

Efecto de Quitosan y Alginato de Sodio sobre la adherencia de *C Albicans* Autoctonas a Células Epiteliales Bucales. (in Vitro)

Silvina Barembaum (1), Carolina Virga (2), Alejandra Bojanich (1), Lila Cornejo (3), Silvia Calamari (1), José Pontón (4), Susana Dorronsoro (5)

(1) Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Introducción a la Química, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba

(2) Profesor Adjunto, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba

(3) Profesor Titular, Cátedra de Biología Celular, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba

(4) Profesor Titular, Departamento of Inmunología, Microbiología y Parasitología, Departamento de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco.

(5) Profesor Titular, Cátedra de Introducción a la Química, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba

Correspondencia:

Dra. Susana Dorronsoro de Cattoni

Haya de la Torre S/N .Agencia Postal 4. CP 5000

Facultad de Odontología-Ciudad Universitaria

Córdoba- ARGENTINA

E-mail: susu@odo.unc.edu.ar

Recibido: 28-12-2001 Aceptado: 28-3-2002

Barembaum S, Virga C, Bojanich A, Cornejo L, Calamari S, Pontón J, Dorronsoro S. Efecto de Quitosan y Alginato de Sodio sobre la adherencia de *C Albicans* Autoctonas a Células Epiteliales Bucales. (in Vitro). Med Oral 2003;8:188-196.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

RESUMEN

El presente estudio se propuso evaluar el efecto de Quitosan de Alto Peso Molecular (QAPM) y Alginato de sodio (Al-Na) sobre la adherencia fungica. Se aisló e identificó *C albicans* de saliva no estimulada provenientes de individuos sanos, ambos sexos. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para cada uno de los biopolímeros. Los valores de CIM fueron de 0.25 g % (P/V) para QAPM y de 0.10 g % (P/V) para Al- Na.

Se evaluó la hidrofobicidad de las levaduras frente al xileno en presencia de QAPM .

Se observaron diferencias estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre el control (sin QAPM) y las diferentes concentraciones de QAPM en las suspensiones fúngicas. Al comparar con el control QAPM y Al-Na disminuyeron la adherencia de las levaduras a las Células Epiteliales Bucales (CEB) ($p=0.00001$), siendo más efectivo Al-Na ($p=0.0001$).

QAPM despegó y agregó *C albicans* incluyendo al hongo y CEB en la malla. Al-Na inhibió, agregó y atrapó a la levadura en la red y excluyó a CEB. Ambos biopolímeros son efectivos, aunque Al-Na demostró ser un fuerte inhibidor de la adherencia. En consecuencia, estos biopolímeros solos o combinados podrán ser usados en el tratamiento de la candidosis oral.

Palabras claves: Quitosan, alginato de sodio, *C albicans*, adherencia, células epiteliales bucales.

INTRODUCCION

La candidosis oral es una infección muy común en las personas de edad portadoras de prótesis dental. *C albicans* es el microorganismo más abundante que coloniza los poros del acrílico y reinfecta la cavidad oral. Altos recuentos de hongos en saliva es común encontrar en la mayoría de los portadores de prótesis (78 al 100 %) en relación con individuos dentados (30 al 60 %) (1-3). La prevalencia de esta patología es mayor en pacientes con compromiso inmunológico, trastornos hematológicos, HIV, transplantados, diabéticos y aquellos que sufren xerostomía provocada por terapia antibiótica prolongada o drogas citotóxicas (4,5).

La adhesión del hongo a las superficies duras o epiteliales de la cavidad oral incluye activos movimientos de quimiotaxis, interacción entre la energía libre de superficie, potencial zeta y la hidrofobicidad. Es importante destacar el rol de los componentes salivales en las interacciones estereoquímicas entre la superficie del microorganismo y el huésped. Dichas interacciones que tienen lugar en el biofilm fortalecen el sinergismo de los microorganismos que lo constituyen. Cuan-

do agentes exógenos (drogas, antisépticos, etc.) modifican la adhesión inicial se interrumpe la colonización microbiana y la subsiguiente invasión a los tejidos del huésped (6,7).

Los perfiles de adherencia dependen de las características estructurales del microorganismo, del polimorfismo de los receptores (glicoproteínas, proteínas) característico de las diferentes localizaciones de la cavidad bucal (8).

Estudios realizados por nuestro equipo de investigación revelaron que los sujetos que padecen de candidosis oral muestran deficiencias en determinados componentes salivales relacionados con el sistema local de defensa (9). Estos valores se recuperan al finalizar el tratamiento de los pacientes tratados con ketoconazol y nistatina (10). Se ha demostrado que tanto nistatina como ketoconazol, desarrollan resistencia. En tratamientos prolongados es común la presencia de efectos colaterales (nauseas, vómitos, toxicidad, etc.), no siempre tolerados por el paciente. La acción de limpieza del flujo salival y de la musculatura oral modifican las concentraciones necesarias para conseguir el efecto terapéutico deseado y en consecuencia reducen la eficacia de los agentes administrados (11).

Resultados in vitro realizados por nosotros han demostrado la efectividad de QAPM y AlNa en el proceso de atrapamiento y adsorción de cepas autóctonas de *St mutans* y *C albicans* sobre perlas de hidroxiapatita (12).

El objetivo de este estudio pretende modificar la adhesión del hongo a células epiteliales bucales y a bases acrílicas mediante el uso de dichos polímeros. En base a los resultados hallados se prevee continuar con el desarrollo de una formulación de estos polímeros, biocompatibles, bacteriostáticos e inocuos para el huésped, destinado al control potencial de infecciones orales.

MATERIAL Y METODOS

- *Microorganismos*: Se aisló *C albicans* de pacientes asistidos en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba. El aislamiento fue realizado en un medio selectivo de agar Sabouraud con cloranfenicol al 1 % (Biokar Diagnostica, France) y se incubaron por 48 - 72hs a 37 °C (13,14). Las cepas fueron identificadas por: prueba del tubo germinativo, características morfológicas sobre agar harina de maíz y por un kit: API 20 AUX (Api 20 C AUX, bioMérieux, France) comercialmente disponible.

- *Biopolímeros*: Se utilizó QAPM purificado al 1 %, deacetilado al 85% (Sigma), peso molecular aproximado de 300 kD y viscosidad de 280 cps disuelto en ácido acético 0,1 N pH 5,9. También se utilizó Al-Na de alta viscosidad 2g % (P/V) (Aldrich). Se prepararon diluciones al 1 %. Las soluciones fueron mantenidas en constante movimiento en un agitador a 40 °C hasta la solubilización completa.

El cambio conformacional del QAPM y del Al-Na se realizó mediante el agregado de buffer fosfato 0,4 M pH 7 y CaCl_2 1M respectivamente, al momento de la realización de cada ensayo.

- *Preparación de la suspensión de levaduras*: Las cepas aisladas

fueron suspendidas en caldo Sabouraud (5×10^6 cel/mL) y se incubó durante 16 hs a 37 °C. Las células fueron transferidas a PBS pH 7,4 estéril y lavadas dos veces. Las levaduras fueron resuspendidas a una concentración de $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cel/mL a 520 nm. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Los biopolímeros fueron agregados a las concentraciones anteriormente mencionadas, por encima y por debajo de la concentración inhibitoria mínima. Se usó como control muestras sin polímero. Finalmente las muestras fueron agitadas a 3000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue removido y el sedimento fue resuspendido en PBS. Se tomaron alícuotas del sobrenadante y del sedimento resuspendido y se colorearon por tinción de Gram para evaluar los cambios morfológicos a través de microscopía óptica (15).

- *Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de los biopolímeros (CIM)*: Se siguieron los criterios descritos por Tarsi et al (16) con modificaciones. Se usaron concentraciones de QAPM que oscilaron entre 0.10 a 1g % (P/V) y de Al-Na del 0.05 al 2g % (P/V), alcanzando un volumen final de 1 mL. Se prepararon dos series de las diluciones de cada uno de los polímeros en caldo Sabouraud dextrosa (Biokar Diagnostica, France). Luego se adicionó 1 mL de PBS pH 7 a QAPM y 1 mL de CaCl_2 a Al-Na. Se inoculó con 5×10^6 UFC/mL de *C albicans* y se incubó por 24 hs a 37°C.

La CIM fue visual y espectrofotométricamente definida como la concentración de los biopolímeros que resultó en la mayor inhibición del crecimiento fúngico.

- *Ensayo de Hidrofobicidad*: El grado de hidrofobicidad se realizó según la técnica descrita por Tarzi et al (17). *C albicans* fue crecida en PBS pH 7 durante toda la noche ($1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL) en presencia o ausencia de los biopolímeros, para ello se utilizó QAPM a concentraciones de: 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 g % (P/V) y Al-Na a concentraciones de: 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 g % (P/V). Se usó un control sin polímero.

Posteriormente se midió la DO a 520 nm. Se tomó 1 mL de cada concentración de las muestras, se les adicionó igual cantidad de xileno y se incubaron a 37 °C por 10 minutos. Se agitaron por vortex durante 1 minuto y se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 minutos. La fase acuosa inferior fue luego removida y se midió la DO de la suspensión por espectrofotometría a 520 nm.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de la DO inicial, donde cada valor representa el promedio más la desviación estándar de repetidos ensayos.

- *Agregación de C albicans a los biopolímeros*:

Quitosan alto peso molecular: Para evaluar la interacción entre QAPM y *C albicans* se tomó una suspensión de dichas células (10^6 UFC/mL) en buffer fosfato y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó QAPM 0.25 g % (P/V) y se ajustó el pH a 7 mediante el agregado de fosfato de sodio o hidróxido de sodio.

Las muestras se agitaron suavemente y se centrifugaron a 3000

x g por 5 minutos. Se extrajo el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con una solución de fosfato de sodio 125 mM pH 7 y se lo resuspendió con un volumen igual de dicha solución. Se tomaron alícuotas del sobrenadante y del sedimento resuspendido y se colorearon con tinción de Gram para la determinación de los cambios morfológicos por microscopía óptica.

Alginato de sodio: Se preparó una suspensión de levaduras (10^6 UFC/mL) a la que se le agregó Al-Na 0.10 gr % (P/V), luego se adicionó CaCl_2 1M para inducir el cambio conformacional. Se ajustó el pH a 7 y se lo mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. A partir de aquí se siguió un procedimiento similar al descrito con QAPM para la evaluación por microscopía óptica.

Preparación de Células Epiteliales Bucales (CEB): Para los ensayos de adherencia de células epiteliales bucales (CEB) se utilizó el método de Kimura y Pearsall (18). Se extrajeron células, durante la mañana, de seis individuos sanos, tres de sexo masculino y tres de sexo femenino, por raspado de mucosa del carrillo derecho e izquierdo con isopos de algodón estériles y se suspendió en 10 mL de PBS estéril. La suspensión de células fue lavada tres veces con PBS y se centrifugó a $3500 \times g$ por 10 minutos. Las células epiteliales lavadas fueron resuspendidas a una concentración de $1-2 \times 10^5$ cél/mL (Cámara de Neubauer, HB, Alemania) y se usaron inmediatamente para los ensayos de adherencia.

- **Ensayo de adherencia de *C. albicans* a CEB:**

Preparación de la suspensión de levaduras: la suspensión de levaduras fue preparada como se describe previamente (15). El ensayo de adherencia fue realizado según la técnica de Kimura y Pearsall (18) con modificaciones. Previo al ensayo de adherencia 0.5 mL de CEB fueron tratadas con saliva inactivada (30 minutos a 56°C) y centrifugadas a $3000 \times g$ por 5 minutos. Se tomaron 0,5 mL de CEB pretratadas y fueron mezcladas con igual volumen de QAPM 0,25 g % (P/V) ó de Al-Na 0,10 g % (P/V). Posteriormente se realizó el cambio conformacional. La suspensión CEB/biopolímeros/levaduras fue mezclada suavemente e incubada con agitación suave a 37°C durante 1 hora. Una alícuota de la muestra fue transferida a un portaobjeto, secada con aire, fijada con metanol y teñida con cristal violeta. El número de levaduras adheridas por células fue cuantificado por microscopía óptica a 400 x. Se determinó el número de levaduras adheridas a cincuenta CEB. Cada ensayo fue realizado por triplicado en tres momentos diferentes.

- **Análisis estadístico:** Los ensayos de hidrofobicidad para QAPM y las pruebas de adherencia de *C. albicans* a CEB entre control y problemas tratados con QAPM y Al-Na fueron procesados estadísticamente por el test t de Student's para muestras apareadas y no apareadas y por la prueba del Chi Cuadrado. Se consideró un nivel de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS

- **Agregación de *C. albicans* a los biopolímeros:** QAPM agregó y atrapó un 70 % de las células fúngicas, detectándose hongos en el sobrenadante, mientras que con Al-Na el atrapamiento observado fue cercano al 100 %. En ambos casos se observa-

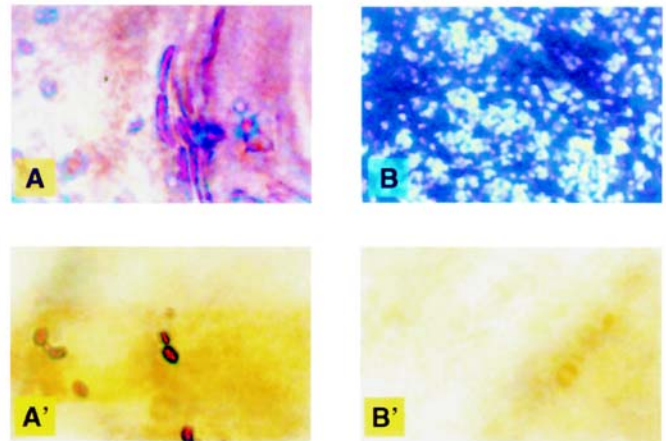


Fig. 1. Análisis morfológico por microscopía óptica de la agregación de células de *C. albicans* por QAPM (Quitosan de Alto Peso Molecular) y Al Na (Alginato de sodio). *In vitro*.

A. Micrografía de células de *C. albicans* suplementada con QAPM 0.25 g % (P/V) A'. Micrografía del sobrenadante de A.

B. Micrografía de células de *C. albicans* suplementada con AlNa 0.10 g % (P/V) B'. Micrografía del sobrenadante de B.

Morphologic analysis by optic microscopy of the in vitro aggregation of C. albicans cell by HMWCh (High Molecular Weight Chitosan) and Na Al (Sodium Alginate)

A. Micrograph of *C. albicans* cells supplemented with 0.25 % (W/V) Micrograph the supernatant of A.

B. Micrograph of *C. albicans* cells supplemented with 0.10% (W/V) Na Al. B' Micrograph the supernatant of B.

Fig. 2. Hidrofobicidad de *C. Albicans* frente a diferentes concentraciones de QAPM

Differences between control and different concentrations of HMWCh were statistically significant ($p < 0.05$).

Control: suspension of *C. albicans* without HMWCh.

Concentración de QAPMg %: Concentration of HMWCh

Densidad óptica: Optical density

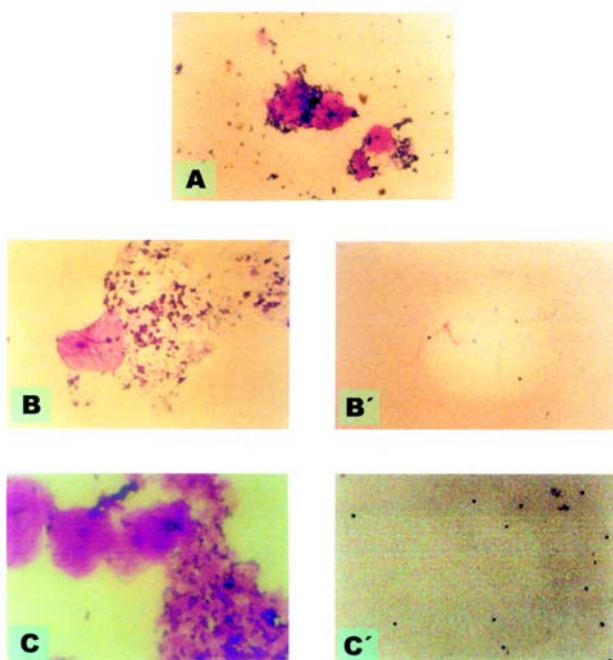


Fig. 3. CEB control cubiertas con saliva y *C. albicans* adherida (A,x20). QAPM (0.25 g%) despegó, agregó y atrapó tanto *C. albicans* y CEB cubiertas con saliva (B). La presencia de células fúngicas en el sobrenadante fue mínima (P=0.05) Fig 3 B', x 40).

Al comparar el comportamiento de QAPM y Al Na, AlNa resultó ser más efectivo (P=0.00001)

AlNa (0.10 g %) despegó, agregó y atrapó a *C. albicans*, pero no incluyó CEB en la malla (Fig 3 C.). La presencia de levaduras en el sobrenadante fue mínima (P= 0.05),Fig 3 C', x 40x.).

La inhibición de la adherencia fúngica reveló diferencias estadísticamente significativas para QAPM y AlNa al comparar con los controles (P=0.00001).

Control BEC coated with saliva and adhered *C. albicans* (A, x 20).

HMWCh (0.25 g%) detached, aggregated and entrapped both *C. albicans* and BEC coated with saliva (B). The presence of fungal cells in the supernatant was minimal (P=0.05, Fig 3 B', x 40) .

When HMWCh and NaAl were compared, NaAl proved to be more effective (P=0.00001)

NaAl (0.10 g %) detached, aggregated and entrapped *C. albicans*, but did not include BEC in the mesh (Fig 3 C.). The presence of yeast in the supernatant was minimal (P=0.05),Fig 3 C', x 40).

Fungal adherence inhibition revealed statistically significant differences for HMWCh and NaAl when compared to controls (P=0.00001).

ron diferencias estadísticamente significativas con relación al control ($p < 0,05$) (Fig 1 A , A').

- **Concentración Inhibitoria Mínima:** Se observó formación de malla, atrapamiento fúngico y turbidez en los sobrenadantes de los polímeros bajo estudio. El valor de CIM para QAPM fue de 0.25 g % (P/V), mientras que para Al-Na fue de 0.10 g % (P/V), concentraciones que mostraron el menor desarrollo microbiano.

Como consecuencia del crecimiento mínimo de colonias en el sobrenadante, se demostró la capacidad fungistática de los biopolímeros. Al comparar con el control, la mayor reducción del crecimiento fue del 85,7 % para QAPM y de 90,8 % para

Al-Na. Las diferencias con el control fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

- **Hidrofobicidad:** El análisis de la hidrofobicidad de las superficies fúngicas crecidas en un medio suplementado con QAPM reveló un aumento de las densidades ópticas (DO) en relación al control (cepas crecidas sin QAPM) a concentraciones crecientes del biopolímero para *C. albicans*. Los resultados revelaron una reducción significativa en la afinidad por el xileno para QAPM ($P < 0,05$) (Fig 2). Con Al-Na no se evidenciaron diferencias en las DO en relación al control.

- **Ensayo de adherencia de *C. albicans* a células epiteliales bucales (CEB):** A concentraciones óptimas (CIM) ambos polímeros pueden interactuar con *C. albicans*, interfiriendo con el proceso de adhesión a CEB. La eficacia fue demostrada por el escaso número de levaduras observadas en el sobrenadante luego de haber realizado los cambios conformacionales de los biopolímeros.

Al comparar los resultados hallados entre el control y la suspensión de levaduras/biopolímeros/CEB, QAPM mostró capacidad para agregar y atrapar tanto *C. albicans* como CEB quedando escasa células en el sobrenadante (Fig 3A, 3B, 3B') ($P < 0,05$). Al-Na mostró resultados similares, sin embargo este último no incluye CEB dentro de la malla y la presencia de levaduras en el sobrenadante fue mínima (Fig 3C, 3C') ($P < 0,05$). La inhibición en la adherencia fúngica reveló diferencias estadísticamente significativas para QAPM y Al- Na ($P=0,00001$) en comparación con el control. Cuando QAPM y AL-Na fueron comparados, Al-Na resultó más efectivo ($P=0,00001$). Los presentes resultados muestran diferencias estadísticamente significativas para ambos polímeros ($P < 0,05$), pero no se detectan diferencias estadísticamente significativas en la capacidad para inhibir la adhesión cuando se comparan entre ellos.

DISCUSION

C. albicans coloniza e infecta las superficies mucosas en mayor proporción que otras *Candida* spp, tanto in vivo como in vitro. El fenómeno de adherencia constituye un proceso clave necesario para la colonización de las levaduras en las superficies mucosas. No todas las *Candida* spp poseen capacidad para adherir e infectar dichas superficies mucosas. *C. albicans*, hongo de alta prevalencia en el ambiente bucal, reúne gran habilidad para adherir y consecuentemente producir candidosis oral (19). Además de los receptores epecíficos, en el proceso de bioadhesión participan fuerzas no específicas entre las que merecen mencionar: van der Waal's, electrostáticas de doble capa, interacciones dependientes del solvente, puente de hidrógeno, hidrofóbicas, estéricas y uniones covalentes (20,21) Tanto en las superficies de *C. albicans*, de CEB como en los polímeros bajo estudio intervienen algunas de estas fuerzas. Los resultados hallados en la presente investigación muestran

que el crecimiento fúngico a concentraciones equivalentes a la CIM es mínimo, lo que reforzaría hallazgos realizados por nosotros que evidenciaron capacidad antifúngica tanto para QAPM como para Al-Na (12). Las concentraciones de 0.25g % para QAPM y de 0.10g % para Al-Na capaces de inhibir el mayor desarrollo de *C. albicans* determinó la concentración óptima necesaria para evaluar la interacción de estos polímeros frente a las CEB. La habilidad de estos polímeros para inhibir el crecimiento microbiano fue reconocida por Muzzarelli et al (22,23), quienes sostienen que estas macromoléculas combinan favorablemente las propiedades físico-químicas y funcionales. Estudios realizados por los mismos autores (24) con quitosanos modificados demostraron un 100 % de inhibición del crecimiento para *Streptococcus* spp y *Candida* spp con el 0 % de actividad bactericida para *Streptococcus* spp y 100 % para *Candida* spp. Nuestros resultados revelan que a concentraciones equivalentes a la CIM, QAPM y Al-Na interactúan con *C. albicans* inhibiendo la adhesión del hongo a las CEB por diferentes mecanismos asociados con la estructura química de los polímeros.

Al analizar la hidrofobicidad a través del fenómeno de competencia entre QAPM y Al-Na frente al complejo xileno-*C. albicans*, sólo QAPM por su carácter hidrofóbico evidenció mayor capacidad de desplazamiento del solvente orgánico. QAPM por su origen policatiónico modificaría la hidrofobicidad de la pared celular de *C. albicans* originando polielectrolitos complejos, donde prevalecerían fuerzas electrostáticas asociadas con el potencial zeta. Por su parte, Al-Na interactuaría con la pared del hongo que produciría modificaciones desorbiendo y atrapando un mayor número de *C. albicans*, debido probablemente a la atracción de fuerzas similares, proceso favorecido además por las propiedades mecánicas del gel y la liberación de iones calcio al medio (24,25).

Es conocido que la invasión de *C. albicans* a las CEB está sustentada por la hidrofobicidad, propiedad que incrementa la adhesión y su resistencia a la acción de los macrófagos (26). Si bien investigaciones realizadas por autores demostraron que a 37°C *C. albicans* es típicamente hidrofílica, y es capaz de transformarse espontáneamente en hidrofóbica. Mientras que las moléculas hidrofílicas interactúan mediante receptores tipo adhesinas donde abundan macrófagos, la mayor capacidad de adherir de moléculas hidrofóbicas estaría en relación con un aumento de la energía libre de la superficie, que depende de las interfases entre líquido-microorganismos y sólido-líquido cuando son reemplazadas por microorganismos-sólido, si el cambio de energía es negativo la reacción transcurre espontáneamente. Si bien en la etapa inicial las moléculas hidrofóbicas no requieren de receptores específicos, la compleja estructura de la pared celular constituida principalmente por glucanos y quitina y especialmente por manoproteínas con funciones enzimáticas y de ligando-receptor posibilitaría la unión a las células epiteliales de la mucosa. Además las modificaciones en la glicosilación de las proteínas de superficie expresa estructuras proteicas hidrofóbicas. Si los diferentes patrones de adherencia se replican en el complejo ecosistema bucal refuerzan la hipótesis que

las células fúngicas hidrofóbicas son más virulentas que las hidrofílicas (27).

Por otra parte es necesario considerar la incidencia de la película salival sobre las CEB. Pocas investigaciones han comprobado fehacientemente dicha incidencia in vivo, debido a las diferentes técnicas usadas y a la composición química de la saliva mixta, no obstante Busscher (28) sugiere que las proteínas de bajo peso molecular reducen la adhesión de las levaduras, en tanto las mucinas salivales desempeñan un rol importante en la adhesión y depuración de *C. albicans* intraoral.

Nuestros resultados sugerirían que tanto QAPM como Al-Na poseen capacidad para inhibir la adherencia de *C. albicans* a CEB, pero las diferencias observadas entre los polímeros permitirían asociarlas con las características físico-químicas y la viscosidad del compuesto bajo estudio. QAPM por su carácter hidrofóbico y la posible transformación hidrofílica que generaría en la superficie de *C. albicans*, permitiría romper la unión adhesina-receptor producida entre *C. albicans* y CEB, atrapando mediante la expresión de nuevas fuerzas de atracción tanto a *C. albicans* como a CEB. Al-Na por su carácter hidrofílico agrega y atrapa a *C. albicans* pero no evidenciaría capacidad para interactuar con las CEB. Tal como propone Senel et al (29) en relación al uso de geles bioadhesivos como portadores de drogas que reducirían la frecuencia de administración de la mismas, pensamos que QAPM y Al-Na podrían ser utilizados por la industria farmacéutica para dar repuesta al desarrollo de un agente terapéutico.

ENGLISH

Effect of Chitosan and Sodium Alginate on the adherence of Autochthonous *C. Albicans* to Buccal Epithelial cells (*in Vitro*)

BAREMBAUM S, VIRGA C, BOJANICH A, CORNEJO L, CALAMARI S, PONTÓN J, DORRONSORO S. EFFECT OF CHITOSAN AND SODIUM ALGINATE ON THE ADHERENCE OF AUTOCHTHONOUS *C. ALBICANS* TO BUCCAL EPITHELIAL CELLS (*IN VITRO*). MED ORAL 2003;8: 188-96.

SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate the effect of Heavy Molecular Weight Chitosan (HMWCh) and Sodium Alginate (NaAl) on fungal adherence. *C. albicans* was identified and isolated from non-stimulated saliva extracted from male and female healthy adults. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for each of the biopolymers. MIC values were 0.25 % (W/V) for HMWCh and 0.10 % (W/V) for NaAl. Fungal cell hydrophobicity was evaluated against xylene in the

presence of HMWCh. Statistically significant differences between the control (without HMWCh) and the different HMWCh concentrations in fungal suspension were observed ($P < 0.05$). The fact that HMWCh and NaAl impaired fungal adherence to buccal epithelial cells (BEC) as compared to control revealed that polymers inhibit *Candida albicans* adherence to BEC (HMWCh and NaAl: $P = 0.00001$), NaAl being more effective than HMWCh ($P = 0.00001$). HMWCh detached and aggregated *C. albicans*, including the fungi and BEC in the mesh. NaAl inhibited adherence, aggregated and entrapped the fungi in the mesh, excluding BEC. We may conclude that both biopolymers are effective. However, NaAl is a stronger inhibitor of adherence. Thus, in combination or alone, these biopolymers could be used in the treatment of oral candidosis.

Key words: Chitosan, sodium alginate, *C. albicans*, adherence, epithelial buccal cells.

INTRODUCTION

Oral candidosis is a common infection in elderly people who wear dentures. *C. albicans* is the most abundant microorganism that colonizes the acrylic denture pores, re-infecting the oral cavity. High fungal counts in saliva are a frequent (78 to 100%) finding in people who wear dentures as compared to dentate individuals (30-60%) (1-3). The prevalence of this infection is higher in immunodeficient individuals, i.e. patients with hematological disorders, HIV, transplanted, or diabetic patients, or those who suffer from xerostomy induced by prolonged antibiotic therapy or cytotoxic drugs (4,5).

Fungal adherence to hard surfaces or oral epithelium involves active chemotaxis, interaction between free surface energy, zeta potential and hydrophobic components. The role of salivary components in the steric interaction forces between the surface of the microorganism and the host is significant. This interaction on the biofilm enhances the synergy between microorganisms. When exogenous agents (drugs, antiseptic agents, etc.) modify initial adhesion, they interrupt microbial invasion and the subsequent invasion of the host tissue (6,7).

Adherence profiles depend on the structural characteristics of the microorganism and on the polymorphism of the receptors (glycoproteins, proteins) which is characteristic of the different sites in the oral cavity (8).

Studies carried out by our team revealed that subjects suffering from oral candidosis show deficiencies in certain salivary components related to the local defense system (9). These deficiencies respond to treatment with ketoconazole and nystatin (10). It has been demonstrated that nystatin and ketoconazole induce resistance. Prolonged treatments frequently cause side effects (nausea, vomiting, toxicity, etc.), that may not be tolerated by the patient. The cleansing effect of the salivary flow and of the oral muscles modifies the initial concentrations of the administered drug. Thus, the concentration values that are necessary to achieve a therapeutic effect cannot be reached and the agent loses effectiveness (11).

In vitro studies performed at our laboratory have shown the effectiveness of Heavy Molecular Weight Chitosan (HMWCh)

and Sodium Alginate (NaAl) in the entrapping and adsorption of autochthonous strains of *S. mutans* and *C. albicans* on small hydroxyapatite beads (12). The aim of the present study was to impair adhesion to epithelial cells and acrylic surfaces using HMWCh and NaAl.

On the basis of these results we wish to continue developing these polymers, that are biocompatible, bacteriostatic and harmless for the host, to potentially control oral infections.

MATERIALS AND METHODS

- *Microorganisms* : *C. albicans* strains were isolated from patients who attended the Oral Health Care Unit of the School of Dentistry of the National University of Córdoba. Isolation was performed in selective Sabouraud agar with chloramphenicol 1% (Biokar Diagnostics, France) and incubated for 48 to 72 hs at 37° C (13, 14). The strains were identified by the germ-tube test, evaluation of morphological characteristics on cornmeal agar and the commercially available API 20 AUX (API System, bioMérieux, France) identification kit.

- *Biopolymers*: We employed Heavy Molecular Weight Chitosan (HMWCh) 1 % purified, diacetylated at 85% (Sigma), approximate molecular weight 300 kD and 280 cps viscosity dissolved in acetic acid 0.1N to reach a pH 5.9.

We also employed Sodium Alginate (NaAl) high viscosity at 2 % (W/V) (Aldrich). We prepared dilutions at 1g %. The solutions were submitted to constant shaking at 40° C until solubilization had been completed.

Changes in the conformation of HMWCh and-NaAl were induced by adding PBS 0.4 M, pH 7 and CaCl_2 1 M respectively, at the time of each assay.

- *Preparation of the yeast suspension*: The isolated strain was suspended in Sabouraud broth (5×10^6 cell/mL) and incubated for 16 h at 37° C. The cells were transferred in sterile PBS, pH 7.4, and washed twice. The yeasts were resuspended to a concentration of 10^6 - 10^7 cells/mL at 520 nm. The samples were allowed to stand at room temperature for 5 min. The biopolymers were then added at the above-mentioned concentrations, above and below the minimum inhibitory concentration. Control samples were left untreated. Finally, samples were gently shaken at $3000 \times g$ for 5 minutes. The supernatant was removed and the sediment was washed twice with PBS. Aliquots of the supernatant and sediment resuspended in PBS were taken. Gram stained samples were used to assess morphological changes by light microscopy (15).

- *Evaluation of Biopolymers Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*: Evaluation was based on the criteria of Tarsi et al. (16) with modifications. Concentrations of HMWCh ranging from 0.10-1 % (W/V) and concentrations of NaAl in the 0.05-2 % (W/V) range, reaching a final volume of 1 mL were evaluated. Serial two-fold dilutions of each of the biopolymers were prepared in Sabouraud dextrose broth (Biokar Diagnostics). We then added 1.0 mL of PBS pH 7 for HMWCh and 1.0 mL Cl_2Ca pH 7 for NaAl, inoculated both preparations with 5×10^6 CFU/mL of *C. albicans* and incubated the mixtures at 37° C for 24 hs. MIC was visually and spectrophotometrically defined as the

concentration of biopolymers that resulted in the greatest inhibition of fungal growth.

- **Hydrophobicity assay:** The hydrophobicity level was determined following the technique of Tarsi et al. (17). *C. albicans* was grown overnight in PBS, pH 7 ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) either in the presence or in absence of the biopolymers. HWMCh was used at concentrations of 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 % (W/V) and NaAl was used at concentrations of 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 % (W/V). The fungal suspension without biopolymers was used as control. Optical density (OD) was then measured at 520nm. Samples of 1mL were placed in test tubes, and equal amounts of p-xylene were added. Following 10 min of pre-incubation at 37°C, the tubes were vortexed for 1 min and allowed to stand at room temperature for 20 min. The lower aqueous phase was then removed, and the OD₅₂₀ of the suspension was measured by spectrophotometry. The results are expressed as the percentage of the initial OD₅₂₀. The data represent the mean plus the standard deviation of the repeated assay.

- **Aggregation of *C. albicans* to biopolymers:**

High Molecular Weight Chitosan: To measure the interaction between HMWCh and *C. albicans*, culture suspensions of strains of *C. albicans* (10^6 UFC/mL) in a Sodium Phosphate solution were allowed to stand at room temperature for 5 minutes. We then added HMWCh 0.25 % (W/V) and the pH was then adjusted to 7.0 by adding a solution of sodium phosphate or sodium hydroxide (csp). The samples were then submitted to gentle shaking and centrifuged at 3000 xg for 5 minutes. The supernatant was removed and the precipitate was washed twice with a solution containing sodium phosphate 125 mM, pH 7.0, and resuspended using similar volumes of the same solution. Similar samples of the supernatant and the resuspended precipitate were stained with Gram stains and employed to assess the morphological changes by light microscopy.

Sodium Alginate: Culture suspensions of fungal strains (10^6 UFC/mL) were prepared. Sodium Alginate 0.10g % (W/V) was added. CaCl_2 1M was added to induce the conformational change in the biopolymer. The pH was adjusted to 7. The preparation was then allowed to stand at room temperature for 15 minutes. Samples of the supernatant and the precipitate were taken and processed as previously described for light microscopy evaluation.

- **Preparation of Buccal Epithelial Cells (BEC):** The method of Kimura and Pearsall (18) was used to prepare the buccal epithelial cells for the adherence assay. Cells were collected in the morning from six healthy adults, (three males and three females) by gentle rubbing of the right and left buccal mucosa with sterile cotton swabs, and dispersed in 10mL of sterile PBS. The pooled cell suspension was washed three times in PBS by centrifugation at 3.500 xg for 10 min. The washed epithelial cells had no yeast attached before the adherence assay. The cells were resuspended to a concentration of $1-2 \times 10^5$ cells/mL (Neubauer's haemocytometer Chamber; HB, Germany) and were used immediately for the adherence assay.

- **Adherence assay of *C. albicans* to Buccal Epithelial Cells (BEC):**

Preparation of the yeast suspension: The yeast suspension was prepared as previously described (15). The adherence assay was performed in keeping with the technique of Kimura and Pearsall (18) with modifications. Before the adherence test, 0.5 mL of the buccal epithelial cell were treated with inactivated saliva (30 min at 56 °C) and centrifuged at 3.000 x g for 5 min. For the assay, 0.5 mL of the pretreated buccal epithelial cells were mixed with either 0.5 mL of the HMWCh 0.25g % or NaAl 0.10g %. The conformational change was then induced. The yeast/ biopolymers/ epithelial cell suspension was mixed gently in tubes and incubated with gentle shaking at 37°C for 1h. A sample of the mixture was transferred to a glass slide, air-dried, fixed with methanol and stained with crystal violet. The number of adhering yeast cells was quantified by light microscopy at x 400 magnification. Fifty buccal epithelial cells were observed for each adhering yeast cell. Each assay was performed on three separate days with triplicate determinations each time.

- **Statistical Analysis:** The results of the hydrophobicity assays for HMWCh and adherence tests of *C. albicans* to BEC for control and HMWCh and NaAl treated samples were submitted to statistical analysis with Student's *t* test for paired and non paired samples and the Chi Square test. The significance level was set at $P < 0.05$.

RESULTS

- **Aggregation of *C. albicans* to biopolymers:** HMWCh aggregated and entrapped about 70% of the fungal cells, whereas with NaAl entrapping was close to 100%. In both cases, the data proved statistically significant (Figure 1 A, A', $P < 0.05$).

- **Minimal Inhibitory Concentration:** The formation of a polymer mesh, fungal entrapping by the polymers under study and turbidity of the supernatants were observed. MIC values were 0.25 % (W/V) for HMWCh and 0.10 % (W/V) for NaAl. Fungal growth was minimum at these concentrations.

The minimal colony growth in the supernatant demonstrates the fungistatic property of the biopolymers. As compared to control, the greatest inhibition values resulted in 85.7% growth reduction for HMWCh and 90.8% for NaAl. The differences with control were statistically significant ($P < 0.05$).

- **Hydrophobicity:** The hydrophobicity analysis of the fungal surfaces cultured in a medium supplemented with HMWCh revealed an increase in the OD as compared with control (strains developed without HMWCh) at increasing polymer concentrations. The results revealed a significant reduction in affinity for xylene for HMWCh ($P \leq 0.05$) (Fig. 2). No differences in OD were detected with NaAl as compared to controls.

- **Adherence assay of *C. albicans* to Buccal Epithelial Cells (BEC):** At optimum concentrations (MIC) both polymers can interact with *C. albicans*, interfering with the process of adhesion to BEC. Efficacy was demonstrated by the scarce number of fungal cells observed in the supernatant after the changes in conformation of the polymers.

Comparing control with the yeast/biopolymers/epithelial cell suspension, HMWCh was seen to aggregate and entrap both *C. albicans* and BEC, leaving a few cells in the supernatant (Fig. 3 A, 3 B and 3B', $P < 0.05$). NaAl showed similar results. However,

it did not include BEC in the mesh, and the presence of yeast in the supernatant was minimal (Fig 3C and 3C', $P < 0.05$).

Fungal adherence inhibition revealed statistically significant differences for HMWCh and NaAl ($P = 0.00001$) when compared to controls. When HMWCh and NaAl were compared, NaAl proved more effective ($P = 0.00001$).

The present results show statistically significant differences for both polymers ($P < 0.05$). However, no statistically significant differences were detected between the polymers in terms of capacity to inhibit adhesion.

DISCUSSION

C. albicans colonizes and infects the mucous surfaces in a greater proportion than other *Candida* spp, both *in vivo* and *in vitro*. Adherence is central to yeast colonization of the mucous surface. Not all *Candida* spp can adhere and infect mucous surfaces. *C. albicans*, a fungus with high prevalence in the oral environment has a great adherence capacity and can therefore cause oral candidosis (19).

Apart from the specific receptors, non specific forces participate in the bioadhesion process, i.e. van der Waal's forces, electrostatic double layer forces, interactions dependent on the solvent, hydrogen binding, hydrophobic, steric and covalent bonds (20, 21). Some of these forces are involved in the interaction between *C. albicans*, BEC and the surface of the polymers under study.

The results of the present study show that fungal growth at concentrations equivalent to MIC is minimal, a fact that would reinforce findings by our lab, that evidenced the antifungal property of both HMWCh and NaAl (12). The concentrations of 0.25% for HMWCh and 0.10 % for NaAl that inhibit *C. albicans* growth determined the optimum concentration at which to evaluate the interaction of these polymers with BEC. The capacity of these polymers to inhibit microbial growth was proved by Muzzarelli et al. (22, 23), who reported that these macromolecules effectively combine physicochemical and functional properties. Studies carried out by the same authors (24) with modified chitosans showed a 100% growth inhibition for *Streptococcus* spp and *Candida* spp, 0% antibacterial effect for *Streptococcus* spp and 100% antifungal activity for *Candida* spp. Our results reveal that at concentrations equivalent to MIC, HMWCh and NaAl interact with *C. albicans*, inhibiting fungal adherence to BEC via different mechanisms associated to the chemical structure of the polymers.

When analyzing hydrophobicity as a factor in the competitive association between HMWCh and NaAl and xylene with *C. albicans*, only HMWCh, due to its hydrophobic nature, showed an improved capacity to dislodge the organic solvent. Because of its polycationic origin, HMWCh may change the hydrophobicity of *C. albicans*' cell wall, producing complex polyelectrolites, where electrostatic forces associated with the zeta potential may show a stronger prevalence. NaAl, in turn, apparently interacts with the fungal wall. This may produce modifications allowing for detaching and entrapping of a higher amount of *C. albicans*, probably due to the attraction of similar forces. This process is favored by the mechanic properties of the gel and the release of calcium ions into the environment

(24,25).

It is a well known fact that *C. albicans* invasion of BEC depends on hydrophobicity, a property that increases the adhesion and resistance to macrophage action (26). Research by other authors demonstrated that at 37°C *C. albicans* is typically hydrophilic, and can spontaneously become hydrophobic. While hydrophilic molecules interact by adhesin receptors where macrophages are abundant, the adherence property of hydrophobic molecules would be related to an increase in superficial free energy. This effect depends on the participating interphases, i.e. if the change in energy is negative, the reaction occurs spontaneously. Although at the initial stage the hydrophobic molecules do not need specific receptors, the complex structure of the cell wall - mostly glucanes and chitin and particularly manoproteins with enzymatic and ligand-receptor activity- may allow adherence to the mucosal epithelial cell. Furthermore, changes in glycosylation of surface proteins express a hydrophobic protein structure. If the various adherence patterns effectively apply to the complex oral environment, this would reinforce the hypothesis that hydrophobic fungal cells are more reactive than hydrophilic cells (27).

Moreover, saliva pellicle action on BEC should also be considered. Few studies have demonstrated this effect *in vivo*, because of the different techniques employed and the varied chemical composition of whole saliva. However, Busscher (28) suggests that low molecular weight proteins reduce yeast adhesion, whereas salivary mucins have an important role in intraoral *C. albicans* adhesion and clearance.

Our results suggest that although both HMWCh and NaAl can inhibit *C. albicans* adherence to BEC, NaAl shows a better adherence inhibition property. This difference may be due to the physico-chemical characteristics and viscosity of the polymers under study.

The hydrophobic nature of HMWCh and the change to a hydrophilic structure it may undergo on the surface of *C. albicans* could break the adhesin-receptor bond between *C. albicans* and BEC. Thus, HMWCh would elicit entrapping via attraction forces of both *C. albicans* and BEC. Because of its hydrophilic nature, NaAl aggregates and entraps *C. albicans*, but does not seem to interact with BEC.

As Senel et al. (29) proposed, the use of bioadhesive gels as drug carriers may reduce administration frequency. In our view HMWCh and NaAl could be used, in combination or alone, by pharmacological companies to develop a therapeutic agent for the treatment of oral candidosis.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Samaranayake YH, Samaranayake LP *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol* 1994;41:295-310.
2. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994;5:125-57.
3. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? *J Dent Res* 1995;74:1152-61.
4. Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B Lesser M, Friedland GH. Oral Candidiasis in high risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984;311:354-8
5. Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human

- immunodeficiency virus infection. J Oral Pathol Med 1989;18:554-64.
6. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base material in-vivo and in-vitro. Crit Rev Oral Biol Med 1999;10:99-116.
 7. Gibbons, RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases. J Dent Res 1989;68:750-60.
 8. Gibbons, RJ. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: A contribution of oral microbiology. J Dent Res 1996;75:866-70.
 9. Dorronsoro de Cattoni ST, Cornejo LS, Lopez de Blanc S, Azcurra A, Calamari S, Femopase F, *et al* . Evaluation of serum and saliva components in candidosis patients. Acta Odont Latinoamer 1997;10:133-48.
 10. Cornejo LS, Lopez de Blanc S, Femopase F, Azcurra A, Calamari S, Dorronsoro de Cattoni ST *et al* . Evolution of saliva and serum components in patients with oral candidosis topically treated with ketoconazole and nystatin. Acta Odont Latinoamer 1998;11:15-25
 11. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Murata H, Subiwahjudi A. The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxyapatite beads. J Dent 1998;26:131-7.
 12. Virga C, Bojanich A, Calamari S, Cornejo LS, Dorronsoro de Cattoni S. Efecto de polimeros en la agregacion y adherencia sobre hidroxiapatita de cepas autoctonas de *St mutans* y *C. albicans* Revista Vasca de Odontoes-tomatología "aceptado para su publicación "
 13. Torres Rodriguez J.M. Micología Médica. Masson Editores; 1993. p. 407-15.
 14. Merz W, Roberts GD. Detection and recovery of fungi from clinical specimens, En Murray PR. Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology W DC; 1995. p. 709-22.
 15. Arjuna NB, Ellepola LP, Samaranayake, YH. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. Arch Oral Biol 1998;43:999-1007
 16. Tarsi R, Corbin B, Pruzzo C, Muzzarelli RA. Effect of low-molecular-weight chitosans on the adhesive properties of oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 1998;13:217-24..
 17. Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzman CA, Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. J Dent Res 1997;76:665-72.
 18. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun 1980;28:464-68.
 19. King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. Infect Immun 1980;27:667-74.
 20. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev 1991;55:1-20.
 21. Glantz PO, Arnebrant T, Nylander T, Baier RE. Bioadhesion -a phenomenon-with multiple dimensions. Acta Odontol Scand 1999;57:238-41.
 22. Muzzarelli RA. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animal and patients. Carbohydr Polym 1993;20:16-25.
 23. Muzzarelli RA, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo P. Antimicrobial properties of N-Carboxibutyl Chitosan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1990;34:2019-23.
 24. Cutler JE, Brawner DL, Hazen KC, Jutila MA. Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues. Infect Immun 1990;58:1902-08.
 25. Byrom D. Microbial Cellulosa Biomaterials. Novel materials from biological sources, U K Mac Millan publishers;1991. p. 265-83.
 26. Weinfeld I, Goldenberg Birman E, Rodrigues Paula C. Macrophage phagocytosis of *Candida albicans*. An in vitro study. Rev Odontol Univ Sao Paulo 1999;13:223-38.
 27. Hazen KC, Brawner DL, Riesselman MH, Jutila MA, Cutler JE. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. Infect Immun 1991;59:907-12
 28. Busscher H, Cowan MM, van der Mei HC. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. FEMS Microbiol Rev 1992;8:199-209.
 29. Senel S, Ikinici G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargon MF Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. Int J Pharm 2000;193:197-203.

Reconocimientos

Los autores agradecen a Amanda Schwint por la asistencia técnica. Esta investigación fue subsidiada por la Secretaría de Ciencia y Técnica de Córdoba (Secyt) de la Universidad Nacional de Córdoba y la Agencia Córdoba Ciencia.