

Artículo original

Estimulación de células mononucleares humanas *in vitro* con extracto total y péptidos liberados al medio por *Candida albicans*

Alejandro Palma Ramos,* Laura Estela Castrillón Rivera,* Diana Emma Becerril Parra,* Rubén Zamora Alvarado,* Ramón Miguel Aguirre Hernández,* Violeta Karen Espinosa Antúnez,* José Roberto González Pacheco,* Carmen Padilla Desgarennes**

RESUMEN

Antecedentes: la candidina es el extracto total obtenido de *Candida albicans*, y es la conjunción de proteínas de superficie e internas que se utiliza en la reacción intradérmica para el estudio de hipersensibilidad tardía. Se ha demostrado que *C. albicans* o sus diferentes antígenos estimulan la respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro*. Se han realizado estudios de los principales componentes manoproteicos de *C. albicans* implicados en la inmunomodulación de las defensas del huésped. Entre las presentes en el extracto ácido se encuentra una proteína de 65 kDa (MP65), que es el principal blanco sobre el que se monta una respuesta por parte de las células T.

Objetivo: estimular células mononucleares humanas *in vitro* con péptidos de extracto total y péptidos secretados al medio de cultivo por *Candida albicans* y la mezcla de ambos.

Material y métodos: para obtener el extracto total (ET) de *Candida albicans*, se cultivó la cepa de referencia ATCC 10231 de este hongo en medio Sauton durante cinco días a 37°C. La biomasa se separó por centrifugación y se solubilizó en solución salina isotónica; la rotura celular se hizo por sonicación y del sobrenadante obtenido se precipitaron las proteínas con solución saturada de sulfato de amonio, el cual fue removido posteriormente por diálisis. El extracto total se ajustó a una concentración de proteínas de 1 mg/mL. Para obtener proteínas liberadas al medio, a partir del medio de crecimiento de *Candida albicans* se procedió a precipitarlas y purificarlas con el mismo tratamiento descrito para el extracto total. Las células mononucleares humanas (CMH) se tomaron de sangre periférica y se purificaron con Lymphoprep; se lavaron con solución salina y se resuspendieron en medio de RPMI, ajustándose a 1×10^6 células/mL. Las citocinas se cuantificaron con la técnica de ELISA, utilizando los paquetes de R&D Systems Quantikine® Human IFN- γ número de catálogo DIF50, y el paquete de R&D Systems Quantikine® Human IL-2 número de catálogo D2050, para cuantificar la IL-2.

Resultados: el estudio electroforético del extracto total de *Candida albicans* mostró principalmente un péptido de 60 a 65 kDa, aproximadamente, al cual se le atribuye la estimulación de la respuesta inmunitaria tipo TH₁. Es clara la observación de la alta producción de INF- γ por las CMH activadas por los péptidos del extracto total de *Candida albicans*, que es mayor a la producción de INF- γ proporcionada por la estimulación de CMH con PHA y con los péptidos purificados del medio de cultivo del mismo microorganismo. El péptido purificado de medio estimula la producción de IL-2 en concentraciones representativas, aunque no muy altas a las 24 horas de activación y a las 96 horas para el extracto total.

Conclusión: los péptidos del extracto total de *Candida albicans* son muy eficientes en la activación de células mononucleares humanas *in vitro* para la producción de INF- γ y también estimula la producción de IL-2. Los péptidos del extracto total de *Candida albicans* son capaces de estimular la formación y activación de células T CD₄ H₁.

Palabras clave: candidina, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Background: Candidin is a total extract obtained from *Candida albicans*, and a combination of both surface and internal protein, for the study of intradermal reaction of late hypersensitivity. It has been shown that *C. albicans* or its different antigens stimulate lymphocyte proliferative response *in vitro*. Several studies about the major mannoproteins components of *C. albicans* implicated in immunomodulation of host defenses were carried out. A protein of 65 kDa (MP65) is present in acid extract which is the primary target on which is mounted a response by T cells.

Objective: To stimulate human mononuclear cells *in vitro* with peptides of total extract, and peptides secreted into the culture medium by *Candida albicans* and the mixture of both.

Material and methods: To obtain the total extract (TE) of *Candida albicans*, strain ATCC 10231 was grown in Sauton media at 37°C for five days. Biomass was separated by centrifugation and solubilized in isotonic saline. The cell disruption was made by sonication and the supernatant obtained by centrifugation proteins were precipitated using saturated ammonium sulfate which was subsequently removed by dialysis. ET was adjusted to a concentration of 1 mg/mL of protein. To obtain proteins released to the medium, directly from the growth medium of *Candida albicans* the precipitation and purification of proteins proceeded by the same treatment described for ET. Human mono-

nuclear cells (MHC) were taken from peripheral blood and were purified with Lymphoprep, washed with saline solution and mixed in the middle of RPMI, adjusting to 1×10^6 cells/mL. Cytokines quantification was carried out by the ELISA technique using the kit of R&D Systems Quantikine® Human IFN γ number of catalogue DIF50, and the kit de R&D Systems Quantikine® Human IL-2 number of catalogue D2050.

Results: Electrophoretic study of total extract of *Candida albicans* showed mainly one peptide of 60 to 65 kDa approximately, which is attributed to the stimulation of the TH1 type immune response. It is a clear observation of the high production of INF- γ by MHC activated by peptides of the total extract of *Candida albicans*, which is greater than the production of INF- γ provided by the stimulation with PHA and peptides purified from the culture medium of the same microorganism. Medium purified peptide stimulates the production of IL-2 at representative concentrations, but not very high at 24 hours of activation, and 96 hours for the total extract.

Conclusion: Peptides of the total extract of *Candida albicans* are very good in the activation of human mononuclear cells *in vitro* for the production of INF- γ . They stimulate production of IL-2, too. The peptides obtained from the total extract of *Candida albicans* can stimulate the formation and activation of cells T CD $_4$ TH $_1$.

Key words: candidin, *Candida albicans*.

C*andida albicans* es una levadura común, comensal en animales y humanos y el principal patógeno oportunista de los mismos, causante de la candidiasis en huéspedes inmunodeprimidos.¹

Este hongo coloniza superficies mucocutáneas de las cavidades oral y vaginal, así como el aparato gastrointestinal. La naturaleza y la medida del deterioro de las defensas del huésped influyen en la manifestación y severidad de la infección.²

La candidina es un extracto total obtenido de este microorganismo y es la conjunción de proteínas de superficie e internas³ que se utiliza en reacción intradérmica para el estudio de hipersensibilidad tardía.⁴

En diversos estudios se ha demostrado que *C. albicans* o sus diferentes antígenos estimulan la respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro*, esto depende en gran parte del grado de compatibilidad genética entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos.¹ La estimulación de células mononucleares humanas con los antígenos de *C.*

albicans resulta en la producción de diferentes citocinas, como el interferón gamma (INF- γ), que se observa aumentado en 24 a 48 horas,^{5,6} además de la interleucina 2 (IL-2).

A pesar de la importancia reconocida de la inmunidad mediada por células en la respuesta ante infecciones causadas por *C. albicans*, se han caracterizado muy pocos blancos antigénicos de esta respuesta. Éstos incluyen proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), enolasas y un gran número de manoproteínas, algunas con funciones de adhesinas.^{3,7} La estimulación de macrófagos es un paso crítico para que el sistema inmunitario detecte las levaduras. Se ha demostrado que los glucanos presentes en la pared celular de *C. albicans* actúan como ligandos para diferentes receptores llevando a distintas vías de estimulación. Los macrófagos humanos responden a *C. albicans* por medio del incremento en la producción de factores de complemento y del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), y estas funciones, así como la expresión de receptor de complemento tipo 3, son reguladas por el factor transformador de crecimiento beta (TGF- β). Los macrófagos también producen factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) después de la estimulación *in vitro* con aislamientos clínicos de *C. albicans* muerta por calor.⁸

Se han realizado estudios de los principales componentes manoproteicos de *C. albicans* implicados en la inmunomodulación de las defensas del huésped. Entre los presentes en el extracto ácido se encuentra una manoproteína de 65 kDa (MP65), que es el principal blanco sobre el que se monta una respuesta por parte de las células T. La respuesta proliferativa estimulada por este componente fue de naturaleza antigénica más que mitogénica, y se dirigió principalmente a los epítopes polipeptídicos. Un constituyente similar se detectó en el material liberado al medio de cultivo por *C. albicans*. El MP65 tiene un punto

* Laboratorio de inmunopotenciadores, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM, Unidad Xochimilco.

** Laboratorio de micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud del DF.

Correspondencia: Dr. Alejandro Palma Ramos. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso núm. 1100, colonia Villa Quietud, CP 04960, México, DF.

Correo electrónico: alpalma@correo.xoc.uam.mx

Recibido: agosto, 2012. Aceptado: octubre, 2012.

Este artículo debe citarse como: Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Becerril-Parra DE, Zamora-Alvarado R y col. Estimulación de células mononucleares humanas *in vitro* con extracto total y péptidos liberados al medio por *Candida albicans*. Dermatol Rev Mex 2012;56(6):377-384.

www.nietoeditores.com.mx

isoeléctrico de 4.1 y una relación proteína-polisacárido de 1.8:1. La proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana se produjo con dosis de nanogramos de MP65 purificado.^{2,9,10}

Las proteínas que se encuentran en el medio de crecimiento *in vitro* a menudo son llamadas proteínas secretadas o extracelulares. Para alcanzar esta localización, viajan a través de la pared celular donde coexisten con fracciones proteicas ligadas a ésta; por su localización, son proteínas que contribuyen a los componentes proteicos totales de la pared; sin embargo, es razonable considerarlas proteínas asociadas de forma transitoria para ser secretadas posteriormente. Diversos componentes de la pared celular que se creía que no eran secretados se han detectado en los sobrenadantes de los cultivos de *C. albicans*. La relación de algunas de estas fracciones con la estructura de la pared celular no es muy clara. Pueden provenir de las capas más externas de la pared. De manera alterna, es posible que sean liberadas por células que fueron lisadas o como consecuencia de una degradación controlada de la estructura de la pared, requerida para la expansión celular durante el crecimiento. Uno de los criterios usados para demostrar una localización celular superficial son los ligandos o anticuerpos.²

OBJETIVO

Estimular células mononucleares humanas *in vitro* con péptidos de extracto total y péptidos secretados al medio de cultivo por *Candida albicans* y la mezcla de ambos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Purificación de proteínas

El crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 10231) se efectuó en medio de Sauton durante cinco días a 37°C. Se centrifugó y se separó la biomasa del medio; se ajustó al tubo 3 del nefelómetro de McFarland con solución salina y se procedió a la sonicación (70 ciclos/min), con periodos de 15 minutos de sonicación por 15 minutos de descanso, lo que se denomina un ciclo. Se realizaron cinco ciclos diarios durante cinco días. Se centrifugó, y al sobrenadante se le precipitaron las proteínas con solución saturada de sulfato de amonio, diluyendo con la muestra hasta 50% de saturación. Se mantuvo durante 24 horas, se centrifugó y se resuspendió el precipitado en 3 mL de agua; después,

se dializó contra agua durante 48 horas, se congeló en un ultracongelador 24 horas y posteriormente se liofilizó por otras 24 horas. Se determinó la concentración de proteínas con el método de Lowry y se ajustó el antígeno a una concentración de 1 mg/mL; a esto se le llamó extracto total.

Para obtener los péptidos de medio se partió del cultivo libre de levaduras, el cual se logró por centrifugación de la biomasa de *Candida albicans*; las proteínas fueron precipitadas con solución saturada de sulfato de amonio. El procedimiento, a partir de este punto, fue el mismo que para la obtención del extracto total (Figura 1).

Obtención de células mononucleares humanas (CMH) de sangre periférica

Este original método fue descrito por Boyum. De manera aséptica, se transfieren 3 mL de solución de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) a un tubo de centrifugado de 15 mL. Se mezclan 2 mL de sangre heparinizada o desfibrinada con 2 mL de solución fisiológica y se vierte la sangre diluida cuidadosamente sobre los 3 mL del medio a temperatura ambiente en un tubo de centrifuga de 15 mL. Después, se centrifuga el tubo a 400/g a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos. Se retira la capa de plasma hasta aproximadamente 2 o 3 mL antes de la capa de mononucleares, y posteriormente también se retira ésta junto con la mitad del volumen del medio de separación restante y se transfieren a un tubo de centrifuga. Se adiciona un volumen igual de buffer de solución salina a la capa de linfocitos y se centrifuga 10 minutos a temperatura ambiente a una velocidad suficiente para sedimentar sin dañar a las células. Se lavan las células nuevamente con el buffer de solución salina y se resuspenden en un medio RPMI ajustando a 10⁶ cel/mL.

Cultivo celular, condiciones y concentraciones finales de los antígenos

La incubación de células mononucleares humanas (CMH) con el antígeno se realiza en un medio de RPMI enriquecido con suero de ternera a 10% y mezcla de antibióticos a 0.1% (5,000 unidades de penicilina y 5 mg de estreptomycin en cloruro de sodio a 0.9%) en atmósfera parcial de CO₂ a 5%, a una temperatura de 37°C, tomando alícuotas de 200 mL de muestra a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Se colocaron 0.5 mL de la suspensión de células mononucleares en un pozo de una caja de cultivo de células de 24 pozos. Después se colocaron 0.5 mL de las soluciones previamente preparadas de péptido liberado al

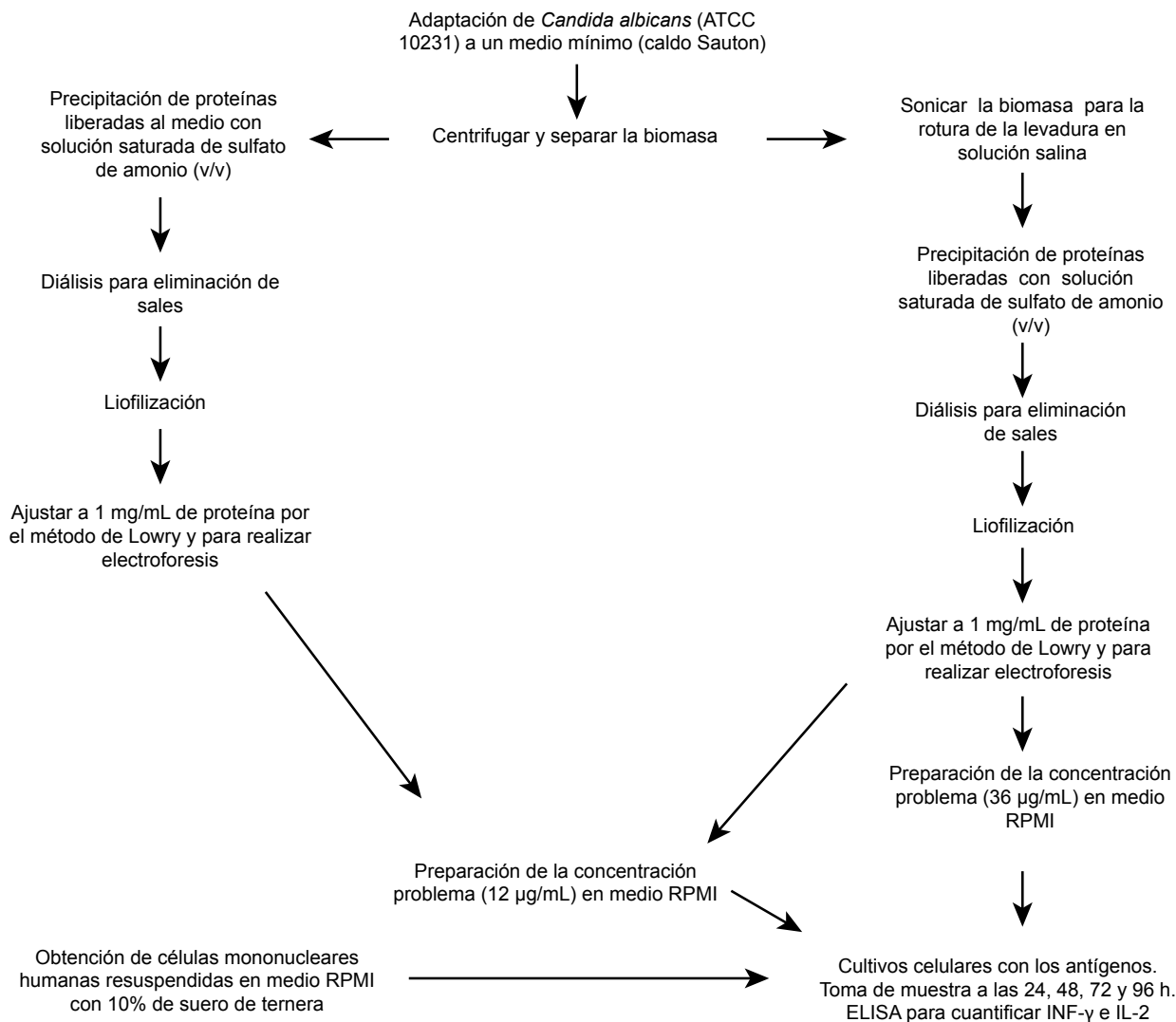


Figura 1. Método de purificación de proteínas.

medio, extracto total o mezcla de ambas muestras, con una concentración 2X, sobre una cantidad de 1×10^6 células mononucleares/mL. Las concentraciones finales para los antígenos fueron de 12 mg/mL de péptidos liberados al medio, 12 mg/mL de extracto total, y también se probó en el caso de la cuantificación de IL-2 una concentración de 36 mg/mL de extracto total. Se utilizaron, como testigo positivo, células activadas con fitohemaglutinina a una concentración de 10 mg/mL.

Western blot

Se llevó a cabo la técnica usando como antígeno a las proteínas del extracto total de *Candida albicans* (anteriormente descrito) contra sueros humanos normales (anticuerpo primario), el anticuerpo secundario fue anti-IgG humano hecho en cabra y conjugado con la enzima (*Anti-Human IgG g-chain specific-peroxidase. Developed in Goat. Affinity isolated antigen specific antibody, SIGMA*).

ELISA

Se efectuó la técnica utilizando el paquete de R&D Systems Quantikine® Human IFN- γ , número de catálogo DIF50, para cuantificar el IFN- γ , y el paquete de R&D Systems Quantikine® Human IL-2, número de catálogo D2050 para cuantificar la IL-2.

RESULTADOS

El estudio electroforético del extracto total de *Candida albicans* mostró varios péptidos entre los que destaca un péptido de 60 a 65 kDa, aproximadamente, al cual se le atribuye la estimulación de la respuesta inmunitaria tipo TH₁, y es esencial en la defensa contra infecciones causadas por este microorganismo (Figura 2).¹¹

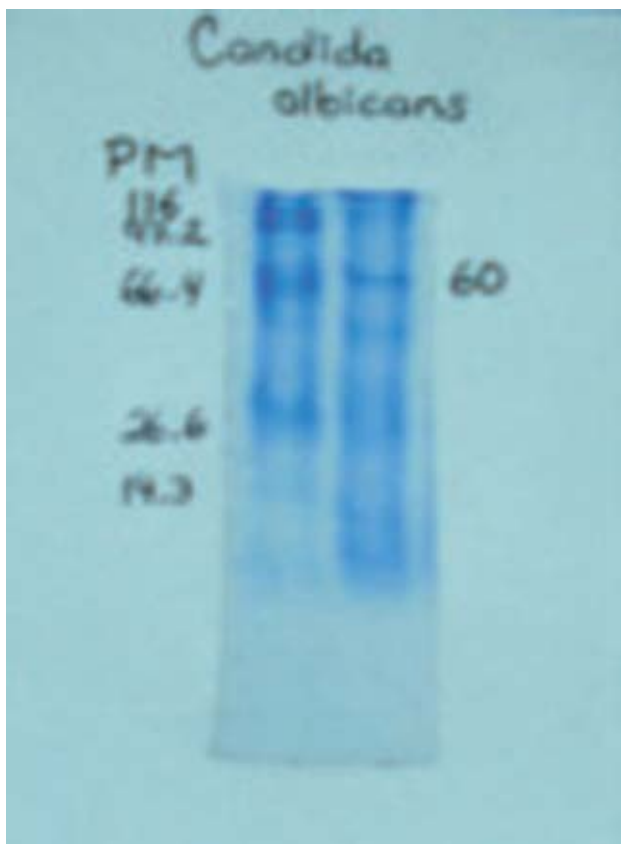


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida a 10% del extracto total de *Candida albicans*, en donde se muestran péptidos que van de 9 a 96 kDa, aproximadamente. En el primer carril se observan los estándares de peso molecular; en el segundo, las proteínas del extracto total.

Posteriormente se realizó la separación de las proteínas secretadas al medio de cultivo por *Candida albicans*. El medio de Sauton es un medio mínimo esencial que contiene sales y glicerina, por lo que las proteínas presentes en el medio de cultivo provienen únicamente del microorganismo. La electroforesis de estas proteínas se muestra en la Figura 3.

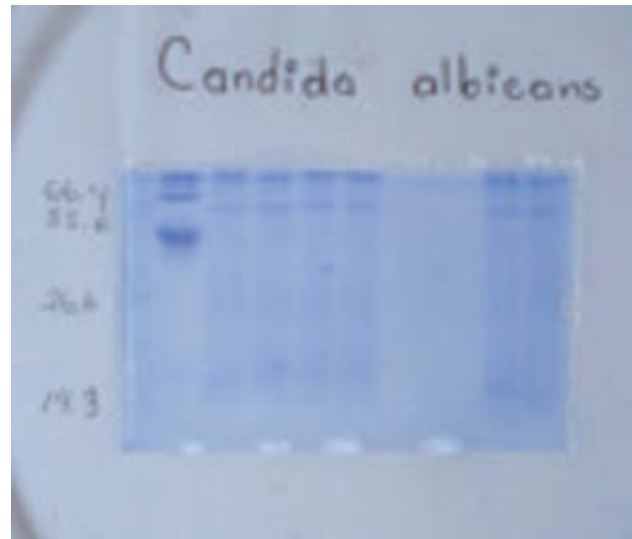


Figura 3. Péptidos obtenidos del medio de cultivo (Sauton), en donde también resalta el péptido de 60 a 65 kDa, aproximadamente.

Al realizar la electrotransferencia e inmunodetección (técnica de Western blot), se observó que los anticuerpos IgG provenientes de los sueros humanos normales (SHN) reconocen al péptido de 65 kDa, lo que indica la importancia de su participación en la activación de la respuesta inmunológica (Figura 4).

Para los estudios de activación de células mononucleares humanas (CMH) con el uso del extracto total de *C. albicans* o sus proteínas de secreción, se cuantificaron las concentraciones de INF- γ y de IL-2 en el sobrenadante de los cultivos. Como testigo negativo se utilizaron células solas sin estimular, y como testigo positivo se usaron células estimuladas con fitohemaglutinina (PHA). Los resultados se muestran en la Figura 5.

La línea roja representa la concentración al doble del valor máximo a partir del cual se hace significativa la concentración evaluada.

Las células sin estimular alcanzan un valor máximo de 100 pg/mL a las 48 y 72 horas, por lo que

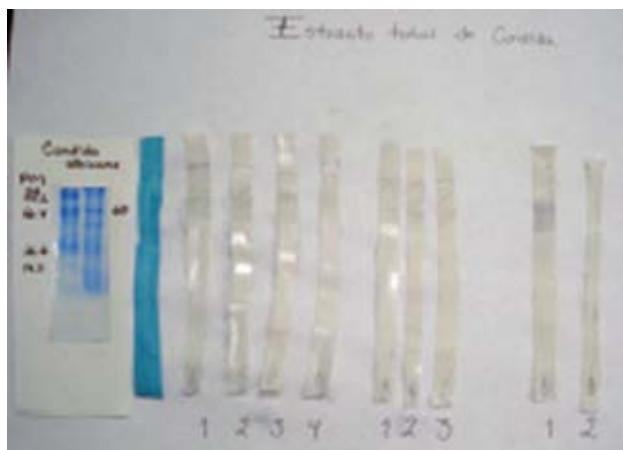


Figura 4. Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot) utilizando el extracto total de *Candida albicans*, en donde se aprecia que el péptido de 65 kDa (P65) es reconocido por los anticuerpos IgG del suero humano normal (SHN).

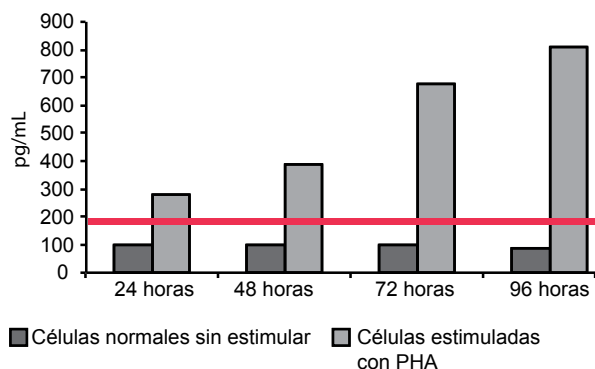


Figura 5. Cuantificación de INF- γ en cultivos de células mononucleares humanas sin activar (testigo negativo) y células mononucleares humanas activadas con fitohemaglutinina (PHA, testigo positivo), por la técnica de ELISA. La línea roja representa la concentración al doble del valor máximo a partir del cual se hace significativa la concentración evaluada.

concentraciones superiores al doble de este valor son representativas (200 pg/mL), y al observar el testigo positivo, muestra concentraciones que llegan a 800 pg/mL a las 96 horas, con concentraciones mayores a 200 pg/mL desde las 24 horas.

Al estimular células mononucleares humanas con péptidos purificados del medio de crecimiento de *Candida albicans* (medio Sauton), a una concentración de 12 mg/mL, se observan concentraciones altas de INF- γ en los medios de cultivo, con un máximo a las 96 horas de 618 pg/mL y un mínimo de 460 pg/mL a las 72 horas, con buenas

concentraciones a las 24 (565 pg/mL) y 48 (515 pg/mL) horas de estimulación (Figura 6).

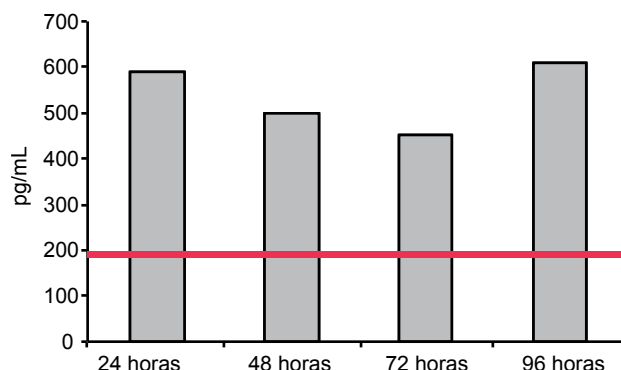


Figura 6. Cuantificación de INF- γ en cultivos de células mononucleares humanas estimuladas con péptidos purificados del medio de cultivo (Sauton) de crecimiento de *Candida albicans*, a una concentración de 12 mg/mL, por la técnica de ELISA.

Cuando se utiliza extracto total de proteínas a partir de la biomasa de *Candida albicans* para estimular células mononucleares humanas a una concentración de 12 mg/mL en 1×10^6 células/mL, se encuentran concentraciones altas de INF- γ (Figura 7).

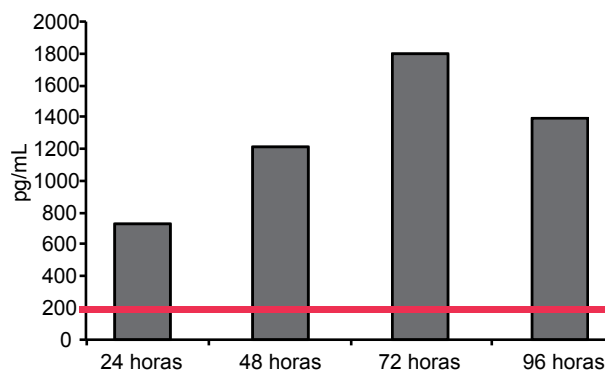


Figura 7. Cuantificación de INF- γ en cultivos de células mononucleares humanas estimuladas con péptidos purificados del extracto total de *Candida albicans*, a una concentración de 12 mg/mL, por la técnica de ELISA.

En este caso, se halló una muy buena activación de células mononucleares humanas, ya que los valores de concentración de INF- γ en los medios de cultivo a las 24 (735 pg/mL), 48 (1,245 pg/mL), 72 (1,790 pg/mL) y 96 horas (1,365 pg/mL), con valores representativos, muestran concentraciones muy altas, que al compararlas con el

testigo positivo, se apreció que hay mayor estimulación con los péptidos del extracto total de *Candida albicans*, que con la fitohemaglutinina.

Los valores encontrados en la cuantificación de IL-2 en cultivos celulares estimulados con y sin mitógeno (fitohemaglutinina) se muestran en la Figura 8.

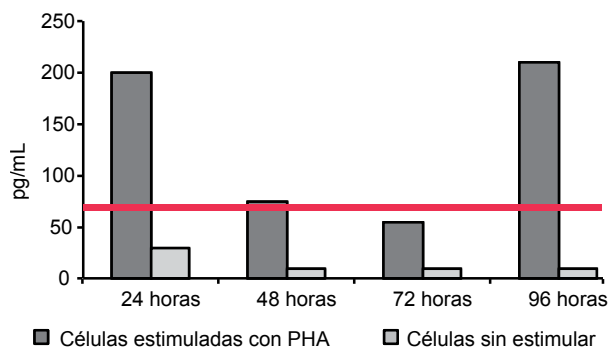


Figura 8. Cuantificación de IL-2 por la técnica de ELISA, en medio de cultivo de células mononucleares humanas estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) y células sin estimular.

La células sin estimular alcanzan un valor máximo de 30 pg/mL a las 24 horas, por lo que el doble de este valor es representativo (60 pg/mL), y al observar el testigo positivo (fitohemaglutinina), se aprecia que estos valores llegan a 200 pg/mL a las 24 horas.

Al activar células mononucleares humanas con el péptido purificado del medio de cultivo del crecimiento de *Candida albicans*, se corrobora buena estimulación para producir IL-2 (Figura 9).

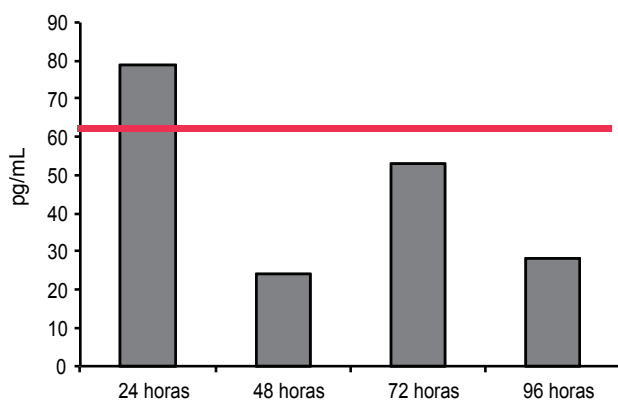


Figura 9. Cuantificación de IL-2 por la técnica de ELISA, en medio de cultivo de células mononucleares humanas estimuladas con péptidos purificados del medio de Sauton crecido con *Candida albicans*.

Se nota la presencia de IL-2 con una concentración significativa (78 pg/mL) a las 24 horas de activación de las células mononucleares humanas, con péptidos purificados del medio de crecimiento de *Candida albicans*.

El extracto total se probó de tres maneras: se utilizaron dos concentraciones por separado (36 y 12 mg/mL) y una mezcla de péptidos de extracto total y purificados del medio, a una concentración de 12 mg/mL. Los resultados encontrados se resumen en la Figura 10.

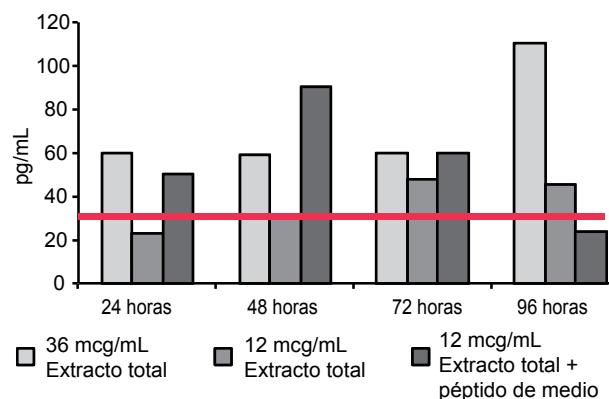


Figura 10. Cuantificación por la técnica de ELISA de la producción de IL-2 secretada por células mononucleares humanas estimuladas con péptidos de extracto total y péptidos de medio de cultivo de *Candida albicans*, con la técnica de ELISA.

Se halló una secreción de IL-2 en células mononucleares humanas estimuladas con péptidos de extracto total sólo en la concentración de 36 mg/mL (110 pg/mL) a las 96 horas, pero no en la concentración de 12 mg/mL. En las células mononucleares humanas estimuladas con los péptidos de extracto total y péptidos purificados del medio de cultivo, se observó IL-2 a una concentración representativa de 92 pg/mL a las 48 horas.

DISCUSIÓN

El estudio electroforético del extracto total de *Candida albicans* mostró principalmente un péptido de 60 a 65 kDa, aproximadamente, al cual se le atribuye la estimulación de la respuesta inmunitaria tipo TH₁, que es esencial en la defensa contra infecciones causadas por *Candida albicans*.¹¹

Es importante contar con un estimulador de estas células para obtener el INF- γ ya que una de sus funciones principales es la activación de macrófagos.¹²

Hay que hacer notar que los valores de INF- γ encontrados en la estimulación de células mononucleares humanas

con los péptidos del extracto total de *Candida albicans* son mucho mayores que los obtenidos por el testigo positivo, que contiene células mononucleares humanas estimuladas con fitohemaglutinina (en donde se encuentra estimulación a partir de las 24 horas con un título de 200 pg/mL hasta el valor de las 96 horas, que es de 800 pg/mL) con un valor de límite de representatividad de 100 pg/mL, obtenido por el doble del valor encontrado en células sin activar. En las células mononucleares humanas estimuladas con el extracto total, se hallaron valores de 600 pg/mL a las 24 horas, de 1,245 pg/mL a las 48 horas, e incluso de 1,800 pg/mL a las 72 horas, más del doble de lo que estimula la fitohemaglutinina (PHA).

Los péptidos purificados del medio de cultivo también demuestran buenos resultados en la activación de células mononucleares humanas para la producción del INF- γ (550 pg/mL a las 24 horas hasta 450 pg/mL a las 72 horas), aunque sus valores no son tan altos como en el caso del extracto total.

En la producción de la IL-2, el testigo positivo (células mononucleares humanas estimuladas con fitohemaglutinina) otorga valores altos, incluso de 200 pg/mL a las 24 horas, con un valor de representatividad de 60 pg/mL obtenido por el doble del valor encontrado en células sin activar. El péptido purificado del medio estimula con concentraciones representativas, aunque no muy altas, a las 24 horas de activación. El extracto total activa su producción, pero hasta las 48 horas al mezclarlo con los péptidos secretados al medio de cultivo.

CONCLUSIÓN

Los péptidos del extracto total de *Candida albicans* son muy eficientes en la activación de células mononucleares humanas *in vitro* para la producción de INF- γ e IL-2. Los péptidos del extracto total de *Candida albicans* son capaces de estimular la formación y activación de células T CD₄H₁.

REFERENCIAS

1. Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. Microbiol Rev 1995;59:646-672.
2. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62:130-180.
3. Ausiello CM, Urbani F, Gessani S, Spagnoli GC, et al. Cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by mannoprotein constituents from *Candida albicans*. Infect Immun 1993;61:4105-4111.
4. Strass DM. Pruebas cutáneas diagnósticas en alergia e inmunología. Educación Médica Continua PORNAAI 2002:1-6.
5. Henderson DC, Rippin JJ. Stimulus-dependent production of cytokines and pterins by peripheral blood mononuclear cells. Immunol Lett 1995;45:29-34.
6. Nakayama T. Immune-specific production of gamma interferon in human lymphocyte cultures in response to mumps virus. Infect Immun 1983;40:486-492.
7. Ausiello CM, Spagnoli GC, Bocanera M, Casalinuovo I, et al. Proliferation of human peripheral blood mononuclear cells induced by *Candida albicans* and its cell wall fractions. J Med Microbiol 1986;22:195-202.
8. Jouault TM, Abed-El Behi E, Martínez-Esparza M, Breuilh L, et al. Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires Galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signalling. J Immunol 2006;177:4679-4687.
9. Torosantucci A, Bromuro C, Gomez MJ, Ausiello C, et al. Identification of a 65-kDa mannoprotein as a main target of human cell-mediated immune response to *Candida albicans*. J Infect Dis 1993;168:427-435.
10. La Valle R, Sandini S, Gomez MJ, Mondello F, et al. Generation of a recombinant 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of cell-mediated immune response to *Candida albicans*. Infect Immun 2000;68:6777-6784.
11. Kosonen J, Luhtala M, Viander M, Kalimo K, et al. *Candida albicans*-specific lymphoproliferative and cytokine (IL-4 and IFN- γ) responses in atopic eczema dermatitis syndrome. Evidence of CD4/CD8 and CD3/CD16⁺, CD56 ratio elevations *in vitro*. Exp Dermatol 2005;14:551-558.
12. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med 1992;176:287-292.