

Distintas patologías debidas a *Candida albicans* y a *Geotrichum candidum*

Dres Ángel Alonso, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico, Pablo A. Riquelme

Div. Alergia e Inmunología - Hospital de Clínicas - Universidad de Buenos Aires - Sociedad Científica Argentina
Asociación Química Argentina - Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Se exponen las diferentes propiedades biológicas de ambos hongos y el papel que ellas juegan en distintas patologías humanas.

Palabras claves. Hongos, hifas, glucoproteínas, microbiota, piel y mucosas.

Different Pathologies Caused by *Candida albicans* and *Geotrichum candidum*

Summary

The different biological properties of both fungi and the role they play in different human pathologies are presented.

Keywords. Fungi, hyphae, glycoproteins, microbiota, skin and mucosa.

Abreviaturas

Ca: *Candida albicans*.

SAP: Aspartil proteinasas (codificadas por 10 genes).

PL: Fosfolipasas.

Gc: *Geotrichum candidum*.

UNP/mL: Unidades de nitrógeno proteico/mL.

SDS-PAGE: Dodecil-sulfato.

SAP: Aspartil proteinasas, codificadas por 10 genes.

PL: Fosfolipasas.

DTT: Dithiothreitol.

SDS-PAGE: Dodecil-sulfato.

BCIP: 5-Br-4-cloro-3-indolil-fosfato.

PRU: Phadebas RAST Units.

DTT: Tubo de drenaje transtimpánico.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

suero ELISA: Prueba de laboratorio que se usa para detectar anticuerpos en la sangre.

Anti-IgE: Anticuerpo monoclonal.

PRU/ml: Unidad de medida de la inmunoglobulina.

Correspondencia: Dr. Ángel Alonso
Correo electrónico: aalonsomed@gmail.com

Introducción

Candida albicans (Ca) es un hongo diploide en forma de levadura perteneciente a la familia de los *Saccharomycetales*. Es un organismo comensal que forma parte de la microbiota normal de los aparatos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, pero al disminuir la inmunidad del portador se hace patógeno y cambia de levadura a hifa filamentosa. Actúa en la digestión de los azúcares, por la fermentación, por ello, su importancia en los diabéticos. Posee 2 familias de enzimas degradativas asociadas con la invasión. Son las aspartil proteinasas (SAP, codificadas por 10 genes) y las fosfolipasas (PL). Las SAP de la pared celular hidrolizan proteínas como colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas. Así, evade la respuesta inmune. SAP 1, 2 y 3 son secretadas por levaduras, dañan tejidos e invaden el epitelio oral y la epidermis. SAP 4, 5 y 6, producidas por hifas, provocan infección sistémica. Las fosfolipasas, o PLA, PLB, PLC y PLD, siendo PLB1 necesaria para la virulencia e invasión pues hidroliza las uniones éster de los glicero-fosfolípidos de la membrana celular del hospedero.¹⁻³⁻⁴⁻⁶⁻⁷

Geotrichum candidum (Gc) es un hongo asociado a la piel, mucosas y heces. Es un organismo del suelo, agente de la enfermedad humana geotrichosis, y de la pudrición ácida de cítricos, tomates y zanahorias. Es utilizado en la producción de quesos y yogures. En 2001 se publicó que *G. candidum* podía consumir el policarbonato de los CD y DVD. Se conoce que Ca produce reacciones inmediatas y tardías de hipersensibilidad tanto cutáneas como respiratorias, en personas sensibles a sus antígenos, como en los animales de experimentación. Considerando que Gc es una levadura del mismo orden taxonómico que Ca, y que su patogenia es poco frecuente salvo en inmunocomprometidos, se decidió estudiar sus proteínas y hexosas al igual que su antigenicidad en los humanos, y en los animales de experimentación.

Materiales y métodos

Tanto Ca como Gc fueron identificados por sus colonias y morfologías teñidas con coloración de Gram, y las fermentaciones de la glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa. En ambos casos, se preparó un extracto con 10.000 UNP/mL (Unidades de nitrógeno proteico/mL), según Frugoni, para el fraccionamiento por columna de Sephadex G-50, mientras que una dilución 1/10 fue preparada para las testificaciones cutáneas en pacientes con rinitis perenne y asma

bronquial, y para los sujetos sanos que integraron el grupo control.²⁻⁵

Pacientes: 20 varones entre 25 y 48 años, con rinitis perenne y asma bronquial, no fumadores, con antecedentes heredofamiliares de enfermedad respiratoria atópica, que nunca realizaron inmunoterapia específica, y que solo empleaban antihistamínicos por la vía oral y aerosolterapia con salbutamol y beclometasona integraron el grupo experimental, mientras que otros 20 varones entre 22 y 50 años, sin padecimiento respiratorio alguno, no fumadores y sin antecedentes personales o heredofamiliares de enfermedad atópica respiratoria constituyeron el grupo control, a los fines de valorar la hipersensibilidad a las pruebas cutáneas con los antígenos de Ca y Gc, obtenidos por pasajes en columnas de Sephadex G-50 y de DEAE-celulosa, y, de las glucoproteínas antigénicas de ambos hongos.⁸⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹²

Testificaciones cutáneas: Los extractos de Ca y de Gc, al igual que las fracciones obtenidas por las columnas de Sephadex y de DEAE-celulosa se esterilizaron por filtros Millipore de 0,22 µ antes de ser utilizadas en las pruebas intradérmicas de 0,02 mL en la piel del brazo, al igual que el habón control positivo de histamina 1/1000 y el habón control negativo de solución fisiológica estéril pH 7,2. Se leyeron a los 20 min., siendo positivo todo eritema-habón de 5 mm o más, en comparación con el habón positivo de histamina y el negativo de solución fisiológica. Se valoraron las reacciones a las 48 h con la producción de una induración propia de las reacciones de tipo tardío.

Inmunizaciones en animales: Conejos albinos adultos fueron inmunizados -por separado- con 0,5 mL del extracto puro de Ca más 0,5 mL del adyuvante de Freund completo, por un lado, y con 0,5 mL del extracto puro de Gc más 0,5 mL del mismo adyuvante, por vía intradérmica en la piel del lomo, por el otro, repartiendo las inoculaciones en habones de 0,20 mL por vez. Luego de 8 semanas de inmunizaciones, se tomó una muestra de sangre de la vena central de la oreja de cada animal, y luego de detectar la presencia de anticuerpos por medio de la técnica de Ouchterlony, se procedió a la sangría de los animales por punción cardíaca bajo anestesia general. Los diferentes inmunoseros obtenidos se guardaron a -20 °C, en recipientes de 5 mL cada uno, debidamente rotulados como Antisuero-anti-Ca y Antisuero-anti-Gc.

Fraccionamiento en columna de Sephadex G-50: Una columna de 480 mm x 10 mm se eluyó con un buffer de ClNa 0,15 M con fosfato a pH 8

y a 4 °C. Un mililitro y medio del extracto puro de Ca (y en otro pasaje con igual volumen de Gc), y, alícuotas de 1,5 mL se obtuvieron, a lo largo de todo el pasaje, y se leyeron por absorbancia a 280 nm de DO en un espectrofotómetro LKB Uvicord. Así se detectaron las proteínas, mientras que las hexosas fueron determinadas por el método del indol usando como solución estándar una mezcla de galactosa-manosa, y lectura en el espectrofotómetro a 470 nm de DO. Como marcadores proteicos se utilizaron: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), tripsinógeno (24 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Fraccionamiento por columna de intercambio iónico: Dos mililitros del primer pico obtenido por Sephadex G-50 (de ambos antígenos) fueron concentrados por preevaporación, dializados contra un buffer de fosfato 0,01 M de pH 8, y pasados luego por una columna de DEAE-celulosa de 380 mm x 25 mm. La elución se realizó con un buffer fosfato desde 0,01 M → 0,2 M y de pH 8 → 6. Los contenidos de proteínas y de hexosas se midieron como se detalló anteriormente.³³

Técnicas inmunológicas: Los extractos de Ca y de Gc, y las fracciones obtenidas por Sephadex y por DEAE-celulosa, fueron testificados frente a un antisuero de conejo anti-Ca y otro anti-Gc, por Ouchterlony y la inmunolectroforesis, para valorar su antigenicidad en los animales y las propiedades de los anticuerpos, empleando los antisueros sin diluir.³⁵ Para la cuantificación de las proteínas se empleó el método de Bradford, con cada extracto y con el pico más significativo de las columnas, empleando como una solución de control a la albúmina sérica bovina.⁹

SDS-PAGE con gelatina: A minigeles de 10 x 10 cm cada uno y un espesor de 1,5 mm de acrilamida al 10%, según Laemmli, le agregamos gelatina al 0,15%. Una vez sembrados, se sometieron a 120 V por 2 horas. Cuando el control de azul de bromofenol llegó al final de la corrida, esta se detuvo, y los geles se lavaron 2 veces en agua destilada con Triton-X-100 al 0,1%, por 15 minutos cada lavado, y se incubaron a 37 °C en un buffer MES (2-(N-morpholino) etanoácido sulfónico a pH 6, en Tris AcH 100 mM a pH 3,5 y en Tris ClH 100 mM a pH 8,5, siempre con dithiothreitol (DTT) al 0,5 mM. La reacción se detuvo y las proteínas se colorearon con azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-ácido acético-agua en las proporciones 5:1:5 (v/v/v) a la temperatura ambiente. Luego se decoloraron con metanol al 20% y ácido acético al 10%, y las bandas activas se observan sin color sobre un fondo azul intenso. Luego, los lavados e incubaciones se hicieron con y sin inhibidores de

las actividades proteásicas y gelatinolíticas, que fueron: el E-64 en 100 mM, el TLCK en 0,5 a 1 mM, el TPCK en 0,5 a 2 mM, el PMSF en 2 mM, la leupeptina en 100 mM, la orto-fenantrolinea 1 mM y la pepstatina-A 100 mM. Los marcadores proteicos fueron: la fosfolipasa b (97,4 kDa), la ASB (66 kDa), la ovoalbúmina (45 kDa), la anhidrasa carbónica (29 kDa), el inhibidor de la tripsina (21,5 kDa) y la lisozima (14,4 kDa). Cuando se valoró el efecto inhibidor de la actividad enzimática y gelatinolítica, antes y después de las absorciones, se utilizaron: la alfa-2-macroglobulina (180 kDa), la beta-galactosidasa (120 kDa), la fructosa-6-fosfoquinasa (84 kDa), la piruvatocinasa (66 kDa), la fumarasa (55,3 kDa), la lactato-dehidrogenasa (43,6 kDa) y la triosa-fosfoisomerasa (30 kDa), que actuaron como patrones comparativos para estimar su peso molecular. Para detectar la actividad enzimática se empleó la técnica de J. J. Cazzulo, con un sustrato de 0,3 mM de Bz-Pro-Phe-Arg-pNa (Bz-PFR-pNa). Ninguna muestra corrida en los geles fue reducida o calentada antes de ser sembrada.

Western-blots: Las muestras, tratadas o no con DTT, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% con dodecil-sulfato (SDS-PAGE), electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, lavadas una hora en un buffer de Tris-solución fisiológica pH 7,6 conteniendo ASB al 2%, y luego, incubadas con los antisueros contra Ca y Gc al 1/250, en el caso de los de conejo, y al 1/10 en los humanos alérgicos. Luego de la incubación nocturna, se lavaron las membranas 3 veces y se incubaron, con una IgG de cabra anti-conejo al 1/3000 conjugada con fosfatasa alcalina -las tratadas con los sueros de conejo-, y con una IgG de conejo anti-IgE humana específica para cadena ε al 1/500 las de los sueros humanos conjugada con fosfatasa alcalina. El revelado se hizo con nitroblue de tetrazolio, y con 5-Br-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), coloreando las bandas positivas con anticuerpos, y, los anti-anticuerpos marcados.¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁸

Absorciones de los inmunosueros y ELISA: Un mililitro del suero del paciente atópico con sensibilidad a Ca y a Gc fue incubado a 37 °C en un baño de María con un mililitro de extracto de Ca 1/10 durante una hora. Luego se centrifugó a 500 r.p.m. por 5 minutos, y el sobrenadante se trasvasó a un recipiente y se guardó a -20 °C, rotulándose: **sueros A**. Lo mismo se realizó con otro mililitro del suero del mismo paciente, que se incubó con un mililitro del extracto de Gc, durante igual tiempo, con idénticos pasos, rotulándose: **sueros B**. Los **sueros A** y **B**, fueron testificados por ELISA empleando como antígenos a Ca y a Gc,

por separado, para valorar si la absorción había modificado la cantidad de anticuerpos anti-*Candida* y anti-*Geotrichum* previos. Estos sueros A y B se sometieron al SDS-PAGE y Western-blots para valorar la existencia o no de las bandas detectadas antes de las absorciones respectivas, así como para analizar si la gelatinólisis había inducido cambios o no.¹⁹⁻²²

Radioinmunoensayos: La IgE sérica total se midió con el PRIST (Phadebas, IgE kits, Pharmacia Chemicals, Uppsala, Suecia), en KU/L, mientras que las IgE específicas para *Ca* y *Gc* se midieron por RAST donde se usaron 12,5 mg/mL de cada antígeno por separado, unidos covalentemente a discos de celulosa (Whatman N° 1) con bromuro de cianógeno. Se midieron en unidades RAST de acuerdo a las clases 0, 1, 2, 3 y 4, correspondiendo a 0,35; 0,70; 3,50 y 17 PRU (Phadebas RAST Units) respectivamente.³⁶

Resultados

La columna de Sephadex G-50 de *Ca* reveló un pico proteico a 280 nm de densidad óptica entre los tubos 8 y 11, y 3 de hexosas entre los tubos 30, 44 y 82 a 470 nm de DO. En la columna de DEAE-celulosa, se vieron 4 picos proteicos en los tubos 25, 45, 70 y 90, mientras que se detectaron 5 picos de hexosas 30, 75, 100, 160 y 180, según la variación del buffer desde un pH de 8 hasta 6 y de 0,01 M hasta 0,2 M, que correspondían a 10.000, 6000, 3000, 1500 y 4000 mcg%, respectivamente. La columna de Sephadex G-50 de *Gc* reveló un pico proteico entre los tubos 45 y 55, a 280 nm de DO, y 3 picos de hexosas en los tubos 11, 33 y 55, con 8000, 9.000 y 26.000 mcg% de glúcidos a 470 nm de DO, mientras que la de DEAE-celulosa solo reveló una proteína en el pico 55 y una hexosa en el 33. Las testificaciones cutáneas de los alérgicos revelaron 18/20 positivos con el extracto total de *Ca*, como con sus fracciones 11 y 44 de Sephadex, y las 30, 75 y 180 de DEAE-celulosa. El extracto de *Gc* fue positivo sólo en 7/20, siendo las proteínas 45 y 55 las más notorias de Sephadex, mientras que con DEAE-celulosa solo el pico 55 y la hexosa 33 fueron significativas. Todo el grupo control fue negativo en las pruebas cutáneas con idénticos antígenos, salvo 4 pacientes de este grupo que concurrieron a las 48 h de la inoculación con una reacción local de *Ca* levemente indurada que no superaba los 5 mm.

El SDS-PAGE, los Western-blots y la gelatinólisis revelaron que *Ca* posee su actividad entre los 45 y 66 kDa, siendo proporcional a la cantidad del antígeno; por ejemplo, 1,15, 1,30 y 4,6 mg. La menor actividad se registró en los 32 kDa. Un ensayo preliminar, con el sustrato Bz-Pro-Phe-Arg-pNa,

Ca exhibió una actividad de 2,7 U/min/mg, con una actividad proteásica por la Arg en la posición 1, que sería el sitio de clivaje. La proteólisis de *Ca* se analizó a 3 pHs (3,5; 6 y 8,5) siendo la mayor a pH 6, la menor a pH 8,5 y ninguna a pH 3,5. Los patrones a pH 6 fueron similares con el buffer Tris-AcH 100 mM o el MES 100 mM. En un gel se cargaron 2,3 mg de proteína pura de *Ca*, se sometió a electroforesis y, al detenerla, el gel se cortó en tiras que se incubaron con los inhibidores de las proteasas por 20 h, mientras que otras tiras control no se incubaron. La actividad a pH 6 fue muy sensible al TLCK, como las bandas entre 45 y 66 kDa y también la de 32 kDa. El E64 y el TLCK inhibieron totalmente, pero el TPCK y la leupeptina solo parcialmente, lo que sugiere que posee peptidasas del tipo cisteína. Además, hay una banda de alto peso molecular que no se inhibe por los inhibidores para cisteína, aspártico o metaloproteasas, pero la inhibe TLCK, posiblemente sea una serina similar tripsina. Cuando *Ca* fue separada por SDS-PAGE y transferida a las membranas de nitrocelulosa e incubada con los antisueros específicos de conejo y de humanos alérgicos que revelaron pruebas cutáneas positivas, y reincubados con los anti-anticuerpos respectivos en los Western-blots, las bandas con pesos moleculares aproximados de 180 kDa, 110 kDa, 65 kDa, 45 kDa y 33 kDa, mostraron reactividad positiva, lo que las involucra en la respuesta inmune en los conejos y en los humanos alérgicos. Similar resultado se logró al procesar las muestras con el DTT o sin él. La actividad proteásica y gelatinolítica del *Gc* reveló 6 a 8 bandas entre los 22 y 96 kDa, con una proteólisis a pH 5 y una gelatinólisis muy sensible al TLCK y al PMSF, revelando una actividad de serina-símil-tripsina. En los Western-blots, las bandas de 22 y de 44 kDa reaccionaron con los sueros humanos de atópicos y la anti-IgE. Un suero ELISA positivo $\geq 0,35$ PRU/mL para *Ca* absorbido con *Ca* resulta negativo en otra prueba (suero A), pero si es testificado con *Gc*, revela una positividad de ELISA $\geq 0,40$ PRU/mL. Por el contrario, un suero B, absorbido con *Gc* sigue siendo positivo luego de ser retestificado con *Ca*, suponiendo que comparten algún péptido que desaparece en las absorciones, y que se modifica en las gelatinólisis.²⁰⁻²¹⁻²³⁻²⁴⁻²⁵⁻²⁶⁻²⁷⁻²⁸⁻²⁹⁻³⁰⁻³¹⁻³²

Discusión

Los alérgenos poseen enzimas que colaboran en su patología. En los sujetos atópicos estas enzimas juegan un papel activo en la génesis de la inflamación de la mucosa afectada. Históricamente, el ácaro *Dermatophagoides pteronysinus* (Voorhorst, 1964) posee una serina-proteasa entre

los 25 y 30 kDa, que despliega una gran actividad en la mucosa respiratoria, incrementando la permeabilidad vascular, la liberación de citoquinas y la trans migración endotelial de las células inflamatorias. En nuestro caso, *Ca* reveló una gelatinólisis entre los 45 y 66 kDa, con menor actividad en los 32 kDa y siempre a pH 6. Al emplear los inhibidores de las proteasas, se detectó que predominan las cisteína-peptidasas. El Western-blot mostró bandas en 180, 110, 65, 45 y 33 kDa, que no todas pueden ser inhibidas por el TCLK, lo cual reafirma 2 tipos de peptidasas (cisteína y serina). Por su parte, el *Gc* muestra una menor reactividad proteica que *Ca*, en especial a nivel de la DEAE-celulosa, proteólisis y gelatinólisis. Se destaca la riqueza de azúcares en ambos hongos, y las propiedades muy similares reveladas con la DEAE-celulosa. Sin embargo, el Ouchterlony, mostró reactividad cruzada entre los 2 antígenos (*Ca* y *Gc*), en especial, entre las proteínas y azúcares obtenidos por DEAE-celulosa más que por Sephadex. La taxonomía de *Gc* fue controversial a lo largo del tiempo. Algunos lo clasificaron como levadura (Kurtzman y Fell, 1998; Barnett, 2000), y otros como mohó (Wouters, 2002). Todas las especies del género *Gc* son consideradas como mohos filamentosos levaduriformes (Hoog y Smith, 2004), y están dentro del filo *Ascomycota*, que es la división más grande dentro del reino Fungi. Las distintas especies de ascomicetos han sido un problema para los taxónomos, pues la clasificación de los hongos se basa en la reproducción sexual, que es más conservada. Esto dificulta la de los que lo hacen solo de forma asexual. Los ascomicetos tienen una estructura reproductora, el “asca”, que posee forma de saco. Muchos ascomicetos son levaduras, vocablo que designa a los hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación o fisión binaria, pero también a hongos con micelio tabicado con ascosporas endógenas cuya reproducción puede ser de 2 tipos: asexual, por esporas exógenas (“conidios” o “conidio-esporas”), y sexual, por esporas endógenas (“ascosporas”). El *Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas* (Greuter y Rankin Rodríguez, 2012), permite dar nombres separados para las formas asexuales (anamorfos) y las sexuales (teleomorfos), llamando “holomorfo” al hongo completo, incluyendo todas las formas anamorfos y teleomorfos. Las cepas de *Gc* poseen leve actividad proteolítica extracelular, pero unas pocas tienen más actividad proteolítica (Guéguen y Lenoir, 1976), especialmente las de origen quesero (Boutrou, 2006b), cuya actividad intracelular (Guéguen y Lenoir, 1976; Litthauer, 1996), sería similar a la de la quimi tripsina, situación que no se observa con *Ca*, y, que avala nuestros hallazgos.³⁴⁻³⁷⁻³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰

Bibliografía

- Alonso A, Scavini LM, Pionetti CH, Mouchián K, Rodríguez SM: Immunochemical properties of soluble fractions of *Candida albicans*. *Medicina*. 1981;41:579-86.
- American Thoracic Society. Definition and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1962;85:762.
- Aoki Y, Nakayoshi H. Studies on the immunologically active substances in fungi. 2. On the immunologic activity especially skin test activity of *Candida* antigens. *Jap. J. Allerg.* 1968;17:48.
- Aoki Y, Nakayoshi H, Asaka S. Studies on the substances for skin test activity. Japan, 1990, 32, 47.
- Dische Z. En *Methods of Biochemical Analysis*. Ed. By D. Glick Vol. 2, p. 313.
- Edge G, Pepys J. Antibodies in different immunoglobulin classes to *Candida albicans* in allergic respiratory disease. *Clin. Allergy*. 1980;10:47.
- Gaines JD. Diagnosis of deep infection with *Candida*. *Arch Int. Med.* 1976;132:699.
- Hurtrel B. Delayed-type hypersensitivity reactions to *Candida albicans* in mice. *Ann. Immunol.* 1978;129:653.
- Iammarino RM. Immunoelectrophoresis adapted for the clinical laboratory. *Clin. Biochem.* 1969;2:447.
- Itkin IH, Dennis M. Bronchial hypersensitivity to extract of *Candida albicans*. *J. Allerg.* 1966;37:187.
- Kabe J, Aoki Y, Ishizaka T, Nakazawa H, Tomaru M. Antigenicity of the fractions of *Candida albicans*. 1. The skin and the bronchial reactivity in man. *Jap. J. Allergy*. 1970;19:91.
- Kabe J, Aoki Y, Miyamoto T. Antigenicity of fractions from extracts of *Candida albicans*. *J. Allergy*. 1971;47:59.
- Lim CS-Y, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(1):21-31.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400-28.
- Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(3):495-544.
- Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27(4):195-9.
- Zhu W, Filler SG.: Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2010;12(3):273-82.
- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Crit Rev Microbiol.* 2006;32(4):217-26.
- Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara J-P. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol.* 2008;46(8):749-72.
- Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence* [Internet]. 2012;3(3). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546903>

21. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001;9(7):327-35.
22. van Burik JA, Magee PT. Aspects of fungal pathogenesis in humans. Annu Rev Microbiol. 2001;55:743-72.
23. Jacobsen ID, Wilson D, Wächter B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10(1):85-93.
24. Monod M, Borg-von ZM. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. Biol Chem. 2002;383(7-8):1087-93.
25. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol. 2009;56(2):211-24.
26. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol. 2004;6(10):915-26.
27. Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. Eukaryotic Cell. 2009;8(11):1750-8.
28. Almeida RS, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. FEMS Yeast Res. 2009;9(7):1000-12.
29. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryotic Cell. 2011;10(9):1173-82.
30. Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini-review. Mycopathologia. 2009;168(4):165-73.
31. Kumamoto CA, Vences MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. Annu. Rev Microbiol. 2005;59:113-33.
32. Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. Mycoses. 2009;52(1):1-10.
33. Leach AA, O'Shea PC. The determination of protein molecular weights of up to 225,000 by gel filtration on a simple column of Sephadex G-200 at 25° and 40°. J Chromatog. 1965;17:245.
34. Negroni P, Negroni R. Micosis cutáneas y viscerales. López Lib., Bs. As., 7° ed. 194, 1980.
35. Ouchterlony O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy. 1958;5:1.
36. Salmon SE, Mackey G, Fudenberg H. Sandwich solid phase radio-immunoassay for the quantitative determination of human globulins. J Immunol. 1969;103:129.
37. Solari M.A. *Candida albicans*: su incidencia en alergia clínica. Prensa Med Arg. 1966;53:1320.
38. Pepys J. Immunological mechanisms in allergy to *Candida albicans*. Ann Allergy. 1974;32:279.
39. Kassamali H, Anaissie E. Disseminated *Geotrichum candidum* infection. J. Clin. Microbiology. 1987;25(9):1782-3.
40. González Zamora JA. *Geotrichum candidum* pneumonia in an elderly patient with interstitial lung disease. Infec. Dis. in Clin. Practice. 2017;25(6):24.