di *killing* ottenuta dall'associazione dei nuovi azoli con il fluconazolo

La sinergia di azione che si ottiene dal trattamento di *C.albicans* con i nuovi azoli in combinazione con il fluconazolo è stata confermata da esperimenti di *Time Killing*.

Dal grafico riportato in figura 13, è stato possibile notare come, mentre dopo 24 ore di trattamento con elevate concentrazioni di fluconazolo (10 µg/ml) non è stato ottenuto nessun effetto significativo sulla crescita del fungo e quindi sul numero di CFU recuperate, la combinazione di AF13 con il fluconazolo, rispettivamente, alle concentrazioni di 2 µg/ml e 3 µg/ml ha determinato una drastica e irreversibile diminuzione del numero delle CFU, indice dell'azione fungicida di tale combinazione. Questo stesso effetto è risultato essere comparabile a quello che si ottiene in presenza del solo azolo ad una concentrazione di 10 µg/ml. Ciò quindi ha dimostrato che utilizzando i due azoli in associazione è possibile ridurre notevolmente le concentrazioni di entrambi.

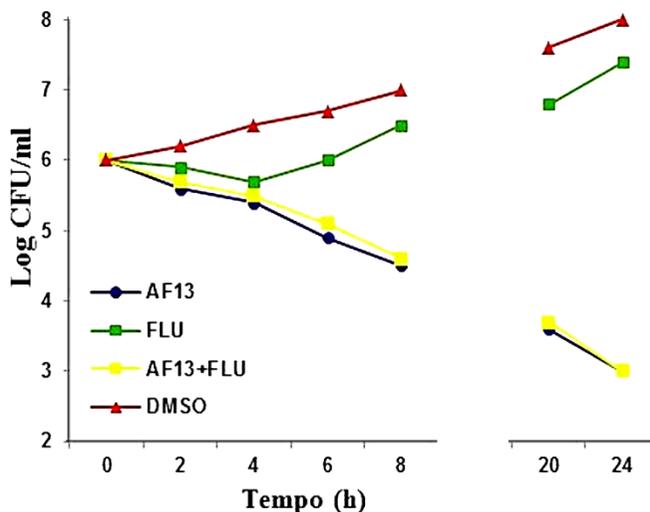


Figura 13- Effetto fungicida determinato dalla sinergia di azione che si crea in seguito al trattamento in combinazione di AF13 alla concentrazione di 2 µg/ml con il fluconazolo 3 µg/ml. I dati ottenuti sono la media geometrica di tre esperimenti indipendenti.

4.13. Attività antimicotica su ceppi di *Candida albicans* resistenti al fluconazolo

Visti gli incoraggianti risultati ottenuti, è stato deciso di proseguire lo studio valutando l'attività degli azoli di nuova sintesi su due ceppi di *C. albicans* resistenti al fluconazolo: il ceppo 64124, resistente per mutazioni di *ERG11*, il gene che codifica per la lanosterolo-14-alfa-demetilasi, e il ceppo MYA-574, resistente per l'*over-espressione* delle pompe di efflusso, che riducono la concentrazione di farmaco all'interno della cellula. I valori di MIC₂ e MIC₀ delle molecole AF13 e AF23 sono stati determinati con il metodo delle microdiluizioni, utilizzando sempre il fluconazolo ed il miconazolo come farmaci di riferimento. In particolare, dopo 24 ore di incubazione a 37°C, le OD_{600nm} ottenute dai pozzetti in cui *C. albicans* è stata trattata con le diverse sostanze in esame, sono state confrontate con le OD_{600nm} ottenute dal trattamento con il solo

veicolo, DMSO. Per il ceppo *wild-type*, di cui da esperimenti precedenti era già noto il valore della MIC₂ sia per i nuovi azoli che per il fluconazolo ed il miconazolo, sono stati calcolati i valori relativi alla MIC₀.

Mentre sia gli azoli in studio che i farmaci di riferimento hanno presentato una forte attività antifungina sul ceppo di *Candida wild-type*, solo AF13 e AF23 hanno manifestato attività su entrambi i ceppi fluconazolo-resistenti, a conferma quindi del fatto che essi possiedono un meccanismo d'azione addizionale, oltre a quello classico delle molecole a struttura azolica, che continua a funzionare anche in questi due ceppi. Di contro, come ci si aspettava, l'azione del miconazolo si è ridotta notevolmente ed il fluconazolo non ha determinato alcun effetto né sulla crescita né sul processo di germinazione di tali ceppi di *Candida*, (Tab.6 e 7).

SOSTANZE	SC5413	64124	MYA 574-GU5
AF13	0.035µg/ml	0.14µg/ml	0.07µg/ml
AF23	0.095µg/ml	0.24µg/ml	0.12µg/ml
FLU	0.080µg/ml	>16µg/ml	>16µg/ml
MICO	0.030µg/ml	5.50µg/ml	1.75µg/ml

Tabella 6– Valori di MIC₂ degli azoli in esame dopo 24 ore di incubazione a 37°C.

SOSTANZE	SC5413	64124	MYA 574-GU5
AF13	0.09µg/ml	2.4µg/ml	0.4µg/ml
AF23	0.19µg/ml	3.15µg/ml	0.6µg/ml
FLU	0.24µg/ml	>32µg/ml	>32µg/ml
MICO	0.15µg/ml	>16µg/ml	5µg/ml

Tabella 7– Valori di MIC₀ degli azoli in esame dopo 24 ore di incubazione a 37°C.

4.14. Effetto fungicida di AF13 su ceppi di *Candida albicans* resistenti al fluconazolo

Nell'ultimo esperimento è stato deciso di valutare se l'attività degli azoli in studio sui due ceppi di *C.albicans* resistenti al fluconazolo fosse di tipo fungistatico, o fungicida così come per il ceppo *wild-type*. Le curve di *killing* hanno mostrato l'effetto delle molecole AF13 e AF23 sui ceppi 64124 e MYA-574, confrontandolo con quello ottenuto in seguito a trattamento con i due farmaci di riferimento, (Fig.14 e 15).

In particolare, per quanto riguarda l'azione sul ceppo resistente per modifiche del gene *ERG11*, il fluconazolo non ha determinato alcun effetto sulla crescita del fungo, mentre le molecole AF13, AF23 e il miconazolo hanno provocato un rallentamento del processo di gemmazione durante le prime 6 ore di trattamento che si è tradotto in una riduzione del numero di CFU/ml recuperate di circa $1 \log_{10}$. Tuttavia solo AF13 ha continuato ad esercitare un'attività di tipo fungistatico che si è protratta fino a 24 ore con una riduzione di circa $0.5 \log_{10}$.

Per quanto riguarda il ceppo resistente perchè *over-esprime* le pompe di efflusso, invece, il fluconazolo ancora una volta non ha mostrato alcuna attività. E' stato interessante notare che, mentre nelle prime 6 ore di trattamento AF13 e AF23 hanno esplicato un'azione simile al miconazolo (forte inibizione della crescita di *Candida* con un decremento del numero di CFU/ml di circa $1.3 \log_{10}$ per i nuovi azoli e di circa $1.1 \log_{10}$ per il miconazolo), solo AF13 ha continuato a determinare una diminuzione del numero di CFU/ml di circa $1.3 \log_{10}$ dopo 24 ore, indice del fatto che questa molecola, a differenza del miconazolo, ha esercitato un'azione di tipo fungicida anche sul ceppo resistente.

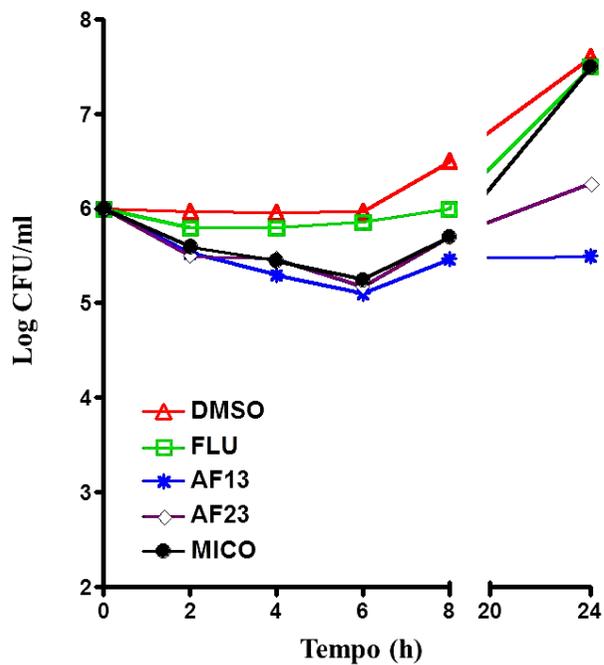


Figura 14– Curva di Killing. Comparazione dell'attività fungicida o fungistatica sul ceppo di *C. albicans* 64124 degli azoli.(10 µg/ml). I dati riportati sono la media geometrica di tre esperimenti indipendenti.

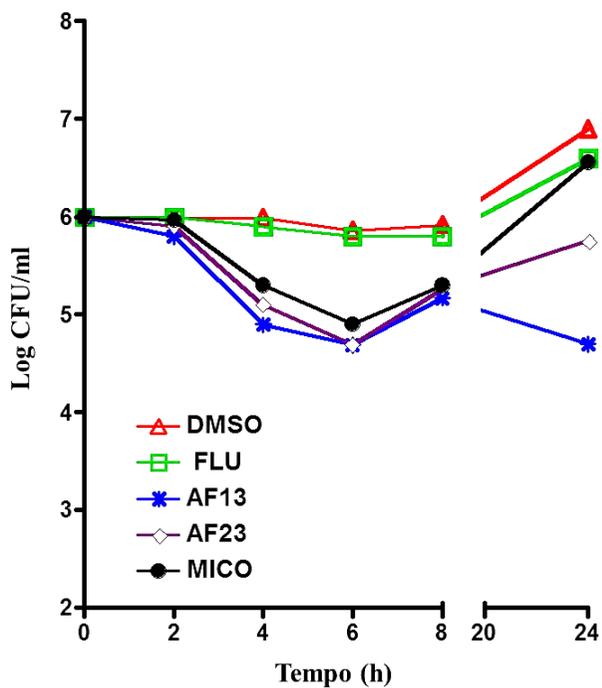


Figura 15– Curva di Killing. Comparazione dell'attività fungicida o fungistatica sul ceppo di *C. albicans* MYA-574 degli azoli (10 µg/ml). I dati riportati sono la media geometrica di tre esperimenti indipendenti.

CAPITOLO 5

Conclusioni

La crescente incidenza delle micosi sistemiche verificatasi negli ultimi trent'anni è il risultato dell'insieme di molti fattori primo fra tutti l'aumento dei pazienti severamente immunocompromessi. Tra questi vi sono i soggetti affetti da AIDS, i pazienti con neutropenia conseguente alla chemioterapia antineoplastica, i trapiantati di midollo osseo o di organo solido e quelli sottoposti a terapia immunosoppressiva. I fattori che hanno contribuito a questo incremento sono da individuare nell'impiego di agenti immunomodulatori per la prevenzione del rigetto nei trapianti di organo e di midollo osseo, nell'uso di farmaci antineoplastici, nelle terapie a lungo termine a base di corticosteroidi e nell'uso indiscriminato di antibiotici che, riducendo la carica batterica, possono creare condizioni di sviluppo ottimali per i funghi. Inoltre anche alcune procedure mediche invasive, come il ricorso a cateteri vascolari, alla dialisi peritoneale, all'emodialisi ed alla nutrizione parenterale hanno concorso all'aumento di infezioni fungine, (Bassetti *et al.*, 2009 e Pfaller *et al.*, 2007) .

Predire l'esito clinico di una micosi sistemica è quasi sempre molto difficile, inoltre vi sono tanti fattori che possono contribuire al fallimento terapeutico. Alcuni di questi sono legati all'ospite: lo stato immunitario, il sito e la severità dell'infezione, la scarsa *compliance* alla terapia. Altri, invece, sono attribuibili alle caratteristiche del farmaco stesso come il dosaggio, la farmacocinetica, le eventuali interazioni con altri farmaci, la tossicità, nonché il prezzo e la disponibilità sul mercato. Questo aumento nel numero di infezioni sorrette da funghi ha determinato un netto incremento nell'uso di farmaci antimicotici non solo a scopo terapeutico, ma anche a scopo profilattico per tutti quei soggetti ad alto rischio di infezione. Non bisogna dimenticare, inoltre, che i farmaci impiegati nella terapia farmacologica hanno solo un'attività di tipo fungistatica e risultano essere altamente tossici quando utilizzati per lunghi periodi di tempo. Questo massivo e prolungato utilizzo di agenti antifungini ha determinato un netto aumento del manifestarsi di

resistenza negli isolati clinici. La resistenza, infatti, ha assunto nel corso degli anni, sempre maggiori implicazioni riguardo la morbilità, la mortalità e l'alto costo della degenza ospedaliera.

È un dato di fatto che numerosi tentativi sono stati fatti per cercare di risolvere il problema dell'appropriata scelta della terapia antifungina, giustificando una forte ripresa della ricerca scientifica rivolta alla scoperta di nuovi agenti antifungini più efficaci, in grado cioè di interferire selettivamente con strutture e/o meccanismi regolativi e di adattamento del fungo.

La specie più frequentemente responsabile delle infezioni fungine è *Candida albicans*, trovata nei siti di infezione circa nel 60% dei casi. Le candidemie presentano un tasso di infezione di 8-10 persone su 100000 all'anno e sono associate ad una mortalità del 30-50%.

In questo progetto di tesi, seguendo le linee guida del "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI), è stata valutata l'attività antimicotica "in vitro" di una libreria di nuovi composti a struttura azolica utilizzando, come riferimento, due differenti farmaci: il miconazolo, in quanto dal punto di vista chimico è un imidazolo così come lo sono le molecole in studio ed il fluconazolo, in quanto rappresenta il farmaco di elezione nella cura delle candidosi. Tra tutti gli azoli in esame, le sostanze AF13, un 1-(1-(bifenil-4-yl)-3-(4-fluorofenil)propan-2-yl)-1H-imidazolo e AF23, un 1-(1-(bifenil-4-yl)-3-(5-clorotiofen-2-yl)propan-2-yl)-1H-imidazolo, sono risultate essere particolarmente attive. Questi azoli, infatti, determinano sia un'inibizione del processo di gemmazione e, quindi, della crescita fungina sia di quello di germinazione, a concentrazioni paragonabili o addirittura inferiori rispetto a quelle riscontrate dopo trattamento con i due farmaci di riferimento (MIC₂: 0.035µg/ml per AF13, 0.095µg/ml per AF23, 0.030µg/ml per il miconazolo e 0.080µg/ml per il fluconazolo e MIC₀: 0.09µg/ml per AF13, 0.19µg/ml per AF23, 0.15µg/ml per il miconazolo e 0.24µg/ml per il fluconazolo). La forte attività antimicotica di questi azoli si è manifestata con la comparsa di un fenotipo particolarmente alterato, infatti in seguito al trattamento con tali molecole le cellule di *C.albicans*, non solo non sono riuscite a germinare, ma non hanno portato a termine il processo di gemmazione, poiché non si è avuta la formazione del setto di divisione e le gemme non sono riuscite a staccarsi dalla cellula madre.

Come è noto, la transizione da lievito ad ifa rappresenta uno dei principali fattori di virulenza di *C.albicans*, in quanto non solo promuove l'invasione della cellula ospite e l'innescarsi dell'infezione, ma impedisce il processo di fagocitosi da parte di macrofagi e neutrofili. Si è deciso, quindi, di approfondire l'effetto di AF13 e AF23 sul processo di germinazione. Mentre le cellule di lievito non trattate sono state in grado di formare vere e proprie ife, il trattamento con gli azoli in studio ha determinato una forte inibizione dell'allungamento dei tubi germinativi, che è risultata essere dipendente dalla concentrazione utilizzata. Tuttavia, non è stata individuata una correlazione diretta tra i valori di MIC e la capacità di tali molecole di prevenire la formazione di ife, in quanto nonostante AF23 ed il fluconazolo presentino valori di MIC₂ identici, l'effetto del farmaco di riferimento è stato nettamente inferiore rispetto all'azolo in esame.

A questo punto, si è deciso di valutare se il diverso effetto sulla morfologia di *Candida* fosse correlato ad una differente polarizzazione della membrana durante il processo di germinazione. La colorazione con il Filipin, un marker selettivo per gli steroli, ha messo in evidenza una diversa concentrazione e distribuzione dei domini ricchi in steroli (SRD) nella membrana. In particolare, in seguito al trattamento con il fluconazolo è stato possibile osservare un'intensa fluorescenza in prossimità del punto di germinazione e nella regione apicale del tubo germinativo, indice del fatto che questo farmaco non previene la formazione degli SRD, al contrario in presenza di AF13 e AF23 la fluorescenza è stata soltanto lieve e diffusa, in quanto essi sono in grado di inibire la formazione degli SRD e, quindi, sia la composizione degli steroli sia la loro distribuzione nella membrana viene ad essere alterata.

Per determinare quale fosse l'effetto degli azoli sulla composizione lipidica della membrana, è stato analizzato il contenuto di steroli, in particolare quello di ergosterolo, il principale sterolo presente a livello delle membrane fungine, e di lanosterolo, sterolo intermedio nella sintesi dell'ergosterolo, in membrane isolate. Sebbene le cellule di *Candida* trattate sia con gli azoli in studio che con il fluconazolo hanno presentato tutte una diminuzione della concentrazione di ergosterolo ed un aumento della concentrazione di lanosterolo, i rapporti tra steroli liberi e fosfolipidi e la loro distribuzione all'interno delle membrane sono risultati essere notevolmente differenti a seconda della sostanza

utilizzata. Infatti, è stato dimostrato che in presenza del farmaco di controllo la polarizzazione degli steroli in prossimità della parte apicale dell'ifa è tale da non inibire la formazione degli SRD. Al contrario, l'aggiunta dei nuovi azoli, specialmente AF13, interrompe questo effetto di polarizzazione. In particolare il rapporto tra steroli liberi e fosfolipidi è rimasto quasi inalterato dopo il trattamento con il fluconazolo, mentre è notevolmente diminuito dopo il trattamento con AF13 e AF23. Questi dati hanno suggerito che sia i composti in esame che il farmaco di riferimento influenzano la biosintesi degli steroli e la loro distribuzione differenziale nella membrana di *C.albicans*.

Al fine di determinare se tali differenze fossero anche accompagnate da un'alterazione nella composizione lipidica e, quindi, da una perdita dell'integrità delle membrane, è stata effettuata un'analisi quantitativa dei fosfolipidi nelle membrane isolate. La percentuale dei diversi fosfolipidi è risultata essere nettamente cambiata in seguito al trattamento; tutti i campioni hanno mostrato una forte diminuzione dei fosfolipidi zwitterionici, di fosfatidilcolina (PC) e di fosfatidiletanolamina (PE), e un concomitante aumento di quelli carichi negativamente. In particolare, una maggiore diminuzione nel rapporto PC/PE è stato osservato per i campioni trattati con AF13 e AF23. Inoltre, sempre per questi campioni, è stata osservato un aumento significativo nel contenuto di fosfatidilglicerolo (PG).

La fluidità di membrana, la sua asimmetria, la sua permeabilità, nonché le funzioni di proteine di membrana, sono regolate dalla composizione dei fosfolipidi, in particolare da un corretto equilibrio tra lipidi formanti (PC) e non (PE) il *bilayer*, tra lipidi di natura anionica e quelli zwitterionici e dal rapporto tra steroli e fosfolipidi, in quanto steroli differenti influenzando in maniera specifica l'inserzione dei fosfolipidi nel *bilayer*. Lo stato e la distribuzione dei lipidi di membrana, regolando l'accumulo intracellulare di farmaci azolici (influenzano sia il processo di diffusione passiva sia la funzionalità delle pompe di efflusso), sono stati correlati al manifestarsi di fenomeni di resistenza di *C.albicans* nei confronti degli azoli correntemente in uso; anche se una correlazione diretta tra una tipica composizione lipidica e l'insorgenza di resistenza non può essere stabilita. Inoltre, modifiche degli steroli possono anche influenzare le proprietà meccaniche della membrana e, quindi, la vitalità, del fungo. La notevole riduzione dei rapporti FS/PL e PC/PE

ed il forte aumento della percentuale di lipidi carichi, in modo particolare del fosfatidilglicerolo PG, osservati nelle membrane delle cellule trattate con gli azoli in esame rispetto a quelle trattate con il fluconazolo, potrebbe essere la causa di un'alterazione a livello del doppio strato lipidico e, quindi, di un cattivo funzionamento della membrana.

La citotossicità delle molecole in esame è stata analizzata mediante esperimenti di infezione "*in vitro*" di macrofagi murini. Questi esperimenti hanno dimostrato che, sia AF13 che AF23, hanno un'attività antifungina selettiva, infatti non hanno determinato alcun effetto sulla vitalità dei macrofagi anche ad alte concentrazioni (MIC_0), sebbene le cellule di lievito siano facilmente fagocitate e uccise dopo trattamento con una concentrazione corrispondente a MIC_2 .

Mediante esperimenti di "*Time Killing*", è stata confermata l'attività fungicida di AF13, ipotizzata nell'analisi morfologica. In particolare, questa molecola è stata in grado di esercitare un potente (solo il 15% delle CFU è recuperato dopo 24 ore di trattamento) e veloce (riduzione del 50% nel numero di CFU recuperate dopo 2 ore di trattamento) effetto fungicida. Questo risultato è di fondamentale importanza, poiché significa poter disporre di molecole in grado di rendere la terapia delle micosi molto più breve ed efficace con conseguente riduzione sia degli effetti collaterali che del manifestarsi di fenomeni di resistenza.

A questo punto, si è deciso di indagare il meccanismo d'azione degli azoli in studio, per capire se la loro potente attività sul fungo *C. albicans* fosse dovuta ad una maggiore interazione con la ERG11p, enzima responsabile della rimozione del gruppo metile in posizione 14 del lanosterolo. Tale demetilazione è un passaggio essenziale nella sintesi di ergosterolo. Sono stati condotti esperimenti di *Binding* alla ERG11p, attraverso i quali è stato dimostrato che sia AF13 che AF23 hanno un'affinità di legame all'enzima paragonabile al fluconazolo. Quindi le differenze osservate nell'attività degli azoli in esame rispetto al farmaco di riferimento non sono dovute a differenze intrinseche di affinità di legame, infatti tutte e tre le molecole hanno presentato valori di $K_d \leq 0.05$ pM. Questo suggerisce che la maggiore efficacia di AF13 e AF23 è dovuta probabilmente al fatto che tali molecole possiedono un meccanismo d'azione addizionale.

Poiché la terapia in combinazione è uno degli approcci che possono essere utilizzati per migliorare l'efficacia del trattamento antifungino, si è deciso di studiare gli effetti determinati dal trattamento in associazione dei nuovi azoli con il fluconazolo mediante il metodo delle microdiluizioni e curve di "killing". I dati ottenuti hanno dimostrato la presenza di una sinergia d'azione derivante dal trattamento in combinazione. L'esposizione di *C. albicans* alla contemporanea presenza di AF13 e fluconazolo ha determinato il manifestarsi di una potente sinergia fungicida. Tale sinergia è di fondamentale importanza perché potrebbe contribuire alla riduzione delle dosi di farmaco da somministrare, con notevole riduzione degli effetti collaterali e miglioramento qualità della vita del paziente.

Infine, si è valutata l'attività antimicotica degli azoli in studio su due ceppi di *Candida* resistenti al fluconazolo: il ceppo 64124, resistente per mutazioni all'*ERG11*, il gene che codifica per la lanosterolo-14-alfa-demetilasi, e il ceppo MYA-574, resistente per l'*over*-espressione delle pompe di efflusso, che riducono la concentrazione di farmaco all'interno della cellula. Mentre sia gli azoli in studio che i farmaci di riferimento hanno presentato una forte attività antifungina sul ceppo di *Candida wild-type*, solo AF13 e AF23 hanno manifestato attività su entrambi i ceppi fluconazolo-resistenti, a conferma quindi del fatto che essi possiedono un meccanismo d'azione addizionale, oltre a quello classico delle molecole a struttura azolica, che continua a funzionare anche su questi due ceppi. Al contrario l'azione del miconazolo si è ridotta notevolmente ed il fluconazolo non ha determinato alcun effetto né sulla crescita né sulla germinazione del fungo. In particolare, le molecole AF13 e AF23 hanno provocato un rallentamento del tempo di duplicazione durante le prime 6 ore di trattamento sul ceppo resistente 64124, anche se solo AF13 ha continuato ad esercitare un'attività di tipo fungistatico che si è protratta fino a 24 ore. Mentre, per quanto riguarda il ceppo MYA-574, le molecole in studio hanno provocato una forte inibizione della crescita di *Candida* durante le prime 6 ore e, sorprendentemente, AF13 ha continuato a mostrare un effetto fungicida anche dopo 24 ore dall'inizio trattamento.

Tale azione fungicida e/o fungistatica è di fondamentale importanza poiché significa poter disporre di molecole per il trattamento di Candidosi resistenti agli attuali farmaci in uso.

In conclusione, in questo lavoro di tesi, è stato dimostrato che, nonostante le somiglianze tra gli azoli di nuova sintesi ed i farmaci di riferimento, vi sono notevoli differenze nel loro meccanismo d'azione. Il nostro studio ha rivelato che l'attività del fluconazolo, che ha come *target* l'inibizione della biosintesi dell'ergosterolo, può essere potenziata utilizzandolo in combinazione con AF13. Ciò mette a disposizione un importante approccio alternativo non solo per superare il fenomeno della resistenza ai farmaci, ma anche la possibilità di ovviare alla sua tossicità nei confronti delle cellule di mammifero che si manifesta soprattutto nei pazienti affetti da HIV, per i quali sono necessarie terapie con elevate dosi di farmaco.

Tuttavia, la possibilità di utilizzare AF13 solo o in combinazione con altri azoli antifungini "*in vivo*" richiedono ulteriori indagini, nonché l'identificazione del meccanismo alla base dell'azione di questi nuovi composti.

CAPITOLO 6

Materiali e metodi

6.1. Terreni di coltura

Terreni utilizzati per la crescita di *Candida albicans*:

YPD:

2% bactopectone (Difco Laboratories)

1% yeast extract (Difco Laboratories)

2% glucosio (SIGMA)

2% bactoagar (Difco Laboratories) è stato aggiunto per solidificare il terreno in piastre Petri.

RPMI-1640 MEDIUM with L-glutamine without glucose and NaHCO₃ (SIGMA):

0.165 M in tampone MOPS (morpholinepropanesulfonic acid) è stato portato a pH 7.0 o 4.0 con NaOH o HCl, è stato filtrato in condizioni sterili.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Lonza)

4.5 g/L D-glucosio

4 mM L-glutamina

Supplementato con:

10% fetal bovine serum (FBS)

50 U/ml penicillina

50 U/ml streptomicina solfato.

6.2. Linee cellulari e condizioni di crescita

6.2.2. *Candida albicans*

Oltre al ceppo di *Candida albicans* wild-type SC5314, sono stati utilizzati anche due ceppi resistenti al fluconazolo, in particolare il ceppo ATCC 64124 resistente per mutazione a carico dell' *ERG11* e il ceppo ATCC MYA 574-GU5 resistente, invece, per una *up*-regolazione dei trasportatori del farmaco. Tali ceppi sono stati

periodicamente cresciuti su piastre YPD ed incubati a 30°C/24 ore. Da colonie ben isolate, sono state preparate le sospensioni cellulari prelevando con un'ansa le colonie dalla piastra Petri e stemperandole in falcon contenenti 7ml di soluzione RPMI (pH 7.0). Gli inoculi sono stati posti *over-night* a 25°C.

6.2.3. Macrofagi

Sono state utilizzate le cellule J774A.1 (linea cellulare murina di Macrofagi). Le cellule sono state cresciute in 75 cm³ flesks utilizzando il mezzo DMEM deplementato ed incubate a 37°C, 5% CO₂.

6.3. Libreria degli azoli in esame

La libreria di nuovi composti a struttura azolica è stata sintetizzata nel laboratorio di chimica-farmaceutica della prof.ssa Castellano S. (Università degli Studi di Salerno). Queste molecole presentano la seguente formula generale:

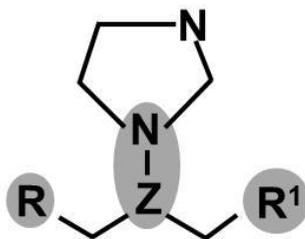
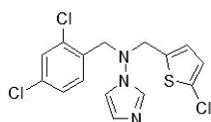


Figura 1 – Formula generale dei composti in esame.

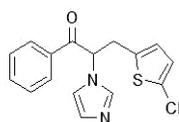
Gran parte di queste molecole sono state progettate e sintetizzate come antimicotici azolici; una prima analisi su alcuni Dermatofiti e su alcuni ceppi del Genere *Candida*, ne ha messo in evidenza l'effettivo potenziale antimicotico (Castellano *et al.*, 2003; Setzu *et al.*, 2002; Castellano *et al.*, 2000), incoraggiando ulteriori e più approfonditi studi in grado di fornire maggiori conoscenze sulle

capacità di tali sostanze di interferire selettivamente con i meccanismi regolativi e di adattamento del fungo.

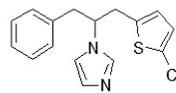
Altre molecole, invece, sono state progettate e sintetizzate come inibitori dell'aromatasi (CYP19), un enzima che catalizza la conversione degli androgeni come androstenedione e testosterone in steroidi estrogenici aromatici come estrone ed estradiolo (Castellano *et al.*, 2008). Riflettendo sia sulla presenza in alcune di queste molecole della funzione 2-clorotiofenica o 7-benzotiofenica che, in antifungini azolici, ne determinano un buon profilo di attività, sia sulla capacità di tali molecole di inibire l'enzima aromatasi, strutturalmente simile alla lanosterolo-14- α -demetilasi, in quanto entrambe isoforme del CYP450, è stato deciso di testare anche il loro potenziale antifungino. La struttura chimica delle molecole in esame è di seguito riportata:



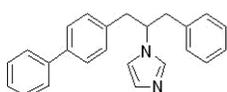
BR5

(COOH)₂

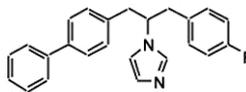
BR6

(COOH)₂

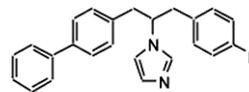
BR9

(COOH)₂

AF7



AF13



AF15

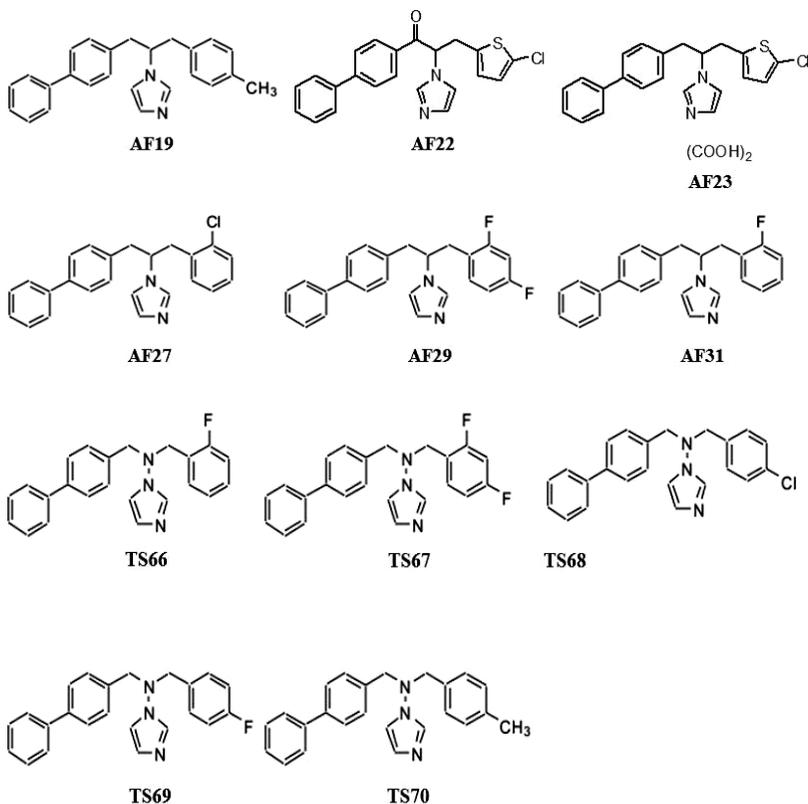


Figura 2 – Formula chimica degli azoli in esame.

6.4. Analisi dell'attività antimicotica

La minima concentrazione inibente (MIC) è definita come la concentrazione più bassa del composto in esame in grado di inibire la crescita di un dato organismo. Nel caso specifico, la determinazione dell'attività antimicotica delle sostanze testate è stata eseguita su ceppi di *Candida* cresciuta *over-night* in RPMI liquido (pH 7.0/25°C) sottoforma di lievito. In seguito a lettura spettrofotometrica a 600nm (Multiskan Spectrum, Thermo Electron

Corporation) delle colture *over-night*, utilizzando la tabella McFarland (Tab.1), è stato possibile effettuare le opportune diluizioni per poter ottenere 7.5×10^3 lieviti/ml per ciascuna coltura, come previsto dalla CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

McFarland Nephelometer Standards:					
McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulphuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1×10^8 CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance (600 nm)	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

Tabella 1- Tabella McFarland.

Gli esperimenti di inibizione di crescita sono stati effettuati utilizzando piastre *multiwells* da 96 pozzetti, a fondo piatto. In ciascun pozzetto sono state piastrate 7.5×10^2 cellule di lievito. Per testare l'azione sulla crescita di *Candida* le sostanze in esame (BR5, BR6, BR9, AF7, AF13, AF15, AF17, AF19, AF22, AF23, AF27, AF29, AF31, TS10, TS65, TS66, TS67, TS68, TS69, TS70, TS71, TS73) sono state sciolte in Dimetilsolfossido (DMSO). Oltre al bianco rappresentato dal solo terreno RPMI, sono stati utilizzati diversi controlli rappresentati dalle sole cellule di *C. albicans*, dalle cellule di *Candida* trattate con DMSO e dalle cellule di *Candida* trattate con fluconazolo. Ogni punto era presente sulla piastra in duplicato.

Per ciascuna sostanza è stato testato un ampio *range* di concentrazione da 0.01 a 20 µg/ml. Successivamente, le piastre sono state poste a 37°C senza CO₂/24 ore. Dopo l'incubazione, ciascuna piastra è stata letta allo spettrofotometro (Labsystems Multiskan EX 51118171, Thermo Scientific). I valori di OD₅₄₀ ottenuti sono stati utilizzati per determinare la presenza o assenza di crescita, rispetto alle cellule di lievito trattate con il solo DMSO.

Le MIC sono state identificate come le minime concentrazioni in grado di provocare un'inibizione della crescita del fungo pari o superiore al 50% (MIC₂) o totale assenza di crescita (MIC₀).

L'attività antimicotica delle sostanze in esame è stata valutata anche sui ceppi resistenti 64124 e MYA 574-GU5. L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

6.5. Test di diffusione su piastra

Una colonia di *C.albicans* è stata inoculata in 50ml di YPD e cresciuta *over-night* a 25°C. Approssimativamente 10^5 cellule/ml sono state inoculate in YPD e agar fuso a 42°C, il tutto versato in piastre Petri e lasciato solidificare a temperatura ambiente.

Sulle piastre ottenute sono state poi aggiunte le sostanze AF13 e AF23 ad una concentrazione pari a 10 volte la MIC₂.

Le piastre sono state poste a 30°C e osservate dopo 48 ore. L'inibizione della crescita di *C.albicans* è indicata dalla comparsa di un alone chiaro in corrispondenza del punto in cui sono state aggiunte le sostanze. Il diametro della zona di inibizione di ciascuna sostanza è stato confrontato con quello ottenuto utilizzando fluconazolo e DMSO.

6.6. Test di degradazione del biofilm

Al fine di determinare la capacità dei composti in esame di degradare il biofilm fungino, una colonia di *Candida albicans* è stata inoculata in 7ml di RPMI a pH 7.0 e cresciuta *over-night* a 25°C. In seguito a lettura spettrofotometrica a 600 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation), della coltura *over-night*, è stato possibile effettuare le opportune diluizioni (come previsto dai protocolli CLSI) per ottenere 7.5×10^3 lieviti/ml, utilizzando la tabella Mc Farland.

Su piastre YPD sono stati posizionati dei dischetti sterili di carta 3 da Filtro di tipo 1, sui quali sono stati successivamente aggiunti 100µl di cellule. Le piastre sono state poste a 35°C per permettere la formazione del biofilm.

Dopo 24 ore di incubazione, 150µl delle sostanze in esame AF13 e AF23, e del Fluconazolo sono stati aggiunti su garze sterili ad una concentrazione pari a 10 volte la MIC₂. Le garze sono poi state posizionate sui dischetti di carta e le piastre sono state re-incubate a 35°C/*over-night*. Successivamente, i dischetti di carta

sono stati trasferiti in eppendorf e vortexati per 3 volte per 3 minuti ciascuno. Un ml di Phosphate buffer saline (PBS) è stato aggiunto ad ogni eppendorf per lavare il dischetto. Sono state effettuate delle diluizioni seriali e circa 150 μ l sono stati piastrati su YPD agar. Le piastre sono state incubate a 35°C per 24 ore. Infine, è stata effettuata la conta delle CFU.

L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

6.7. Studio del fenotipo

Candida è stata cresciuta *over-night* in RPMI liquido (pH 7.0/25°C) sotto forma di lievito. In seguito a lettura spettrofotometrica a 600 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation) delle colture *over-night*, utilizzando la tabella McFarland, è stato possibile effettuare le opportune diluizioni per poter ottenere 7.5×10^3 lieviti/ml per ciascuna coltura, come previsto dalla CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando piastre multiwells da 96 pozzetti, a fondo piatto. In ciascun pozzetto sono state piastrate 7.5×10^2 cellule di lievito.

Le sostanze sono state testate ad una concentrazione equivalente alla MIC₂: 0.035 [g/ml per AF13, 0.095 [g/ml per AF23 e 0.080 [g/ml per il fluconazolo. Successivamente, le piastre sono state poste a 37°C senza CO₂. Dopo 48 ore di incubazione sono stati preparati i vetrini ed esaminati al microscopio (Axioplan 2 Imaging).

L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

6.8. Test dei tubi germinativi

La crescita e la morfologia di *Candida*, in seguito al trattamento con le molecole in esame, sono state valutate utilizzando RPMI a pH 7.0. La formazione dei tubi germinativi è stata indotta inoculando cellule di lievito in fase stazionaria in mezzo fresco preriscaldato ad una densità di 6×10^6 cellule/ml in 96 pozzetti della *multiwells*. Concentrazioni di azoli pari alla MIC₂ sono state aggiunte a ciascun pozzetto. Dopo incubazione a 37°C per 2 ore la *multiwells* è stata esaminata al microscopio (Evos) per monitorare la modificazione fenotipica e la formazione dei tubi germinativi. Il

test è stato effettuato utilizzando come riferimento il fluconazolo alle stesse concentrazioni.

L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

6.9. Colorazione con Filipin

Il Filipin, un marker selettivo degli steroli, è stato disciolto in DMSO.

Per visualizzare i domini ricchi di steroli, 10^4 cellule/ml sono state cresciute *over-night* in mezzo liquido RPMI (pH 7.0) a 35°C in presenza di 0.15µg/ml della sostanza in esame.

Il test è stato condotto in tubi di plastica da 1.5ml.

Dopo 8 ore le cellule sono state:

- ❖ raccolte;
- ❖ lavate con acqua 50 µl (3 volte);
- ❖ colorate con Filipin (15.3µM) al buio per 30 secondi;
- ❖ lavate con 50µl di RPMI (pH 7.0);
- ❖ disposte in quantità di 10µl sui vetrini per l'osservazione al microscopio (Axioplan 2 Imaging).

Per la visualizzazione al microscopio sono stati utilizzati obiettivi 100X e filtro DAPI.

L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

6.10. Estrazione dei microsomi dalla membrana plasmatica

Candida albicans è stata cresciuta in RPMI pH 7.0 a 25°C *overnight*. Il giorno seguente la coltura è stata diluita per ottenere 1.5×10^4 cell/ml in YPD e sono stati aggiunti gli azoli in esame, il Fluconazolo ed il solo veicolo ad una concentrazione pari a 0.05 µg/ml. Le colture sono state poi incubate a 28°C in agitazione (160 rpm) per 10-14 ore, così da raggiungere la fase esponenziale.

Gli sferoplasti sono stati preparati modificando in alcuni punti la procedura riportata da Li e Culter. Le cellule in fase esponenziale sono state lavate con una soluzione di Tris/HCl pH 7.0 50mM a cui sono stati aggiunti in precedenza saccarosio 0.25M ed EDTA

10mM. Successivamente le cellule sono state centrifugate a 1500g per 10 minuti e risospese nella stessa soluzione contenente Zymolase 20T a 80 unità per grammo di lieviti. Dopo incubazione a 36°C per 60 minuti in agitazione, sono state centrifugate a 1500g per 30 minuti. Le cellule sono state poi risospese in 50mM Tris/HCl pH 7.5 al fine di indurre shock osmotico. Infine per isolare la frazione microsomiale, le cellule sono state centrifugate più volte: 3000g per 10 minuti, 15000g per 20 minuti, 100000g per 45 minuti.

6.11. Estrazione e separazione dei lipidi

I lipidi sono stati estratti seguendo la procedura descritta da Quartacci et al. Alle cellule sono stati aggiunti isopropanolo al punto di ebollizione e una miscela di cloroformio:metanolo (2:1v/v) contenente butilidrotoluene (50g/ml) come antiossidante. In seguito è stato effettuato un lavaggio con 0.88% di KCl e i lipidi totali sono stati frazionati, mediante una colonna Sep-Pack, nelle seguenti classi: lipidi neutri, glicolipidi e fosfolipidi. In particolare l'eluizione è avvenuta utilizzando 20 ml di una miscela cloroformio: acido acetico (100:1 v/v) per i lipidi neutrali, 10 ml di acetone e 10 ml di una miscela acetone: acido acetico (100:1 v/v) per i glicolipidi e 7.7 ml di una miscela metanolo: cloroformio: acqua (100: 50: 40) per i fosfolipidi.

Successivamente è stato possibile ottenere i singoli lipidi mediante TLC (Silica Gel 60, 0.25 mm thickness; Merck, Germany). Dopo lo sviluppo, le bande sono state localizzate con l'uso di vapori di iodio e i singoli fosfolipidi identificati mediante cromatografia.

Infine è stata effettuata l'analisi quantitativa.

6.12. Analisi degli Steroli

Gli steroli sono stati separati e quantificati mediante GLC. Successivamente sono stati disciolti in etilacetato per l'analisi al Perkin-Elmer Sigma 2B gas cromatografo con detector a ionizzazione di fiamma. Inoltre per l'analisi è stata utilizzata una colonna capillare in silicio 30 m x 0.32 mm SPB-5 (Supelco).

L'identificazione dell'ergosterolo e del lanosterolo è stata effettuata sulla base dei differenti tempi di ritenzione.

6.13. Infezione dei macrofagi con *Candida albicans*

Candida è stata cresciuta *over-night* in RPMI liquido (pH 7.0) a 25°C per evitare la formazione di ife. Contemporaneamente, aliquote di macrofagi di 3×10^4 cell/ml sono stati cresciuti in DMEM e posti in 175 cm² Falcon tissue flasks e incubati *over-night* a 37°C, 5% CO₂. Dopo 3-4 giorni, i lieviti di *Candida* sono stati risospesi in DMEM e aggiunti sul monostrato di M ∇ in presenza degli azoli ad una concentrazione pari alla MIC₂₀. Per l'infezione è stato utilizzato un rapporto di circa 5:1 (cellule di lievito : M ϕ).

Le flasks sono state poi incubate a 37°C, 5% CO₂. Dopo 60 minuti le cellule di *Candida* non ingerite sono state rimosse mediante lavaggi successivi con PBS. L'infezione è stata seguita per 8 ore utilizzando il microscopio Time Lapse (Leica CTR 6500). Le immagini furono acquisite ogni 10 minuti per un periodo di 8 ore.

L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

6.14. Colorazione di Hotchkiss-MacManus

Per monitorare le modificazioni morfologiche di *Candida albicans* durante il processo di infezione e meglio comprendere l'evolversi della stessa, è stata effettuata la colorazione di Hotchkiss-MacManus.

I M ∇ (3×10^4 cellule/ml) sono stati cresciuti in DMEM nei pozzetti di Chamber Slide System (LAB-TEK Brand Products), a 37°C, 5% CO₂/24 ore.

Dopo aver lavato i macrofagi con RPMI fresco, si è proceduto all'infezione (rispettando il rapporto 5 *Candida*:1 M ∇), in presenza delle molecole in esame ad una concentrazione pari alla MIC₂ ed utilizzando come controlli Fluconazolo e DMSO.

L'infezione è stata fermata dopo 5 ore e si è proceduto alla colorazione nel seguente modo:

- ❖ lavaggio con PBS (Phosphate buffered saline);
- ❖ aggiunta di acido periodico (1% v/v) per 5 minuti;
- ❖ lavaggio con H₂O per 2 minuti;
- ❖ aggiunta di Reattivo di Shiff per 30 minuti (*Candida* si colora di fucsia);
- ❖ lavaggio con H₂O per 10 minuti;
- ❖ aggiunta Light green (1% v/v) per 15 secondi (i macrofagi si colorano di verde);
- ❖ lavaggio con etanolo 100% per 2 minuti.

La LAB-TEK è stata osservata al microscopio.

6.15. Analisi dell'attività fungicida: Time Killing assay

Al fine di valutare la potenziale attività fungicida dei nuovi composti azolici, *Candida albicans* è stata cresciuta *over-night* in RPMI (pH 7.0/25°C) sottoforma di lievito. In seguito a lettura spettrofotometrica a 600nm (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation), della coltura *over-night*, utilizzando la tabella di Mc Farland è stato possibile effettuare le opportune diluizioni (come previsto dai protocolli CLSI) per ottenere 10⁶ lieviti/ml. Il test è stato eseguito in tubi da 15ml ciascuno contenente un volume di 5 ml. Dopo l'aggiunta degli azoli in esame e del fluconazolo ad una concentrazione pari a 10µg/ml, i tubi sono stati posti in incubatore a 25°C senza agitazione.

Aliquote di 0.1ml sono state prelevate da ciascun tubo a tempi definiti (0, 2, 4, 6, 8 e 24 ore) ed il conteggio delle CFU (*colony forming unit*) è stato determinato mediante diluizioni seriali su piastre di agar YPD incubate a 30°C *over-night*.

L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

Lo stesso esperimento è stato effettuato anche per valutare la potenziale attività fungicida degli azoli in studio sui ceppi resistenti ATCC 64124 e ATCC MYA571-GU5.

6.16. Affinità degli azoli in esame per ERG11p

L'affinità dei nuovi agenti antifungini azolici alla ERG11p è stata valutata, utilizzando il metodo descritto da Lamb *et al.* Sono state preparate soluzioni degli azoli in studio e del fluconazolo in dimetilformamide (DMF) ad una concentrazione di 0,1 µg/µl. Queste soluzioni sono state utilizzate per la titolazione con una soluzione 3 µM di ERG11p, preparata in 0,1M di Tris-HCl (pH 8,1) e 25% (peso/volume) di glicerolo a 22°C. Gli Spettri differenziali tra 500 e 350 nm sono stati determinati in seguito ad aggiunte incrementali degli azoli in esame e del farmaco di riferimento. Ogni titolazione è stata effettuata in triplicato. Un riarrangiamento dell'equazione Morrison è stato utilizzato per adattare i dati e calcolare la costante di dissociazione (Kd). Un'elevata affinità di legame è caratterizzata da un valore della Kd simile o inferiore alla concentrazione di ERG11p presente. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il programma ProFit (versione 6.2, QuantumSoft, Zurigo, Svizzera).

6.17. Sinergismo

L'interazione tra le nuove molecole ed il fluconazolo è stata studiata utilizzando il metodo delle microdiluzioni in piastre multiwells da 96 pozzetti, seguendo le linee guida della CLSI M27-A3.

Alla sospensione di lieviti, contenente 10^3 cell/ml, sono stati addizionati da una parte AF13 alla concentrazione di 0.01µg/ml in combinazione con il fluconazolo alla concentrazione di 0.015µg/ml e dall'altra AF23 alla concentrazione di 0.015µg/ml in combinazione con il Fluconazolo alla concentrazione di 0.02µg/ml.

Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore. La densità ottica è stata misurata spettrofotometricamente a 540nm

(Labsystems Multiskan EX 51118171, Thermo Scientific). Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

Per stabilire l'effetto delle combinazioni dei farmaci, i dati ottenuti spettrofotometricamente sono stati inoltre analizzati usando l'indice FICI (fractional inhibitory concentration index) basato sulla teoria dell'additività di Loewe (Berenbaum, 1989).

L'indice **FICI** è definito nel seguente modo:

$$FICI = FIC(A) + FIC(B) = \frac{MIC(A) \text{ in combinazione}}{MIC(A) \text{ da solo}} + \frac{MIC(B) \text{ in combinazione}}{MIC(B) \text{ da solo}}$$

Dove:

MIC(A) e MIC(B) sono le MICs rispettivamente dei farmaci A e B. Sinergismo e antagonismo sono definiti rispettivamente da un FICI ≤ 0.5 e ≥ 4 .

Mentre un FICI ≥ 0.5 e ≤ 4 è considerato un dato irrilevante.

6.18. Time Killing e sinergismo

Per valutare se anche la combinazione della molecola AF13 con il farmaco di riferimento possa presentare effetti fungicidi, così come accade quando è utilizzata singolarmente, è stato effettuato un test di Time Killing utilizzando combinazioni di tale azolo in associazione con il fluconazolo.

Tali combinazioni sono state testate in mezzo liquido RPMI pH 7.0 a 25°C, utilizzando tubi da 15ml contenente 5ml ciascuno. *Candida albicans* è stata cresciuta *over-night* in RPMI (pH 7.0/25°C) sotto forma di lievito. In seguito a lettura spettrofotometrica a 600 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation) della coltura *over-night*, è stato possibile effettuare le opportune diluizioni (come previsto dai protocolli CLSI) per ottenere 10^6 lieviti/ml, utilizzando la tabella Mc Farland.

La sostanza AF13 alla concentrazione di 2µg/ml è stata testata in associazione al fluconazolo alla concentrazione di 3 µg/ml.

Il conteggio delle CFU è stato determinato mediante diluizioni seriali su piastre di agar YPD incubate a 30°C *over-night*.

L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

Bibliografia

Abe F, Usui K, Hiraki T **2009**. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *BIOCHEMISTRY* 48:8494.

Ahmad A, Khan A, Khan LA, Manzoor N **2010**. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY* 59:1178.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD **1994**. *BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA* terza edizione Zanichelli.

Aoyama Y, Yoshida Y, Sato R **1984**. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 alpha-demethylation. II. Lanosterol metabolism by purified P-450(14)DM and by intact microsomes. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 259:1661.

Bassetti M, Ansaldi F, Nicolini L, Malfatto E, Molinari MP, Mussap M, Rebesco B, Bobbio Pallavicini F, Icardi G, Viscoli C **2009**. *THE JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY* 64:625.

Backhed and Hornef **2003**. Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat *MICROBES INFECT* 11:951-9.

Berenbaum **1989**. What is synergy? *PHARMACOL REV.* 41:93-141.

Berman J. **2002**. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast *NAT REV GENET* 3:918-30.

Calderone RA **1993**. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *TRENDS IN MICROBIOLOGY* 1:55-8.

Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A **2005**. Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time-kill, and Etest methods. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 49:1593.

Castellano S, La Colla P, Musiu C, Stefancich G **2000**. Azole antifungal agents related to Naftifine and Butenafine. *ARCH. PHARM. MED. CHEM.*

Castellano S, Stefancich G, Chillotti A, Poni G **2003**. Synthesis and antimicrobial properties of 3-aryl-1-(1,1'-biphenyl-4-yl)-2-(1H-imidazol-1-yl)propanes as "carba-analogues" of the N-arylmethyl-N-[(1,1'-biphenil)-4-ylmethyl]-1H-imidazol-1-amines, a new class of antifungalagents *IL FARMACO*.

Castellano S, Stefancich G, Musiu C, La Colla P **2000**. A new class of antifungal agents. Synthesis and antimycotic activity of disubstitued N-azolymines. *ARCH. PHARM. MED. CHEM.*

Castellano S, Stefancich G, Ragno R, Schewe K, Santoriello M, Caroli A, Hartmann R.W, Sbardella G **2008**. CYP19 (aromatase): Exploring the scaffold flexibility for novel selective inhibitors *BIORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY*.

Charlier C, Hart E, Lefort A, Ribaud P, Dromer F, Denning DW, Lortholary O **2006**. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years?. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY* 57:384.

Chen S C, A Slavin, MA Sorrell **2011**. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *T.C. DRUGS* 71, 11.

Claveau Y, Mostefaoui and M Rouabhia **2004**. *In vitro* analyses of tissue structure and interleukin-1beta expression and

Bibliografia

production by human oral mucosa in response to *Candida albicans* infections *CYTOKINE* 25:162-71.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA , 3 **2008**.

Conti HR and Gaffen SL **2010**. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *MICROBES AND INFECTION* 7:518–527.

Copeland RA **2005**. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. Methods of biochemical analysis. *NEW YORK: WILEY-INTERSCIENCE* 178-213.

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS **1995**. *MICROBIOLOGIA* quarta edizione, Zanichelli.

Ernst JF, Schmidt A **2000**. Dimorphism in Human Pathogenic Yeasts. *CONTRIB MICROBIOL*. Basel Karger vol. 5.

Favre B, Didmon M, Ryder NS **1999**. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14alpha-demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *MICROBIOLOGY* 145, 2715.

Filler SC and Sheppard DC **2006**. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cell. *PLOS PATHOG*. 2:129.

Gafter-Gvili A, Vidal L, Goldberg E, Leibovici L, Paul M **2008**. Treatment of invasive candidal infections: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings*. *MAYO CLINIC* 83, 1011.

Ghannam S, Dejou C, Pedretti N **2011**. CCL20 and beta-defensin-2 induce arrest of human Th17 cells on inflamed endothelium in vitro under flow conditions *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* 186:3:1411–1420.

Bibliografia

Ha KC, White TC **1999**. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 43:763.

Haynes Ken **2001**. Virulence in *Candida* specie. *TRENDS IN MICROBIOLOGY* 9:210-218.

Israelachvili JN, Marčelja S, Horn RG **1980**. Physical principles of membrane organization. *QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS* 13:121.

Takeya H, Miyazaki Y, Miyazaki H, Nyswaner K, Grimberg B, Bennett JE **2000**. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 44:2985.

Klengel T, Liang WJ, Chaloupka J, Ruoff C, Schroppel K **2005**. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *CURR BIOL.* 22:2021-6.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis R E, Ernst ME, Pfaller MA **1998**. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 42:1207.

Kwon-Chung KJ and Bennett JE **1992**. *MEDICAL MYCOLOGY*.

Lamb D, Kelly D, Kelly S **1999**. Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. *DRUG RESISTANCE UPDATES* 2:390.

Lamb DC, Kelly DE, Waterman MR, Stromstedt M, Rozman D, Kelly SL **1999**. Characteristics of the heterologously expressed human lanosterol 14 α -demethylase (other names: P45014DM,

Bibliografia

CYP51, P45051) and inhibition of the purified human and *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal agents. *YEAST* 15:755.

La Placa M **2005**. *PRINCIPI DI MICROBIOLOGIA MEDICA*, decima edizione. Esculapio.

Li RK, Cutler JE **1991**. A cell surface/plasma membrane antigen of *Candida albicans*. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 137: 455.

Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S **2002**. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE* 8:76-81.

Lutz JD, Dixit V, Yeung CK, Dickmann LJ, Zelter A, Thatcher JE, Nelson WL, Isoherranen N **2009**. Expression and functional characterization of cytochrome P450 26A1, a retinoic acid hydroxylase. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY* 77:258.

Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar **1998**. Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *PH ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 42:3018.

Mannock DA, Lewis RNAH, McMullen TPW, McElhaney RN **2010**. The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid-sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS* 163:403.

Marr KA, Leisenring W, Crippa F, Slattery JT, Corey L, Boeckh M, McDonald GB **2004**. Cyclophosphamide metabolism is affected by azole antifungals. *Blood* 103:1557.

Martin SW, Konopka JB **2004**. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *EUKARYOTIC CELL* 3:675.

Bibliografia

Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA **2005**. Combination treatment of invasive fungal infections. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 18:163.

Murkherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA **2003**. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *INFECT IMMUN* 71:43333-4340.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B **2003**. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *MICROBIOL MOL BIOL*. 67:400-428.

Nishikawa H, Yamada E, Shibata T, Uchihashi S, Fan H, Hayakawa H, Nomura N, Mitsuyama **2010**. Uptake of T-2307, a novel arylamidine, in *Candida albicans*. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY* 65:1681.

Noverr MC, Huffnagle GB **2004**. Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *INFECTIO AND IMMUNITY* 72:6206.

Odds FC **1988**. *Candida e Candidosi*. A review and bibliography. *BAILLIERE TINDAL*, London.

Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J **2003**. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 47:956.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Zeichner LO, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobe JD **2009**. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the

Infectious Diseases Society of America. *CLINICAL INFECTIOUS DISEASES* 48:503.

Pappas P, Rex J, Sobel J **2004**. Guidelines for the treatment of Candidiasis. *CLIN. INFECT. DIS.* 38 :161-89.

Parks LW, Casey WM **1995**. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY* 49:95.

Perumal, Mekala, Chaffin **2007**. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* 7:2454-63

Prasad T, Chandra A, Mukhopadhyay CK, Prasad R **2006**. Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug-susceptible cells. *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* 11:3597-606

Porta A, Ramon AM, Fonzi WA **1999**. PHR1, a Homolog of *Aspergillus nidulans* palF, Controls pH-Dependent Gene Expression and Filamentation in *Candida albicans*. *JOURNAL BACTERIOLOGY* 181:7516-7523.

Porta A, Wang Z, Ramon A, Muhlshlegel FA, Fonzi WA **2001**. Spontaneous second-site suppressors of the filamentation defect of *prp1* mutants define a critical domain of Rim101p in *Candida albicans*. *MOL GENET GENOMICS* 266:624-631.

Prigneau O, Porta A, Maresca B **2004**. *Candida albicans* CTN gene family is induced during macrophage infection: homology, disruption and phenotypic analysis of CTN3 gene. *FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY* 41:783.

Quan H, Cao YY, Xu Z, Zhao JX, Gao PH, Qin XF, Jiang YY **2006**. Potent in vitro synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to

fluconazole. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 50:1096.

Quartacci MF, Glišić O, Stevanović B, Navari-Izzo F **2002**. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 53:2159.

Quartacci MF, Cosi E, Navari-Izzo F **2001**. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 52:77.

Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL **2002**. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *JOURNAL ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY* 49:973-980.

Ramani R, Chaturvedi V **2000**. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 44: 2752.

Rodloff AC, Koch D, Schaumann S **2011**. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH* 16: 187-195.

Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV, Dronda F, Laguna F, Chaves F, Valencia E **1995**. Correlation of *in vitro* susceptibility test results with clinical response: a study of azole therapy in AIDS patients. *JOURNAL ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY* 35:793-804.

Rogers TR **2006**. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact?. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS* 27:1-7.

Bibliografia

Sanglard D, Odds FC **2002**. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *THE LANCET INFECTIOUS DISEASES* 2:73.

Scherer S and Magee PT **1990**. Genetics of *Candida albicans*. *MICROBIOLOGY REVIEW* 54:226-241.

Setzu MG, Stefancich G, La Colla P, Castellano S **2002**. Synthesis and antifungal properties of N-[(1,1'-biphenyl)-4-ylmethyl]-1H-imidazol-1-amine derivatives. *IL FARMACO*.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE **2011**. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance and disease. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* 213-267.

Sharma SC. **2006**. Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS YEAST RESEARCH* 6:1047.

Singh A, Prasad R **2011**. Comparative lipidomics of azole sensitive and resistant clinical isolates of *Candida albicans* reveals unexpected diversity in molecular lipid imprints. *PLoS ONE* 6:19266.

Soll DR, Morrow B and Srikanta T **1993**. High frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *TRENDS GENETICS* 9:61-65.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P **1999**. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *SCIENCE* 283:1535-8.

Vázquez-Torres A and Balish E **1997**. Macrophages in Resistance to Candidiasis. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEW* 61:170-192.

Bibliografia

Weindl JR, Naglik S, Kaesler **2007**. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *JOURNAL CLINICAL INVESTIGATION* 12:3664-72.

Jefcoate CRE, Gaylor JL, Calabrese RL **1969**. Ligand interactions with cytochrome P-450. I. Binding of primary amines. *BIOCHEMISTRY* 8:3455.

Jefcoate CR **1978**. Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. In: *FLEISCHER S, PACKER L, EDS. METHODS IN ENZYMOLOGY: ACADEMIC PRESS* 258-79.

Wolker Stuart **2001**. *MICROBIOLOGIA* SeS Na.

RINGRAZIAMENTI

Colgo l'occasione per ringraziare le persone che hanno sempre creduto in me e che mi sono sempre state vicino... Grazie, innanzitutto al Prof. Bruno Maresca per avermi dato l'opportunità di far parte del suo gruppo di ricerca e di approfondire il mio progetto di tesi, completandolo con lo svolgimento di questo progetto di Dottorato. Grazie alla Prof.ssa Amalia Porta per essere stata una costante guida e per gli insegnamenti ricevuti. Grazie alla Dott.ssa Nunzia Armenante con cui ho fatto i primi passi nel mondo della scienza... Un ringraziamento speciale va alla mia amica nonché collega Dott.ssa Ilaria Granata con cui ho condiviso, fin dal primo giorno, questo importante percorso, per aver sorriso con me nei momenti piacevoli, ma soprattutto per avermi ascoltata e supportata in quelli difficili... Dico ancora grazie alla mia famiglia, un riferimento costante nella mia vita, per avermi sempre sostenuta ed incoraggiata durante tutto il mio percorso di studi e per avermi sempre dato dimostrazione di essere fiera di me. Infine, desidero con tutto il cuore ringraziare Angelo che mi è sempre stato accanto, ogni giorno con i suoi consigli e le sue battute... in fondo è anche grazie a lui che oggi raggiungo uno dei più importanti traguardi della mia vita.