

Efecto del quitosán de alto peso molecular y del alginato de sodio sobre la proteinasa ácida secretoria de *Candida albicans*

Silvia Calamari¹, Alejandra Bojanich¹, Silvina Barembaum¹, Ana Azcurra¹, Carolina Virga² y Susana Dorronsoro¹

¹Departamento de Biología Bucal y ²Departamento de Patología Bucal, Facultad de Odontología, Córdoba, Argentina

Resumen Se evaluó el efecto del quitosán de alto peso molecular (QAPM) y del alginato de sodio (NaAL) sobre la producción de proteinasa ácida por una cepa de colección y cinco aislamientos de *Candida albicans*. Se indujo la secreción de proteinasa ácida con y sin agregado de polímeros a distintas concentraciones y se determinó la actividad enzimática. QAPM y NaAL disminuyeron significativamente la actividad enzimática (>76% cepa de colección y >89% aislamientos, $p < 0,05$). QAPM no modificó la concentración de proteínas y NaAL produjo una disminución. Se concluye que ambos polímeros son efectivos en inhibir la actividad de proteinasa ácida de *Candida albicans*.

Palabras clave *Candida albicans*, Proteinasa ácida, Quitosán de alto peso molecular, Alginato de sodio

High molecular weight chitosan and sodium alginate effect on secretory acid proteinase of *Candida albicans*

Summary The effect of high molecular weight chitosan (HMWCh) and sodium alginate (NaAL) on acid proteinase secretion of *Candida albicans* (one of culture collection and five isolates) was evaluated. The secretion of acid proteinase was induced in the presence and the absence of these polymers in different concentrations and their enzymatic activity was determined. HMWCh and NaAL significantly diminished the enzymatic activity (>76% for the collection strains and > 89% for the isolates, $p < 0.05$). HMWCh did not modify protein concentrations, but NaAL did. It can be concluded that both polymers can inhibit the proteinase activity of *Candida albicans*.

Key words *Candida albicans*, Acid proteinase, High molecular weight chitosan, Sodium alginate

Es conocido que *Candida albicans* es el principal responsable de la candidiasis bucal de pacientes portadores de prótesis. Diversos factores contribuyen al desarrollo de infecciones por *C. albicans*, entre los que merecen destacarse enzimas como la proteinasa ácida o carboxilproteinasa extracelular. Su secreción está asociada con la capacidad de adherirse y colonizar el tejido del huésped,

habiéndose demostrado su papel en la invasión y destrucción del tejido del huésped [3,5,6,8]. Las especies del género *Candida* poseen una alta capacidad de secretar proteinasa ácida y producir infecciones, especialmente cuando el pH desciende y hay una disminución del flujo salival como consecuencia del uso de prótesis dentales [8].

El quitosán de alto peso molecular (QAPM) [10] y el alginato de sodio (NaAL) [4], por sus propiedades físico-químicas, han demostrado capacidad para agregar y atrapar *C. albicans* adherida tanto a células epiteliales como a placas de acrílico *in vitro* [1,13]. Este estudio se propuso evaluar el efecto de QAPM y de NaAL sobre la actividad de la proteinasa ácida de *C. albicans*.

Las muestras de saliva provenientes de pacientes con prótesis dental fueron sembradas en agar glucosado de Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 1% a 37 °C durante 48 h [9]. La identificación de las especies se realizó por la morfología de las colonias, ensayo de tubo germinativo y asimilación de azúcares con API 32 C AUX System, (BioMérieux, Francia). También se utilizó la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 (ATCC, EE.UU.).

Para incrementar la producción de proteinasa se siguieron los criterios de Remold [12] y se empleó un

Dirección para correspondencia:

Dra. Susana Dorronsoro
Departamento de Biología Bucal
Facultad de Odontología - Ciudad Universitaria
Haya de la Torre S/N, Agencia Postal 4
CP 5016, Córdoba, Argentina
Tel.: +54 351 433 3033
Fax: +54 351 433 4178 / 4179
Correo electrónico: susu@odo.unc.edu.ar

Aceptado para publicación el 2 de noviembre de 2004

Tabla 1. Interacción de QAPM y NaAL sobre la actividad de proteinasa ácida de *Candida albicans* y proteínas totales.

	Actividad enzimática U/l		% de disminución		Proteínas totales µg/ml	
	Aislamientos clínicos	ATCC 10231	Aislamientos clínicos	ATCC 10231	Aislamientos clínicos	ATCC 10231
<i>C. albicans</i> sin polímero	1,34 ± 0,65	1,16 ± 0,82			0,59 ± 0,18	1,42 ± 0,50
<i>C. albicans</i> + QAPM 0,25%	0,12 ± 0,03 *	0,06 ± 0,02 *	91,0	94,7	0,51 ± 0,23	1,34 ± 0,45
<i>C. albicans</i> + QAPM 0,50%	0,10 ± 0,03 *	0,04 ± 0,01 *	92,5	96,5	0,56 ± 0,25	1,38 ± 0,36
<i>C. albicans</i> + NaAL 0,10%	0,02 ± 0,01 *	0,28 ± 0,01 *	98,5	75,8	0,42 ± 0,07	0,54 ± 0,12
<i>C. albicans</i> + NaAL 0,25%	0,14 ± 0,04 *	sin actividad *	89,5	100	0,33 ± 0,15	0,62 ± 0,21

* Representa las diferencias estadísticamente significativas en la actividad enzimática entre las muestras sin el agregado de polímero y las muestras con el agregado de polímeros a distintas concentraciones.

medio que contiene 0,5 g MgSO₄, 1 g KHPO₄, 20 g de glucosa, 2 g de suero albúmina bovina o humana y 1,25 g de una preparación polivitamínica en un l de agua, ajustado a pH 4 con HCl. Se adicionaron 100 µl de la suspensión de cada una de las cepas (1 x 10⁸ células/ml) a 10 ml de este medio en presencia de los biopolímeros (QAPM Unifarma, 90 % desacetilado, 280 cps, PM 300 KD, NaALKimitsu, Chile, 420 cps) (QAPM al 0,25% y 0,5% y NaAL al 0,10% y 0,25%) y en ausencia de los mismos y se incubaron siete días a 27 °C en un incubador con agitación. Las levaduras fueron centrifugadas a 1.300 g a 4 °C por 30 min, los sobrenadantes se ajustaron a un pH 6,5 con NaOH 1N, se filtraron mediante filtros estériles (poros 0,2 µm) y se guardaron a -80 °C hasta su uso. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas totales según el método de Lowry [7] y, al final de su purificación, las muestras fueron separadas por cromatografía (Sephadex G-75, Sigma, EE.UU.) y se determinó la absorbancia a 280 nm. Se adicionó 1,0 ml de tampón 0,2 M citrato de sodio pH 4,5 y 750 µl de solución albúmina bovina 1% P/V a 250 µl de las muestras de cada fracción de ensayo. La mezcla fue incubada con agitación a 37 °C por 60 min. Se inhibió la reacción por adición de 500 µl de ácido tricloroacético 20% (V/V) y se centrifugó a 1.500 g por 30 min a 4 °C. Se determinó la concentración de proteínas y la actividad enzimática por litro del medio inductor de Remold a una concentración de 1 x 10⁸ cél/ml. Una unidad arbitraria es definida como el incremento de la absorbancia a 595 nm entre 0,100 y 60 min [8,11]. En todos los casos la fracción de ensayo se trabajó por triplicado. Las fracciones de ensayo fueron procesadas estadísticamente mediante la prueba de t de student para muestras apareadas. La cromatografía con Sephadex G-75 permitió la separación de 15 fracciones (Figura 1). La actividad enzimática determinada en las fracciones de ensayo número 6 para PCB y 7 para la cepa ATCC 10231 fue 1,71 ± 0,95 y 2,74 ± 0,81 U/l, mientras que la concentración de proteínas totales en estas fracciones fue 0,35 ± 0,11 y 0,51 ± 0,12 µg/µl.

El agregado de QAPM y NaAL, a ambas concentraciones, reveló diferencias estadísticamente significativas en la actividad enzimática al compararla con los controles. El QAPM en ambas concentraciones no modificó la concentración de proteínas totales en los sobrenadantes, no así NaAL, el que produjo una disminución de las proteínas totales para ambas concentraciones, según consta en la tabla 1. El efecto del QAPM y NaAL sobre la actividad proteínica mostró una inhibición significativa, con una efectividad que osciló entre 70% y 90% para *C. albicans* de portadores de prótesis dental como para la cepa ATCC.

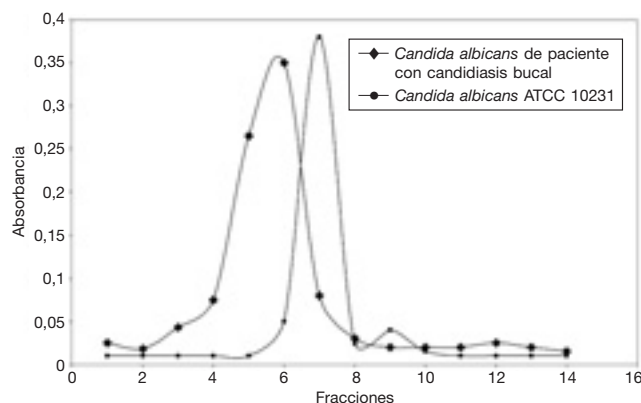


Figura 1. Separación por cromatografía de las cepas bajo estudio (Sephadex G-75). Corresponde al fraccionamiento de una muestra problema representativa de las muestras de ensayo (n=5).

El mecanismo por el cual el QAPM produciría la disminución de la actividad enzimática estaría relacionado con el cambio conformacional que sufren estos polímeros a pH cercano a 7. NaAL, polisacárido lineal con carga negativa, es capaz de interactuar con cationes polivalentes como Ca²⁺ formando un gel que sería responsable de la inmovilización de la proteinasa ácida, siendo más evidente a mayor concentración, lo que redundaría en la disminución de la actividad de la enzima [4,10].

El QAPM no incidió en los niveles de proteínas totales del sobrenadante; NaAL disminuyó dichos niveles, con capacidad de retener proteínas de menor peso molecular (40 a 45 KD). Sin embargo, este proceso no se observó con proteínas de mayor peso molecular, como es el caso de IgAs anti-*C. albicans* de saliva, las que no revelaron variación en su concentración cuando interactuaron con el QAPM y el NaAL tanto in vitro como in vivo [2], por lo que no estaría afectada la capacidad de defensa del huésped.

Estos resultados, sumados a los ya hallados por nosotros [1,2] sugerirían que estos biopolímeros podrían ser utilizados en el tratamiento de la candidiasis bucal.

Bibliografía

1. Barembaum S, Virga C, Bojanich A, Cornejo S, Calamari S, Pontón J, Dorronsoro de Cattoni S. Effect of chitosan and sodium alginate on autochthonous *C. albicans* adherence to buccal epithelial cells *in vitro* study. *Rev Med Oral* 2003; 8: 188-196.
2. Bojanich A, Calamari S, Virga C, Cornejo S, Dorronsoro de Cattoni S. Proteínas antigénicas, IgAs Anti-SM y Anti-CA y capacidad de aglutinación salival de cepas autóctonas de *C. albicans* y *S. mutans*. *Arch Odontostomatol* 2001; 17: 168-174.
3. Cotter G, Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci* 2000; 57: 241-249
4. Draget KI, Skjak-Braek, Smirsdod O. Alginate based new materials. *International bases new materials* 1997; 21: 47-55.
5. Ghannoum GR, Abu Elteen K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1986; 24: 407-413.
6. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 1996; 7: 55-69.
7. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
8. Mc Mullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolate from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 183-189
9. Merz W, Roberts GD. Detection and recovery of fungi from clinical specimens. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology* (6th Ed) Washington DC, American Society for Microbiology, 1995: 709-722.
10. Muzzarelli RA, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo P. Antimicrobial properties of N-Carboxibutyl Chitosan. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2019-2023.
11. Ray TL, Payne CD. Comparative production and purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990; 58: 508-514.
12. Remold H, Fasold H, Staib F. Purification and characterization of proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1968; 167: 399-406.
13. Samaranayake LP, MacFarlane TW. An *in vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 603-609.
14. Samaranayake YH, MacFarlane TW, Samaranayake LP, Aitchison T. The *in vitro* proteolytic and saccharolytic activity of *Candida* species cultured in human saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 98: 229-235.