

Estandarización de un método espectrofluorométrico para medición de proteasa aspártica secretada (Sap) de *Candida albicans*

Standardization of a spectrofluorometric method to measure secreted aspartic protease (Sap) from *Candida albicans*

Luz Stella Ramírez Aristizábal, Cristian Mauricio Arias, Jackeline Marulanda Osorio

Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira-Risaralda, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la proteasa aspártica secretada (Sap) es considerada un factor de virulencia en el proceso de infección por *Candida albicans*. La frecuencia de candidiasis a nivel mundial aumenta cada día, razón por la cual se hace necesario encontrar nuevos medicamentos que combatan esta enfermedad, al mismo tiempo desarrollar métodos que evalúen en forma rápida compuestos inhibidores de Sap.

Objetivo: estandarizar un método fluorescente para identificar la inhibición de actividad de Sap.

Métodos: se indujo la producción de Sap en cultivos de *C. albicans* según la metodología descrita por Capobianco y se evaluaron sus niveles por electroforesis en geles SDS-PAGE en diferentes lapsos de tiempos. La actividad de Sap fue verificada por espectrofluorimetría, para lo cual se determinaron las condiciones de reacción, variando las concentraciones de cobre y fluorexon, y los resultados de inhibición, se expresaron como disminución en la señal de fluorescencia. Como control de inhibición de Sap se utilizó Pepstatin A y como control positivo de actividad proteasa se utilizó pancreatina.

Resultados: se establecieron concentraciones de 5,5 y 5,0 μM para fluorexon y cobre respectivamente; el tiempo óptimo de acoplamiento de estos fue de 120 min y la mayor actividad de Sap se alcanzó a las 22 h de incubación.

Conclusiones: las condiciones estandarizadas para el método espectrofluorométrico, permiten confirmar la inhibición de Sap por Pepstatin A y demostrar que es un método viable para evaluar inhibidores de esta proteasa.

Palabras clave: *Cándida albicans*, inhibición, método espectrofluorométrico, proteasa aspártica secretada.

ABSTRACT

Introduction: the Secreted Aspartyl Protease (Sap) is considered a virulence factor in the infection process caused by *Candida albicans*. The frequency of candidiasis worldwide is increasing, hence the need for finding new drugs to fight this illness and also a quick and economic evaluation and screening methods to identify some Sap inhibition agents.

Objective: to standardize fluorescent method for identifying the Sap activity inhibition.

Methods: Sap production was induced in *C. albicans* cultures following the methodology described by Capobianco, their levels were evaluated by electrophoresis on SDS-PAGE gels at different periods of time. Sap activity was checked by spectrofluorometry, for which the reaction conditions were determined, varying the concentrations of copper and fluorexon, and the inhibition results were expressed as decreased fluorescence signal. Pepstatin A served as Sap inhibition control whereas pancreatin was the positive control of the protease activity.

Results: the concentration rates of 5.5 μM and 5.0 μM were found for fluorexon and copper, respectively; their optimal coupling times was 120 min and the maximum Sap activity was observed after 22 h of incubation.

Conclusions: the standardized conditions for the spectrofluorometric method allowed confirming the inhibition of Sap by Pepstatin A and showing that this is a viable method to evaluate inhibitors of this protease.

Key words: *Candida albicans*, inhibition, spectrofluorometric method, secreted aspartyl protease.

INTRODUCCIÓN

Cándida albicans es una levadura dimórfica que existe como un organismo comensal en la cavidad oral, tracto gastrointestinal, tracto genital femenino y ocasionalmente en la piel. Bajo condiciones de inmunosupresión, *C. albicans* se puede volver patogénica causando candidiasis oral, vaginal y/o sistémica.¹

Aunque la habilidad de causar enfermedad es un proceso complejo que involucra múltiples interacciones entre *C. albicans* y el hospedero, la mayoría de los estudios se enfocan en el rol de un grupo de proteasa aspártica (Sap), como factor de virulencia. Las evidencias que soportan el rol de Sap en virulencia son las siguientes: 1) alta correlación entre virulencia y niveles de expresión de la proteasa; 2) los mutantes con deficiencia de proteasa son menos virulentos o son avirulentos; 3) se han detectado Sap y anticuerpos de Sap, en hospederos

infectados; y 4) Sap puede degradar un amplio rango de sustratos, incluyendo proteínas relacionadas con defensas inmunológicas y estructurales, como IgG, queratina, colágeno acidificado y proteínas de matriz extracelular.²⁻⁶

Este tipo de proteasas comprende una familia de al menos 10 isoenzimas, de las cuales Sap2 es la que más se produce cuando *C. albicans* se cultiva en medios que contienen proteína como única fuente de nitrógeno,^{7,8} y en las primeras etapas de la infección.⁹

La estrecha relación entre proteasa y virulencia aunado a la creciente frecuencia de estas infecciones, así como la aparición de cepas resistentes a los medicamentos actuales, ha llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos,¹⁰ y a la necesidad de encontrar métodos rápidos de diagnóstico y de evaluación de potenciales inhibidores de estas proteasas.¹¹

La tendencia en la implementación de análisis enzimáticos por fluorometría se ha incrementado en los últimos años.¹² En general, ésteres de fluoresceína a menudo se han empleado para el estudio de diversas actividades de la esterasa,¹³⁻¹⁵ fosfodiesterasa¹⁶ y fosfatasas,^{17,18} pero su uso para el estudio de la actividad de proteasas de *C. albicans* ha sido poco estudiado.

La actividad proteolítica ha sido medida usando albúmina sérica bovina (BSA), hemoglobina y estrato córneo humano como sustrato;¹⁹ sin embargo, estos métodos carecen de sensibilidad, en que el tiempo de consumo y expresión de la actividad en unidades proteolíticas es arbitrario. La síntesis de sustratos fluorogénicos para proteasas permite el desarrollo de un rápido ensayo de microtitulación fluorescente que define la actividad en términos de la actividad hidrolítica, por lo que el desarrollo de este tipo de metodologías se convierte en procedimientos promisorios para la evaluación de la actividad proteolítica de Sap. Es así como en el presente trabajo tiene el objetivo de estandarizar un método fluorométrico para la evaluación de la acción de proteasas obtenidas directamente de un cultivo de *C. albicans*.

MÉTODOS

Para la estandarización del método, se realizaron diferentes ensayos, con el fin de establecer las mejores condiciones, como determinación de las longitudes de onda de excitación, de emisión, *slit* de emisión, *slit* de excitación, voltaje del detector y filtros de excitación y de emisión; además de las concentraciones de fluorexon, cobre, pH del *buffer* y tiempos de acoplamiento de los reactivos.

MÉTODOS DE ENSAYO

Se utilizó como indicador de fluorescencia fluorexon, un bisiminodiacetato derivado de la fluoresceína.²⁰ El ensayo se fundamenta en la capacidad que tiene el fluorexon para formar un complejo de transición no fluorescente con el Cu⁺², el cual es desplazado por los aminoácidos liberados en la proteólisis del BSA causada por Sap; el compuesto al perder su enlace con el cobre recupera su fluorescencia, como se observa en la [figura 1](#).

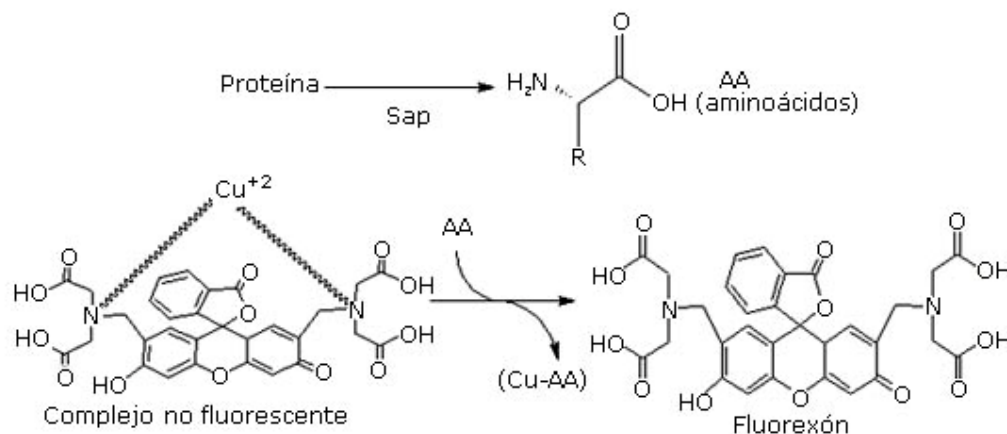


Fig. 1. Interacción cobre-fluorexón-aminoácido.

Se trabajó con soluciones de cobre, fluorexon, medio de cultivo YNB (base nitrógeno levadura) suplementado con (BSA 0,1 %) y *buffer* fosfato pH 5,0. Las mediciones se realizaron sobre placas de 96 pozos, en un Fluorescence Spectrophotometer Cary Eclipse Varian con un rango de longitudes de onda entre 260 nm y 541 nm; se adicionaron 25 μ L de cada una de las soluciones y se completó con *buffer* fosfato pH 5,0 hasta un volumen de 250 μ L. Con el fin de determinar las mejores condiciones de reacción, se evaluaron concentraciones de 0,34; 0,69; 1,38; 2,75; 5,5; 11 y 13,2 μ M para el fluorexon y de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 y 10 μ M para el cobre.

Además de variar las concentraciones, también se analizaron los tiempos de acoplamiento entre el fluorexon y el cobre estableciéndose la cinética de esta reacción, la cual se realizó por un período de 4 h realizando medidas cada 20 min. Adicionalmente se empleó como control de actividad proteasa, solución de pancreatina, a una concentración de 2,0 mg/mL, y se realizó el seguimiento por fluorometría.

CRECIMIENTO DE *Candida albicans* Y PRODUCCIÓN DE Sap

La cepa de *C. albicans* ATCC 10231 se replicó en Biggy agar (Oxoid). Se inoculó 1 colonia/mL de medio que contenía YNB y BSA 0,1 % , se incubó a 29 °C; se extrajeron muestras del cultivo de *C. albicans* cada 2 h durante 30 h, con el fin de monitorear el crecimiento, la producción de Sap y el pH durante el proceso. El crecimiento se evaluó por siembra directa sobre agar biggy y haciendo recuento de colonias.

Para evaluar la producción de Sap, cada una de las muestras separadas se centrifugó a 10 000 r.p.m. durante 10 min y el sobrenadante se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE para determinar la pureza de la proteasa y su masa molecular.

Una vez identificados los tiempos en que se inicia la producción de Sap, se realizó un nuevo inóculo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente y se extrajeron muestras en los tiempos de mayor producción, los cuales correspondieron a 16 h; 18 h; 20 h; 22 h; 24 h y 26 h para ser evaluados por fluorometría, siguiendo la técnica estandarizada.

HIDRÓLISIS HEMOGLOBINA

Como método alternativo para verificar la producción de Sap, se realizó una siembra de *C. albicans* con un hisopo sobre una placa de agar Ogy suplementado con sangre, incubando por un período de 2 días a 29 °C. La producción de proteasa se verificó por la hidrólisis de la hemoglobina.

ACONTROL MEDIANTE INHIBICIÓN DE Sap POR PESTATIN A

Para verificar la aplicación de la técnica espectrofluorométrica, se usó como control positivo Pepstatin A (p531825 Sigma), un inhibidor específico de actividad de Sap;²¹ la adición al cultivo de Pepstatin A se realizó luego de 4 h de crecimiento del microorganismo y se evaluaron 4 concentraciones diferentes de Pepstatina A, las cuales corresponden a 500 µM; 250 µM; 100 µM y 10 µM; los cultivos que no contenían Pepstatin A, se tomaron como referencia para verificar la producción de Sap. Se colectaron muestras de 18 h, 20 h y 22 h de incubación de cada uno de los cultivos, los cuales se evaluaron por electroforesis SDS-PAGE y fluorometría.

Todas las muestras se centrifugaron a 10 000 r.p.m. durante 10 min; el sobrenadante se utilizó para correr el gel de electroforesis SDS-PAGE, y para mediciones por fluorometría.

ELECTROFORESIS POR SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE para proteínas se realizó utilizando la metodología sugerida en el kit de BIORAD, usando gel de resolución del 4 % en acrilamida, y un gel de concentración del 10 %. La electroforesis se corrió con cambios de diferencia de potencial de 80, 100 y 120 Voltios a tiempos de 30, 45 y 45 min respectivamente. El gel se tiñó con una solución de azul brillante de Commassie.

RESULTADOS

PROGRAMACIÓN DEL EQUIPO

Las condiciones adecuadas encontradas en los ensayos después de un barrido espectral se muestran en la [tabla 1](#); las longitudes de onda de excitación y emisión coinciden con las informadas por *Dean et al.*²⁰

Tabla 1. Condiciones experimentales empleadas en la cuantificación por espectrofluorometría

Parámetro	Programación
Longitud de onda de excitación (nm)	486
Longitud de onda de emisión (nm)	525
Slit de excitación (nm)	5
Slit de emisión (nm)	5
Detector de voltaje PMT	Bajo (400)
Filtro de excitación	Auto
Filtro de emisión	Abierto

Con el fin de encontrar las concentraciones de fluorexon y cobre ideales para la formación del complejo, se dejó constante la concentración de uno de los reactivos haciendo variar la del otro, y se realizaron gráficas de concentración contra señal de fluorescencia, presentadas en las figuras 2 y 3.

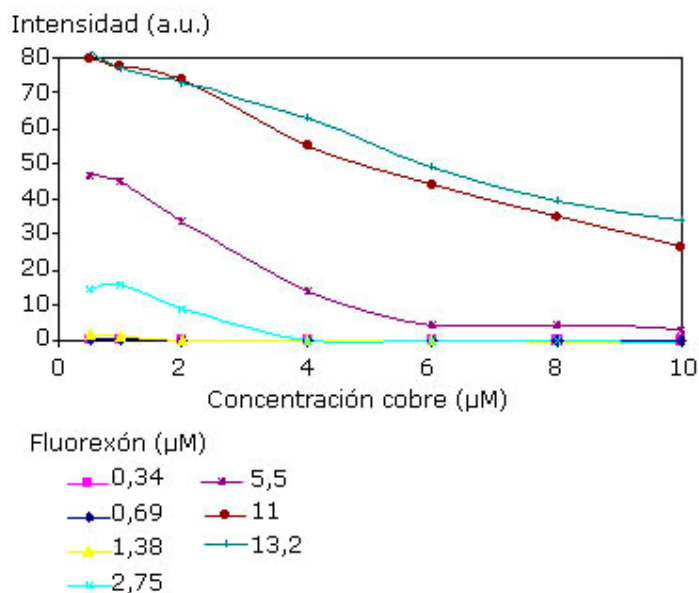


Fig. 2. Variación de la fluorescencia en función de la concentración de cobre a distintas concentraciones de fluorexon.

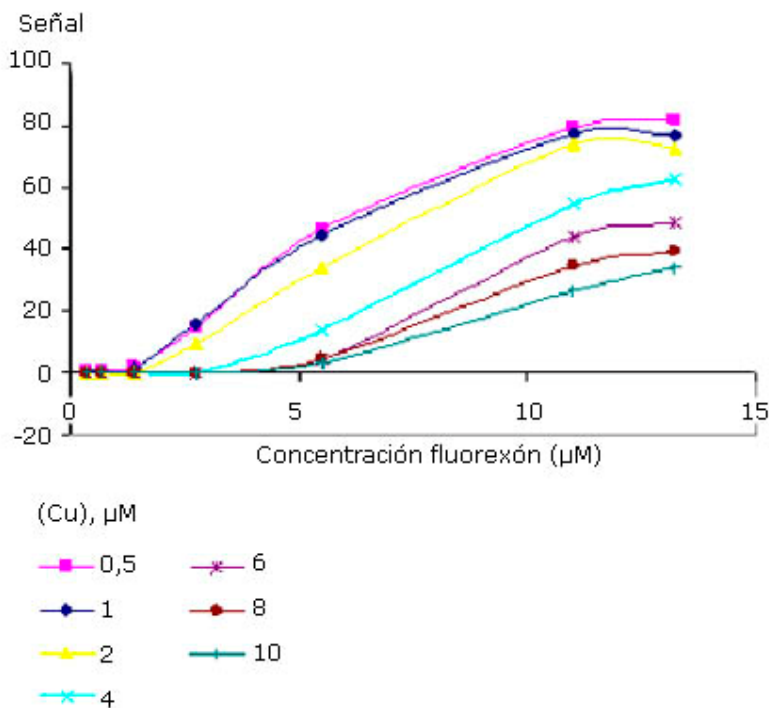
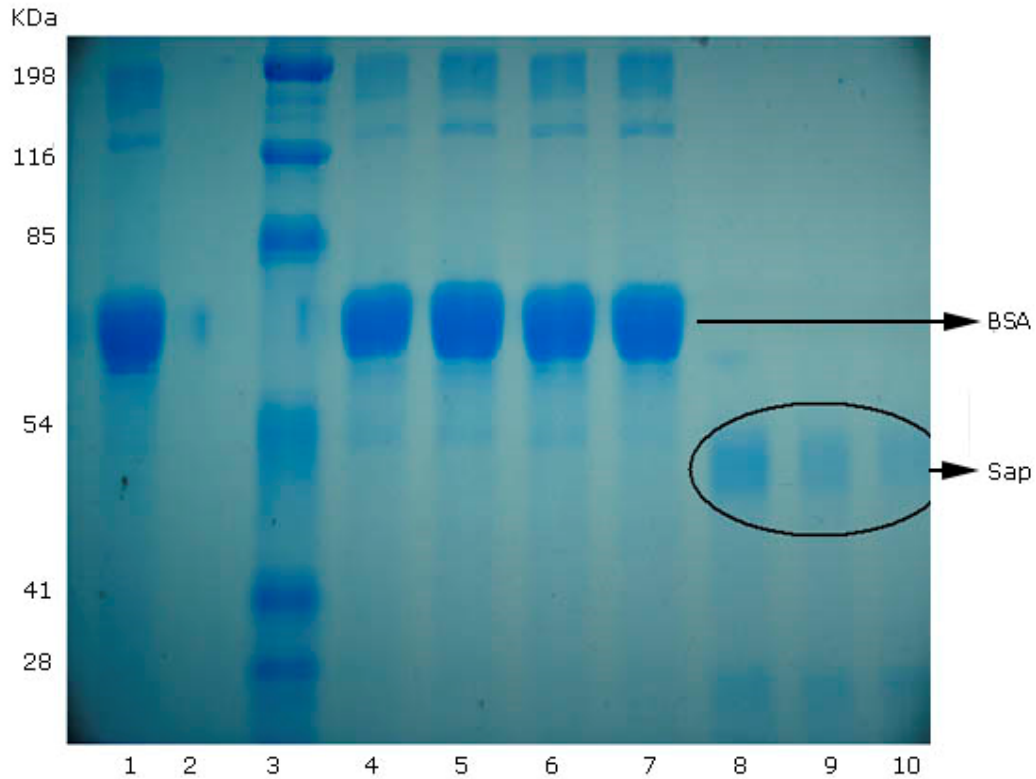


Fig. 3. Variación de la fluorescencia en función de la concentración de fluorexon a diferentes concentraciones de cobre.

PRODUCCIÓN DE Sap

En la [figura 4](#) se muestran los resultados de electroforesis, donde se tiene que: 1) medio BSA 0,1 %; 2) Pepstatin A (100 μ M); 3) marcador peso molecular; 4) *C. albicans* + Pepstatin A (100 μ M). 5) *C. albicans* (6 h); 6) *C. albicans* (8 h); 7) *C. albicans* (10 h); 8) Sap 22 h; 9) Sap 24 h; 10) Sap 26 h.



I: medio BSA 0,1 %; 2) Pepstatin A (100 μ M); 3) marcador peso molecular; 4) *C. albicans* más Pepstatin A (100 μ M); 5) *C. albicans* (6 h); 6) *C. albicans* (8 h); 7) *C. albicans* (10 h); 8) Sap 22 h; 9) Sap 24 h; 10) Sap 26 h.

Fig. 4. Electroforesis para la producción de Sap.

Asimismo, en la [tabla 2](#) se presentan los valores de pH obtenidos entre las 8 h y 30 h de crecimiento, tomados cada 2 h.

Tabla 2. Valores de pH registrados en el tiempo

Tiempo (h)	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
pH	5,13	4,90	4,65	4,06	3,86	3,68	3,65	3,55	3,53	3,51	3,49	3,49

Durante el período de incubación de *C. albicans* inducida, se encuentran diferentes niveles de producción de Sap; la evaluación por fluorimetría de los tiempos de mayor producción de Sap se muestra en la [figura 5](#), las velocidades de reacción alcanzadas durante este, se representan por las pendientes de la curvas para un período comprendido entre 5 min y 10 min, correspondientes a 0,2365; 0,5003; 0,4691; 0,5827; 0,5102 y 0,4636 respectivamente.

INHIBICIÓN DE PRODUCCIÓN DE Sap

En la [figura 6](#) se muestra la inhibición de Sap por acción de Pepstatin A para una medición espectrofluorométrica realizada a un cultivo de 20 h de incubación.

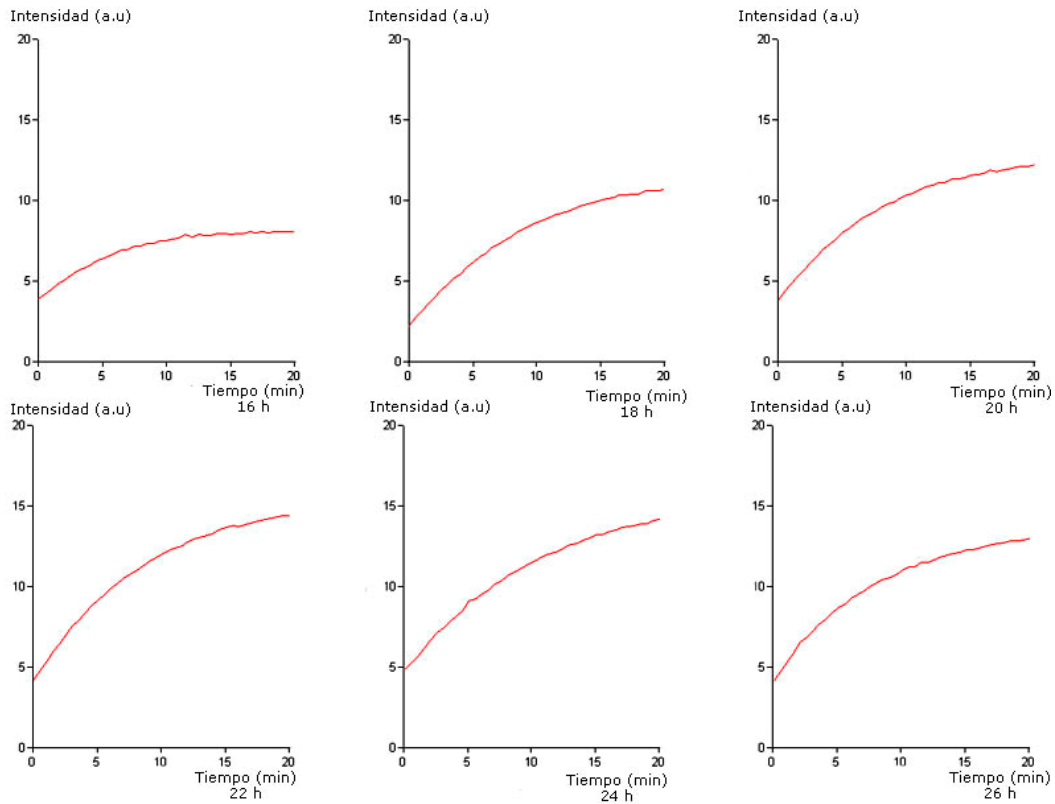
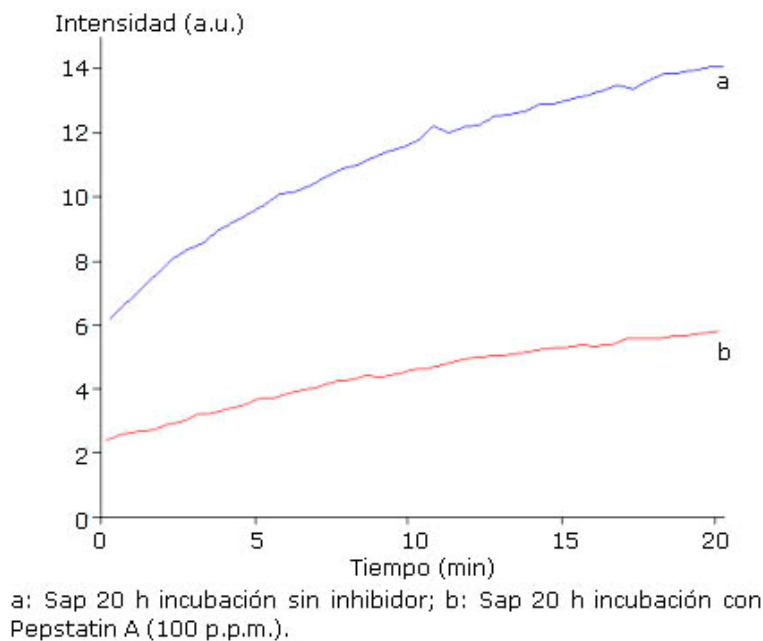


Fig. 5. Medición de la actividad de Sap mediante espectrofluorometría a diferentes tiempos de incubación.



a: Sap 20 h incubación sin inhibidor; b: Sap 20 h incubación con Pepstatin A (100 p.p.m.).

Fig. 6. Inhibición de Sap por pepstatin A.

DISCUSIÓN

Para una concentración constante de fluorexon de 5,5 μM , existe un mayor gradiente de señal (Fig. 2). Cada punto representa el valor promedio obtenido por al menos tres repeticiones independientes. Se muestra el cambio en la señal de fluorescencia cuando se hace variar la concentración de cobre manteniendo la concentración de fluorexon constante.

La mejor concentración para el fluorexon es de 5,5 μM y para el cobre se encontraba entre 4 μM y 6 μM , por lo que se decidió trabajar con el promedio de 5,0 μM ; esta concentración de cobre permitió disminuir la fluorescencia con un mejor gradiente de señal, dejando menor cantidad de cobre residual, lo cual facilitó el retorno de la señal, al reaccionar con los aminoácidos (Fig. 2 y 3).

La cinética de acoplamiento de fluorexon y cobre muestra que el tiempo de reacción debe ser por lo menos 120 min, para que se estabilice la señal y así, asegurar la constancia en la intensidad de fluorescencia, permitiendo reproducibilidad en las mediciones.

El análisis de fluorescencia para la proteasa utilizada como control positivo, usando el sistema fluorexon cobre, muestra que al adicionar este grupo de enzimas en presencia del BSA, induce un incremento en la señal de fluorescencia, lo cual demuestra la degradación del sustrato por acción de las proteasas.

En los resultados de la electroforesis (Fig. 4), durante el crecimiento de *C. albicans*, la banda correspondiente al BSA permanece constante durante las primeras 10 h y no se evidencia producción de Sap; a las 12 h de crecimiento aparece una nueva banda que coincide con la masa molecular de Sap 2 (41 KDa) y el pH óptimo de $\pm 4,0$.^{7,21} Además, otros informes sustentan que dicha enzima es la que más se produce cuando *C. albicans* se cultiva en medios que contienen proteína como única fuente de nitrógeno.^{7,8} En los carriles 8, 9 y 10 que corresponden a tiempos de incubación de 22 h, 24 h y 26 h se observa la más alta concentración de las proteasas y la ausencia completa de la banda de BSA lo que evidencia una hidrólisis completa de este.

En la [tabla 2](#) se evidencian los cambios de pH que se dan en el cultivo a medida que se va dando la producción de las proteasas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayor producción de Sap en las condiciones descritas se obtiene a un pH entre 4,65 y 3,51, luego de un período de incubación entre 12 h y 26 h a 29 °C; resultado similar al obtenido por Capobianco,¹¹ el cual muestra que los máximos niveles de enzima se alcanzan entre las 10 h y 24 h. Estos resultados coinciden con los informados sobre la familia de este grupo de proteasas donde el pH óptimo²² se encuentra entre 3,5 y 4,0.

Los resultados presentados en la [figura 5](#) permiten inferir que la mayor actividad de Sap se alcanza a las 22 horas de incubación, cuando se obtiene el valor más alto de la pendiente, lo cual corresponde a un pH alrededor de 3,55; lo que demuestra una vez más la influencia del pH en la actividad de Sap. Además corrobora los resultados obtenidos en el gel de electroforesis donde también se aprecia que la mayor producción de Sap se da a las 22 h de incubación. Estos resultados permiten establecer los tiempos de mayor productividad, lo cual puede ser aprovechado para conocer las propiedades bioquímicas de esta familia de proteasas, así también como el momento adecuado para la degradación de estas por parte de agentes inhibitorios.

En siembras realizadas sobre placas de agar-sangre, se evidenciaron zonas claras de hidrólisis de la hemoglobina, en el cultivo que no tenía inhibidor de Sap, con lo cual se corroboró la producción de proteasa; el cultivo al que se le había adicionado Pepstatin A mostró clara acción del bloqueo por este inhibidor, en la reacción de hidrólisis. (Resultados no mostrados).

En la [figura 6](#) (a) se observa un aumento constante de fluorescencia, ya que la producción de Sap degrada la cadena de aminoácidos del BSA, lo que induce un aumento en la señal. En la [figura 6](#) (b) la señal es baja, puesto que la Pepstatin A inhibió la producción de Sap, por tanto no hubo liberación de aminoácidos que permitiera competir con el cobre para restaurar la señal del fluorexon. Lo anterior coincide con los resultados de la literatura que informan la Pepstatin A como un inhibidor específico de actividad de Sap, que en un rango de concentraciones de 1,0 μM y 10 μM , inhibe entre 18 y 78 % aproximadamente.^{23,24}

Al comparar los resultados obtenidos por electroforesis SDS-PAGE y fluorometría, es evidente que la presencia de Sap se encuentra estrechamente relacionada con la degradación de BSA, por lo que la no hidrólisis de BSA es sinónimo de inhibición de la actividad de Sap.

La aplicación de esta técnica fluorescente para el análisis de actividad proteolítica hace posible el estudio de un amplio número de muestras como posibles inhibidores de Sap en muy poco tiempo y a bajos costos, complementando con las técnicas de electroforesis e hidrólisis de la hemoglobina, permitirán evaluar un gran número de compuestos y trabajar con diferentes aislamientos de *C. albicans* para determinar sensibilidades y resistencias.

En conclusión, se logró estandarizar un método para evaluar la producción de proteasa aspártica secretada de *C. albicans*. Las condiciones estandarizadas permitieron confirmar la inhibición de Sap por Pepstatin A y demostrar que es un método viable para evaluar inhibidores de esta proteasa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias-contrato Cenivam 432-2004 y a la Universidad Tecnológica de Pereira.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Odds F. *Candida* species and virulence. ASM News. 1994;60:313-8.
2. Douglas LJ. *Candida* proteinases and candidosis. Crit Rev Biotechnol. 1988;8:121-9.
3. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Ann Rev Microbiol. 1991;45:187-218.
4. Ruchel R, de Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *Candida* acid proteinases. J Med Vet Mycol. 1992;30(Suppl 1):123-32.
5. White TC, Kohler CA, Miyasaki SH, Agabian N. Expression of virulence factors in *Candida albicans*. Can J Botany. 1995;73(S1):1058-64.

6. Ray TL, Payne CD, Morrow BJ. *Candida albicans* acid proteinase: Characterization and role in candidiasis. Aspartic proteinase conference on structure and function of the aspartic proteinases: Genetics, structures, and mechanisms. California: Plenum Press; 1990. p. 173-83.
7. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. Mol Microbiol. 1994;14:87-99.
8. White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J Bacteriol. 1995;177:5215-21.
9. Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Yamahoto Y, Kuroda K, et al. *Candida albicans* Possesses Sap7 as a Pepstatin A-Insensitive Secreted Aspartic Protease. PloS One. 2012;7(2): e32513.
10. Cutfield SM, Dodson EJ, Anderson BF, Moody PC, Marshall CJ, Sullivan PA, et al. The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors. Structure. 1995;3:1261-71.
11. Capobianco JO, Lerner CG, Goldman RC. Application of a fluorogenic substrate in the assay of proteolytic activity and in the discovery of a potent inhibitor of *Candida albicans* aspartic proteinase. Anal Biochem. 1992;204:96-102.
12. Goddard JP, Reymond JL. Recent advances in enzyme assays. Trends Biotechnol. 2004;22:363-70.
13. Breeuwer P, Drocourt JL, Bunschoten N, Zwietering MH, Rombouts FM, Abee T. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluoresceindiacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. Appl Environ Microbiol. 1995;61:1614-9.
14. Lomolino G, Lante A, Crapisi A, Spettoli P, Curioni A. Detection of *Saccharomyces cerevisiae* carboxy lesterase activity after native and sodium dodecyl sulfate electrophoresis by using fluorescein diacetate as substrate. Electrophoresis. 2001;22:1021-3.
15. Kierat RM, Kramer R. A fluorogenic and chromogenic probe that detects the esterase activity of trace copper(II). Bioorg Med Chem Lett. 2005;15:4824-7.
16. Takakusa H, Kikuchi K, Urano Y, Sakamoto S, Yamaguchi K, Nagano T. Design and synthesis of an enzyme-cleavable sensor molecule for phosphodiesterase activity based on fluorescence resonance energy transfer. J Am Chem Soc. 2002;124:1653-7.
17. Wang Q, Scheigetz J, Roy B, Ramachandran C, Gresser MJ. Novel caged fluorescein diphosphates as photoactivatable substrates for protein tyrosine phosphatases. Biochim Biophys Acta. 2002;1601:19-28.
18. Gee KR. Novel fluorogenic substrates for acid phosphatase. Bioorg Med Chem Lett. 1999;9:1395-6.

19. Dostal J, Hamal P, Pavlickova L, Soucek M, Rumi T, Pichova I . Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2): 712-6.
20. Kathryn Dean ES, Gerard K, Olivier R, Jean-Louis R. A Green Fluorescent Chemosensor for Amino Acids Provides a Versatile High-Throughput Screening (HTS) Assay for Proteases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13:1653-6.
21. Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol.* 1998;28: 543-54.
22. Ruchel R, Tgegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. *Saboraud.* 1982;20:233-44.
23. Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B, Korting HC. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2003;52:247-9.
24. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on *in vitro* activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2038-42.

Recibido: 19 de diciembre de 2013.

Aprobado: 20 de enero de 2014.

Luz Stella Ramírez Aristizábal. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira-Risaralda, Colombia. Correo electrónico: luramire@utp.edu.co