

PAPEL DEL HIERRO EN EL CRECIMIENTO DEL PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS

Jorge M. Trujillo J.*

Palabras Claves: *Paracoccidioides brasiliensis*, Hierro.

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento del *Paracoccidioides Brasiliensis* en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de hierro y frente a la edición de agentes quelantes tales como transferrina sérica humana, desferoxamina, y 1,10-fenantrolina y se elaboraron curvas de crecimiento. Como control se hizo lo mismo con una cepa de *Cándida Albicans*. No se obtuvo inhibición del crecimiento del *Paracoccidioides Brasiliensis* en un medio de cultivo con baja concentración de hierro ni aún frente a la adición de quelantes. Contrariamente, al crecimiento de *Cándida Albicans* se inhibió en los medios de cultivo a los cuales se adicionaron quelantes. Estos hallazgos continúan demostrando la facilidad del *Paracoccidioides Brasiliensis* por subsistir frente a condiciones aparentemente adversas.

INTRODUCCION

Se ha establecido anteriormente que algunos microorganismos requieren hierro, zinc, y otros iones para su normal desarrollo^{1,2,3,4,5,6,19}. También se ha encontrado que el plasma humano posee propiedades bacteriostáticas, fungistáticas y citostáticas relacionadas con su capacidad de captar el hierro libre por medio de la

transferrina^{6,7,8,9,10,11,19}. Algunos microorganismos, incluyendo *Cándida Albicans*, han desarrollado moléculas ("Sideróforos") capaces de quelar el hierro y competir con la transferrina humana por este y otros iones^{12,13,14,15,16,17,18,19,20,21}.

Con este trabajo se pretendió evaluar si el *Paracoccidioides Brasiliensis* presentaba cierto requerimiento absoluto por el hierro y determinar si era posible inhibir su crecimiento limitando la concentración de este ión en el medio de cultivo. Para el efecto, se comparó el crecimiento obtenido en medio completo (con hierro), con el crecimiento en medios que tenían concentración reducida de este ión, bien fuera por eliminación del hierro de los ingredientes, o bien mediante la adición de quelantes. Como control se utilizó también una cepa de *Cándida Albicans*.

MATERIALES Y METODOS

Todos los materiales utilizados fueron de vidrio o de plástico y se prepararon de una manera especial. Estos se dejaron durante 3 días en mezcla sulfocrómica, quelante del hierro, la cual se renovó diariamente. Los materiales se lavaron posteriormente haciendo 3 enjuagues con agua destilada y desionizada, (filtro rovik, model PR-DA-1, Walter Rothlisberger & Co.) para, finalmente, ser esterilizados en autoclave.

Cepas: Se utilizaron 3 cepas diferentes de *Paracoccidioides Brasiliensis* que fueron aisladas de 3 pacientes "Gar" "Pied", y "Sua". Se utilizó además una cepa de *Cándida Albicans* como control. Para este microorganismo ya se ha establecido el requerimiento por hierro^{2,3,4,6,10,12,13,16,18,20}.

* Jorge M. Trujillo J.
Interno de la Facultad de Medicina
Instituto de Ciencias de la Salud C.E.S.
Medellín Colombia

Método:

Bajo estrictas condiciones de asepsia, siempre trabajando dentro de una cámara de seguridad, se sembraron dichas cepas en medio sintético sólido modificado de Mc. Veigh y Morton (SMV)²². Luego se incubaron los tubos durante 5 días a 37°C hasta obtener un crecimiento adecuado y libre de contaminantes.

Posteriormente, se hizo un lavado de este crecimiento con medio sintético líquido, preparado en forma idéntica pero sin agar, obteniendo así una suspensión de 5 cc. por tubo; ésta se incubó en agitación constante a 160 rpm durante 5 días a 37°C, con el objeto de que el microorganismo consumiese las posibles trazas de hierro presentes en el medio. Luego se centrifugaron los tubos a 30.000 rpm a temperatura ambiente y se eliminaba el sobrenadante.

Para *Cándida Albicans* la cepa se mantuvo por siembras repetidas en el medio sintético modificado (SMV). Esta levadura se cultivaba inicialmente en el agar y posteriormente en el medio líquido, de la misma manera que para *P. Brasiliensis*.

Al finalizar el procedimiento descrito, y siempre que se iniciaba o se determinaba una curva, se verificaba la ausencia de contaminantes mediante un examen directo microscópico. En caso de encontrar contaminantes se descartaba la curva y se iniciaba una nueva.

Determinación de viabilidad:

Para determinar la viabilidad inicial se utilizó la técnica de bromuro de etidio y fluoresceína (EB+F)²³, y se estableció el porcentaje de células vivas de acuerdo a la siguiente fórmula:

Porcentaje de viabilidad (%) = # de células viables / # de células totales, multiplicado por 100.

En ocasiones el crecimiento del hongo en el medio líquido no era uniforme, sino en acúmulos, debido a la adhesión de las levaduras. Como una suspensión de tales características no podía ser evaluada con precisión al espectrofotómetro, se empleó la técnica de "sonicación", sometiendo la suspensión del hongo a vibraciones de alta frecuencia durante 30 segundos, (Branson Sonifier model W 185) a 5W. Este procedimiento logra la homogenización de las levaduras pero afecta la viabilidad. Por lo tanto, cuando éste paso fue necesario, la determinación del porcentaje de viabilidad se realizaba después de haber sonificado la cepa.

Para *C. Albicans* no se consideró necesario determinar la viabilidad inicial debido a la alta capacidad de este microorganismo para reproducirse rápidamente y porque para cada grupo de curvas, el inóculo provenía de un mismo cultivo.

Curva de crecimiento previa: (Determinación del inóculo):

Cuando se tuvo el porcentaje de viabilidad, se procedió a hacer una curva de crecimiento para cada cepa,

utilizando medio sintético líquido completo con hierro, 3 tubos para cada cepa, cada tubo con una concentración de inóculo diferente; alta, intermedia y baja, que correspondían a las diluciones 2,4, y 7 de la curva estándar de Mc. Farland. Se utilizaron 5 cc. de medio para cada tubo.

Las concentraciones para el inóculo se establecieron así:

Una vez se obtuvieron densidades que correspondían macroscópicamente, por comparación contra un fondo oscuro, con las diluciones de Mc. Farland, se hizo la medición más precisa en el espectrofotómetro utilizando 540 mm de longitud de onda (Coleman Junior II Spectrophotometer, model 6/35) y registrando la transmitancia. El blanco utilizado fue el mismo medio sintético líquido intacto.

Entonces se colocaron los distintos tubos en agitación constante a 37°C, a 160 rpm, y se hicieron lecturas en el espectrofotómetro cada 24 horas durante 96 horas. Con respecto a *C. Albicans* no se hicieron curvas de crecimiento para determinar el inóculo puesto que su cinética es ya conocida.⁽¹⁰⁾ Se estandarizó el inóculo por turbidimetría en la misma forma que para *P. Brasiliensis*, siguiendo el esquema anotado.

Sustratos utilizados:

Medio completo: Para las curvas de crecimiento en medio completo se utilizó el medio sintético de Mc. Veigh y Morton modificado²², el cual contiene 0.279 mg de hierro por litro.

Medio con baja concentración de hierro: Para la preparación del medio con bajo contenido de hierro se utilizaron los mismos componentes del medio sintético completo, salvo el hierro (sulfato ferroso diamónico).

Comprobación de los niveles de hierro: Para establecer la cantidad de hierro en ambos medios se utilizó el método de la 1,10 fenantrolina. (Hach Chem. Co., Ames, Iowa, U.S.A.).

Según la fórmula de preparación, el medio sintético completo contiene 0.279 miligramos de hierro por litro. Usando la técnica de la fenantrolina encontramos un contenido de hierro de 0.2 mgrs por litro. En cuanto al medio sin hierro, dicha técnica reveló un contenido de 0.02 miligramos, o sea una décima parte del medio completo. Estas trazas de hierro representarían contaminación de los reactivos empleados en la preparación del medio.

Fijación del hierro:

Con transferrina:

Al medio con concentración conocida de hierro le fue adicionada transferrina humana purificada insaturada al 98% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.). Una mol de transferrina está en capacidad de captar 2 moles de hierro²⁴ y con base en este dato y conociendo la concentración de hierro en el medio, se adicionó la

transferrina para obtener el 33% de saturación, la que normalmente existe en el plasma humano y que en este medio estaba en capacidad de quelar 0.4 ug de hierro por ml. Una vez agregada la transferrina, el medio se pasó por un filtro de 0,22 micras, tipo millipore (7103 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.).

Con Desferoxamina:

El medio se preparó utilizando 47 ug de desferoxamina por mililitro ("Desferal", CIBA-GEIGY Limited, Suiza) capaz de quelar hierro a una concentración de 4 ug/ml, doscientas veces mayor a la existente en el medio, lo que aseguraba una mínima cantidad de hierro libre. Los cálculos se hicieron con base en la capacidad de captación de hierro que tiene el reactivo. (100 partes por peso de desferal 8.5 partes por peso de hierro férrico).

Con 1,10 Fenantrolina:

Se utilizó 1,10 fenantrolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) a una concentración de 5 uM por litro, siguiendo las indicaciones de trabajos anteriores^{7,13}.

Esta concentración aseguraba la capacidad de quelar 3.000 ug de hierro por ml., de acuerdo a la capacidad de captación que tiene la fenantrolina por este ión (1 mol de fenantrolina está en capacidad de quelar 1 mol de hierro, aunque el zinc compite igualmente por el sitio de unión)⁷.

Elaboración de curvas de crecimiento:

Curvas de crecimiento del *Paracoccidioides Brasiliensis*: Se prepararon 4 tubos para cada medio, 8 tubos para cada cepa, 24 tubos en total; se comparó el crecimiento en dos medios de una vez. Para la elaboración de las curvas de crecimiento en medio completo y en medio pobre en hierro, se utilizó siempre el promedio de las lecturas de los 4 tubos. Para la preparación del inóculo se utilizó la técnica descrita anteriormente incluyendo los 4 días de agitación constante a 37°C, a 160 rpm, en agua destilada y desionizada, con el fin de agotar las reservas de hierro. Luego siguiendo los mismos procedimientos previamente enunciados, se sembraron las cepas en sus respectivos tubos, después de: a) Haber determinado las viabilidades iniciales, b) Haber verificado la ausencia de contaminantes mediante el examen directo, y c) De acuerdo al inóculo seleccionado por las curvas anteriores. Al hacer las lecturas en el espectrofotómetro (540 nm) se aceptó un margen de error de 5% de transmitancia (mayor y menor) de la que había sido escogida para el inóculo.

Se tomaron las mediciones de transmitancia a intervalos de 24 horas durante 264 horas. Luego se hizo nuevamente la determinación del porcentaje de viabilidad para cada tubo tomándose el promedio para cada medio como la viabilidad final.

Se comparó el crecimiento de *P. Brasiliensis* en medio completo sin hierro y en medio con 1,10 fenantrolina. Se evaluó el crecimiento de *P. Brasiliensis* frente a la adición de 1,10 fenantrolina y no frente a la transferrina ni al desferal, pues fue éste el quelante que más completamente inhibió el crecimiento de *C. Albicans* utilizada como control.

Curvas de crecimiento de *Cándida Albicans*:

Inicialmente se elaboraron curvas de manera idéntica, con lecturas cada 24 horas. Se observó que el crecimiento máximo se mantenía en las primeras 24 horas siendo escaso el crecimiento posterior. Además se habían reportado estudios en la literatura que evaluaban el crecimiento de *C. Albicans* cada 5 horas²³, obteniéndose diferencias en solo las primeras 20 horas de crecimiento. Por lo tanto las curvas controles con *C. Albicans* se elaboraron con registros de densidad óptica tomados cada 5 horas así:

Se inocularon 30 tubos y se colocaron en agitación constante a 37°C. a 160 rpm. Cada 5 horas se tomaban 3 tubos a los cuales se agregaba 1 cc de formol al 37%.

Este producía un retraso en el crecimiento del hongo en dichos tubos sin alterar la turbidez del medio y por lo tanto, estabilizaba la densidad óptica para esa hora.

Estos 3 tubos eran luego retirados del grupo que continuaba en crecimiento. Así se completaron 25 horas.

Para evitar error en la lectura se utilizó como blanco el mismo medio adicionado con 1 cc. de formol. Al finalizar las 25 horas se hacía la lectura en espectrofotómetro.

También en el caso de *C. Albicans* se elaboraron curvas de crecimiento comparativo en medios completos, pobre en hierro, y adicionados de transferrina, desferal y 1,10 fenantrolina.

Análisis estadístico:

Se evaluaron los diferentes puntos de las curvas de crecimiento, estableciéndose la presencia de diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de Test de Student apareado²⁶.

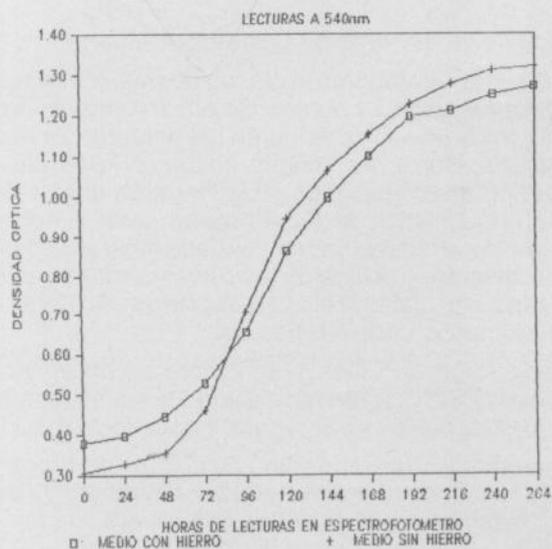
Resultados:

Las curvas de crecimiento de base que se elaboraron para la determinación del inóculo, demostraron un mayor crecimiento en los tubos cuyas diluciones iniciales correspondieron, por comparación, con la turbidez por Mc. Farland de 2,2 y 4 para las cepas "Gar", "Pied" y "Sua", respectivamente. Las densidades ópticas aceptadas fueron de 0.301-0.398 para Mc. Farland 2, y de 0.347-0.456 para Mc. Farland 4.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento de las tres cepas de *P. Brasiliensis* en los medios completo y pobre en hierro (figs. 1a, b, c). La adición de 1,10 fenantrolina tampoco influyó en el crecimiento de ninguna de las cepas de *P. Brasiliensis*. (Figs. 2a, b, c).

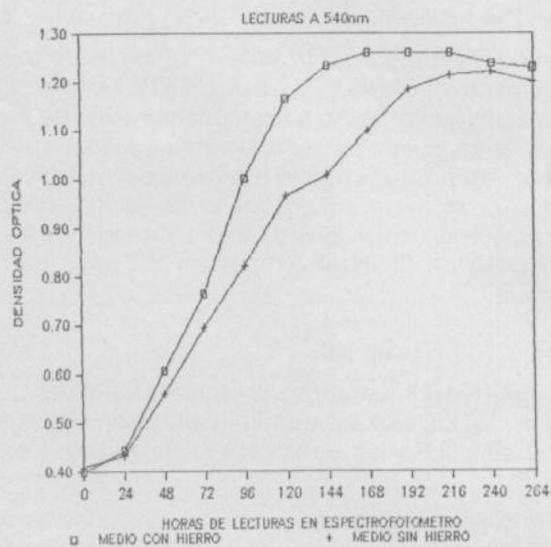
CRECIMIENTO COMPARADO DE TRES CEPAS DE
PARACOCCIDIROIDES BRASILIENSIS
("GAR", "PIED", Y "SUA")
EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN HIERRO

Fig 1a: Cepa "GAR"



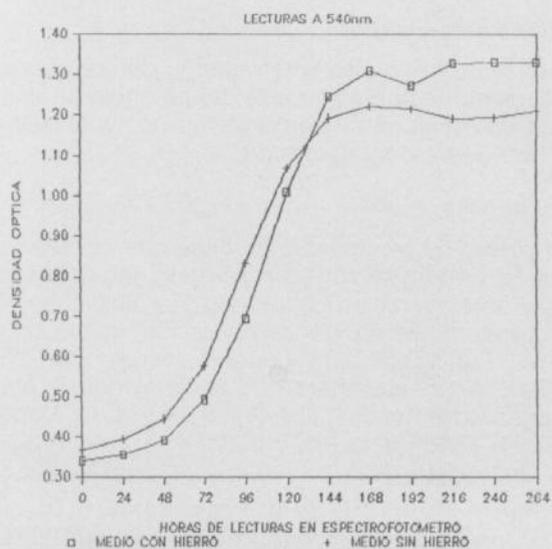
CRECIMIENTO COMPARADO DE TRES CEPAS DE
PARACOCCIDIROIDES BRASILIENSIS
EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN HIERRO

Fig 1c: Cepa "SUA"



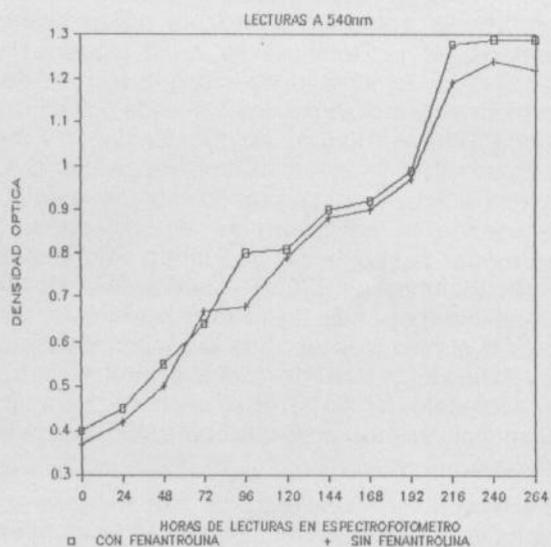
CRECIMIENTO COMPARADO DE TRES CEPAS DE
PARACOCCIDIROIDES BRASILIENSIS
("GAR", "PIED" Y "SUA")
EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN HIERRO

Fig 1b: Cepa "PIED"



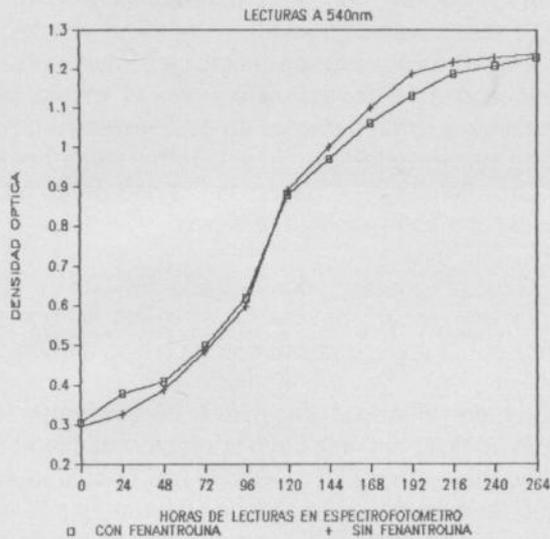
CRECIMIENTO COMPARADO DE TRES CEPAS DE
PARACOCCIDIROIDES BRASILIENSIS
("GAR", "PIED", Y "SUA")
EN DOS MEDIOS DE CULTIVO:
CON Y SIN 1,10 FENANTROLINA

Fig. 2a: Cepa "SUA"



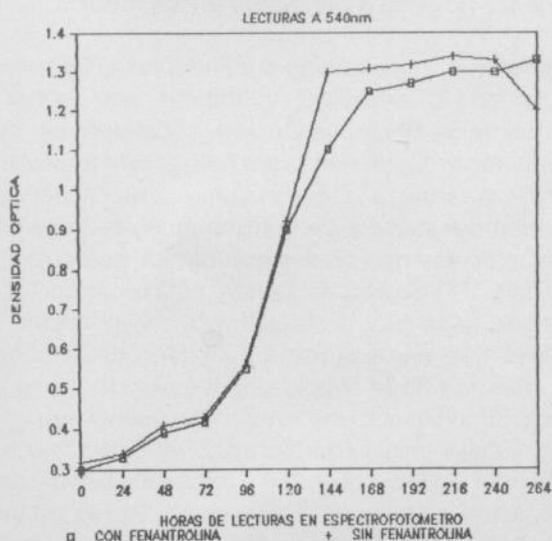
CRECIMIENTO COMPARADO DE TRES CEPAS DE PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS ("GAR", "PIED", Y "SUA") EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN 1,10 FENANTROLINA

Fig. 2b: Cepa "GAR"



CRECIMIENTO COMPARADO DE TRES CEPAS DE PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS ("GAR", "PIED", Y "SUA") EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN 1,10 FENANTROLINA

Fig. 2c: Cepa "PIED"



Con el objeto de determinar si existían diferencias entre las células cultivadas en los medios con y sin hierro, además de fenantrolina, se determinó la viabilidad inicial y final de cada una (tabla 1); tampoco aquí se encontraron diferencias significativas.

TABLA 1

VIABILIDADES INICIALES Y FINALES PARA TRES CEPAS DE PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS CRECIDAS A 37°C EN DISTINTOS MEDIOS			
VIABILIDAD INICIAL / VIABILIDAD FINAL (%)			
MEDIOS	PIED	CEPAS SUA	GAR
CON HIERRO	90/37	84/43.5	89/39
SIN HIERRO	90/44	84/47.5	89/32
CON FENANTROLINA	82/28	88/40	93/35
SIN FENANTROLINA	82/34	88/36	93/30

No hubo diferencia significativa en el crecimiento de *C. Albicans* en medio con y sin transferrina (fig. 3); sin embargo, se encontró diferencia estadística entre el crecimiento en medio con y sin desferal, inclusive a las 20 y 25 horas de lectura ($P=0.0047$ y $P=0.0084$, respectivamente) (fig. 4). También fue significativa la diferencia entre el crecimiento en medios con y sin fenantrolina (fig. 5). Puede observarse como en este caso, el crecimiento se inhibió casi totalmente en presencia del quelante, con diferencias marcadas, tanto a las 10 ($P=0.0000014$) como a las 25 horas ($P=0.00000056$).

Fig. 3

CRECIMIENTO COMPARADO DE UNA CEPA DE CANDIDA ALBICANS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN TRANSFERRINA.

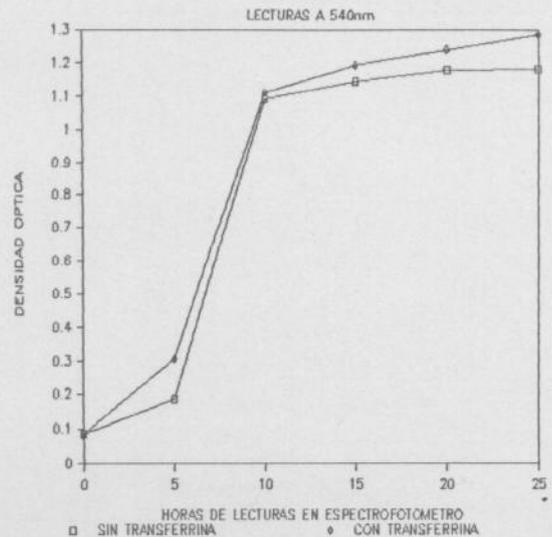


Fig. 4

CRECIMIENTO COMPARADO DE UNA CEPA DE CANDIDA ALBICANS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN DESFERAL.

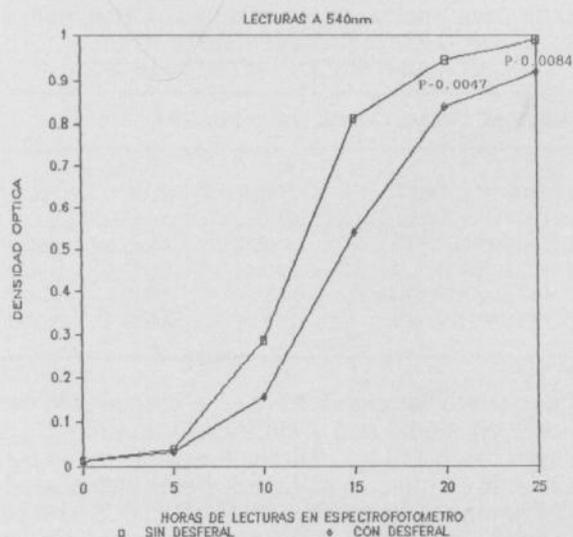
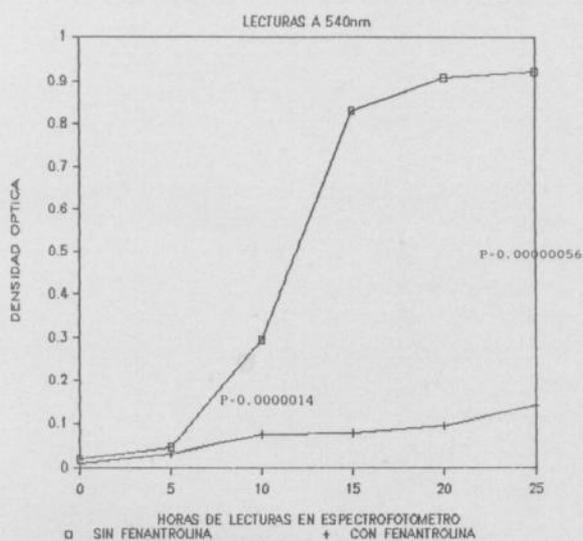


Fig. 5

CRECIMIENTO COMPARADO DE UNA CEPA DE CANDIDA ALBICANS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO: CON Y SIN 1,10 FENANTROLINA



Discusión:

El papel del hierro en el crecimiento de la forma levadura del *P. Brasiliensis* no parece ser de importancia. En efecto en este trabajo no se obtuvo inhibición significativa en el crecimiento del hongo en medios pobre en hierro (0.02 mg/l), adicionado con transferrina (33% de saturación), con desferoxamina (47, ug/ml), y con 1,10 fenantrolina (5 uM/l). Por el contrario, el crecimiento de *C. Albicans* se inhibió casi totalmente en el medio con 1,10 fenantrolina y en el medio con desferoxamina; el crecimiento en esta levadura no se inhibió en los otros medios. En esta forma se demostró que *P. Brasiliensis* tiene capacidades diferentes a las de *C. Albicans* con respecto al hierro.

Otros autores¹⁰ habían demostrado inhibición casi completa del crecimiento de *C. Albicans* en sueros humanos con transferrina saturada con hierro al 25, 50 y 75%.

También fue evaluado el crecimiento de este hongo en un medio artificial definido cuyo contenido de hierro se había reducido mediante la adición de conalbumina, quelante de este ión, para obtener diferentes porcentajes de saturación con el mismo. En este medio se obtuvo inhibición casi total de crecimiento cuando la saturación de la conalbumina con hierro era inferior al 100% y el escaso crecimiento observado se interpretó como el resultado de la presencia de pequeñas concentraciones de hierro en el inóculo. El efecto inhibitorio se revertía completamente cuando la saturación era igual o mayor al 100%. Se atribuyó el efecto inhibitorio del crecimiento del hongo a la baja concentración de hierro libre (deprivación de hierro), por la capacidad de captación (por porcentaje de saturación) que tenía cada uno de los quelantes presentes en los medios.

Posteriormente se examinó la influencia del tamaño del inóculo en la actividad inhibitoria que sobre el crecimiento de *Rhizopus Oryzae* y *Trichophyton mentagrophytes* presentan el suero humano, la transferrina y 1,10 fenantrolina⁷. Se encontró que la actividad inhibitoria del suero y de la transferrina se revertía al utilizar inóculos mayores o con mayor porcentaje de viabilidad. No ocurrió así con la 1,10 fenantrolina, en presencia de la cual el efecto inhibitorio persistía. Se concluyó que el mecanismo inhibitorio de la transferrina, además de la simple deprivación de hierro que explica la inhibición en medio de cultivo con 1,10 fenantrolina, involucraba interacciones directas con las células del cultivo. También se relacionaba con la viabilidad de las mismas. Para ese trabajo se estandarizó en 2.5 ug/ml la capacidad de captación de hierro de los medios utilizados. La capacidad de captación de

hierro que tenían la transferrina, la desferoxamina y 1,10 fenantrolina en este trabajo, fue de 0.04, 4 y 3,000 ug/ml respectivamente.

En otra investigación² en la que el crecimiento se evaluaba por concentración de ATP en el medio, también se obtuvo inhibición del crecimiento de *C. Albicans* en presencia de transferrina humana insaturada, no así cuando la transferrina estaba saturada.

Nuestros resultados con *C. Albicans* correlacionan con los hallazgos que se habían descrito para este hongo, excepto que no se obtuvo inhibición de su crecimiento con transferrina. La ausencia de efecto inhibitorio sobre el crecimiento de tal hongo no podría explicarse por falta de privación de hierro, considerando el porcentaje de saturación de la transferrina, pero si por un inóculo suficientemente grande y con alto porcentaje de viabilidad, como se explicó anteriormente.

También es cierto que la elaboración de un medio de cultivo sin contaminación con hierro continua siendo una limitación técnica, pues aún en medios de mayores recursos tecnológicos, se encuentra mucha dificultad en eliminar este ión a niveles verdaderamente despreciables^{12,16,17}.

Según nuestros resultados, la privación de hierro con 1,10 fenantrolina, la que resultó en inhibición del crecimiento de *Cándida Albicans* no ejerció igual efecto sobre el crecimiento del *Paracoccidioides Brasiliensis*.

En este momento no es posible determinar el mecanismo que explique este hecho pero posiblemente deberá considerarse también el tamaño del inóculo, la viabilidad de las cepas, y la producción de sideróforos, entre otras. Es aparente que el *Paracoccidioides Brasiliensis* presenta una mayor capacidad para crecer en un medio con privación de hierro que la *Cándida Albicans*, estando el primero dotado de cualidades que le permiten evadir uno de los mecanismos naturales de defensa que posee el suero humano.

La fenantrolina es igualmente capaz de quelar el hierro y el zinc¹³, hecho que hace aún más interesante el que este compuesto no haya sido capaz de inhibir el crecimiento de *P. Brasiliensis*, ya que el zinc ha sido demostrado como esencial en el desarrollo de otros hongos^{27,28,29}. Por ello parecería de importancia el determinar, en investigaciones futuras, el efecto que pudiera tener el zinc sobre el crecimiento de *P. Brasiliensis*.

Sería muy interesante evaluar el crecimiento de estos hongos en plasma humano con diferente capacidad de captación de hierro, por distintas saturaciones de transferrina, con diferentes inóculos y viabilidades, como se ha hecho con *C. Albicans* y algunos otros dermatófitos.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del laboratorio de la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB, por su colaboración técnica y científica.

BIBLIOGRAFIA

1. CALDWELL, C.W. & SPROUSE, R.F.: Iron and Host Resistance in Histoplasmosis. *J. Invest. Dermatol.*, 1967; 49: 437-442.
2. SHIRAISHI, A. & ARTA, T.: Antifungal Activity of Transferrin. *Sabouraudia*, 1979; 17: 79-83.
3. ESTERLY, N.B., BRAMMER, S.R. & CROUNSE, R.G.: The relationship of transferrin and iron to Serum inhibition of *Candida Albicans*. *J. Invest. Dermatol.*, 1967; 49: 437-442.
4. KING, R.D., KHAN, H.A., FOYE, J.C., GREENBERG, J.H., & JONES, H.E.: Transferrin, Iron, and Dermatophyte Inhibitory Component Definitively Identifies as Unsaturated Transferrin. *J. Lab. Clin. Meth.*, 1975; 86: 204-212.
5. LEWIN, R.: How Microorganisms Transport Iron. *Science*, 1984; 225: 401-402.
6. CAROLINE, L., ROSNER, F. & KOZINN, P.J.: Elevated Serum Iron, Low Unbound Transferrin and Candidiasis in Acute Leukemia, *Blood*, 1969; 34: 441-451.
7. ARTIS, W.M., PATRUSKY, F., RASTINEJAD, F. & DUNCAN, R.L.: Fungistatic Mechanism of Human Transferrin for *Rhizopus Orvsae* and *Trichophyton mentagrophytes*: Alternative to Simple Iron Deprivation. *Infec. Immun.*, 1983; 41: 1265-1278.
8. SUTCLIFFE, M.C., SAVAGE, A.M. & ALFORD, R.H.: Transferrin-Dependent Growth Inhibition of Yeast-Phase *Histoplasma capsulatum* by Human Serum and Lymph. *J. Infec. Dis.*, 1980; 142: 209-219.
9. BERGERON, R.J.: Iron: a Controlling Nutrient in Proliferative Processes. *TIBS*, 1986; 11: 133-134.
10. CAROLINE, L., TASCHDJIAN, C.L., KOZINN, P.J. & SCHADE, A.L.: Reversal of Serum Fungistasis by the Addition of Iron. *J. Invest. Dermatol.*, 1964; 42: 415-419.
11. ARTIS, W.M., WADE, T.R. & JONES, H.E.: Restoration of *Trichophyton mentagrophytes* growth in medium depleted of metals by chelation: Importance of Iron. *Sabouraudia*, 1983; 21: 41-48.

12. ISMAIL, A. & LUPAN, D.M.: Utilization of Siderophores by *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 1986; 96: 109-113.
13. BEDELL, G.W. & ANDERSON, R.V.: Inhibition of the Differentiation of *Candida albicans* by the Chelator 1,10 Phenanthroline. *Mycopathologia*, 1985; 92: 161-167.
14. WEINBERG, E.D.: Iron and Susceptibility to Infectious Disease. *Science*, 1974; 184: 952-956.
15. HOLZBERG, M & ARTIS, W.: Hydroxamate Siderophore Production by Opportunistic and Systemic Fungal Pathogens. *Infection and Immunity*, 1983; 40: 1134-1139.
16. KIRKPATRICK, C.H., GREEN, I., RICH, R.R. & SCHADE, A.L.: Inhibition of Growth of *Candida albicans* by Iron unsaturated Lactoferrin: Relation to Host-Defense Mechanisms in Chronic Mucocutaneous Candidiasis. *J. Infect. Dis.*, 1971; 124: 539-543.
17. HUSCHKA, H.G., MOLLER, G. & WINKELMANN, G.: The Membrane Potential is the Driving Force for Siderophore Iron Transport in Fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 1983; 20: 125-129.
18. LEVITZ, S.M. & DIAMOND, R.: Killing of *aspergillus fumigatus* Spores and *Candida albicans* Yeast Phase by the Iron-Hydrogen Peroxide Cytotoxic System; Comparison with the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Halide System. *Infection Immunity*, 1984; 43: 1100-1102.
19. WEINBERG, E.: Iron and Infection. *Microbiological Reviews*, 1978; 42: 45-66.
20. ISMAIL, A., BEDELL, G. & LUPAN, D.: Effect of Temperature on Siderophore Production by *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 1985; 132: 1160-1165.
21. ISMAIL, A., BEDELL, G. & LUPAN, D.: Siderophore Production by the Pathogenic Yeast, *Candida Albicans*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 1985; 130: 885-891.
22. RESTREPO, A. & JIMENEZ, B.: Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Phase in a Chemically defined Medium. *J. Clin. Microb.*, 1980; 12: 279-281.
23. RESTREPO, A., CANO, L.E., DEBÉDOUT, C., BRUMMER, E. & STEVENS, D.A.: Comparison of Various Techniques for determining Viability of *Paracoccidioides Brasiliensis* Yeast-Form Cells. *J. Clin. Microb.*, 1982; 16: 209-211.
24. LEAVELL, S., THORUP, O.: *Fundamentals of Clinical Hematology*. W. B. Saunders, Philadelphia, 1976: 130-138.
25. BAKER, C.: *Physicians Desk Reference*. Medical Economics Company, Gradell, N.J., 1978; 748-749.
26. COLTON, T.: *Statistics in Medicine*. Little Brown Company, Boston, M.A., 1974.
27. ANDERSON, J.M. & SOLL, D.R.: Effects of Zinc on Stationary-phase Phenotype and Macromolecular Synthesis Accompanying Outgrowth of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1984; 46: 13-21.
28. BEDELL, G. & SOLL, D.: Effects of Zinc on the Growth and Dimorphism of *Candida albicans*: Evidence for Zinc Resistant and Sensitive Pathways for Mycelium Formation. *Infect. Immun.*, 1979; 26: 348-354.
29. SOLL, D., BEDELL, G. & BRUMMEL, M.: Zinc and the Regulation of Growth and Phenotype in the Infectious Yeast *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 1981; 32: 1139-1147.