



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DE TLR2 Y MyD88  
EN LA RESPUESTA INMUNE  
FRENTE A *Candida albicans***

TESIS DOCTORAL  
presentada por:

Eva Villamón Ribate  
Valencia, diciembre 2004

UMI Number: U607772

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607772

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



PARTICIPACION DE TRABAJO EN LA RESPUESTA INMEDIATA

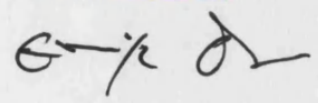
FACULTAD DE FARMACIA BIBLIOTECA VALENCIA
Fecha de entrada: 10-3-2005
Signatura: _____
Registro: 12467

i. 19585986.

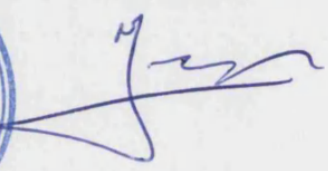
UNIVERSIDAD DE VALENCIA      FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, a esta Tesis doctoral de D. ...EVA VILLANON RIBATE... la calificación de...EXCEL. LENT. U.M. LAudem...  
Valencia, a...9...de...MARZO...de...2005

El Secretario,



El Presidente,







VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Don Daniel Gozalbo Flor y Dña. M<sup>a</sup> Luisa Gil Herrero, profesores titulares de la  
Universitat de València,

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo presentado por la Lda. **Eva Villamón Ribate**, titulado  
"Participación de TLR2 y MyD88 en la respuesta inmune frente a *Candida albicans*" ha  
sido realizado en el Departamento de Microbiología y Ecología de Universitat de  
València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta  
Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Valencia, diciembre de 2004

D. Daniel Gozalbo Flor

Dña. M<sup>a</sup> Luisa Gil Herrero



La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

PROYECTO 01/0527, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.

PROYECTO PI03/0647, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.

PROYECTO GV043/75, Consejería de Cultura, educación y deporte, Generalidad Valenciana.

AYUDAS A GRUPOS 03/172, Consejería de Cultura, Educación y Deporte, Generalidad Valenciana.





*A José Vicente*



Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A los directores de la tesis, Dr. Daniel Gozalbo y Dra. M<sup>a</sup> Luisa Gil, por haber confiado en mí cuando tuvieron la posibilidad de pedir una beca predoctoral; por la dirección de la tesis que han realizado, por su ayuda incondicional y amistad, trabajar con ellos ha sido una experiencia muy positiva en todos los aspectos.

A los Drs. Didier Fradelizi y Jaques Bertoglio por haberme dado la oportunidad de trabajar en sus laboratorios, por su ayuda y amistad durante todo el tiempo.

Al Dr. José Enrique O'Connor por asesorarnos en el desarrollo de esta tesis, especialmente en todo lo relacionado con la citometría de flujo; por la beca de colaboración que me concedió durante tres meses y que permitió que terminara el trabajo experimental.

A las Dras. M<sup>a</sup> Luisa Ferrándiz y M<sup>a</sup> Carmen Terencio por su ayuda en la manipulación de los animales y en la medida de la PGE<sub>2</sub>.

A Luisa, Patricia y Celia por su amistad y ayuda en todo momento.

A Ana Flores, por su dedicación incondicional para que todo funcione bien en cultivos celulares y por su ayuda y asesoramiento siempre que lo he necesitado.

A familiares y amigos que aunque no entienden nada de lo que he estado haciendo durante estos años me han ayudado a llevar los momentos difíciles con más optimismo.

A José Vicente por su inestimable ayuda, comprensión y compañía, por lo bien que sabemos llevarlo todo juntos, si no hubiera sido por él hace tiempo que hubiera tenido que abandonar la idea de hacer investigación.



<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.- <i>Candida albicans</i>: características generales.....</b>	<b>3</b>
1.1.- La pared celular de <i>Candida albicans</i> .....	4
1.2.- <i>Candida albicans</i> como agente patógeno .....	6
1.2.1.- Factores de virulencia .....	8
A.- Dimorfismo .....	8
B.- Adhesión.....	10
C.- Secreción de enzimas hidrolíticas .....	16
D.- Cambio fenotípico o "switching" .....	17
<b>2.- Respuesta inmune frente a <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>19</b>
2.1.- Barreras físicas, bioquímicas y microbiológicas .....	20
2.2.- Inmunidad innata.....	21
2.2.1.- Activación del complemento .....	21
2.2.2.- Fagocitosis .....	22
2.2.3.- Inflamación inducida por complemento, eicosanoides y citocinas.....	25
2.2.4.- Activación de células "Natural Killer" (NK).....	29
2.3.- Inmunidad específica .....	30
2.3.1.- Inmunidad mediada por células .....	30
2.3.2.- Linfocitos B: anticuerpos .....	33
<b>3.- "Toll-Like Receptors" (TLR).....</b>	<b>36</b>
3.1.- Papel de los TLR en la respuesta inmune .....	38
3.1.1.- Los ligandos de los TLR.....	39
A.- TLR4 .....	41
B.- TLR2 .....	41
3.1.2.- Vías de transducción de señal de los TLR.....	43
A.- Transducción de señal dependiente de MyD88 .....	44
B.- Transducción de señal independiente de MyD88 .....	45
3.1.3.- Distribución de los TLR.....	46
3.2.- TLR y <i>Candida albicans</i> .....	48
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>III. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>ARTÍCULO 1: E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against <i>Candida albicans</i> infections. Microbes and Infection 6: 1-7.....</b>	<b>57</b>
<b>ARTÍCULO 2: E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, M.L. Ferrandiz, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004. Toll-like receptor-2 is dispensable for acquired host immune resistance to <i>Candida albicans</i> in a murine model of disseminated candidiasis. Microbes and Infection 6: 542-548.....</b>	<b>67</b>

**ARTÍCULO 3: E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, C. Murciano, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004. Myeloid differentiation factor (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines. European Cytokine Network 15: 263-271. ....77**

**ARTÍCULO 4: E. Villamón, P. Roig, M.L. Gil, D. Gozalbo, 2005. Toll-like receptor 2 mediates prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*. Research in Microbiology, en prensa. ....89**

**IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 95**

**1.- Estudio de la participación del receptor TLR2 en la respuesta inmune innata y adquirida frente a *Candida albicans*.....97**

**2.- Estudio de la participación de MyD88 en la respuesta inmune innata y adquirida frente a *Candida albicans* .....103**

**3.- Estudio de la participación de los receptores TLR2 y TLR4 en la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *Candida albicans* .....107**

**V. CONCLUSIONES ..... 109**

**VI. BIBLIOGRAFÍA ..... 113**

## **I. INTRODUCCIÓN**

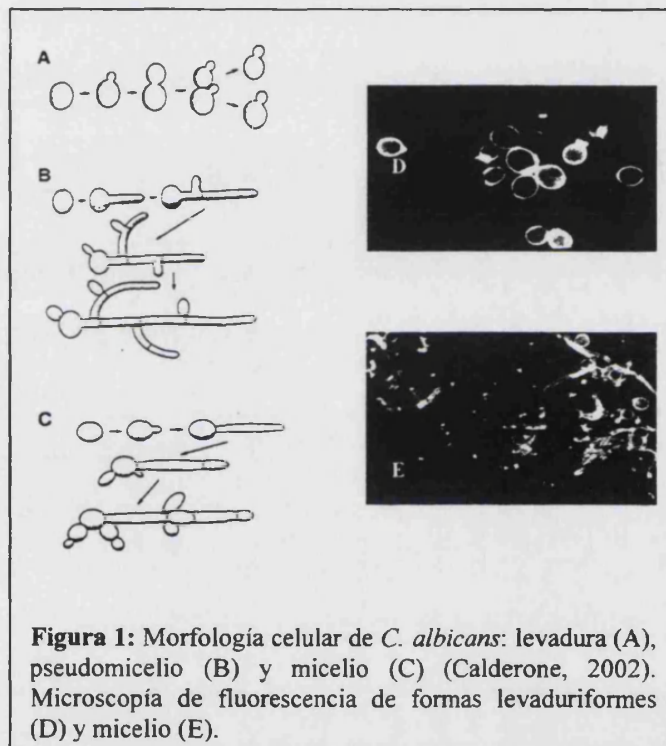




## 1.- *Candida albicans*: características generales

*C. albicans* es un hongo diploide unicelular que pertenece al grupo de los *Deuteromycetes*, conocidos con el nombre común de hongos imperfectos, por carecer de ciclo de reproducción sexual conocido, reproduciéndose asexualmente mediante la formación de conidios (Carile y Watkinson, 1994).

*C. albicans* es un hongo dimórfico que normalmente crece como levadura



(blastospora o blastoconidio), pero que en determinadas condiciones ambientales emite tubos germinales o hifas (fase de micelio) (Figura 1). Sin embargo, esta especie puede ser considerada como un hongo polimórfico, ya que también se han detectado otras dos morfologías fúngicas: (i) pseudohifa o pseudomicelio, que se diferencia del micelio en el grosor y en la presencia

de una constricción en las uniones septales, originándose células alargadas por gemación a partir de blastosporas o de otra pseudohifa, que permanecen unidas a la célula parental, pudiendo llegar a parecer un verdadero micelio, (ii) las clamidosporas (esporas asexuales), que presentan forma redondeada y son formas de resistencia generadas a partir del micelio bajo determinadas condiciones desfavorables (Odds, 1988; Kerridge, 1993).

*C. albicans* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, hallándose frecuentemente como comensal inocuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal, y en el tracto gastrointestinal del hombre y otros mamíferos. En individuos sanos suele encontrarse en forma saprófita, pero bajo determinadas condiciones puede invadir cualquier tejido del cuerpo desde su hábitat normal y

manifestar carácter patógeno, por lo que es considerada como un patógeno oportunista (Calderone, 2002).

Aunque los *Deuteromycetes* carecen de ciclo sexual, recientemente se han encontrado evidencias genéticas y fisiológicas que indican que *C. albicans* puede experimentar bajo ciertas condiciones el proceso de conjugación, generando variantes genéticas que podrían favorecer la supervivencia del hongo durante el proceso de infección en el hospedador (Gow *et al.*, 2000; Tzung *et al.*, 2001; Lockhart *et al.*, 2003).

### **1.1.- La pared celular de *Candida albicans***

La pared celular de *C. albicans* es una estructura dinámica y compleja que protege a la célula de los cambios de presión osmótica y le confiere su forma característica. Además de su función en la morfogénesis, por ser la estructura celular más externa, la pared celular tiene una función esencial en las interacciones con el hospedador, tales como la adhesión y la modulación de la respuesta inmune (Chaffin *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

La pared celular está formada mayoritariamente por carbohidratos (80-90% del peso seco de la pared), mientras que las proteínas representan el 20% y los lípidos son un componente minoritario (1-7%). Los principales polisacáridos de la pared son de 3 tipos: (i)  $\beta$ -glucanos, que son polímeros de glucosa con uniones  $\beta(1,3)$  y  $\beta(1,6)$ , (ii) quitina, que es un polímero lineal de N-acetil-D-glucosamina con enlaces  $\beta(1,4)$  y (iii) manano, conjunto de polímeros de manosa unidos covalentemente a proteínas (manoproteínas) (Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

Glucanos y quitina forman un esqueleto que da forma y aporta rigidez a la pared celular. Los  $\beta$ -glucanos son el principal polisacárido de la pared, aproximadamente el 60% del peso seco de la misma, mientras que la quitina es un componente minoritario (0,6-9%).

El manano permanece unido covalentemente a proteínas (manoproteínas) y representa el 40% de los polisacáridos de la pared celular. Los polímeros de manosa se unen a residuos de asparagina mediante un enlace N-glicosídico con dos N-acetilglucosaminas, o bien se unen a residuos de treonina o serina por un enlace O-glicosídico (Chaffin *et al.*, 1998; Gow *et al.*, 1999). Las manoproteínas se encuentran asociadas a la pared celular de diferentes formas: algunas permanecen débilmente unidas a otros componentes de la pared y son solubilizadas por agentes caotrópicos o con detergentes; otras están unidas covalentemente a polímeros estructurales y sólo son solubilizadas tras tratamientos enzimáticos con  $\beta$ -glucanasas y/o quitinasas; por último, un tercer grupo se extrae con agentes reductores, indicando su unión a otras manoproteínas de la pared celular mediante puentes disulfuro (Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

Distintas interacciones entre estos componentes (glucano, quitina y manoproteínas) son las responsables de la arquitectura final de la pared celular. Los glucanos forman una red tridimensional que constituye el soporte para otros componentes celulares, la quitina se une covalentemente al glucano y se encuentra en capas internas, y las manoproteínas se distribuyen a lo largo de toda la estructura de la pared y son el componente mayoritario en capas externas, pudiendo formar extensiones filamentosas denominadas fimbrias (Klis *et al.*, 2001; Gozalbo *et al.*, 2004).

Los lípidos están presentes formando parte del complejo fosfolipomanano (PLM), formado por oligomanósidos asociados a moléculas lipídicas. El PLM es un derivado de inositol fosfoceramida, originado por la adición de manosas fosfato, que dan lugar a un glicosfingolípido altamente glicosilado, cuyo carácter hidrofílico permite su difusión a través de la pared celular (Poulain *et al.*, 2002; Trinel *et al.*, 2002).

## 1.2.- *Candida albicans* como agente patógeno

*C. albicans* como patógeno oportunista puede producir distintos tipos de patologías denominadas genéricamente candidiasis, término que se refiere a cualquier infección causada por especies del género *Candida*, siendo la especie *C. albicans* la más frecuentemente aislada en las infecciones nosocomiales, aunque en los últimos años ha aumentado el aislamiento de otras especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, etc. (Calderone, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2002).

Las infecciones producidas por *C. albicans* pueden dividirse en dos categorías: superficiales y sistémicas. En las candidiasis superficiales se ven afectadas las mucosas del tracto gastrointestinal, oral o vaginal, por infecciones que en ocasiones presentan un carácter crónico y que, en la mayoría de los casos, suelen resolverse tras un tratamiento antifúngico. Sin embargo, las candidiasis sistémicas o invasivas se diagnostican cuando se encuentran microorganismos del género *Candida* en sangre, afectando o no a los tejidos, o cuando la infección se ha extendido y afecta a uno o varios órganos internos; estas infecciones aparecen fundamentalmente en pacientes inmunocomprometidos por diferentes causas. La incidencia de las candidiasis sistémicas ha aumentado notablemente en las últimas décadas debido a la concurrencia de una serie de factores, como la terapia masiva con antibióticos, la utilización de pautas inmunosupresoras intensivas en pacientes neoplásicos y trasplantados, la nutrición parenteral, el empleo de prácticas quirúrgicas y técnicas terapéuticas y diagnósticas agresivas, siendo la candidiasis una de las principales causas de mortalidad en pacientes inmunodeprimidos (Dixon *et al.*, 1996; Garber, 2001).

Las infecciones fúngicas invasivas representan una de las principales causas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos debido, al menos en parte, a que tanto el diagnóstico como el tratamiento son complicados. Las candidiasis sistémicas son difíciles de diagnosticar, ya que la mayoría de los pacientes no muestran signos clínicos específicos que indiquen la existencia de una infección fúngica. El método de diagnóstico clásico consiste en aislar al microorganismo

por hemocultivo, pero es problemático por su baja sensibilidad y porque la presencia del microorganismo en sangre es transitoria; además es necesaria la identificación del mismo mediante varios métodos, como el test de germinación en suero y tests bioquímicos de asimilación de azúcares (Bodey, 1993). Alternativamente, los test serológicos pueden ser útiles para el diagnóstico cuando los hemocultivos son negativos, aunque el diagnóstico basado en la detección de antígenos o anticuerpos en sangre presenta problemas de baja sensibilidad o especificidad (De Repentigny *et al.*, 1994). Por otro lado, el creciente conocimiento de la genética molecular de *C. albicans* y la necesidad de un método rápido de diagnóstico, han potenciado el desarrollo de técnicas de biología molecular para identificar especies del género *Candida*. Las técnicas de PCR han sido ampliamente utilizadas para detectar e identificar diferentes especies del género, empleando distintos genes como dianas para la amplificación (Buchman *et al.*, 1990; Donnelly *et al.*, 1999; Maneu *et al.*, 2000; Wahyuningshi *et al.*, 2000; Kanbe *et al.*, 2002; Arancia *et al.*, 2004).

El tratamiento de las micosis sistémicas, incluyendo las candidiasis, se ha basado fundamentalmente en el empleo de tres clases de fármacos: antibióticos poliénicos, flucitosina y azoles. No obstante, estos compuestos tienen inconvenientes, tales como la toxicidad o la inducción de aparición de resistencias y por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas drogas antifúngicas (Sanglard y Odds, 2002; Odds *et al.*, 2003). Recientemente, han aparecido nuevos antifúngicos de aplicación clínica: (i) triazoles de nueva generación (posaconazol, ravuconazol, voriconazol), (ii) nuevos antibióticos del grupo de las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina); estas nuevas equinocandinas representan los únicos antifúngicos de interés clínico que actúan sobre una nueva diana (inhibición de la biosíntesis de glucano) tras varias décadas de investigación (Odds *et al.*, 2003; Gozalbo *et al.*, 2004).

### 1.2.1.- Factores de virulencia

La virulencia de *C. albicans* viene determinada por un conjunto de factores que incluyen tanto la capacidad del hongo para provocar una infección, como la respuesta del hospedador ante la invasión fúngica. Las infecciones por *Candida* aparecen tras varias etapas secuenciales. La adhesión a la superficie de los epitelios inicia el proceso y la colonización de ésta es la segunda etapa. Los factores fúngicos y del hospedador implicados en estas etapas probablemente no son los mismos que los requeridos para la penetración de las superficies epiteliales. Esta penetración marca, en muchos casos, el límite del proceso infeccioso (dando como resultado infecciones superficiales), ya que *C. albicans* normalmente no es capaz de proseguir el proceso invasivo en hospedadores inmunológicamente sanos. No obstante, en situaciones en las que el hongo es capaz de alcanzar la sangre, debe necesariamente expresar factores que lo protejan contra las defensas del hospedador. Para causar una infección diseminada, las células fúngicas deben expresar los factores necesarios para atravesar los endotelios e invadir los tejidos (Hostetter, 1994; Weig *et al.*, 1998; Calderone, 2002).

Por lo tanto, la patogenicidad de *C. albicans* depende de diferentes factores de virulencia del hongo, entre los cuales están el dimorfismo, la expresión de adhesinas y receptores superficiales para ligandos de los tejidos animales y la hidrofobicidad de la superficie celular, la producción de exoenzimas hidrolíticas, el cambio fenotípico, así como la inmunomodulación de la respuesta inmune.

#### A.- Dimorfismo

Uno de los factores de virulencia más estudiados en *C. albicans* es el dimorfismo. La transición morfológica levadura-micelio depende de factores ambientales como el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la hemina, etc., y se inicia mediante la formación del tubo germinativo a partir de levaduras (Casanova *et al.*, 1997; van Burik y Magee, 2001). Dicha transición morfológica

se ha considerado tradicionalmente como un factor de virulencia, puesto que cuando *C. albicans* crece como saprófito sólo se encuentran formas levaduriformes, mientras que en tejidos infectados pueden encontrarse tanto levaduras como micelios y pseudomicelios (Calderone, 2002), sugiriéndose que la forma micelial podría estar mejor adaptada que las levaduras para la adhesión y penetración de las capas epiteliales (Calderone, 1993; Gow *et al.*, 1994; Krestchmar *et al.*, 1999), aunque no existe una demostración inequívoca. Mutantes monomórficos incapaces de miceliar son menos virulentos, o avirulentos, lo que apoyaría la idea de la implicación de la transición levadura-micelio en la virulencia (Lo *et al.*, 1997; Baillie y Douglas, 1999; Ramage *et al.*, 2002; Romani *et al.*, 2003). También se ha observado que la forma micelial inhibe la liberación de interleucina-12 (IL-12) por los monocitos, y que las células dendríticas de ratón son capaces de discriminar entre las levaduras y los micelios, secretando IL-12 sólo en respuesta a las levaduras (d'Ostiani *et al.*, 2000). La liberación de IL-12 es necesaria para la aparición de una respuesta inmune de células T-helper tipo 1 (Th1), que se considera protectora, mientras que una respuesta Th2 (T-helper tipo 2) se asocia a infecciones crónicas (véase apartado 2.3.1.).

La transición levadura-micelio implica una respuesta celular a ciertos estímulos ambientales que desencadenan un cambio de patrón de crecimiento y de las características de la pared celular. Estos cambios le confieren particularidades propias a la forma micelial que afectan a la adhesión, la hidrofobicidad, la expresión de antígenos y podrían estar implicados en una mayor virulencia (Soll, 1990). Por lo tanto el dimorfismo no sólo representa un factor de virulencia "per se", sino también por estar corregulado junto a otros factores de virulencia asociados a la morfología celular (Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000).

La base genética de dichos cambios morfológicos está siendo actualmente muy estudiada. Se conoce que en la transición morfológica están implicadas varias rutas de transducción de señal que incluyen factores de transcripción específicos. Así, determinados factores ambientales activan a través de proteínas



sensores diferentes rutas de transducción de señal. Estas rutas pueden converger en factores de transcripción distintos o idénticos (Tup1, Efg1, etc.) que regulan la expresión de genes diana responsables de la transición morfológica (Braun y Johnson, 2000; Ernst, 2000; Liu, 2001).

### **B.- Adhesión**

Las interacciones físicas entre las células de *C. albicans* y las células del hospedador están mediadas por moléculas de la pared celular del hongo, por ser la estructura más externa del microorganismo. La función de estas interacciones en patogénesis es compleja, ya que existen una gran variedad de factores de adhesión cuya participación en virulencia depende de la cepa del hongo, del tejido del hospedador infectado y del estado del paciente. Aunque componentes de la pared celular como quitina, glucanos o moléculas lipídicas participan parcialmente en la adhesión de *C. albicans* al hospedador, las proteínas y manoproteínas son las principales responsables de tal proceso (Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

*C. albicans* tiene capacidad para adherirse a células epiteliales y endoteliales, a proteínas séricas, a la matriz extracelular y a ciertos materiales inertes como prótesis, catéteres, etc. Los constituyentes de la pared celular implicados en esta unión han sido genéricamente designados con el término "adhesinas" (Calderone y Fonzi, 2001), y su variedad podría ser un reflejo de la heterogeneidad de tejidos que puede invadir en el hospedador (Calderone y Braun, 1991; Hostetter, 1994; Fukazawa y Kagaya, 1997; Douglas, 2003).

La adhesión del microorganismo al hospedador implica distintos tipos de interacciones moleculares. Además de las interacciones receptor-ligando, la adhesión a plástico y la hidrofobicidad de la superficie celular fúngica (HSC) pueden tener también una función importante en patogénesis. En este sentido, podemos destacar varios tipos de interacciones en la adhesión del hongo al hospedador:

**Moléculas tipo lectina:** Las adhesinas de *C. albicans* pueden interactuar con receptores glicosídicos (glicoproteínas o glicolípidos) de una forma similar a la descrita para las lectinas en diferentes mecanismos de adhesión bacterianos. Este tipo de adhesión ha resultado ser el más utilizado en la interacción con células epiteliales. En *C. albicans* se han descrito una gran variedad de moléculas tipo lectina, las cuales reconocen diferentes grupos antígenicos, como glicósidos que contienen L-fucosa o N-acetilgalactosamina, que pueden servir de receptores del microorganismo en células epiteliales. La unión del hongo a la superficie de eritrocitos está mediada por ligandos azucarados, y dicha interacción parece estar relacionada con la capacidad del hongo para la adquisición de hierro. Las fimbrias fúngicas se unen directamente a las células epiteliales de la boca, estando implicada en esta interacción una glicoproteína de 66kDa. Esta proteína es la subunidad mayor de las fimbrias y media la unión a glicoesfingolípidos presentes en las células epiteliales. Además, entre las muchas adhesinas que *C. albicans* utiliza para unirse al colágeno de tipo IV, se encuentran algunas lectinas capaces de interactuar con oligosacáridos específicos presentes a nivel del ligando. Los receptores tipo lectina de *C. albicans* también reconocen proteínas de saliva, (como mucinas) o complejos bacterianos polisacáridicos (mediando la interacción con especies del género *Streptococcus*), lo que contribuye a la colonización oral por el hongo (Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

**Proteínas que reconocen ligandos que presentan la secuencia arginina-glicina-aspártico (RGD):** Muchos de los ligandos reconocidos por receptores fúngicos contienen el motivo con la secuencia RGD. Así, las adhesinas de *C. albicans* presentan ciertas similitudes en cuanto a su estructura y función con las integrinas de mamífero. Las secuencias RGD se encuentran en proteínas de la matriz extracelular, en el fragmento C3 del complemento y en el fibrinógeno, y son capaces de interactuar con integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de mamífero. Dichas integrinas son proteínas transmembrana heterodiméricas que presentan un importante papel en la adhesión de células de mamífero a la matriz extracelular (Fukazawa y Kagaya, 1997; Hostetter, 1999).

*C. albicans* presenta receptores para productos de conversión del fragmento C3 del complemento (fragmentos C3d e iC3d). La deposición de fragmentos del complemento en determinadas superficies, como células endoteliales, epiteliales o materiales plásticos, podría mediar la adhesión del hongo a dichas superficies. A través de los receptores fúngicos del complemento se pueden formar agregados de células del hongo que podrían protegerlo de la fagocitosis. Además, la superficie de *C. albicans* es capaz de unir factores reguladores del complemento (H y FHL-1), lo que podría regular la activación de la vía alternativa del complemento e inactivar productos tóxicos procedentes de la activación del mismo (Meri *et al.*, 2002; Gozalbo *et al.*, 2004).

*C. albicans* presenta una importante afinidad por diferentes proteínas de la matriz extracelular, como laminina y fibronectina. Estas interacciones están mediadas por receptores fúngicos tipo integrina y facilitan la colonización por el hongo de las superficies endoteliales y epiteliales (Hostetter, 1994; Hostetter, 1999; Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004). La laminina es el mayor componente de la membrana basal y es reconocida por una gran variedad de receptores de *C. albicans*. Por otro lado, estudios de adhesión del hongo al endotelio indicaron que la fibronectina es el ligando más importante en la adhesión de *C. albicans*, lo que ha llevado a la identificación de diferentes receptores en la pared celular del hongo, tanto de la forma levaduriforme como micelial, habiéndose descrito una gran variedad de adhesinas tipo integrina con múltiples propiedades y diferentes afinidades por el ligando. La adhesión de *C. albicans* al colágeno de tipo I y de tipo IV de la membrana basal está completamente inhibida por la presencia de fibronectina, lo que indica que los mismos receptores pueden ser los responsables de ambas interacciones; en este sentido, se han descrito moléculas responsables de la unión a fibronectina y colágeno que son similares entre sí. En la unión de los receptores del hongo con el colágeno deben estar implicados diferentes tipos de interacciones, ya que la presencia de péptidos RGD solamente inhibe la adhesión al colágeno tipo IV. También se han descrito adhesinas tipo lectina capaces de ligar colágeno (Chaffin *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 2001). Las células de *C. albicans* son capaces

de interactuar con vitronectina, una proteína que forma parte de las paredes vasculares y de la dermis, y que está presente en el suero, donde interviene en la regulación de la coagulación sanguínea. En la adhesión del hongo a vitronectina y a las células endoteliales humanas están implicados receptores fúngicos tipo integrina y en ella participan además los dominios glicosaminoglicanos de la vitronectina, que parecen ser los responsables de la regulación de la adhesión (Chaffin *et al.*, 1998; Santoni *et al.*, 2001). Además se ha descrito la interacción del  $\beta$ -glucano del hongo y la vitronectina, en la cual también parecen estar implicados los dominios glicosaminoglicanos de la vitronectina. Por otro lado, la vitronectina presenta más capacidad de adsorción a biomateriales poliméricos que otras proteínas de la matriz extracelular o del suero, lo que facilita la posible adhesión del hongo a catéteres o prótesis, favoreciéndose las infecciones nosocomiales por *C. albicans*. Se ha demostrado que la capacidad de unión de *C. albicans* a entactina, una glicoproteína presente en la matriz extracelular, está mediada por sitios de unión de péptidos RGD. Además de participar en la adhesión, las moléculas fúngicas tipo integrina tienen funciones importantes en la fisiología del hongo, como se ha descrito para Intp, un receptor tipo integrina implicado en la adhesión y que participa en la transición levadura-micelio y por lo tanto en la virulencia (Gale *et al.*, 1998; Hostetter, 1999; Gozalbo *et al.*, 2004).

**Otras proteínas de unión:** Varias manoproteínas de la superficie celular de *C. albicans* interactúan con fibrinógeno, y también con laminina y C3d, lo que sugiere su relación con integrinas de mamíferos (Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Hostetter, 1999). El receptor para el fibrinógeno mejor caracterizado es una manoproteína de 58 kDa, que parece interactuar con el fibrinógeno a través de su porción O-glicosídica. La capacidad de *C. albicans* de interactuar con fibrinógeno puede ser un factor de virulencia del hongo, puesto que proteínas de la coagulación sanguínea, como la fibrina, parecen actuar como receptores de las células fúngicas, permitiendo su unión a los coágulos sanguíneos *in vivo*, por lo que una coagulación intravascular diseminada puede desencadenar una septicemia por *C. albicans*. Además, la unión de *C. albicans* a las plaquetas parece estar mediada por plasminógeno. Se han descrito una gran



variedad de proteínas de la pared celular del hongo implicadas en la unión al plasminógeno; esta unión no parece estar mediada por manano, habiéndose determinado la participación de residuos de lisina del extremo C-terminal de estas proteínas (Crowe *et al.*, 2003). La activación, por activadores del hospedador, del plasminógeno unido al hongo podría originar un incremento de la capacidad del hongo para invadir los tejidos y provocar necrosis.

La familia de proteínas Als (codificadas por las secuencias ALS “Agglutinin-Like Sequences”) está formada por glicoproteínas implicadas en la adhesión a superficies del hospedador. Estas proteínas y Hwp1, una proteína relacionada estructuralmente con las Als, presentan un péptido señal en el extremo N-terminal y un extremo C-terminal con dominios que median la adición de un residuo glicosilfosfatidilinositol y su interacción con el glucano de la pared celular (Sundstrom, 2002; Alberti-Segui *et al.*, 2004). Las proteínas Als son capaces de interactuar con distintos ligandos del hospedador como laminina, fibronectina y colágeno, probablemente al reconocer determinados grupos de aminoácidos (treonina, serina o alanina). Hwp1 es un sustrato de la transglutaminasa epitelial, lo que favorece la adhesión del hongo a la superficie epitelial a través de enlaces covalentes (Staab *et al.*, 1999). Algunas de estas adhesinas, además de su implicación en virulencia, juegan un papel importante en la fisiología de *C. albicans*, participando por ejemplo en la transición levadura-micelio y en la conjugación (Sundstrom, 2002; Alberti-Segui *et al.*, 2004).

**Proteínas que se unen al plástico:** La capacidad que presenta *C. albicans* para adherirse a materiales de plástico usados en la práctica clínica (catéteres, prótesis, etc.) contribuye a la aparición de muchas infecciones nosocomiales. Tras la adhesión, el microorganismo puede formar “biofilms” que favorecen o inician la aparición de infecciones diseminadas (Douglas, 2003). Se han descrito numerosas especies proteicas y manoproteicas implicadas en la adhesión a material plástico, cuya expresión depende de múltiples factores ambientales (Chaffin *et al.*, 1998; Chandra *et al.*, 2001). La adherencia al plástico parece estar relacionada con la HSC del hongo, ya que se producen interacciones hidrofóbicas

entre la superficie del plástico y la parte peptídica de manoproteínas, lo que facilita la colonización por el hongo. Proteínas de la saliva son capaces de adsorberse al material plástico de prótesis dentales, lo que favorece la colonización por las células fúngicas (San Millan *et al.*, 2000; Holmes *et al.*, 2002; Gozalbo *et al.*, 2004).

**Mananos y otros polisacáridos:** La porción de manano de las manoproteínas de la superficie de *C. albicans* también está implicada en la interacción hongo-hospedador, ya que numerosos estudios demuestran que el manano interviene en la adhesión del hongo a la superficie de células epiteliales o endoteliales (Hostetter, 1994; Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004). El manano es capaz de unirse a los glóbulos rojos humanos lo que provoca la hemólisis, hecho que está relacionado con la capacidad de utilización de hierro y hemoglobina (Tavares *et al.*, 1993). El manano participa también en la adhesión a componentes salivares y en la interacción del hongo con distintas especies bacterianas, en las que deben participar moléculas bacterianas tipo lectina que interaccionan con carbohidratos de la superficie del hongo. La porción de manano O-glicosídico de la proteína de 58 kDa implicada en la interacción con fibrinógeno, media la unión a dicho ligando. Además, las diferencias en los residuos de manosa incorporados (manosilación) a las proteínas de la pared celular del hongo, parecen controlar la hidrofobicidad de la misma (Masuoka y Hazen, 1999; Alonso *et al.*, 2001). En las membranas de macrófagos se han detectado receptores tipo lectina, como el receptor de manosa, el receptor de glucano y la dectina-1, los cuales están relacionados con la fagocitosis y la producción de citocinas en respuesta a *C. albicans* (Romani *et al.*, 2004). El PLM de *C. albicans* se ha descrito como ligando del receptor TLR2 ("Toll-Like Receptor 2") presente en la superficie de células fagocíticas (Jouault *et al.*, 2003). Diferentes estudios demuestran que la quitina está relacionada con la adherencia a la superficie epitelial, aunque la quitina aparece en la superficie celular en las etapas tempranas del crecimiento y su papel en la infección no está claro (Fukazawa y Kagaya, 1997).

**Hidrofobicidad:** La HSC de *C. albicans* esta relacionada con una gran variedad de interacciones del hongo con el hospedador, así como con diferentes funciones fúngicas (la adherencia a las superficies endoteliales y epiteliales, a las proteínas de la matriz extracelular y al plástico, la evasión de *C. albicans* de la acción de las células fagocíticas y la captación de algunas sustancias del medio). La hidrofobicidad depende de la expresión combinada de una serie de proteínas hidrofóbicas de la superficie fúngica y de cambios en la glicosilación de proteínas de la capa más externa, afectando a la ultraestructura de la superficie celular del hongo y a su fenotipo (Masuoka y Hazen, 1999; Singleton *et al.*, 2001; Gozalbo *et al.*, 2004).

### C.- Secreción de enzimas hidrolíticas

Determinadas enzimas son secretadas al exterior de la célula fúngica, donde se encuentran sus sustratos. Cuando la acción de estas enzimas afecta a la función y viabilidad del hospedador, las enzimas se consideran factores de virulencia, ya que contribuyen al establecimiento de la infección (Chaffin *et al.*, 1998; Calderone, 2002).

La actividad proteolítica extracelular en *C. albicans* se debe a la acción de una familia de enzimas denominadas aspartil-proteasas (Sap: "Secreted aspartyl proteases"), cuya secreción aumenta la capacidad del hongo para penetrar y colonizar los tejidos del hospedador, permitiéndole además evadir la respuesta inmune (De Bernardis *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1990; van Burik y Magee, 2001; Naglik *et al.*, 2003). La expresión de Saps depende tanto de la cepa fúngica como de las condiciones ambientales. Estas enzimas tienen una gran variedad de sustratos dependiendo del órgano infectado o colonizado. Varias observaciones sugieren una función importante de las proteínas Sap en la patogénesis de las candidiasis: (i) son secretadas *in vivo* por especies patógenas de *Candida* durante la infección, y existe una correlación entre virulencia y producción de proteínasa, tanto en aislados clínicos de *C. albicans* como en cepas de laboratorio; (ii) pueden degradar proteínas relacionadas con el sistema inmune del hospedador

como inmunoglobulinas y complemento, y además son capaces de hidrolizar mucina, lo que facilita al hongo la penetración a través de la mucosa gastrointestinal; (iii) se han clonado y caracterizado diez genes *SAP* en *C. albicans*, y se ha demostrado que mutantes nulos para alguno de estos genes presentan una menor virulencia en modelos animales de candidiasis diseminada (Naglik *et al.*, 2003).

Las fosfolipasas (A, B, C) son enzimas hidrolíticas implicadas en la patogénesis de *C. albicans*, ya que están asociadas con daño en las membranas celulares del hospedador, adherencia y penetración. Existe una correlación entre producción de fosfolipasas por aislados de *C. albicans*, adhesión a células epiteliales y virulencia en modelo de ratón (Ibrahim *et al.*, 1995; Chaffin *et al.*, 1998; van Burik y Magee, 2001).

Por último, se ha sugerido la implicación de otras enzimas hidrolíticas en la virulencia de *C. albicans* como esterasas, glucoamilasas, fosfatasa ácida, factor hemolítico, hialuronidasa, condroitin sulfatasa y metalopeptidasa. Sin embargo, la participación de estas enzimas en virulencia no está tan bien caracterizada como en el caso de las Sap o las fosfolipasas (Calderone, 2002; Gozalbo *et al.*, 2004).

Además, algunas proteínas cuya localización primaria es el citosol, también se han detectado en la pared celular, tales como proteínas glicolíticas (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, aldehído deshidrogenasa, enolasa) y miembros de la familia de proteínas de choque térmico (hsp70, hsp90 y otros). Algunas de estas proteínas podrían tener funciones relevantes en patogénesis, bien como adhesinas o como moduladores de la respuesta inmune (Chaffin *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1998).

#### **D.- Cambio fenotípico o "switching"**

Se denomina cambio fenotípico a la capacidad de muchas cepas de *C. albicans* de cambiar de forma espontánea, reversible y a alta frecuencia, entre diferentes fenotipos o estados morfológicos y fisiológicos, distinguibles fácilmente por su



morfología colonial. Estos cambios pueden derivarse de factores ambientales y pueden tener un profundo efecto en la virulencia del hongo. La frecuencia del cambio entre una forma colonial y otra puede aumentar por radiación y temperatura (Soll *et al.*, 1993; Calderone, 2002). El "switching" en *C. albicans* es pleiotrópico, afectando a diferentes parámetros morfológicos y fisiológicos, tales como la antigenicidad, la morfología y tamaño celular, la adhesión, la secreción de proteasa ácida, la sensibilidad a las drogas, etc., lo que puede proporcionar a las células una variabilidad análoga a la recombinación en una población que posee ciclo sexual (Soll, 1992; Soll *et al.*, 1993). Una misma cepa puede llegar a presentar más de ocho morfologías coloniales diferentes, interconvertibles entre sí a lo largo del tiempo. Como consecuencia del "switching" se altera, directa o indirectamente, la expresión de muchos genes, tales como reguladores transcripcionales, *TUPI*, *EFG1*, etc., y algunos implicados en virulencia (SAP, resistencia a drogas, etc...).

Este cambio fenotípico no puede explicarse por recombinación meiótica, pues *C. albicans*, siendo diploide, carece de ciclo sexual clásico conocido. Además, la alta frecuencia de reversión, la existencia de múltiples fenotipos y la naturaleza reversible del cambio son incompatibles con mecanismos normales de mutación (Soll, 1992; Gow, 1994). Así pues, deben existir unos mecanismos genéticos que le confieran a la célula un nivel de variación fenotípica elevado (Soll, 1990). Se han sugerido varias hipótesis, la más reciente indica que el "switching" en *C. albicans* podría estar controlado de manera similar a los genes que controlan el tipo sexual en *S. cerevisiae*, de manera que los genes que controlan la morfología colonial y celular estarían localizados en posiciones cromosómicas que pueden existir en dos estados alternativos: estado silencioso y estado activo, dependiendo de la estructura de la cromatina. La transición entre ambos estados parece depender de los genes *SIR* ("Silent Information Regulator") necesarios para establecer el estado silencioso (Loo y Rine, 1994; Ramsey *et al.*, 1994). Se ha descrito que mutantes nulos para el gen *SIR2* presentan niveles anormalmente elevados de variación morfológica colonial y de cambios de cariotipo, lo que indica que la frecuencia de "switching" en *C. albicans* y la estabilidad

cromosómica, están bajo el control de dicho gen (Pérez-Martín *et al.*, 1999). Recientemente nuestro grupo ha descrito que el sistema de la ubiquitina está implicado en el control del “switching” (Roig y Gozalbo, 2003) probablemente (i) mediante la ubiquitinación de histonas a través de enzimas conjugadoras de ubiquitina como Rad6 (Robzyc *et al.*, 2000) y/o (ii) mediante el control de la activación del complejo de proteínas Sir a través de la acción de una enzima desubiquitinadora (Moazed y Johnson, 1996).

Uno de los sistemas de “switching” más estudiado en *C. albicans* es la transición entre colonias blancas (W) y opacas (O); las células O son más grandes, alargadas y tienen una superficie granulosa, mientras que las células W son levaduras ovoides normales, y ambos tipos difieren en muchas propiedades bioquímicas. El “switching” entre colonias blancas y opacas que presenta *C. albicans* está controlado por MTL (“Mating Type Locus”), homólogo al locus MAT (“Mating Type”) de *S. cerevisiae*, encargado del control de los genes implicados en la conjugación. La mayoría de cepas del hongo son heterocigotas para el locus MTL y en ellas no se da “switching” WO, mientras que si son homocigotas, son capaces de experimentar este fenómeno que se ha relacionado con la patogénesis. Durante el proceso infeccioso una parte de la población de células W, que son más resistentes, cambia al tipo O, que es capaz de experimentar el proceso de conjugación para generar variantes genéticas mejor adaptadas a la supervivencia en el hospedador (Lockhart *et al.*, 2002; Soll, 2004).

## **2.- Respuesta inmune frente a *Candida albicans***

Tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida están implicadas en la resistencia frente a *C. albicans*, siendo necesaria, en primer lugar, la intervención de la respuesta innata para que posteriormente se desencadene la respuesta específica (Calderone, 2002).

## 2.1.- Barreras físicas, bioquímicas y microbiológicas

La superficie del cuerpo está protegida por epitelios que constituyen una barrera física entre el medio interno y los agentes patógenos del exterior. Los epitelios abarcan la piel y los revestimientos de las estructuras tubulares del cuerpo, como el tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario (Janeway *et al.*, 2003). La principal línea de defensa ante una infección microbiana es la piel, que es impermeable a la mayoría de los agentes infecciosos cuando está intacta. La superficie de la piel no es un lugar donde el desarrollo de los hongos está favorecido, ya que está expuesta a la luz ultravioleta, no presenta un alto grado de humedad y tiene su propia flora con la que la especie fúngica debería competir. La mayoría de microorganismos no son capaces de sobrevivir durante mucho tiempo sobre la piel, debido a los efectos inhibitorios directos del ácido láctico, los ácidos grasos del sudor y las secreciones sebáceas, así como al bajo pH que se crea (Calderone, 2002; Roitt y Delves, 2003). Se han descrito diferentes tipos de esfingosinas activas frente a *C. albicans*, y se han aislado varias proteínas con acción antifúngica en la epidermis, que pueden tener un papel importante en la defensa frente a infecciones fúngicas cutáneas (Calderone, 2002).

Los epitelios internos se denominan mucosas epiteliales ya que secretan un fluido viscoso denominado mucus que contiene glucoproteínas denominadas mucinas. Los microorganismos envueltos por el mucus no pueden adherirse al epitelio y a las mucosas epiteliales, y así pueden ser expulsados en el flujo de mucus conducido por el movimiento de los cilios epiteliales (Janeway *et al.*, 2003).

En el tracto intestinal las células de Paneth sintetizan péptidos bactericidas y fungicidas denominados criptidinas o  $\alpha$ -defensinas. Otros epitelios, principalmente en la piel y en el tracto respiratorio, producen péptidos antimicrobianos relacionados con las criptidinas, las  $\beta$ -defensinas. Las defensinas, en general, son capaces de suprimir el crecimiento de bacterias y de hongos a través de distintos mecanismos (Janeway *et al.*, 2003; Tanida *et al.*,

2003). Además, se ha descrito recientemente que *C. albicans* es capaz de inducir la expresión de  $\beta$ -defensinas, tanto en epitelios humanos (Meyer *et al.*, 2004) como en tejidos de ratón (Schofield *et al.*, 2004), lo que sugiere que estas  $\beta$ -defensinas jugarían un papel en la protección frente a las candidiasis. Por último, cabría indicar que las defensinas, además de tener un efecto antimicrobiano directo, también realizan otras funciones relacionadas con la defensa del hospedador frente a los microorganismos patógenos, como quimiotaxis para diferentes tipos celulares, opsonización e interacción con el complemento, provocar la secreción de histamina, etc. (Lehrer, 2004).

La mayoría de las superficies epiteliales están asociadas a una flora normal de microorganismos no patógenos con los que el microorganismo patógeno debe competir por los nutrientes y los sitios de unión a las células. La flora normal puede producir sustancias antimicrobianas que previenen la colonización por otros microorganismos patógenos (Janeway *et al.*, 2003). Está demostrado que la colonización por *C. albicans* y por otros hongos se ve incrementada en animales a los que se les ha alterado la flora normal con antibióticos y en humanos tratados con antibióticos de amplio espectro (Calderone, 2002).

## **2.2.- Inmunidad innata**

La inmunidad innata está mediada por diferentes tipos celulares como neutrófilos, macrófagos y “Natural Killer” (NK), así como por distintas moléculas solubles como opsoninas, defensinas y citocinas.

### **2.2.1.- Activación del complemento**

El sistema del complemento está formado por un gran número de proteínas plasmáticas, que reaccionan unas con otras para opsonizar agentes patógenos e inducir una serie de respuestas inflamatorias que ayudan a luchar contra la infección. Cierta número de proteínas del complemento son proteasas que se activan a sí mismas por rotura proteolítica (zimógenos). El sistema se caracteriza



por producir una respuesta rápida frente a un estímulo desencadenante, mediada por un fenómeno de amplificación en cascada (Janeway *et al.*, 2003; Roitt y Delves, 2003). El componente más abundante y principal es C3 y la ruptura de esta molécula constituye el centro de todos los fenómenos mediados por complemento. Existen tres vías por las que el complemento puede activarse en la superficie de los agentes patógenos (vía clásica, vía alternativa y vía MBL “Mannan-Binding Lectin”); estas vías dependen de moléculas diferentes para su iniciación, pero convergen para generar el mismo conjunto de moléculas efectoras. Existen varios modos por los que el sistema del complemento protege frente a la infección (opsonización de los microorganismos, quimiotaxis de fagocitos, inflamación y citólisis directa de los microorganismos) (Janeway *et al.*, 2003).

Estudios *in vivo* han demostrado que el complemento es un componente importante en la resistencia a hongos, actuando a través de la opsonización e inducción de una respuesta inflamatoria (Kozel, 1998). Estudios de inmunofluorescencia han permitido demostrar que *C. albicans* activa el complemento *in vivo*, lo que conlleva a la deposición de C3b (fragmento de degradación de C3) en la superficie celular fúngica. Esta deposición se ve acelerada a través de la activación de la vía clásica del complemento por anticuerpos anti-manano del suero del hospedador. Además de activarse la vía alternativa y la clásica del complemento en presencia de *C. albicans*, el manano presente en la superficie celular del hongo puede tener un papel importante en la activación del complemento vía MBL (Kozel, 1996; Meri *et al.*, 2002; Poulain y Jouault, 2004).

### **2.2.2.- Fagocitosis**

Las células encargadas de fagocitar y destruir a los microorganismos, opsonizados o no, son los neutrófilos y macrófagos principalmente (Janeway *et al.*, 2003; Roitt y Delves, 2003).

Los neutrófilos representan la población fagocítica más abundante en la sangre pero no están presentes en tejidos sanos normales. En su superficie expresan receptores de quimiocinas que al interactuar con estas inducen el reclutamiento de los neutrófilos al lugar de la infección. Se ha descrito que los neutrófilos representan la primera línea de defensa frente a las candidiasis. En general, la neutropenia o defectos congénitos en la función de los neutrófilos se han asociado con una mayor susceptibilidad a las candidiasis (Vázquez-Torres y Balish, 1997; Mansour y Levitz, 2002). La fagocitosis de levaduras de *C. albicans* por los neutrófilos se produce en ausencia de opsoninas en el suero, pero éstas son necesarias para la óptima muerte intracelular del hongo. Un método no oxidativo que presentan los neutrófilos para matar a los agentes patógenos son las defensinas, que constituyen una familia de péptidos antimicrobianos presentes en los gránulos de los neutrófilos. Las defensinas humanas han resultado poseer una importante actividad anti-*Candida*. Por otra parte, radicales del oxígeno producen, entre otros efectos, modificaciones en las proteínas del hongo y rompen ácidos nucleicos (Mansour y Levitz, 2002). También se ha descrito que la destrucción de *C. albicans* por parte de los neutrófilos se debe a la activación de proteasas (Reeves *et al.*, 2002).

Los macrófagos derivan de promonocitos de la médula ósea que, tras diferenciarse como monocitos sanguíneos, se asientan en los tejidos como macrófagos maduros (Roitt y Delves, 2003). La fagocitosis de levaduras de *C. albicans* por los macrófagos puede darse sin necesidad de que la célula esté opsonizada, pero la opsonización favorece la muerte del hongo (Calderone, 2002).

Las células dendríticas también son capaces de fagocitar células de *C. albicans*, aunque su función principal no es la de eliminar al patógeno del hospedador, sino la de inducir una respuesta inmune específica, actuando como células presentadoras de antígenos (Torosantucci *et al.*, 2004).

La fagocitosis es un proceso activo que se inicia tras unirse el agente patógeno a receptores de membrana de las células fagocíticas. La fagocitosis de *C. albicans* tras su opsonización se lleva a cabo a través de los receptores de

complemento y de los receptores Fc de las células fagocitarias. Por otro lado, la fagocitosis del hongo no opsonizado se ha relacionado con los llamados PRRs (“Pattern Recognition Receptors”), capaces de reconocer moléculas muy conservadas de los microorganismos (PAMPs “Pathogen-Associated Molecular Patterns”) y que no están presentes en las células de mamífero (Lee *et al.*, 2003).

Entre los receptores del complemento está el CR3, molécula heterodimérica (CD11b/CD18) que pertenece a la familia de las  $\beta$ -integrinas, con capacidad para reconocer diferentes ligandos como iC3b (derivado inactivo del C3b que está unido al agente patógeno) o  $\beta$ -glucano (Lee *et al.*, 1997; Calderone, 2002).

Los receptores Fc pertenecen a una familia de moléculas que unen la porción Fc de las inmunoglobulinas. La unión del receptor Fc a la superficie del agente patógeno cubierto por anticuerpos activa la fagocitosis, la producción de agentes oxidantes fungicidas y promueve la producción de citocinas y quimiocinas (Calderone, 2002).

El primer PRR que se describió fue el receptor de manosa (MR) que reconoce glicanos específicos del hongo (Vázquez-Torres y Balish, 1997). En principio, se describió en macrófagos, pero se ha demostrado que se encuentra en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células dendríticas (Tarnowski *et al.*, 1988; Shepherd *et al.*, 1991; Sallusto *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1998; Linehan *et al.*, 1999). Estudios *in vitro* han demostrado la implicación de MR en la fagocitosis de *C. albicans* y en la activación de los macrófagos (Karbassi *et al.*, 1987; Marodi *et al.*, 1991). Recientemente, mediante ensayos *in vivo* con ratones deficientes en MR se ha demostrado que esta deficiencia no aumenta la susceptibilidad de los ratones a una candidiasis diseminada, y además, que macrófagos de ratones MR<sup>-/-</sup> son capaces de fagocitar al hongo (Lee *et al.*, 2003). Por lo tanto, deben de existir otros receptores capaces de mediar la fagocitosis de *C. albicans*. En este sentido se ha descrito la presencia de receptores capaces de reconocer el glucano de la superficie del hongo. Concretamente, se ha identificado un receptor, denominado dectina-1, capaz de reconocer  $\beta(1,3)$ -glucanos. La expresión de la dectina-1 en células no fagocíticas es suficiente para que dichas células sean capaces de internalizar zimosán

(preparación particulada de la pared celular de *S. cerevisiae*, formada fundamentalmente por glucano y manano), lo que indica que dicho receptor está implicado en la fagocitosis del hongo (Gantner *et al.*, 2003; Underhill, 2003a; Taylor *et al.*, 2004). También se han descrito otros receptores implicados en la fagocitosis de *C. albicans* como las lectinas galectina-3, presente en macrófagos, y el receptor DC-SIGN, presente fundamentalmente en células dendríticas, que reconocen diferentes formas de manano (Cambi *et al.*, 2003; Poulain y Jouault, 2004).

### **2.2.3.- Inflamación inducida por complemento, eicosanoides y citocinas**

La inflamación puede originarse como respuesta a un daño tisular o al reconocimiento de un microorganismo patógeno. La respuesta inflamatoria desempeña varias funciones esenciales para combatir la infección: reclutar células efectoras al foco de infección para aumentar la destrucción de los microorganismos invasores, proporcionar una barrera física que impida la extensión de la infección y promover la reparación del tejido dañado. La inflamación en el sitio de la infección se inicia fundamentalmente por la respuesta de los macrófagos a los agentes patógenos. Los cuatro signos que caracterizan la inflamación son: dolor, enrojecimiento, calor e hinchazón, causados por cambios en los vasos sanguíneos locales. Se produce un aumento del diámetro y de la permeabilidad vascular que conlleva la salida de fluido y proteínas de la sangre y su acumulación en el tejido. Además, en las células endoteliales que delimitan el vaso sanguíneo, se activa la expresión de moléculas de adhesión que promueven la unión de los leucocitos circulantes y su posterior extravasación y migración a los tejidos (Janeway *et al.*, 2003; Roitt y Delves, 2003).

Todos estos cambios son inducidos por diferentes mediadores inflamatorios, que se liberan como consecuencia del reconocimiento del agente patógeno: factor



activador de plaquetas (PAF), péptidos del complemento (C3a y C5a), eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), citocinas y quimiocinas.

Se ha demostrado, utilizando modelos de candidiasis experimental en ratón, que la capacidad endógena para generar PAF en respuesta a *C. albicans* es un proceso clave implicado en la activación temprana del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (“Nuclear Factor- $\kappa$ B”), que a su vez confiere al órgano resistencia frente al hongo mediante la inducción de citocinas proinflamatorias anti-*Candida* (como TNF- $\alpha$ , “Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ”). Esta activación temprana inducida por PAF no tiene lugar en órganos susceptibles como el riñón (Choi *et al.*, 2001). Los péptidos C3a y C5a producen la desgranulación de mastocitos y contracción de músculo liso, y además C5a aumenta la permeabilidad vascular y actúa como un poderoso quimioatrayente para neutrófilos y monocitos, activando a los neutrófilos (Janeway *et al.*, 2003). En modelos de candidiasis experimental en ratón, se ha demostrado que la deficiencia en C5 produce un fenotipo complejo caracterizado por una rápida proliferación fúngica en los órganos diana, incapacidad para movilizar granulocitos y desarrollo de una respuesta alérgica letal (Mullick *et al.*, 2004).

La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) es un mediador celular que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos, además de en la respuesta inflamatoria (Peters-Golden, 1997; Narumiya *et al.*, 1999). A pesar de poseer acciones proinflamatorias, la PGE<sub>2</sub> presenta otras acciones antagónicas como la inhibición de la producción de citocinas, como TNF- $\alpha$ , o determinadas quimiocinas, inhibición de la respuesta Th1 y de la proliferación linfocitaria (Kunkel *et al.*, 1988; Betz y Fox, 1991; Standiford *et al.*, 1992; Strassmann *et al.*, 1994; Sergeeva *et al.*, 1997; Vassiliou *et al.*, 2003). *C. albicans* induce la producción de PGE<sub>2</sub> en células endoteliales, epiteliales y en células mononucleares de sangre periférica (Witkin *et al.*, 1991; Filler *et al.*, 1994; Deva *et al.*, 2003), y además se ha descrito que la PGE<sub>2</sub> estimula la formación de micelio en *C. albicans* (Kalo-Klein y Witkin, 1990). Por lo tanto, la producción de prostaglandinas en el lugar de la infección podría favorecer la colonización por el hongo. Esto podría explicar el efecto beneficioso que el tratamiento con el fármaco antiinflamatorio

aspirina tiene sobre la candidiasis vulvovaginal (Deva *et al.*, 2001). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que un nuevo antiinflamatorio no esteroideo (LAAE-14) que causa una inhibición *in vitro* de la producción de PGE<sub>2</sub> por macrófagos peritoneales de ratón estimulados con *C. albicans*, incrementa *in vivo* la resistencia de los ratones a una candidiasis diseminada (Lucas *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2004). En este contexto, cabe destacar que se ha demostrado que las propias células fúngicas son capaces de producir ciertos eicosanoides, como algunas prostaglandinas, lo que podría representar un factor de virulencia adicional (Noverr *et al.*, 2003; Alem y Douglas, 2004).

Las citocinas son pequeñas proteínas sintetizadas por todos los tipos celulares, pero especialmente por macrófagos y linfocitos T, cuando se activan en respuesta a distintos estímulos (patógenos, toxinas...). Estas citocinas se unen en las células diana a receptores específicos, caracterizados por tener una gran afinidad por su ligando. La unión de la citocina a su receptor provoca una cascada de reacciones bioquímicas en el interior celular, que dan como resultado la regulación de la actividad de la célula diana, activando o inhibiendo su función. Las citocinas actúan como verdaderas hormonas del sistema inmune y están implicadas en la elaboración de la respuesta inmune tanto innata (inflamación, quimiotaxis), a través de la activación de macrófagos y linfocitos NK, como específica (humoral o celular, actuando sobre los linfocitos T y B), sirviendo de conexión entre los dos tipos de respuesta. Además, las citocinas tienen una función muy importante en la regulación de la hemopoyesis (Roitt y Delves, 2003).

Entre las citocinas producidas durante el curso de las candidiasis cabe destacar las siguientes:

**TNF- $\alpha$** , **IL-1 $\beta$** , **IL-18** e **IL-6** son citocinas proinflamatorias producidas rápidamente por los fagocitos tras su interacción con células de *C. albicans* y se han detectado en sepsis causadas por el hongo (Presterl *et al.*, 1999). El TNF- $\alpha$  es importante en el control de las candidiasis diseminadas, ya que la neutralización del TNF- $\alpha$  endógeno con anticuerpos específicos o con determinados agentes farmacológicos como clorpromacina, empeora el desarrollo de la enfermedad (Steinshamn y Waage 1992; Netea *et al.*, 1995). Además, ratones deficientes en

TNF- $\alpha$  o en sus receptores, son más susceptibles a las candidiasis (Netea *et al.*, 1995; Steinshamn *et al.*, 1996; Mencacci *et al.*, 1998a). La IL-6 y la IL-1 $\beta$  también participan en la respuesta innata frente al hongo, aunque en menor medida que el TNF- $\alpha$  (Calderone, 2002). La administración a ratones de IL-1 $\beta$  recombinante protege frente a la infección por *Candida*, aunque la deficiencia de IL-1 no aumenta la susceptibilidad a la infección, y dicha susceptibilidad aumenta ante la deficiencia de IL-6 (Mencacci *et al.*, 1998b; Van Enckevort *et al.*, 1999). Estudios recientes han demostrado que la IL-18 endógena es necesaria para la defensa del hospedador frente a la candidiasis; el tratamiento de ratones con IL-18 recombinante reduce la mortalidad y disminuye la presencia de levaduras en el riñón, aumentando los niveles de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Stuyt *et al.*, 2002; Stuyt *et al.*, 2004).

El IFN- $\gamma$  es la principal citocina producida por los linfocitos Th1 activados, aunque también es producida por linfocitos NK. Su función principal es la de activar a los macrófagos y neutrófilos para la destrucción de los microorganismos fagocitados, aumentando también la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase II (Janeway *et al.*, 2003).

El IFN- $\gamma$  tiene una función crítica en la defensa frente a las candidiasis; ratones deficientes en IFN- $\gamma$  son mucho más susceptibles a las candidiasis y la administración de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  produce una respuesta Th2 no protectora (Romani *et al.*, 1992a; Kaposzta *et al.*, 1998).

La IL-12 es una citocina proinflamatoria y reguladora, puesto que controla la respuesta inmune adquirida a través del desarrollo de linfocitos T específicos (Trinchieri, 2003). La IL-12 es esencial en la inducción de linfocitos T secretores de IFN- $\gamma$ , lo que se ha asociado con una respuesta protectora (Th1) frente a las candidiasis (Romani, 2004). La IL-12 es producida por los monocitos/macrófagos y células dendríticas en respuesta fundamentalmente a levaduras de *C. albicans* (Chiani *et al.*, 2000; d'Ostiani *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Además, cepas virulentas del hongo son capaces de inhibir la producción de IL-12 mediante la secreción de un factor que estimula la vía de transducción de señal ERK-MAPK ("Extracellular Signal Regulated Kinase-Mitogen Activates Protein

Kinases”), lo que produce una atenuación de la respuesta inmune (Tang *et al.*, 2004).

Otra citocina reguladora es la **IL-10**, que es producida tras la fagocitosis del hongo y juega un papel crucial en la determinación de la susceptibilidad a la infección (Mencacci *et al.*, 1998a; d’Ostiani *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2000). La IL-10 actúa disminuyendo la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-12) e inhibiendo el desarrollo de una respuesta celular protectora (Mencacci *et al.*, 1998a; Roidiles *et al.*, 2000). Además, la IL-10 es producida fundamentalmente en respuesta a la forma micelial del hongo, lo que puede contribuir a su mayor virulencia (d’Ostiani *et al.*, 2000; Bozza *et al.*, 2004).

La **IL-4** es una citocina que inhibe la capacidad fungicida de los fagocitos y participa en la generación de una respuesta Th2, no teniendo una función relevante en la defensa frente a *C. albicans* (Kaposzta *et al.*, 1998; Bozza *et al.*, 2004).

#### **2.2.4.- Activación de células “Natural Killer” (NK)**

Las células asesinas naturales o células NK son linfocitos que se caracterizan por su morfología de linfocitos grandes y granulosos y porque no expresan los receptores específicos de antígenos. La función fisiológica de los linfocitos NK es la de reconocer y destruir células tumorales y células infectadas por virus sin necesidad de inmunización o activación previa (Janeway *et al.*, 2003; Roitt y Delves, 2003).

A las células NK se les ha considerado como mediadores importantes en la respuesta innata frente a infecciones virales y células transformadas, pero cada vez existen más evidencias de su papel en las primeras etapas de infecciones bacterianas y fúngicas. Numerosos estudios demuestran que el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  secretados por células NK activadas favorece la actividad fungicida de las células fagocíticas y además, la producción de IL-15 por monocitos en respuesta a *C. albicans* aumenta el poder citotóxico de las células NK (Tran *et al.*, 2003; Arancia *et al.*, 1998; Ferrante, 1994; Marodi *et al.*, 1993). Sin embargo, su

participación *in vivo* en la protección frente a las candidiasis es controvertida, encontrándose resultados contradictorios en la bibliografía (Greenfield *et al.*, 1993; Romani *et al.*, 1993a; Ortega *et al.*, 2000; Balish *et al.*, 2001; Algarra *et al.*, 2000).

### **2.3.- Inmunidad específica**

#### **2.3.1.- Inmunidad mediada por células**

En mamíferos, la respuesta inmune innata generada en los tejidos periféricos suele ser insuficiente para destruir por completo al agente infeccioso por lo que se produce la activación de la respuesta específica en los tejidos linfoides.

Datos experimentales y evidencias clínicas indican que tanto la respuesta innata como la adquirida regulan el control y la resistencia frente a las candidiasis, siendo esencial la coordinación entre ambos tipos de inmunidad. La activación de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, o de ambos tipos celulares, es un arma muy importante en la defensa frente a las infecciones fúngicas. En la respuesta inmune frente a diferentes hongos está descrito que una respuesta Th1, caracterizada por la producción de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o GM-CSF (“Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor”), está relacionada con resistencia a la infección, mientras que una respuesta Th2, caracterizada por la presencia de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, se relaciona con mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas (Huffnagle y Deepe, 2003). Las citocinas producidas por las células Th1 activan a las células fagocíticas favoreciendo la eliminación de *C. albicans*, mientras que las citocinas que provienen de células Th2 inhiben el desarrollo de una respuesta Th1 y por lo tanto, se desactivan las células encargadas de la fagocitosis (Romani, 2004). Por otro lado, se ha descrito que junto con un correcto balance entre las respuestas Th1/Th2, es necesaria la aparición de células T reguladoras para mantener una inmunidad protectora frente al hongo. Estas células T reguladoras son activadas por células dendríticas

que secretan IL-10, y actuarían regulando negativamente la respuesta Th1, para evitar una exacerbada respuesta inflamatoria (Romani *et al.*, 2002).

Modelos de candidiasis experimental en ratón han demostrado que la infección primaria con una cepa poco virulenta de *C. albicans* (PCA2) induce una importante respuesta Th1 protectora, de forma que los animales quedan protegidos frente a una segunda infección con una cepa virulenta del hongo (Romani *et al.*, 1991a; Romani *et al.*, 1992b; Romani *et al.*, 1993b).

Las células dendríticas son capaces de discriminar entre las distintas morfologías de *C. albicans* en términos de maduración, producción de citocinas e inducción de una determinada respuesta Th, tanto *in vivo* como *in vitro* (Romani *et al.*, 2004). Mediante diferentes estudios *in vitro* se ha observado que células dendríticas de ratón y humanas son capaces de fagocitar levaduras y micelios de *C. albicans*, aunque el proceso de fagocitosis no es exactamente igual en ambos casos. Un gran número de levaduras se encuentran parcialmente degradadas en el interior de los fagosomas después de 2-4 horas de la fagocitosis, mientras que tras 1 hora la forma micelial del hongo parece haber escapado del interior del fagosoma, encontrándose libre en el citoplasma (Romani *et al.*, 2002; Bozza *et al.*, 2004). Numerosos receptores están implicados en la fagocitosis del hongo por las células dendríticas, entre los que se encuentran PRRs (MR, dectina-1 y DC-SIGN), receptores Fc y receptores de diferentes componentes del complemento. La forma levaduriforme del hongo es fagocitada por las células dendríticas a través de los PRRs y la forma micelial requiere una previa opsonización (Bozza *et al.*, 2004). Estudios *in vivo* han demostrado que la fagocitosis del hongo opsonizado genera citocinas relacionadas con una respuesta Th2, mientras que la fagocitosis a través del MR conlleva una respuesta Th1 (Montagnoli *et al.*, 2002; Romani *et al.*, 2002). La fagocitosis de levaduras de *C. albicans* induce la producción de IL-12 por las células dendríticas, mientras que micelios del hongo inhiben la producción de dicha citocina e inducen IL-4 (d'Ostiani *et al.*, 2000; Bacci *et al.*, 2002; Torosantucci *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que células dendríticas tratadas con levaduras de *C. albicans* o transfectadas con RNA de levadura, (pero no las tratadas con micelio o

transfectadas con RNA de micelio), al ser inoculadas en ratones susceptibles a las candidiasis, son capaces de estimular una respuesta específica Th1, que confiere resistencia antifúngica. Estos resultados plantean la posible utilización de las células dendríticas para el desarrollo de vacunas frente a las infecciones fúngicas (d'Ostiani *et al.*, 2000; Bacci *et al.*, 2002; Montagnoli *et al.*, 2002; Bozza *et al.*, 2004).

Estudios *in vitro* han demostrado que la diferenciación de monocitos humanos en células dendríticas se ve profundamente alterada por la interacción con levaduras o micelios de *C. albicans*. Cada tipo morfológico produce diferentes modificaciones en el proceso de diferenciación, pero en ambos casos se ve afectada la funcionalidad de las células generadas. Por lo tanto, la diferenciación de monocitos en células dendríticas es un proceso que puede ser explotado por *C. albicans* para evadir la vigilancia del sistema inmune (Torosantucci *et al.*, 2004).

La mayoría de los linfocitos CD8<sup>+</sup> efectores cumplen una función de eliminación de parásitos intracelulares mediante la lisis de las células infectadas. Para realizar la función citolítica, la célula CD8<sup>+</sup> efectora necesita una fuerte señal coestimuladora, la cual puede venir por medio de la célula que le presenta el antígeno o bien gracias a la colaboración de ciertos linfocitos CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores utilizan dos mecanismos diferentes de lisis: (i) induciendo la muerte celular programada (apoptosis) en las células diana a través de moléculas de membrana especializadas, o (ii) destruyendo la células mediante la formación de canales en la membrana gracias a la acción de perforinas y granzimas (Janeway *et al.*, 2003).

Las células T CD8<sup>+</sup> participan en la defensa frente a las infecciones fúngicas por un mecanismo que todavía no está muy claro. Está descrito que las células CD8<sup>+</sup>, además de secretar IFN- $\gamma$ , tienen un efecto antifúngico frente al micelio de *C. albicans* (Deepe, 1997). Estudios *in vivo* con diferentes modelos de candidiasis en ratón, indican una posible participación de las células T CD8<sup>+</sup> en la protección tanto frente a la candidiasis vaginal como a la sistémica: tras una infección vaginal se observa un aumento considerable y persistente del número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Ghaleb *et al.*, 2003), y la eliminación de dichos linfocitos

produce un aumento en la gravedad de las lesiones tisulares tras una candidiasis sistémica (Ashman *et al.*, 1999).

### **2.3.2.- Linfocitos B: anticuerpos**

Observaciones clínicas y modelos animales de diferentes micosis, incluyendo las candidiasis, indican que, aunque la inmunidad celular es importante en la prevención de las infecciones fúngicas, la protección frente a las micosis diseminadas también depende de la inmunidad humoral (Casadevall *et al.*, 1998; Romani, 2004). Aunque hay datos conflictivos sobre la importancia de los anticuerpos anti-*Candida* como herramienta efectiva contra las infecciones (en el suero inmune hay una mezcla de anticuerpos protectores, no protectores y deletéreos), cada vez hay más evidencias que indican que algunos anticuerpos específicos pueden ser inmunoprotectores frente a la infección (Casadevall *et al.*, 1998; Bromuro *et al.*, 2002; Fernández-Arenas *et al.*, 2004). Los anticuerpos pueden ejercer su efecto protector por diferentes mecanismos (opsonización, inhibición de la adhesión, inhibición de la transición levadura-micelio, neutralización de factores de virulencia, actividad fungicida directa, etc.) que son difíciles de evaluar, aunque algunas de estas actividades biológicas se han demostrado para algunos anticuerpos monoclonales (Martínez *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004). Se puede afirmar que anticuerpos, inmunidad celular e innata cooperan en la protección durante la infección por *C. albicans* (Fernández-Arenas *et al.*, 2004; Kozel *et al.*, 2004).

Utilizando un modelo de candidiasis experimental en ratones deficientes en linfocitos B, Montagnoli *et al.* (2003) han sugerido que los anticuerpos participan en el desarrollo de una inmunidad a largo plazo frente al hongo (inmunidad de memoria). Los ratones deficientes en células B son capaces de controlar el crecimiento del hongo tras una infección primaria, pero son más susceptibles frente a una reinfección por *C. albicans*. Los autores observan que en estos ratones no se forman linfocitos T reguladores, lo que se asocia a una menor producción de IL-10 por las células dendríticas, desencadenándose una respuesta



Th1 exacerbada. Además, la administración de anticuerpos opsonizantes en estos ratones restaura la producción de IL-10 por las células dendríticas y la aparición de niveles normales de linfocitos T reguladores (Montagnoli *et al.*, 2003).

El suero de ratones, obtenido tras diferentes días postinfección, inmunodetectó 31 proteínas fúngicas utilizando una aproximación proteómica; entre estas proteínas se encuentran enzimas glicolíticas (fructosa bifosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, enolasa y piruvato quinasa), otras enzimas metabólicas (metionina sintasa, alcohol deshidrogenasa, etc.) y miembros de la familia hsp70 (“heat shock proteins”; Ssa1, Ssb1) (Pitarch *et al.*, 2001). Empleando también una aproximación proteómica se han distinguido dos categorías de suero, protector y no protector, que se diferencian en los títulos de inmunoglobulinas totales y de inmunoglobulinas IgG2a, que son superiores en el suero protector; ambos tipos de suero reconocen diferentes antígenos, sugiriéndose que algunos de estos antígenos pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas frente a las candidiasis (Fernández-Arenas *et al.*, 2004).

Numerosos estudios que examinan la respuesta humoral frente a *C. albicans* en pacientes infectados y en modelos animales, han demostrado la presencia de antígenos inmunodominantes con pesos moleculares de 45 a 52 kDa (Matthews *et al.*, 2003). Uno de los antígenos inmunodominantes de *C. albicans* es la enolasa, con la que se ha desarrollado un test de diagnóstico de la enfermedad (Walsh *et al.*, 1991). Aunque la inmunización con enolasa recombinante tiene un ligero efecto protector en la candidiasis sistémica en ratón, dicho efecto no se puede atribuir a los anticuerpos anti-enolasa, puesto que el mismo efecto se encuentra en ratones deficientes en linfocitos B (Montagnoli *et al.*, 2004).

El suero de pacientes que se han recuperado de una candidiasis sistémica contiene anticuerpos frente a un antígeno de 47 kDa, que se identificó como un fragmento termoestable de degradación proteolítica de la hsp90 de *C. albicans*. Un anticuerpo monoclonal de ratón, desarrollado frente a un epítipo de este fragmento, es capaz de disminuir la mortalidad en modelos de candidiasis sistémica en ratón (Matthews *et al.*, 1991; Matthews y Burnie, 1992). Un posible mecanismo de protección podría ser la inhibición de la unión de la hsp90 del

hongo a las proteínas séricas, provocando un efecto beneficioso para el hospedador. El posible efecto protector de un anticuerpo recombinante humano frente a este epítipo (Mycograb) se ha ensayado en modelos invasivos de candidiasis aguda y crónica en ratón, obteniéndose un resultado satisfactorio (Matthews *et al.*, 1995; Matthews y Burnie, 2001). Mycograb muestra actividad frente a un amplio rango de especies de levaduras, produce una mejora significativa en la candidiasis murina, y cuando se combina con anfotericina B, produce una completa curación de la infección. Esto ha llevado a iniciar pruebas en pacientes humanos con candidiasis sistémica usando Mycograb solo o en combinación con anfotericina B, que están actualmente en curso (Matthews y Burnie, 2001; Matthews *et al.*, 2003).

El suero de personas adultas sanas contiene anticuerpos capaces de reconocer el manano de *C. albicans* y los niveles encontrados varían mucho entre unas personas y otras. La clase de inmunoglobulina que se encuentra principalmente es IgG, siendo mucho más bajos los niveles de IgM (Martínez *et al.*, 1998). Está demostrado que los anticuerpos frente a epítopos del manano juegan un papel importante frente a las infecciones por *C. albicans*. La inmunización de ratones con una fracción de manano implicada en la adhesión de las células fúngicas al hospedador resultó en la inducción de una respuesta humoral protectora. Además, un anticuerpo monoclonal frente a un epítipo de manano que participa en la adhesión, protege a los ratones frente a las candidiasis diseminadas (Han y Cutler, 1998; Martínez *et al.*, 1998). El mecanismo a través del cual estos anticuerpos ejercen la protección no está claro, pero puede deberse a que favorecen la fagocitosis y/o alteran la adherencia del hongo *in vivo*. Dos anticuerpos monoclonales del isotipo IgM e IgG específicos de un epítipo de la superficie de *C. albicans* [ $\beta(1,2)$ -manotriosa] protegen al ratón frente a las candidiasis, mientras que un anticuerpo monoclonal del isotipo IgM que reconoce un epítipo distinto de manano es incapaz de conferir protección. Por lo tanto, la especificidad del epítipo y la activación del complemento están relacionadas con la capacidad de estos anticuerpos para proteger frente a las candidiasis, y el mecanismo de protección parece estar asociado con



incremento de la fagocitosis y muerte de las células fúngicas (Han *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001). Existen evidencias de que anticuerpos anti-manano reducen *in vitro* la adherencia de *C. albicans* al poliestireno y a componentes de la matriz extracelular del hospedador (San Millan *et al.*, 2000; Rodier *et al.*, 2003). Estudios recientes demuestran que los niveles observados en sueros normales de IgG anti-manano influyen en la cinética de activación y unión de C3, y que los anticuerpos anti-manano encontrados en donantes sanos pueden funcionar también directamente como opsoninas sin precisar de complemento (Kozel *et al.*, 2004).

También se ha descrito un anticuerpo monoclonal frente a una manoproteína de alto peso molecular que se expresa en la superficie del micelio, y que presenta tres actividades anti-*Candida*: inhibición de la adherencia del hongo a las células epiteliales de la boca, inhibición de la transición levadura-micelio y acción fungicida directa (Moragues *et al.*, 2003).

Durante el curso de las candidiasis sistémicas y vaginales se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-Sap. Aunque se ha demostrado en modelos experimentales de vaginitis en rata que la inmunización con Sap2, la administración de un anticuerpo monoclonal anti-Sap2 o de anticuerpos anti-Sap2 de fluidos vaginales protegen parcialmente frente a la infección (De Bernardis *et al.*, 1997), el posible efecto protector de los anticuerpos anti-Sap frente a las infecciones sistémicas y de mucosas por *Candida* no está claro (Naglik *et al.*, 2003).

### 3.- “Toll-Like Receptors” (TLR)

La proteína Toll fue originalmente descrita en la mosca *Drosophila* como un receptor transmembrana de tipo I, implicado en el desarrollo embrionario (Hashimoto *et al.*, 1988). Posteriormente se descubrió la función de los receptores Toll en la respuesta inmune en *Drosophila*, organismo que sin presentar respuesta inmune adquirida, es muy resistente a las infecciones microbianas debido a la capacidad de síntesis de péptidos antimicrobianos muy

potentes. Estos péptidos son producidos a través de una vía de transducción de señal que implica la participación de 2 receptores de la familia Toll (dToll y 18W). La activación de dToll induce la producción de un péptido antifúngico denominado drosomicina, y la activación del receptor 18W produce un péptido antibacteriano, la atacina (Lemaitre *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997). Posteriormente, se han descrito en la mosca hasta 9 proteínas que pertenecen a la familia Toll (Means *et al.*, 2000; Tauszig *et al.*, 2000; Kaisho y Akira, 2002) cuyas funciones no están claras, pero se relacionan todas ellas con la resistencia frente a diferentes patógenos.

Diferentes estudios han descrito en mamíferos proteínas homólogas al receptor Toll de *Drosophila*, a las que se les ha denominado “Toll-Like Receptors” (TLR). En 1990 se descubrió la primera proteína humana relacionada con los receptores Toll de *Drosophila*, a la que posteriormente se le denominó TLR1 (Taguchi *et al.*, 1996). El descubrimiento de proteínas de mamífero homólogas a la proteína Toll planteaba el estudio de su posible función en la respuesta inmune innata (Medzhitov y Janeway, 1997). En 1997 se caracterizó otra proteína de la familia TLR en mamíferos (TLR4 humano), a la que se implicó en la respuesta inmune innata, ya que causaba la inducción de genes relacionados con citocinas y otras moléculas coestimuladoras (Medzhitov *et al.*, 1997). También se implicó al TLR4 en la respuesta al lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, ya que si bien durante años el CD14 se había considerado el receptor responsable de los efectos del LPS en macrófagos, monocitos y neutrófilos, dicho papel no estaba claro, ya que no presenta dominios intracelulares responsables de la transducción de señal. Numerosos estudios sugerían que el CD14 debía actuar asociado con otras proteínas transmembrana capaces de llevar a cabo la transducción de señal tras el reconocimiento del ligando (Aderem y Ulevitch, 2000; Means *et al.*, 2000). Análisis genéticos revelaron que el TLR4 es el receptor implicado en la transducción de señal en respuesta al LPS. Ratones C3H/HeJ y C57BL/10ScCr presentan una respuesta deficiente frente al LPS ya que presentan mutaciones en el gen *TLR4* (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999). Los ratones C3H/HeJ presentan una mutación puntual en la que un

residuo de prolina de la región intracitoplasmática del TLR4 se sustituye por uno de histidina, siendo la prolina esencial para que se produzca la transducción de señal (Hoshino *et al.*, 1999; Underhill *et al.*, 1999). Los ratones C57BL/10ScCr contienen una delección cromosomal en el locus TLR4. La función de TLR4 en el reconocimiento del LPS quedó confirmada posteriormente al obtener y analizar ratones “knockout” para dicho receptor (Hoshino *et al.*, 1999).

El descubrimiento de los TLR marcó el comienzo de una nueva etapa en el estudio de la regulación de la respuesta inmune frente a microorganismos patógenos. Actualmente, se han descrito en mamífero 11 proteínas de la familia TLR. Muchos de estos TLR participan en el reconocimiento de diferentes patógenos y en la inducción de una respuesta inmune innata frente a ellos, aunque también se les ha implicado en el desarrollo de la respuesta específica (Barton y Medzhitov, 2002; Takeda *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

### **3.1.- Papel de los TLR en la respuesta inmune**

Los TLR son una familia de proteínas muy conservadas que se caracteriza por presentar un dominio extracelular rico en residuos de leucina responsable del reconocimiento de los ligandos (Bell *et al.*, 2003), y una región intracitoplasmática denominada TIR (“Toll/Interleukin-1 Receptor (IL-1R) Homology (TIR) Domain”), homóloga a la región intracitoplasmática del receptor de la IL-1, capaz de transmitir señales de activación (Takeda y Akira, 2004a).

Para que se genere una respuesta inmune es necesario un previo reconocimiento del patógeno. Los TLR están implicados en este primer paso. Los distintos patógenos poseen una gran variedad de moléculas muy conservadas, que no se encuentran en el hospedador, denominadas PAMPs (Medzhitov y Janeway, 1997). Durante la infección microbiana estos componentes son reconocidos por una gran variedad de células (neutrófilos, monocitos, macrófagos, NK, mastocitos, células epiteliales, etc.) a través de los TLR, lo cual produce la activación de estas células, induciendo la expresión de citocinas,

moléculas coestimuladoras y otras muchas moléculas antimicrobianas. Así, los TLR participan activamente en el desarrollo de la respuesta innata, encaminada a eliminar al microorganismo en los primeros estadios de la enfermedad.

El descubrimiento de que los TLR también se expresan en células dendríticas inmaduras, sugirió que estos receptores podrían estar implicados en la generación de una respuesta inmune adquirida. Diferentes estudios han mostrado que la interacción de diferentes ligandos microbianos con los TLR presentes en las células dendríticas inmaduras desencadena: (i) un aumento de expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase II, que presentan los péptidos antigénicos a los linfocitos T, (ii) un aumento de expresión de moléculas coestimuladoras, importantes para la expansión clonal de las células T y (iii) secreción de citocinas inmunomoduladoras, que dirigen la diferenciación de los linfocitos T en células efectoras (Barton y Medzhitov, 2002; Takeda *et al.*, 2003; Sousa, 2004).

### **3.1.1.- Los ligandos de los TLR**

Aunque durante los últimos años se han caracterizado diferentes ligandos para los diferentes TLR, todavía no se conocen los ligandos fisiológicos para algunos TLR y con gran probabilidad, se seguirán descubriendo ligandos adicionales a los ya descritos. La gran mayoría de los ligandos caracterizados corresponden a estructuras microbianas conservadas (PAMPs), presentes en bacterias, hongos y virus. Recientemente, se ha descrito que ligandos endógenos (procedentes del hospedador), también son reconocidos por algún TLR. Por último, también se ha visto que algunos compuestos sintéticos (drogas antiviricas) pueden interaccionar como ligandos con ciertos TLR, aunque obviamente no pueden considerarse ligandos fisiológicos (Tabla 1). El TLR2 es esencial para el reconocimiento de lipopéptidos microbianos y zimosán. El TLR1 y TLR6 se asocian con el TLR2 y discriminan entre triacil y diacil-lipopéptidos, respectivamente. El TLR4 reconoce el LPS y algunos ligandos endógenos. El TLR9 es el receptor de DNA con motivos CpG no metilados, presente en DNA bacteriano y poco frecuentes

en DNA de vertebrados, mientras que el TLR3 está implicado en el reconocimiento de RNA bicatenario viral. El TLR5 es el receptor de la flagelina bacteriana. Los receptores TLR7 y TLR8 interaccionan con diferentes drogas sintéticas, con actividad antivírica o inmunomoduladora, que presentan similitudes estructurales con los ácidos nucleicos (Takeda *et al.*, 2003; Tabla 1). Recientemente, se ha sugerido que el ligando fisiológico de TLR7 y TLR8 es el RNA monocatenario vírico (Heil *et al.*, 2004). Por último, el ligando del TLR10 no se conoce actualmente, y el TLR11, recientemente descrito, no reconoce ningún ligando ya descrito para los otros TLR pero se activa en respuesta a bacterias uropatógenicas (Zhang *et al.*, 2004).

TLR	Origen del ligando	Ligando
TLR1	Bacterias gram positivas	Modulina, lipopéptidos
TLR2	Bacterias gram positivas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus</i> Micobacterias y micoplasmas <i>Listeria</i> Levaduras <i>Trypanosoma cruzi</i> Espiroquetas	Lipoproteínas, peptidoglicano, ácidos teicoicos Polímeros de ácido manurónico Modulina Lipoproteínas; lipopeptidos; lipoarabinomanano Bacteria muerta por calor Zimosán Proteínas GPI LPS
TLR3	Virus	dsRNA
TLR4	Bacterias gram negativas Plantas Virus respiratorio sincitial Hospedadores (ligandos endógenos)	LPS Taxol Proteína F hsp60; hsp70; fibronectina; ácido hialurónico; heparán sulfato; fibrinógeno; defensinas
TLR5	Bacterias gram negativas Bacterias gram positivas	Flagelina
TLR6	Bacterias gram positivas	Modulina; factor soluble de la tuberculosis; proteína A de <i>Borrelia burgdorferi</i>
TLR7	VIH	Pequeños compuestos antivirales ssRNA vírico
TLR8	VIH	Pequeños compuestos antivirales ssRNA vírico
TLR9	Bacterias	CpG-DNA
TLR10		???
TLR11	Bacterias gram negativas uropatógenicas	???

**Tabla 1:** Los ligandos de los TLR. Modificado de Kaisho y Akira (2002) y Akira y Hemmi (2003).

A continuación se describen con detalle los ligandos de los receptores TLR4 y TLR2, por ser los dos receptores para los que se han descrito un mayor número de ligandos microbianos y los únicos que se han implicado en el reconocimiento de células fúngicas.

#### **A.- TLR4**

El principal ligando del TLR4 es el LPS, aunque el reconocimiento del LPS requiere de otras proteínas que forman con el TLR4 el receptor funcional. El LPS se une a una proteína presente en el suero, "LPS-binding protein", y este complejo que forman es reconocido por el CD14, receptor unido a la membrana por un anclaje glicosilfosfatidilinositol, que a su vez interacciona con el TLR4. Además, la funcionalidad del receptor del LPS requiere la presencia de la proteína MD-2, que participa en la secreción del TLR4 a la membrana y que en su localización superficial interacciona con el dominio extracelular del TLR4 (Takeda *et al.*, 2003; Miyake, 2004).

El TLR4 tiene otros ligandos (Tabla 1) entre los que se encuentran ligandos endógenos. El TLR4 es capaz de reconocer componentes de la matriz extracelular, como fibronectina, ácido hialurónico y heparán sulfato, y otros ligandos del hospedador, como fibrinógeno, hsp y defensinas (Biragyn *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004). Muchos de estos compuestos se producen en procesos inflamatorios en respuesta a daño tisular, aún en ausencia de infección, por lo que se ha sugerido que los TLR, además de reconocer microorganismos, estarían implicados en detectar daño tisular (Beg, 2002; Takeda y Akira, 2004b). Sin embargo, no puede descartarse que el efecto observado en algunos casos se deba a la presencia de LPS contaminante en la preparación purificada de los ligandos endógenos (Tsan y Gao, 2004).

#### **B.- TLR2**

El receptor TLR2 reconoce una gran variedad de componentes microbianos (Tabla 1) entre los que cabe citar: lipoproteínas de bacterias gram negativas,



micoplasmas y espiroquetas, el peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos de bacterias gram positivas, lipoarabinomano de micobacterias, glicoinositol fosfolípidos de *Trypanosoma cruzi*, glicolípidos de *Treponema maltophilum*, porinas de *Neisseria* y zimosán. Además el TLR2 reconoce también varios tipos de LPS atípicos de *Leptospira interrogans* y *Porphyromonas gingivalis*, a diferencia del TLR4, que reconoce LPS de enterobacterias. Estos dos tipos de LPS atípico difieren estructuralmente y funcionalmente del LPS de enterobacterias.

El hecho de que el receptor TLR2 sea capaz de reconocer esta gran variedad de ligandos puede deberse a su capacidad de asociación con otros TLR, concretamente con el TLR1 y con el TLR6, lo que le confiere la posibilidad de discriminar entre diferentes componentes microbianos. La interacción entre TLR2 y TLR6 es necesaria para el reconocimiento de diacil-lipopéptidos, mientras que la cooperación entre TLR2 y TLR1 participa en el reconocimiento de triacil-lipopéptidos. Por lo tanto, el TLR1 y el TLR6 cooperan funcionalmente con el TLR2 discriminando diferencias estructurales en lipopéptidos (Takeda *et al.*, 2003; Wetzler, 2003; Takeda y Akira, 2004a). Además, el receptor CD14 puede actuar aumentando la eficiencia de reconocimiento del TLR2 frente a algunos de sus ligandos (Wetzler, 2003).

El zimosán fue descrito como ligando del TLR2 en el año 1999 (Underhill *et al.*, 1999). Aunque no se ha caracterizado el componente del zimosán responsable de la interacción con el TLR2, parece ser que dicha interacción no está mediada por el glucano, ya que al eliminar del zimosán los demás componentes mediante tratamiento alcalino, pierde la capacidad de activar por el TLR2 (Underhill, 2003b). En cambio, el glucano del zimosán es el componente reconocido por el receptor dectina-1, que activa la fagocitosis de las partículas de zimosán. Aunque la dectina-1 y el TLR2 reconocen diferentes moléculas del zimosán, y parece que no existe interacción entre ambos receptores, la activación a través de la dectina-1 es capaz de producir un aumento en la respuesta inflamatoria mediada por el TLR2, probablemente por solapamiento en las vías de transducción de señal (Gantner *et al.*, 2003; Underhill, 2003a).

### 3.1.2.- Vías de transducción de señal de los TLR

La vía de transducción de señal de los TLR comienza a través del dominio intracitoplasmático TIR que está bastante conservado en todos los TLR. Este dominio TIR del TLR interacciona con el dominio TIR de otras moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) (Figura 2). La primera molécula adaptadora que se describió fue MyD88 (“Myeloid Differentiation Factor 88”) y posteriormente se demostró que existía una vía de transducción de señal dependiente de MyD88, común a todos los TLR y esencial para la inducción de citocinas inflamatorias, y una vía independiente de MyD88, que se ha descrito que es específica para TLR3 y TLR4 y que utiliza la molécula adaptadora TRIF.

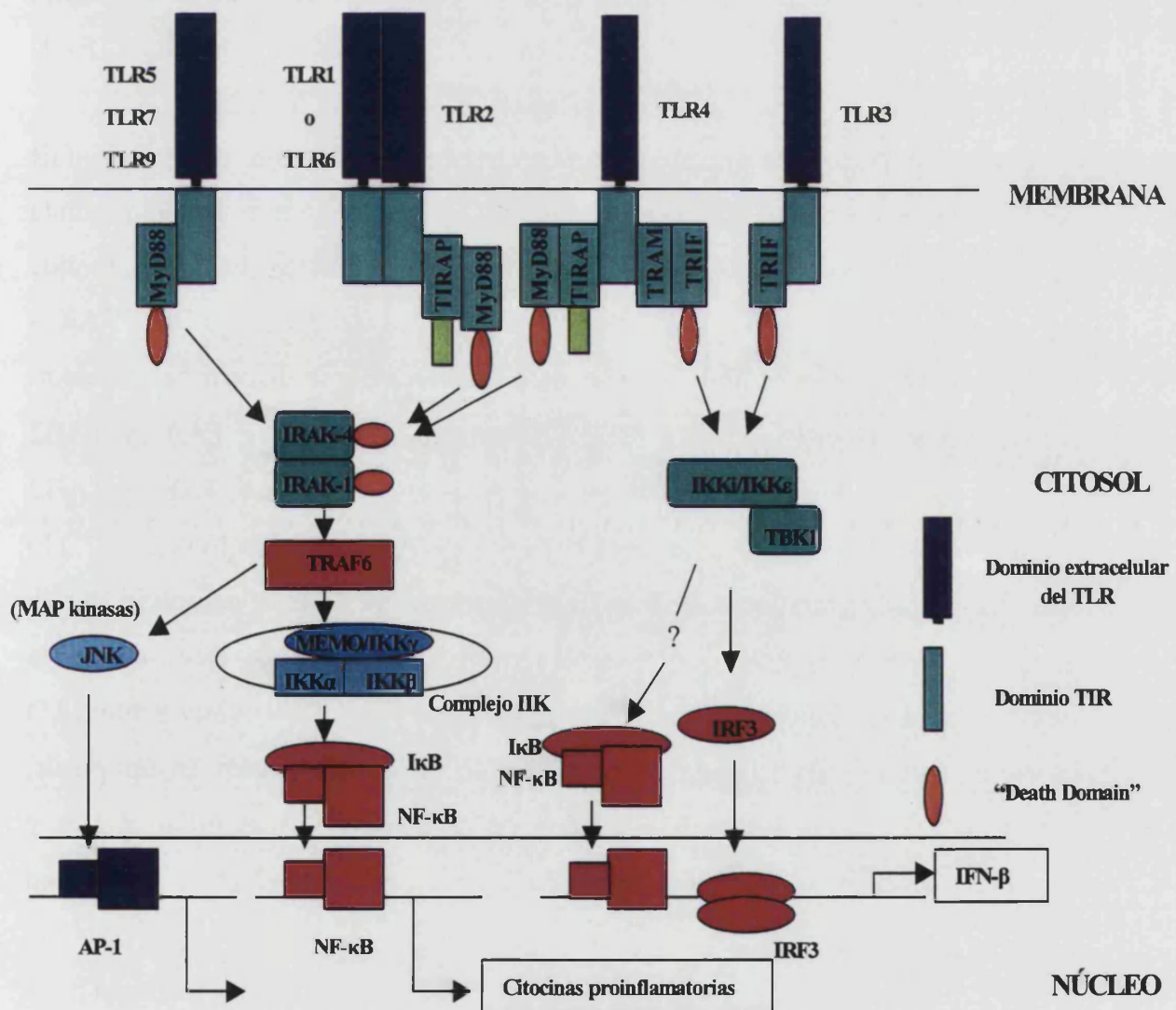


Figura 2: Vías de transducción de señal a través de TLR. Modificado de Takeda y Akira (2004a) y Takeda y Akira (2004b)

### A.- Transducción de señal dependiente de MyD88

MyD88 contiene en su extremo N-terminal un dominio de aproximadamente 90 aminoácidos denominado “Death Domain” (DD). El DD fue identificado en proteínas promotoras de apoptosis, aunque se ha demostrado que muchas proteínas con DD no presentan claras funciones apoptóticas, sino que participan en interacciones proteína-proteína.

En 1994 se observó que el extremo C-terminal de MyD88 presenta una secuencia de unos 200 aminoácidos, similar a las regiones intracelulares del receptor Toll de *Drosophila* y del receptor de la IL-1 de mamíferos, denominándose dominio TIR. A través de estos dos dominios (TIR y DD), MyD88 actúa como una molécula adaptadora entre los miembros de la familia TLR/IL-1R y otras proteínas implicadas en la transducción de señal como IRAK (“IL-1 Receptor- Associated Kinase”) (Janssens y Beyaert, 2002).

Una vez el ligando interactúa con el TLR correspondiente, el dominio TIR de MyD88 se une con el dominio TIR de TLR. En ese momento, MyD88 recluta a IRAK-4, IRAK-1 y TRAF-6 (“TNF-Receptor-Associated Factor”), lo que induce la asociación de IRAK-1 y MyD88 a través de sus dominios DD. IRAK-4 a continuación fosforila IRAK-1 que junto con TRAF6 se disocia del receptor. TRAF6 interactúa con TAK1 (“TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1”), TAB1 y TAB2 (“TAK1-Binding Proteins 1 and 2”); el complejo TRAF6, TAK1, TAB1 y TAB2 forma un complejo más grande con Ubc13 y Uev1A (“Ubiquitin Ligase E2”) lo que induce la activación de TAK1. TAK1 activada fosforila el complejo IKK y MAP kinasas (como JNK “c-Jun N-terminal Kinase”), lo que induce la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (“Activator Protein 1”) respectivamente. AP-1 regula la expresión de genes implicados en apoptosis, mientras que NF- $\kappa$ B induce la expresión de genes de citocinas inflamatorias y otros genes implicados en el control de la proliferación celular e inmunidad (Takeda y Akira, 2004a).

Otra molécula con dominio TIR, TIRAP (“TIR Domain Adaptor Protein”), es esencial en la vía de transducción de señal dependiente de MyD88 mediada

únicamente por los receptores TLR2 y TLR4. La molécula TIRAP, que también fue denominada inicialmente Mal (“MyD88-Adaptor-Like”), se pensó que podría ser la molécula adaptadora implicada en la transducción de señal independiente de MyD88, aunque posteriormente ha quedado demostrado que no es así (Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002a).

### **B.- Transducción de señal independiente de MyD88**

Macrófagos deficientes en MyD88 no presentan activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a ligandos de los receptores TLR2, TLR7 y TLR9, pero la estimulación con LPS, ligando del TLR4, produce la activación de NF- $\kappa$ B, aunque dicha activación se encuentra retardada al compararse con macrófagos control, lo que sugería la existencia de una vía de activación independiente de MyD88 (Kawai *et al.*, 1999). Tras estudiar cuales eran los genes que se inducían por el LPS en los macrófagos deficientes en MyD88, se observó que ligandos del TLR4, pero no del TLR2, inducían la expresión de genes inducibles por IFN- $\beta$ , tanto en macrófagos salvajes como en MyD88-/- (Kawai *et al.*, 2001), como consecuencia de la activación del factor de transcripción IRF-3 (“Interferon Regulatory Factor 3”) (Kawai *et al.*, 2001) que induce la producción de IFN- $\beta$ , que a su vez induce la expresión de genes regulados por interferón (Hoshino *et al.*, 2002; Toshchakov *et al.*, 2002; Doyle *et al.*, 2003). Se ha demostrado que ligandos del TLR3 también activan IRF-3 y que en macrófagos deficientes en MyD88, estimulados con ligandos del TLR3, se activa NF- $\kappa$ B, indicando que el receptor TLR3 también utiliza la vía independiente de MyD88 (Weaver *et al.*, 1998; Yoneyama *et al.*, 1998; Takeda y Akira, 2004b).

Se ha demostrado que la molécula adaptadora que participa en la vía de transducción de señal independiente de MyD88 es una molécula con dominio TIR denominada TRIF (“TIR Domain-Containing Adaptor Inducing-IFN- $\beta$ ”). La producción de IFN- $\beta$  en respuesta a ligandos del TLR3 y del TLR4 se ve claramente disminuida en ratones deficientes en TRIF (Yamamoto *et al.*, 2002b;

Yamamoto *et al.*, 2003). Una cuarta molécula adaptadora con dominio TIR es la molécula TRAM (“TRIF Related Adaptor Molecule”), que participa específicamente en la vía de transducción de señal independiente de MyD88 a través de TLR4 (Takeda y Akira, 2004b).

La vía de transducción de señal independiente de MyD88 es importante en la respuesta frente a infecciones víricas, puesto que induce la producción de IFN- $\beta$  y se activa a través del TLR3 y TLR4, receptores que pueden reconocer ligandos procedentes de virus (Tabla 1).

### 3.1.3.- Distribución de los TLR

La expresión de los TLR en diferentes células es un área de investigación en curso y posiblemente, los tipos celulares que expresan algún TLR siga aumentando en los próximos años. Además, la expresión de los TLR está modulada por una variedad de factores, tales como la invasión microbiana, componentes microbianos y citocinas (Takeda *et al.*, 2003).

Todos los receptores, excepto TLR3, se expresan en monocitos, macrófagos y neutrófilos (Muzio *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2003). También los eosinófilos expresan TLR1, 4, 7, 9 y 10; aunque en general, los niveles de estos receptores son menores que en los neutrófilos, hay que destacar que expresan un alto nivel de TLR7 y responden bien a ligandos de este receptor, lo que sugiere su participación en la respuesta frente a las infecciones víricas (Nagase *et al.*, 2003). Los mastocitos, importantes en la respuesta inmune innata, expresan TLR2, 4, 6 y 8, pero no TLR5 (McCurdy *et al.*, 2001; Supajatura *et al.*, 2001; Supajatura *et al.*, 2002).

Aunque las células NK participan en la respuesta inmune frente a microorganismos, su capacidad para reconocer directamente a los patógenos sólo ha podido ser demostrada recientemente, cuando se ha descrito que células NK altamente purificadas son capaces de reconocer y responder a componentes de microorganismos patógenos a través de los TLR (Chalifour *et al.*, 2004).

En células dendríticas, la expresión de los TLR depende del tipo de célula dendrítica y de su estado de maduración. En humanos, existen dos tipos de células dendríticas, las mieloides y las plasmocitoides (Rissoan *et al.*, 1999; Liu, 2001; Liu *et al.*, 2001). Las primeras expresan TLR1, 2, 4, 5 y 8, mientras que las segundas TLR7 y 9, aunque algunos autores indican que TLR7 también se expresa en las dendríticas mieloides (Jarrossay *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002). La expresión de TLR1, 2, 4 y 5 se observa en células dendríticas inmaduras y va disminuyendo a medida que van madurando (Visintin *et al.*, 2001). El TLR3 se expresa solamente en células dendríticas maduras (Muzio *et al.*, 2000).

La expresión de los TLR también es generalizada entre los linfocitos. La expresión de los TLR en los linfocitos B genera funciones efectoras, tales como producción de anticuerpos, y representa una conexión directa entre inmunidad innata y específica (Coutinho y Poltorack, 2003). Además, se ha descrito que el TLR2 se expresa en la superficie de células T activadas y de memoria, donde podría funcionar como receptor coestimulador para la activación de células T y en el mantenimiento de las células de memoria (Komai-Koma *et al.*, 2004). El análisis de la expresión de los TLR en diferentes subpoblaciones de linfocitos T, ha mostrado que los T reguladores expresan selectivamente TLR4, 5, 7 y 8; además, estas células responden directamente a productos bacterianos proinflamatorios, un mecanismo que probablemente contribuye al control de la respuesta inflamatoria (Caramalho *et al.*, 2003).

Los TLR, además de expresarse en células del sistema inmune, se han encontrado en otros tipos celulares como células epiteliales y endoteliales, contribuyendo a las respuestas inflamatorias. Así por ejemplo, células epiteliales intestinales expresan bajos niveles de TLR4, lo que podría explicar que el LPS no produce importantes procesos inflamatorios a este nivel (Abreu *et al.*, 2001; Naik *et al.*, 2001). La expresión de los TLR parece estar estrictamente regulada en las células epiteliales intestinales, de manera que las bacterias patogénicas gram negativas inducen una respuesta inflamatoria que no es inducida por las bacterias comensales, y además recientemente se ha descrito que la activación de

los TLR por la microflora comensal está implicada en la protección contra el daño intestinal y la mortalidad asociada a este daño, lo que revela una nueva función de los TLR en el mantenimiento de la homeostasis epitelial intestinal (Takeda *et al.*, 2003; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Algunos TLR, como el TLR2 y el TLR4, se expresan en células epiteliales renales tras inducción por IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , lo que contribuye a la detección de la infección bacteriana en el lumen de los túbulos y a la inducción de la respuesta inflamatoria (Wolfs *et al.*, 2002). La expresión de TLR4 en el epitelio pulmonar es importante en la detección de *Haemophilus influenzae* y el TLR4 presente en el epitelio de la córnea contribuye a la respuesta inflamatoria frente a parásitos nematodos (Saint Andre *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002).

Las células endoteliales también son capaces de expresar TLRs, en particular TLR2 y TLR4, indicando su posible función en la detección de patógenos (Takeda *et al.*, 2003; Talreja *et al.*, 2004).

### 3.2.- TLR y *Candida albicans*

La función de los TLR en la defensa frente a las candidiasis sólo ha empezado a estudiarse en los últimos años. Al iniciarse el trabajo experimental de esta tesis doctoral no existía ninguna publicación sobre el tema y durante el desarrollo del mismo, han aparecido cuatro publicaciones que se comentan a continuación.

Las tres primeras publicaciones aparecieron en el año 2002. En la primera de ellas (Netea *et al.*, 2002) se estudia el papel del TLR4 en las candidiasis utilizando ratones C3H/HeJ que, como se ha indicado anteriormente, tienen un TLR4 no funcional. Los autores encuentran que estos ratones son más sensibles a las candidiasis invasivas midiendo el grado de colonización del riñón tras inyección intravenosa de levaduras vivas, aunque no presentan datos de curvas de supervivencia/mortalidad. La producción de citocinas proinflamatorias *in vitro* es normal en estos ratones, pero la producción de quimiocinas está disminuida, lo que concuerda con un menor reclutamiento de neutrófilos a la cavidad intraperitoneal tras la inyección de levaduras. En cambio, utilizando células

humanas la producción de la quimiocina IL-8 no se inhibió con anticuerpos anti-TLR4, lo que sugiere que la respuesta mediada por TLR4 frente a *C. albicans* en humanos es diferente a la observada en ratones (Netea *et al.*, 2002).

En la segunda publicación se estudia la relación entre un polimorfismo encontrado en el gen TLR4 humano (la asparagina de la posición 299 es sustituida por una glicina, mutación funcionalmente equivalente a la que presentan los ratones C3H/HeJ), y la susceptibilidad y/o gravedad de candidiasis urogenitales. Los autores no encuentran ninguna relación estadísticamente significativa entre dicho polimorfismo en el TLR4 y las candidiasis urogenitales (Morré *et al.*, 2002).

En la tercera publicación se describe que el manano de la pared celular de la forma levaduriforme de *C. albicans*, y en menor medida de la forma de micelio, es capaz de inducir la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos humanos, a través del receptor TLR4, de manera similar al LPS; dicha inducción está mediada por CD14, que reconocería el complejo formado por el manano y la proteína de unión al LPS (Tada *et al.*, 2002).

Por último, en el año 2003 se ha descrito que el PLM de la superficie celular de *C. albicans* es un ligando que estimula la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos de ratón al interactuar con el TLR2 (Jouault *et al.*, 2003).

Los resultados sobre este tema publicados en paralelo a los de esta tesis hasta el momento actual, serán discutidos en conjunto en la sección de discusión general.





## **II. OBJETIVOS**



El descubrimiento de los TLR ha abierto nuevas perspectivas en el estudio de la respuesta inmune del hospedador frente a las infecciones microbianas. Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en la introducción, el objetivo general de esta tesis doctoral ha sido el estudio de la participación de estos receptores en la respuesta inmune frente a *C. albicans*. Para ello, se han utilizado ratones deficientes en TLR2, TLR4 o MyD88 con base genética C57BL/6, cedidos por el Dr. Akira de la Universidad de Osaka, Japón.

Los objetivos concretos del presente trabajo han sido los siguientes:

1. **Estudio de la participación del receptor TLR2 en la respuesta inmune innata y adquirida frente a *C. albicans*.** Los resultados obtenidos se recogen en los siguientes artículos:
  - **E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004.** Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and Infection* 6: 1-7.
  - **E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, M.L. Ferrandiz, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004.** Toll-like receptor-2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. *Microbes and Infection* 6: 542-548.
  
2. **Estudio de la participación de MyD88 en la respuesta inmune innata y adquirida frente a *C. albicans*.** Los resultados de este apartado se encuentran recogidos en el siguiente artículo:
  - **E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, C. Murciano, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004.** Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines. *European Cytokine Network* 15: 263-271.

3. **Estudio de la participación de los receptores TLR2 y TLR4 en la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *C. albicans*.** Este objetivo ha dado lugar a la siguiente publicación:
  - **E. Villamón, P. Roig, M.L. Gil, D. Gozalbo, 2005.** Toll-like receptor-2 mediates prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*. *Research in Microbiology*, en prensa.

### **III. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN**



**ARTÍCULO 1: E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and Infection* 6: 1-7.**







Original article

## Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections

Eva Villamón<sup>a</sup>, Daniel Gozalbo<sup>a</sup>, Patricia Roig<sup>a</sup>, José Enrique O'Connor<sup>b</sup>,  
Didier Fradelizi<sup>c</sup>, M. Luisa Gil<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València, Edificio de Investigación, C/Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Département d'Immunologie, Inserm 567, CNRS UMR 8104, Université Paris 5, Institut Cochin, Paris, France

Received 25 August 2003; accepted 18 September 2003

### Abstract

In this work, we studied the role of toll-like receptor-2 (TLR2) in murine defenses against *Candida albicans*. TLR2-deficient mice experimentally infected intraperitoneally (i.p.) or intravenously (i.v.) in vivo had very significant impaired survival compared with that of control mice. In vitro production of TNF- $\alpha$  and macrophage inhibitory protein-2 (MIP-2) by macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> mice in response to yeasts and hyphae of *C. albicans* were significantly lower (80% and 40%, respectively;  $P < 0.05$ ) than production by macrophages from wild-type mice. This impaired production of TNF- $\alpha$  and MIP-2 probably contributed to the 41% decreased recruitment of neutrophils to the peritoneal cavity of i.p. infected TLR2<sup>-/-</sup> mice. In contrast, in vitro phagocytosis of yeasts and production of reactive oxygen intermediates (ROI) were not affected in macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> animals. Our data indicate that TLR2 plays a major role in the response of macrophages to *C. albicans*, triggering cytokine and chemokine expression, and it is essential for in vivo protection against infection.

© 2003 Elsevier SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Candida albicans*; TLR2; Macrophages

### 1. Introduction

The dimorphic fungus *Candida albicans* is one of the most frequent etiologic agents causing the opportunistic infection candidiasis, a disease which can be fatal when progressing to systemic dissemination. The incidence of this infection is increasing as a result of expansion of the immunocompromised population [1,2].

Prevention of candidiasis requires the coordinated action of innate and adaptive immune defenses. Phagocytes, such as neutrophils and macrophages, are crucial to these processes. These cells can clear the pathogen via phagocytosis. Furthermore, macrophage activation leads to the release of several key mediators such as proinflammatory cytokines; TNF- $\alpha$  is of special importance in protecting the host against disseminated candidiasis. Neutralization of endogenous TNF- $\alpha$  by either anti-TNF- $\alpha$  antibodies (Abs) or pharmacological

agents dramatically worsens the course of this experimental disease [3,4]. Mice lacking TNF- $\alpha$  receptors and TNF- $\alpha$ , lymphotoxin- $\alpha$  double-knockout mice have increased susceptibility to disseminated candidiasis [5,6]. Other cytokines, such as IL-6, G-CSF and GM-CSF, are important for neutrophil recruitment during candidiasis, but the precise role of chemokines during *C. albicans* infection, and which chemokines mediate cytokine-driven neutrophil influx, have been little examined as yet [7]. It is established that Th1, and not Th2, response confers protection against candidiasis. Understanding of the mechanisms of Th1 lymphocyte induction has made important progress recently [8]. It is recognized that activation of phagocytic cells following pathogen-binding to cell surface molecules acting as pathogen sensors is a key initial event [9,10].

The main pattern recognition receptors on the surface of phagocytic cells are the toll-like receptors (TLRs), a family of evolutionarily conserved transmembrane proteins that function as sensors of infection and induce the activation of innate and adaptive immune responses. Ten mammalian TLRs have

\* Corresponding author. Tel.: +34-96-354-3026; fax: +34-96-354-3099.  
E-mail address: [m.luisa.gil@uv.es](mailto:m.luisa.gil@uv.es) (M.L. Gil).

been described so far, and TLR ligands include molecular products derived from bacteria, protozoa, viruses and fungi. Signal transduction through TLRs results in the upregulation of major histocompatibility complex (MHC) class II, costimulatory molecules, cytokines and antimicrobial responses. Their intracellular Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain binds to MyD88, a common adaptor protein containing a TIR domain. MyD88 is the adaptor molecule required for all but a subset of TLR-mediated signaling events [11].

Despite the importance of *C. albicans* in causing human disease, little information is available on the role of TLRs in host defense against candidiasis. TLR4-defective C3H/HeJ mice were reported to be more susceptible to *C. albicans* infection [12]. However, these authors observed that, in vitro, neither production of TNF- $\alpha$  and other proinflammatory cytokines nor candidacidal ability of neutrophils and macrophages were affected in these TLR4-deficient mice. Only the production of chemokines, such as KC and macrophage inhibitory protein-2 (MIP-2), decreased and was accompanied by impaired neutrophil recruitment. Nevertheless, they also noted that the murine data were at variance with results in humans, since in vitro production of IL-8, the human homologue of murine KC and MIP-2, was not blocked by anti-TLR4 Abs [12]. Morré et al. [13] have examined the role of TLR4 Asp299Gly gene polymorphism in human susceptibility to *C. albicans* infection. This genotype results in an endotoxin hyporesponsiveness similar to the phenotype of C3H/HeJ mice. The results indicated that this functional TLR4 Asp299Gly gene polymorphism did not play any major role in human susceptibility to and severity of urogenital *C. albicans* infections. All these results, although indicating that TLR4 plays an important role in protecting mice against candidiasis, did not rule out the possibility that additional TLR molecules on murine macrophages might also participate as sensor molecules capable of recognizing this fungus. In addition, such studies underline the dissimilarities between human and murine TLRs, and the complexity of host-parasite relationships during candidiasis, including the differences between host defenses against mucosal or disseminated infections.

The discovery of TLRs has opened new perspectives for studying host defenses against microbial infections. In this work, we studied the role of TLR2 in the protective response against yeasts and hyphae of *C. albicans* by using gene-targeted mice lacking TLR2 expression (TLR2<sup>-/-</sup>). We report here the influence of TLR2 gene deletion on (i) susceptibility in vivo to experimental fungal infection, (ii) TNF- $\alpha$  and MIP-2 release by macrophages in response to *C. albicans* in vitro, (iii) neutrophil recruitment to the site of infection, (iv) phagocytosis, and (v) formation of reactive oxygen intermediates (ROI) by macrophages in response to *C. albicans*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice

TLR2<sup>-/-</sup> mice (C57BL/6 background) were kindly provided by Dr. S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan) [14],

and C57BL/6 mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were used as controls. Mice of both sexes between 7 and 12 weeks old were used for experiments.

### 2.2. Infection and survival curves

Cells of *C. albicans* strain ATCC 26555 were grown in YPD medium (1% Difco yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 28 °C up to the late exponential growth phase ( $A_{600\text{ nm}}$  0.6–1), and they were collected and washed with pyrogen-free water. Cells were resuspended in water and maintained for 3 h at 28 °C with shaking and afterwards at 4 °C for 24 or 48 h (starved yeast cells), as previously described [15]. The suspension was finally washed and diluted in pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, Barcelona, Spain) to the appropriate cell concentration before injection. Mice were challenged intraperitoneally (i.p.) with  $50 \times 10^6$  *C. albicans* yeasts in a volume of 0.5 ml, or intravenously (i.v.) with  $10^6$  *C. albicans* yeasts in a volume of 0.2 ml, and survival was checked daily for 15 days.

Experiments were performed under conditions designed to minimize endotoxin contamination. Endotoxin-free water and PBS were used, fungal culture media were passed through a detoxi-gel endotoxin removing gel (Pierce, Rockford, IL) and tested for absence of endotoxin by the E-toxate assay (Sigma, Madrid, Spain).

### 2.3. In vitro cytokine production

Resident peritoneal macrophages were harvested by instilling and withdrawing 10 ml of complete cell culture medium: RPMI-1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated FBS and 1% penicillin–streptomycin (Gibco, Barcelona, Spain). The cells were washed once with the same medium and plated at a density of  $2.3 \times 10^5$  cells in 200  $\mu$ l of medium per well in a 96-well tissue culture plate. Peritoneal macrophages were allowed to adhere for 2 h, the non-adherent cells were removed, and the adherent macrophages were cultured for 72 h. Cells were challenged with the indicated stimuli for 24 h. Supernatants were then harvested and tested for TNF- $\alpha$  and MIP-2 release by commercial ELISA kits (eBioscience, San Diego, CA, and R&D Systems, Minneapolis, MN, respectively).

The stimuli used were LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma, Madrid, Spain), the yeast cell wall particle zymosan (Molecular Probes, Eugene, OR), and two *C. albicans* forms, yeast and hypha, obtained as reported elsewhere [15,16]. Briefly, starved yeast cells were inoculated (200  $\mu$ g [dry weight] of cells per ml) in a minimal synthetic medium and incubated for 3 h at 28 °C to obtain yeasts or at 37 °C to obtain hyphae. For heat inactivation, yeasts and hyphae were resuspended in water and treated at 100 °C for 1 h. After inactivation, fungal cells were extensively washed in PBS and brought to the desired cell density in complete cell culture medium.

#### 2.4. Recruitment of neutrophils

To investigate the recruitment of neutrophils at the site of infection, groups of four mice were injected i.p. with  $10^7$  heat-killed *C. albicans* yeast cells. After 4 h, peritoneal cells were collected and washed once with PBS. The percentage of neutrophils was determined by labeling cells with FITC-conjugated anti-mouse Ly-6G antibody (clone RB6-8C5; eBioscience, San Diego, CA), and analysis by flow cytometry, using an EPICS Elite Cell Sorter XL-MCL (Coulter Beckman).

#### 2.5. *Candida* phagocytosis assay

Heat-killed *C. albicans* cells were made fluorescent by FITC labeling. Briefly, yeasts were resuspended in carbonate buffer (pH 10) containing 0.05 mg of FITC per ml, and incubated at room temperature for 2 h. FITC was eliminated by extensive washing with PBS, and homogeneous distribution of FITC labeling was confirmed by flow cytometry. Zymosan particles were labeled with fluorescein as indicated above for yeasts. Resident peritoneal macrophages were plated at a density of  $1.6 \times 10^5$  cells in 200  $\mu$ l of medium per well in a 96-well tissue culture plate, and after 48 h, were incubated with FITC-labeled yeast (6:1 ratio) or FITC-labeled zymosan (6:1 ratio). After 18 h, cells were washed, scraped into suspension and analyzed by flow cytometry. To differentiate cell surface-adherent microorganisms from the internalized ones, trypan blue (0.2%) was added to quench extracellular fluorescence. Macrophages were gated on the basis of their forward and side scatter, and at least 5000 events were acquired. The extent of phagocytosis was assessed as the percentage of positive (green) cells as well as by the increase of the mean intensity of fluorescence in macrophages.

#### 2.6. Formation of ROI in peritoneal macrophages

Resident peritoneal macrophages were plated at a density of  $1.6 \times 10^5$  cells in 200  $\mu$ l of medium per well in a 96-well tissue culture plate, and after 72 h were incubated with heat-killed yeast (6:1 ratio) or zymosan (6:1 ratio). After 2 h, cells were washed, incubated with 0.15  $\mu$ g/ml dihydro-rhodamine (DHR) 123 (Molecular Probes, Eugene, OR) for 30 min, scraped into suspension and analyzed by flow cytometry. Macrophages were gated on the basis of their forward and side scatter, and at least 5000 events were acquired. The results are presented as the fold induction of oxidation of DHR123, defined as the mean fluorescence of the sample treated with stimulus plus DHR123 divided by the mean fluorescence of DHR123 treatment alone.

#### 2.7. Statistical analysis

Statistical differences were determined using Student's two-tailed *t*-test. Significance was accepted at the  $P < 0.05$  level. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. *In vivo* susceptibility of mice to experimental *C. albicans* infections

To assess the role of TLR2 in the host defense against *C. albicans*, TLR2<sup>-/-</sup> and control mice were infected with *C. albicans* yeasts, and their survival was monitored for 15 days (Fig. 1). We first selected the i.p. route because we reasoned that peritoneal macrophages which express TLRs would be the first-line effector cells encountering and possibly neutralizing the yeast cells before they could disseminate. Inoculations were performed with  $50 \times 10^6$  yeast cells per mouse (Fig. 1A). This dose was selected following preliminary studies evaluating the mortality rates in C57BL/6 mice according to the number of *C. albicans* cells injected. Most animal deaths occurred during the first week after infection. Subsequently, most surviving animals stayed alive and exhibited normal appearance and activity. The percentage of dead animals following i.p. infection was 45.46% in TLR2<sup>-/-</sup> mice. It was significantly higher than the percentage of dead animals in control mice (18.46%). In subsequent experiments, infections were performed by the i.v. route with  $10^6$  yeast cells per mouse. Mortality was followed for 15 days (Fig. 1B). Using this i.v. inoculation route, 100% of TLR2<sup>-/-</sup> mice died within 7 days, while only 44.5% of the wild-type animals had died at day 7, and no further deaths occurred until day 15. We concluded that TLR2 expression is of crucial importance for the protection of mice against *C. albicans* disseminated candidiasis.

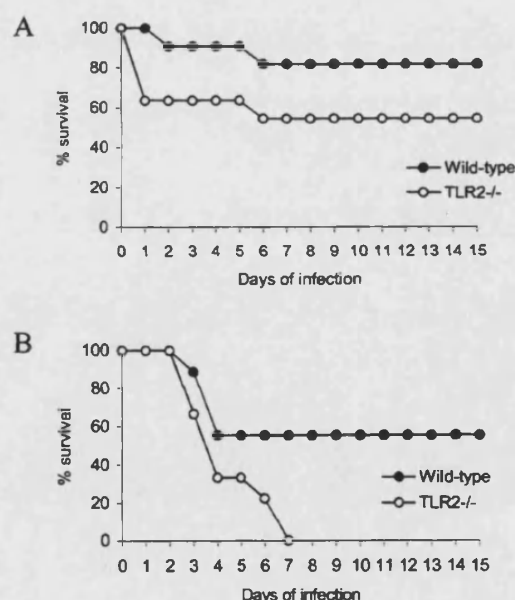


Fig. 1. Survival of animals infected with *C. albicans*. Wild-type mice and TLR2<sup>-/-</sup> mice were infected i.p. with  $50 \times 10^6$  yeasts per mouse (A) or i.v. with  $10^6$  yeasts per mouse (B), and observed for 15 days. (A) shows data from one representative experiment of two, using 11 mice for each group, and (B) shows data from one experiment, using nine mice for each group.

### 3.2. Role of TLR2 in TNF- $\alpha$ and MIP-2 macrophage production in response to *C. albicans*

To investigate the role of TLR2 in the production of cytokines and chemokines by macrophages stimulated with *C. albicans*, in vitro peritoneal macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> and control C57BL/6 mice were stimulated with yeasts or hyphae. Wells containing macrophages stimulated by known TLR2 (zymosan) and TLR4 (LPS) agonists were included as controls. Unstimulated macrophages served as negative controls. The synthesis of TNF- $\alpha$  in response to yeasts and hyphae was significantly lower by macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> mice compared with synthesis by macrophages from wild-type animals (Fig. 2A; 88% reduction in the case of yeasts,  $P = 0.000079$ , and 73% reduction in the case of hyphae,  $P = 0.011$ ). As expected, zymosan stimulated TNF- $\alpha$  release from wild-type macrophages only, and LPS stimulated TNF- $\alpha$  release by macrophages from both wild-type and TLR2<sup>-/-</sup> animals. Production of MIP-2 by macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> mice in response to yeasts and hyphae was also impaired compared with production by macrophages from control animals (Fig. 2B; 45% reduction in the case of yeasts,  $P = 0.008$ , and 52% reduction in the case of hyphae,  $P = 0.0026$ ). It is noteworthy that the production of MIP-2 in response to zymosan was diminished, but not abolished, in TLR2<sup>-/-</sup> macrophages. In selected assays with fungal stimuli, 2  $\mu\text{g/ml}$  of polymixin B was added to culture wells, prior to stimulation, to neutralize possible endotoxin con-

tamination. This had no significant effect on cytokine release (data not shown).

The very significant reduced production of TNF- $\alpha$  and MIP-2 by *C. albicans*-stimulated macrophages from TLR2-deficient animals (80% and 49%, respectively) clearly indicated that TLR2 is an essential receptor for *C. albicans*. Based upon results by Netea et al. [12], who reported that *C. albicans*-induced stimulation of macrophages from C3H/HeJ mice led to a reduced production of MIP-2, similar to the inhibition that we observed in TLR2<sup>-/-</sup> mice, but had no effect on murine TNF- $\alpha$  production, it seems likely that both TLR2 and TLR4 receptors are involved in macrophage response to *C. albicans*, but in a different manner, the former controlling both TNF- $\alpha$  and chemokine production while the latter control only chemokine production.

*C. albicans* putative virulence factors include the ability to switch from saprophytic yeast to the more virulent filamentous form of the fungus. Yeast forms are found in the environment or during commensalism, whereas in the course of fungal infectious disease both morphotypes are found in infected tissues [17]. Recent studies demonstrated that whereas yeasts activate human monocytes to produce IL-12, driving immune response toward a Th1 protective anticandidal immunity, the hyphal forms inhibit IL-12 production. Thus, the virulence attributed to the dimorphic transition might be related to the lack of a protective anti-candidal immunity resulting from a deficient induction of IL-12 by hyphae [18,19]. In the present work we found that both forms, yeast and hypha, stimulated TNF- $\alpha$  and MIP-2 production by macrophages; hyphae stimulating more TNF- $\alpha$  production than yeasts but equal amounts of MIP-2. For both morphotypes, the stimulation of TNF- $\alpha$  production was highly TLR2 dependent, whereas stimulation of MIP-2 production was only partially dependent on TLR2 engagement. Our results are in line with those by Underhill et al. [20], who showed a crucial role of TLR2 in TNF- $\alpha$  production in response to zymosan. Recently, Gantner et al. [21] have described a collaborative induction of inflammatory responses to zymosan by dectin-1 and TLR2. Dectin-1 is a lectin receptor for  $\beta$ -glucan that participates in the recognition of zymosan and enhances TNF- $\alpha$  and IL-12 production mediated by TLR2. The precise molecular nature of the *C. albicans* ligand(s) for TLRs still has to be determined, but it is thought to be located in the fungal cell wall, as the outermost cellular structure [22,23].

### 3.3. Role of TLR2 in the recruitment of neutrophils

To investigate the recruitment of neutrophils to the site of a *C. albicans* infection, groups of TLR2<sup>-/-</sup> and C57BL/6 mice were injected i.p. with  $10^7$  heat-killed *C. albicans* yeasts, and peritoneal cells were harvested 4 h later. The percentage of neutrophils was determined by flow cytometry using the RB6-8C5 monoclonal antibody. RB6-8C5 is directed against Ly-6G, previously known as Gr-1, an antigen on the surface of murine granulocytes whose expression

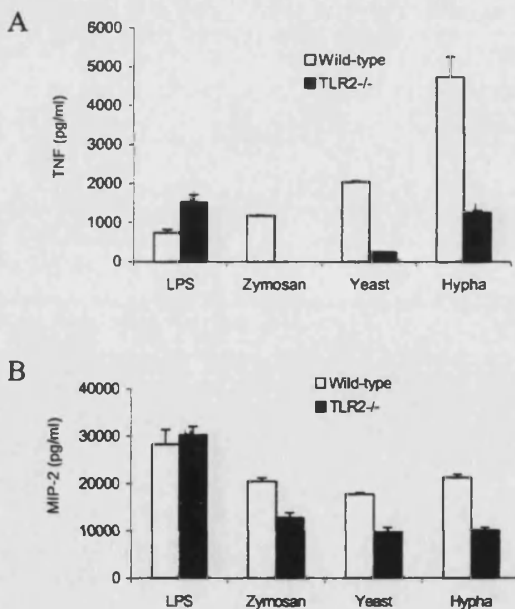


Fig. 2. TNF- $\alpha$  and MIP-2 production in response to *C. albicans*. Resident peritoneal macrophages from wild-type and TLR2<sup>-/-</sup> mice were isolated and challenged with *E. coli* LPS (250 ng/ml), zymosan ( $3.75 \times 10^6$  particles per ml), *C. albicans* yeasts (150  $\mu\text{g}$  [dry weight] of cells per ml) or hyphae (150  $\mu\text{g}$  [dry weight] of cells per ml) for 24 h. Concentrations of TNF- $\alpha$  (A) and MIP-2 (B) in the culture supernatants were measured by ELISA. Depicted are the means of duplicates from one representative experiment of two.

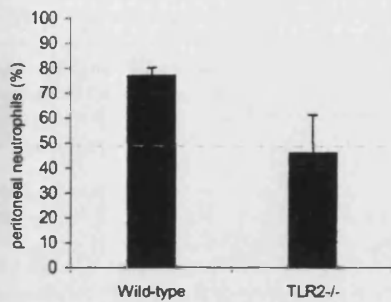


Fig. 3. Recruitment of neutrophils in TLR2<sup>-/-</sup> mice in response to *C. albicans*. C57BL/6 and TLR2<sup>-/-</sup> mice were injected i.p. with 10<sup>7</sup> heat-killed *C. albicans* yeasts per mouse. Four hours later, the percentage of neutrophils present in the peritoneal cavity was quantified by labeling with FITC-labeled anti-Ly-6G antibody (clone RB6-8C5) and flow cytometry analysis. Data represent mean  $\pm$  S.D. of four mice from one representative experiment of two.

increases with cell maturity and is absent from precursor cells. As shown in Fig. 3, there were significantly fewer neutrophils in the peritoneal cavity of TLR2<sup>-/-</sup> than in the cavity of control mice (41% inhibition;  $P = 0.027$ ). The reduced recruitment of neutrophils may be related, at least in part, to the impaired production of MIP-2 by macrophages from TLR2<sup>-/-</sup>, since MIP-2 is a CXC chemokine that causes marked neutrophil chemotaxis and activation [24]. Moreover, the reduction in TNF- $\alpha$  production by macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> may also be partly responsible for the impaired influx of neutrophils, since it is known that the early TNF- $\alpha$  response is an important stimulus of chemokine production [25,26] and that TNF- $\alpha$  lymphotoxin- $\alpha$  double-knockout mice have an impaired recruitment of neutrophils in response to *C. albicans* [5].

#### 3.4. TLR2 in phagocytosis of *C. albicans*

Subsequently, we sought to determine whether TLR2 is also required for *C. albicans* phagocytosis. We assessed whether macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> mice differed from control macrophages regarding their ability to internalize *C. albicans* yeast cells. We used a flow cytometry assay to determine the percentage of macrophages containing internalized FITC-labeled yeasts. The extracellular fluorescence possibly caused by unspecific binding of FITC-labeled organisms to the extracellular surface of macrophages was quenched with trypan blue, a method that distinguishes intracellular from extracellular yeasts [27]. The mean channel fluorescence intensity of macrophages indicated the extent of the phagocytosis. As shown in Fig. 4, *C. albicans* uptake by peritoneal macrophage from TLR2 knockout mice was not modified compared with uptake by peritoneal macrophages from wild-type animals. We also measured phagocytosis of zymosan by macrophage from both wild type and TLR2<sup>-/-</sup>, and found equivalent results (Fig. 4), as recently reported [21].

Our finding that TLR2 is critical for cytokine production but not for phagocytosis is consistent with previous studies which have shown that neither TLR2 nor TLR4 play a role in

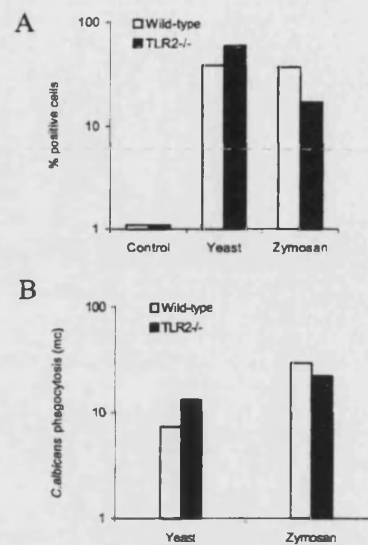


Fig. 4. Phagocytosis of heat-inactivated *C. albicans* yeasts by resident peritoneal macrophages from wild-type and TLR2<sup>-/-</sup> mice. FITC-labeled *C. albicans* cells and FITC-labeled zymosan were added to the macrophage cultures at a 6:1 ratio and further incubated for 18 h before assessing the extent of phagocytosis by flow cytometry in the presence of trypan blue. The extent of phagocytosis is represented as percentage of green fluorescent cells (A) and as the green fluorescence mean intensity (B). Data are from one representative experiment of two.

fungi phagocytosis by macrophages. Netea et al. [12] showed that phagocytosis of *C. albicans* was not reduced in C3H/HeJ mice. All these results are in agreement with several in vitro studies. The mannose receptor (MR) was first identified as a key receptor for *C. albicans* phagocytosis [28]. A recent study identified the two major *C. albicans* receptors on human monocyte-derived dendritic cells, the already described MR and the newly identified C-type lectin DC-SIGN (CD209) [29]. This newly described DC-SIGN (CD209) *C. albicans*-uptake receptor, which has an expression significantly broader than initially reported, including monocytic human cell lines and peripheral blood mononuclear cells [30], may explain why macrophages from MR<sup>-/-</sup> mice were equally capable of *C. albicans* uptake [31]. Moreover, dectin-1 expression in non-phagocytic cells is sufficient to confer the ability to internalize zymosan [21], and therefore, it can be suggested that dectin-1 may also contribute to phagocytosis of *C. albicans* by recognizing the cell wall  $\beta$ -glucan. Altogether, these data, including ours, suggest that MR and/or CD209 are the main receptors for *C. albicans* uptake, whereas TLRs are not involved in phagocytosis but signal for cytokine and chemokine production.

#### 3.5. Intracellular formation of ROI in response to *C. albicans*

We used DHR123 to quantify the production of ROI by macrophages in response to *C. albicans*. DHR123 reacts with hydrogen peroxide in the presence of peroxidase, cytochrome *c* or Fe<sup>2+</sup>, and also reacts with peroxyinitrite, the

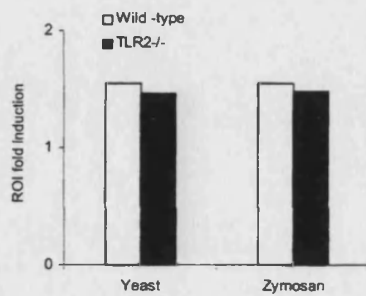


Fig. 5. Generation of ROI in response to *C. albicans* in peritoneal macrophages from wild-type and TLR2<sup>-/-</sup> mice. Macrophage cultures were incubated with heat-inactivated *C. albicans* (6:1 ratio) and zymosan (6:1 ratio) for 120 min. Cells were then washed, incubated with DHR123 for 30 min, and the induced fluorescence was determined by flow cytometry. Depicted is the fold induction of oxidation of DHR123 in the presence of *C. albicans* and zymosan compared with self-oxidation of DHR123 alone. Shown are representative results of two experiments.

anion formed when nitric oxide (NO) reacts with superoxide [32]. As shown in Fig. 5, macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> mice generated similar levels of ROI as wild-type macrophages in response to both zymosan and *C. albicans* cells, indicating that TLR2 is not involved in ROI generation. Also, it has recently been reported that zymosan activates ROI production in a TLR2-independent fashion [21]. Previously, Netea et al. [12] showed that TLR4 is not involved in generation of superoxide and NO in response to *C. albicans*. These results indicate that neither TLR4 nor TLR2 participates in inducing direct candidacidal host mechanisms.

In summary, TLR2-defective mice are more susceptible to *in vivo* experimental infection by *C. albicans*. This increased susceptibility is associated with defective synthesis of TNF- $\alpha$  and MIP-2 and impaired recruitment of neutrophils to the site of infection. We conclude, therefore, that TLR2 is an essential contributor to murine host defenses against *C. albicans*.

## Acknowledgements

This work was supported by grant 01/0527 from Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. E.V. and P.R. are recipients of fellowships from Conselleria d'Innovació (Generalitat Valenciana) and from the Ayuntamiento de Valencia (Carmen y Severo Ochoa), respectively. We are grateful to Dr. Shizuo Akira for making the TLR2<sup>-/-</sup> mice available to us, and to Dr. M. L. Ferrandiz and Dr. L. Jaafar for technical assistance in infection assays.

## References

- [1] J.L. Vincent, E. Anaissie, H. Bruining, W. Demajo, M. El-Ebiary, J. Haber, Y. Hiramatsu, G. Nitenberg, P.O. Nyström, D. Pittet, T. Rogers, P. Sandven, G. Sganga, M.D. Schaller, J. Solomkin. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infections in surgical patients under intensive care, *Intensive Care Med* 24 (1998) 206–216.
- [2] G. Garber, An overview of fungal infections, *Drugs* 61 (Suppl. 1) (2001) 1–12.
- [3] M.G. Netea, W.L. Block, B.J. Kullerg, M. Bemelmans, M.T.E. Vogels, W.A. Buurman, J.W.M. Van der Meer, Pharmacological inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice, *J. Infect. Dis* 171 (1995) 393–399.
- [4] S. Steinshamn, A. Waage, Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice, *Infect. Immun* 60 (1992) 4003–4008.
- [5] M.G. Netea, L.J.H. Van Tits, J.H.A.J. Curfs, F. Amiot, J.F.G.M. Meis, J.W.M. Van der Meer, B.J. Kullberg, Increased susceptibility of TNF- $\alpha$  lymphotoxin- $\alpha$  double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida*, *J. Immunol* 163 (1999) 1498–1505.
- [6] S. Steinshamn, M.H.A. Bemelmans, L.H.J. Van Tits, K. Bergh, W.A. Buurman, A. Waage, TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense, *J. Immunol* 157 (1996) 2155–2159.
- [7] T.R. Traynor, G.B. Huffnagle, Role of chemokines in fungal infections, *Med. Mycol* 39 (2001) 41–50.
- [8] S.J. Szabo, B.M. Sullivan, S.L. Peng, L.H. Glumcher, Molecular mechanisms regulating TH1 immune responses, *Annu. Rev. Immunol* 21 (2003) 713–758.
- [9] M. Altamura, D. Casale, M. Pepe, A. Tafaro, Immune responses to fungal infections and therapeutic implications, *Curr. Drug Targeting Immune Endocrinol. Metabol. Disord.* 1 (2001) 189–197.
- [10] L. Romani, F. Bistoni, P. Puccetti, Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence, *Trends Microbiol* 10 (2002) 508–514.
- [11] K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, Toll-like receptors, *Annu. Rev. Immunol* 21 (2003) 335–376.
- [12] M.G. Netea, C.A.A. Van der Graaf, A.G. Vonk, I. Verschueren, J.W.M. Van der Meer, B.J. Kullberg, The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis, *J. Infect. Dis* 185 (2002) 1483–1489.
- [13] S.A. Morré, L.S. Murillo, J. Spaargaren, H.S.A. Fennema, A.S. Peña, Role of the toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism in susceptibility to *Candida albicans* infection, *J. Infect. Dis* 186 (2002) 1377–1379.
- [14] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity* 11 (1999) 443–451.
- [15] I. Gil-Navarro, M.L. Gil, M. Casanova, J.E. O'Connor, J.P. Martínez, D. Gozalbo, The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen, *J. Bacteriol* 179 (1997) 4992–4999.
- [16] D. Gozalbo, I. Gil-Navarro, I. Azorin, J. Renau-Piqueras, J.P. Martínez, M.L. Gil, The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein, *Infect. Immun* 66 (1998) 2052–2059.
- [17] R.A. Calderone, *Candida and Candidiasis*, ASM Press, New York, 2001.
- [18] P. Chiani, C. Bromuro, A. Torosantucci, Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*, *Infect. Immun* 68 (2000) 5628–5634.
- [19] L. Liu, K. Kang, M. Takahara, K.D. Cooper, M.A. Ghannoum, Hyphae and yeasts of *Candida albicans* differentially regulate interleukin-12 production by human blood monocytes: inhibitory role of *C. albicans* germination, *Infect. Immun* 69 (2001) 4695–4697.
- [20] D.M. Underhill, A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti, A. Aderem, The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens, *Nature* 401 (1999) 811–815.
- [21] B.N. Gantner, R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira, D.M. Underhill, Collaborative induction of inflammatory response by dectin-1 and toll-like receptor 2, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 1107–1117.

- [22] W.L. Chaffin, J.L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, J.P. Martínez, Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 130–180.
- [23] J.P. Martínez, M.L. Gil, J.L. López-Ribot, W.L. Chaffin, Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1998) 121–141.
- [24] S. Wolpe, A. Cerami, Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines, *FASEB J.* 3 (1989) 2565–2573.
- [25] F. Bazzoni, B. Beutler, The tumor necrosis factor ligand and receptor families, *New Engl. J. Med.* 334 (1996) 1717–1725.
- [26] R.M. Strieter, S.L. Kunkel, in: R.G. Crystal, J.B. Wests (Eds.), *Chemokines, The Lung*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, pp. 155.
- [27] R.R. Ingalls, M.A. Arnaout, D.T. Golenbock, Outside-in signaling by lipopolysaccharide through a tailless integrin, *J. Immunol.* 159 (1997) 433–438.
- [28] A. Vasquez-Torres, E. Balish, Macrophages in resistance to candidiasis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 170–192.
- [29] A. Cambi, K. Gijzen, I.J.M. De Vries, R. Torensma, B. Joosten, G. J. Adema, M.G. Netea, B.J. Kullberg, L. Romani, C.G. Figdor, The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 532–538.
- [30] S. Mummidi, G. Catano, L. Lam, A. Hoeffle, V. Telles, K. Begum, F. Jimenez, S.S. Ahuja, S.K. Ahuja, Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33196–33212.
- [31] S.J. Lee, N.Y. Zheng, M. Clavijo, M.C. Nussenzweig, Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice, *Infect. Immun.* 71 (2003) 437–445.
- [32] R.P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, eighth ed, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, 2001.





**ARTÍCULO 2:** E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, M.L. Ferrandiz, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004. Toll-like receptor-2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. *Microbes and Infection* 6: 542-548.





Original article

## Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis

Eva Villamón<sup>a</sup>, Daniel Gozalbo<sup>a</sup>, Patricia Roig<sup>a</sup>, José Enrique O'Connor<sup>b</sup>,  
M. Luisa Ferrandiz<sup>c</sup>, Didier Fradelizi<sup>d</sup>, M. Luisa Gil<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Facultad de Ciencias Biológicas, Edificio de Investigación, C/ Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Farmacología, Universitat de València, Valencia, Spain

<sup>d</sup> Département d'Immunologie, Inserm 567, CNRS UMR 8104, Université Paris 5, Institut Cochin, 27, rue Faubourg-Saint-Jacques, 75674 Paris cedex 14, France

Received 11 February 2004; accepted 17 February 2004

Available online 13 April 2004

### Abstract

Previous work by our group showed that Toll-like receptor 2 (TLR2) is essential for activation of innate immunity, playing a major role in the response of macrophages to *Candida albicans*, triggering cytokine and chemokine expression, and therefore TLR2  $-/-$  mice are more susceptible to systemic primary candidiasis. In this work, we used a murine model of systemic *C. albicans* infection, in which resistance to reinfection with virulent wild-type cells is induced by prior exposure of mice to a low-virulence aegerminative strain of *C. albicans* (primary sublethal infection), to study the influence of TLR2 gene deletion on (i) the ability to develop an acquired resistance upon vaccination; (ii) the development of the acquired humoral response; and (iii) the production of Th1 cytokines IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$ . Our results indicate that, although TLR2  $-/-$  mice have a very impaired production of Th1 cytokines compared with control mice, they are equally capable of mounting a specific humoral response to the fungus and developing a vaccine-induced resistance.

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Candida albicans*; TLR2; Specific antibodies; Vaccination; IFN- $\gamma$ ; IL-12; TNF- $\alpha$

### 1. Introduction

The dimorphic fungus *Candida albicans* is both a commensal and an opportunistic pathogen in humans. Depending on the underlying host defect, this microorganism is able to cause a variety of infections that range from mucosal candidiasis to life-threatening invasive infections. The frequency of the latter has increased in recent years as a result of an expanding immunocompromised population [1,2].

Experimental data and clinical evidence have indicated that both the innate and adaptive immune systems regulate the control and resistance to *C. albicans* infections [3]. The coordination of the innate and adaptive arms of antifungal defense may also be important; it has been demonstrated that Th cell reactivity plays a central role in regulating immune responses to *C. albicans*, Th1 reactivity being responsible for

resistance and Th2 response being associated with susceptibility [4–6]. Interestingly, although protective immunity to *C. albicans* is mediated by Th1 cells, some Th2 cytokines are required for the maintenance of the anti-fungal immune protection [7,8]; regulatory T cells (Treg), activated by IL-10-producing dendritic cells, are also involved in the induction of memory protective immunity by negative regulation of antifungal Th1 reactivity [9]. Recently a role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity has been established [10].

Toll-like receptors (TLRs) are a family of evolutionarily conserved transmembrane proteins that function as sensors of infection and induce the activation of innate immune responses. Ten mammalian TLRs have been described so far, and TLR ligands include molecular products derived from bacteria, protozoa, viruses and fungi, and also several putative endogenous ligands. TLRs are expressed primarily on macrophages and dendritic cells and control the activation of these antigen-presenting cells. Signal transduction through

\* Corresponding author. Tel.: +34-96-354-30-26; fax: +34-96-354-30-99.  
E-mail address: [m.luisa.gil@uv.es](mailto:m.luisa.gil@uv.es) (M.L. Gil).

TLRs results in the up-regulation of MHC class II, costimulatory molecules, cytokines and antimicrobial responses [11,12]. The identification of TLRs as a family of receptors involved in controlling dendritic cell activation has focused attention on these receptors as possible regulators of adaptive immune responses [13].

Little information is available on the role of TLRs in host defenses against fungal pathogens [14] and in the recognition of the important human pathogen *C. albicans*. We have recently found that TLR2 and TLR4 participate in murine defenses against *C. albicans* infections ([15]; Villamón et al., unpublished). Experimentally infected TLR2-deficient mice show a very significant impaired survival compared with control mice, and macrophages from TLR2  $-/-$  mice have a significant reduced production of TNF- $\alpha$  in response to yeasts and hyphae; also, recruitment of neutrophils and macrophage inhibitory protein-2 (MIP-2) production is impaired in these mice [15]. Recently, Jouault et al. [16] examined the involvement of TLRs in the ability of phospholipomannan (PLM, a unique glycolipid present in the cell surface of *C. albicans*) to stimulate TNF- $\alpha$  production by macrophages; deletion of TLR4 or TLR6 genes led to a limited effect, whereas deletion of the TLR2 gene abolished the cell response [16].

TLR4-defective C3H/HeJ mice were more susceptible to *C. albicans* infection, although neither production of TNF- $\alpha$  and other proinflammatory cytokines, nor candidacidal ability of neutrophils and macrophages were affected; only the production of chemokines, such as cytokine-induced neutrophil chemoattractant (KC) and MIP-2, were decreased and accompanied by impaired neutrophil recruitment [17]. Using TLR4  $-/-$  mice, we recently found that, although these mice are more susceptible to in vivo experimental infection by *C. albicans*, this increased susceptibility cannot be associated with impaired synthesis of TNF- $\alpha$  or MIP-2, neutrophil recruitment, phagocytosis or reactive oxygen intermediates' (ROIs) generation (Villamón et al., unpublished). All these results underline the complexity of host-parasite relationships during candidiasis, indicating that several TLRs may simultaneously play a role for protecting mice, and that probably also several ligands of the fungus are recognized.

In order to investigate the role of TLR2 in the acquired immune response to *C. albicans*, we use here a murine model of systemic *C. albicans* infection, developed and characterized by Romani et al. [18–20], in which substantial protection to reinfection with highly virulent wild-type cells is induced by prior exposure of mice to a low-virulence agerminative strain of *C. albicans*. In this experimental model, the development of a protective anticandidal response correlates with the detection of Th1-associated immunity and Treg cells [9,21–23]. We report here the influence of TLR2 gene deletion on (i) the ability to develop an acquired resistance upon vaccination (primary sublethal infection); (ii) the development of the acquired humoral response; and (iii) the production of Th1 cytokines IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$ .

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice

TLR2  $-/-$  mice (C57BL/6 background) were kindly provided by Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan) [24], and C57BL/6 mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were used as controls. Mice of both sexes between 7 and 12 weeks old were used for experiments.

### 2.2. Yeast strains and infections

Cells of *C. albicans* PCA2, a low-virulence non-germinative strain [25], were grown in YPD medium (1% Difco yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 28 °C up to the late-exponential growth phase ( $A_{600\text{ nm}}$  0.6–1), collected and washed with pyrogen-free water. Cells were resuspended in water, maintained for 3 h at 28 °C with shaking and afterwards at 4 °C during 24 or 48 h (starved yeast cells), as previously described [26]. The suspension was finally washed and diluted in pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, Barcelona, Spain) to the appropriate cell concentration before injection. Mice were challenged intravenously with  $10^6$  yeasts in a volume of 0.2 ml (primary candidiasis). Seventeen days later, mice were intravenously infected (secondary infection) with *C. albicans* ATCC 26555, a high-virulence strain ( $10^6$  yeasts in a volume of 0.2 ml), cultured as described for the low-virulence strain, and survival was checked daily for 15 days. Control mice were intravenously infected with  $10^6$  yeasts of *C. albicans* ATCC 26555 (primary candidiasis) and survival was checked for 15 days.

Experiments were performed under conditions designed to minimize endotoxin contamination. Endotoxin-free water and PBS were used, fungal culture media were passed through a detoxi-gel endotoxin-removing gel (Pierce, Rockford, IL) and tested for absence of endotoxin by the E-toxate assay (Sigma, Madrid, Spain).

### 2.3. In vitro cytokine production by splenocytes

Three days after the primary infection, and 17 days after the secondary infection, total spleen cells were obtained by collagenase D treatment of the spleens, washed once with RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated FBS and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Barcelona, Spain, complete cell culture medium) and plated at a density of  $10^7$  cells in 1 ml of medium per well in a 24-well tissue culture plate, in the presence of 2.5  $\mu\text{g}$  per ml of amphotericin B (Gibco, Barcelona, Spain). Cells were challenged with the indicated stimuli for 48 h. Supernatants were then harvested and tested by commercial ELISA kits for TNF- $\alpha$ , IL-12p70 (eBioscience, San Diego, CA) and IFN- $\gamma$  (R&D Systems, Minneapolis, MN).

The stimuli used were the yeast cell wall particle zymosan (Molecular Probes, Eugene, OR), heat-inactivated *C. albicans* PCA2 yeasts, and *C. albicans* ATCC 26555 hyphae,

obtained as reported elsewhere [26,27]. Briefly, starved yeast cells were inoculated (200 µg [dry weight] of cells per ml) in a minimal synthetic medium and incubated for 3 h at 28 °C to obtain yeasts or at 37 °C to obtain hyphae. For heat inactivation, yeasts and hyphae were resuspended in water and treated at 100 °C for 1 h. After inactivation, fungal cells were extensively washed in PBS and brought to the desired cell density in complete cell culture medium.

#### 2.4. Semi-quantitative determination of *Candida*-specific antibodies by ELISA

Serum obtained by retro-orbital bleeding of experimental animals was assayed by ELISA to determine *Candida*-specific antibody levels. Microtiter plates were coated with 50 µl of 60 mM sodium carbonate (pH 9.6) containing either *C. albicans* ATCC 26555 yeasts or hyphae (150 µg dry weight of cells per well), or with soluble cell extracts (1 µg of protein per well), obtained from yeasts or hyphae by boiling cells in PBS supplemented with 1% SDS and 1% DTT. After overnight incubation at 4 °C, the wells were washed with 0.05% (v/v) Tween-20 in PBS (washing buffer) and blocked with 50 µl of PBS supplemented with 1% BSA, for 1 h at room temperature. Three washes with washing buffer were followed by the addition of 50 µl per well of serum samples diluted in PBS with 0.01% of Tween-20 and 0.5% BSA and further incubation for 1 h at 37 °C. After washing, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Zymed, San Francisco, CA) was added to the wells and incubated for 1 h at 37 °C, and the color intensity was determined at 450 nm following the addition of the substrate mixture.

#### 2.5. Statistical analysis

Survival curves were analyzed by Kaplan–Meyer log rank test. Student's two-tailed *t* test was used to compare cytokine production. Data are expressed as mean ± S.D. Significance was accepted at the *P* < 0.05 level.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Immunization with PCA-2 strain induces anti-*Candida* resistance in TLR2 $-/-$ mice

Recently, by using an experimental model of infection in TLR2-deficient mice, we have shown the critical role of this receptor in host defense against *C. albicans* [15]. TLR2 participate in *C. albicans* recognition and activation of innate immunity, and therefore TLR2  $-/-$  mice are more susceptible to systemic primary candidiasis. In this work, we investigate whether TLR2 also play a role in the generation of a specific and definitive adaptive immune response. For this, we used a well-characterized model in which substantial protection against reinfection with highly virulent wild-type cells is induced by prior exposure of mice to a low-virulence agerminative strain of *C. albicans* [18–23].

TLR2  $-/-$  mice and C57BL/6 mice were injected i.v. with  $10^6$  cells of low-virulence strain PCA-2, and their survival

was monitored for 17 days (not shown). As expected, all control mice survived this infection with attenuated variant cells, and appeared clinically normal. In contrast, although TLR2  $-/-$  mice survived the infection, they showed clinical signs of disease, including weight loss, lethargy, and a ruffled appearance. As the release of some cytokines may be impaired in TLR2  $-/-$  mice, we assessed levels of TNF- $\alpha$ ,

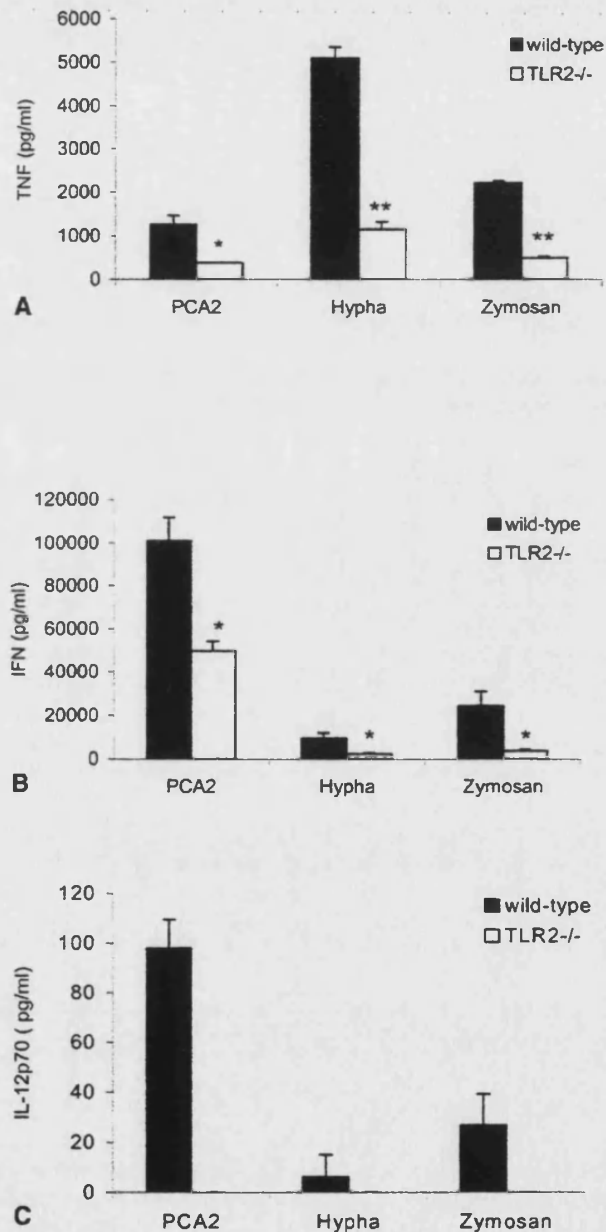


Fig. 1. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 production by splenocytes in response to *C. albicans*. TLR2  $-/-$  and wild-type mice were i.v. infected with  $10^6$  PCA2 cells. Three days later, splenocytes were isolated and challenged for 48 h with *C. albicans* PCA2 yeasts (30 µg [dry weight] of cells/ml), *C. albicans* ATCC 26555 hyphae (30 µg [dry weight] of cells/ml) or zymosan ( $3.75 \times 10^6$  particles per ml). Concentration of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 in the culture supernatants was measured by ELISA. Depicted are means of duplicates from one representative experiment of two. (\*) *P* < 0.05, (\*\*) *P* < 0.01 with respect to the stimulated wild-type cells.

IFN- $\gamma$ , and IL-12p70 production by antigen-stimulated splenocytes 3 days after PCA-2 infection (Fig. 1). As previously described ([15], Villamón et al., unpublished) production of TNF- $\alpha$  was dramatically impaired in TLR2  $-/-$  mice compared with control mice (Fig. 1A). The production of TNF- $\alpha$  in response to PCA-2, hyphae and zymosan was significantly diminished (69.25%, 77.42%, and 77.79%, respectively;  $P < 0.05$ ). Also, as early as 3 days postinfection, the IFN- $\gamma$  production was significantly lower but not abolished in TLR2  $-/-$  mice, compared with control mice (Fig. 1B) in response to PCA-2, hyphae and zymosan (50.75%, 74.32%, and 83.95%, respectively;  $P < 0.05$ ). However, IL-12p70 could not be detected in TLR2  $-/-$  mice as opposed to wild-type mice (Fig. 1C). Wild-type mice produced IL-12p70 basically upon exposure to PCA-2 yeasts, and very little upon exposure to hyphae, which is in accordance with previous results showing that IL-12 production by human blood monocytes and mouse and human dendritic cells basically occurs in response to the yeast form of *C. albicans* [28–31]. Interestingly, the lower production of IL-12p70 in response to hyphae correlates with the lower production of IFN- $\gamma$  against this morphotype; also, in TLR2  $-/-$  mice, the undetectable levels of IL-12p70 correlate with lower IFN- $\gamma$  production compared with wild-type mice. Overall, these results indicate that early in infection, production of proinflammatory cytokines, including Th1 cytokines (IL-12 and IFN- $\gamma$ ) is affected in TLR2-deficient mice.

Secondary infection of mice was performed 17 days after the primary i.v. challenge, by i.v. injection of  $10^6$  cells of high-virulence strain ATCC 26555, and survival was monitored for 15 days (Fig. 2). As controls, naive TLR2  $-/-$  and C57BL/6 mice were i.v. injected with  $10^6$  cells of high-virulence strain ATCC 26555 (primary candidiasis in naive mice) (Fig. 2). As expected, upon reinfection, C57BL/6 mice survived the infection (100% survival at day 15), whereas control C57BL/6 mice (non-vaccinated) showed only 28.6% survival at day 15 ( $P = 0.0068$ ). Similarly, TLR2  $-/-$  mice surviving PCA-2 infection (vaccinated mice), were also re-

sistant to the *C. albicans* ATCC 26555 infection (85.7% survivors at day 15), whereas 100% of control TLR2  $-/-$  mice primarily infected with the high virulence strain (non-vaccinated) died within 7 days ( $P = 0.0032$ ). As previously described [15], naive TLR2  $-/-$  mice were more susceptible to systemic primary candidiasis than naive wild-type mice ( $P = 0.01$ ). These results suggest that although effector mechanisms of resistance to primary *C. albicans* infection are impaired in TLR2-deficient mice, they are able to develop a significant acquired resistance upon vaccination (primary sublethal infection).

### 3.2. Cytokine production by splenocytes from TLR2 $-/-$ immunized mice

To clarify the mechanisms of protection of the immunized TLR2  $-/-$  mice, we examined the cytokine production by splenocytes, following in vitro antigen restimulation (Fig. 3). Seventeen days after the secondary infection, the production of TNF- $\alpha$  in response to PCA-2, hyphae and zymosan was similar in wild-type and TLR2  $-/-$  mice (Fig. 3A). Production of IFN- $\gamma$  was still diminished in TLR2  $-/-$  compared with control mice in response to PCA-2, hyphae and zymosan (38.9%, 74.86%, and 80.49% inhibition, respectively;  $P < 0.05$ ). (Fig. 3B). Again, IL-12p70 was not detected in the supernatants from TLR2  $-/-$  splenocytes (Fig. 3C). These results indicate that Th1 cytokines (IL-12 and IFN- $\gamma$ ) are affected in TLR2-deficient mice.

Interestingly, upon reinfection, the production of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  was similar in TLR2  $-/-$  and wild-type mice. TNF- $\alpha$  is of special importance for protecting the host against disseminated candidiasis. Neutralization of endogenous TNF- $\alpha$  by either anti-TNF- $\alpha$  antibodies or pharmacological agents dramatically worsens the course of this experimental disease [32,33]. Mice lacking TNF- $\alpha$  receptors and TNF- $\alpha$ , lymphotoxin- $\alpha$  double-knockout mice showed increased susceptibility to dissemi-

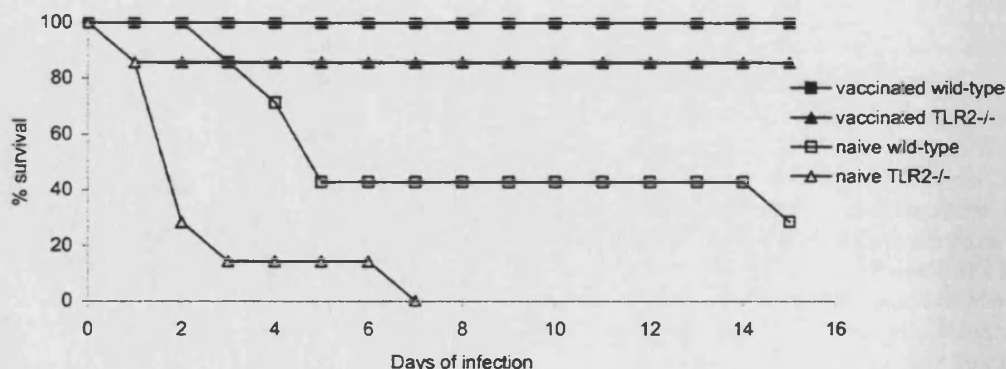


Fig. 2. Survival of animals infected with *C. albicans*. Naive or vaccinated wild-type and TLR2  $-/-$  mice were infected intravenously with  $10^6$  *C. albicans* ATCC 26555 yeasts per mouse and observed for 15 days. Vaccinated mice were i.v. infected with  $10^6$  cells of low-virulence PCA2 17 days before reinfection. Naive wild-type mice had increased mortality when compared with vaccinated wild-type mice ( $P = 0.0068$ ), and similarly, naive TLR2  $-/-$  mice had increased mortality when compared with vaccinated TLR2  $-/-$  mice ( $P = 0.0032$ ). The graph shows data from one experiment, using seven mice for each group.

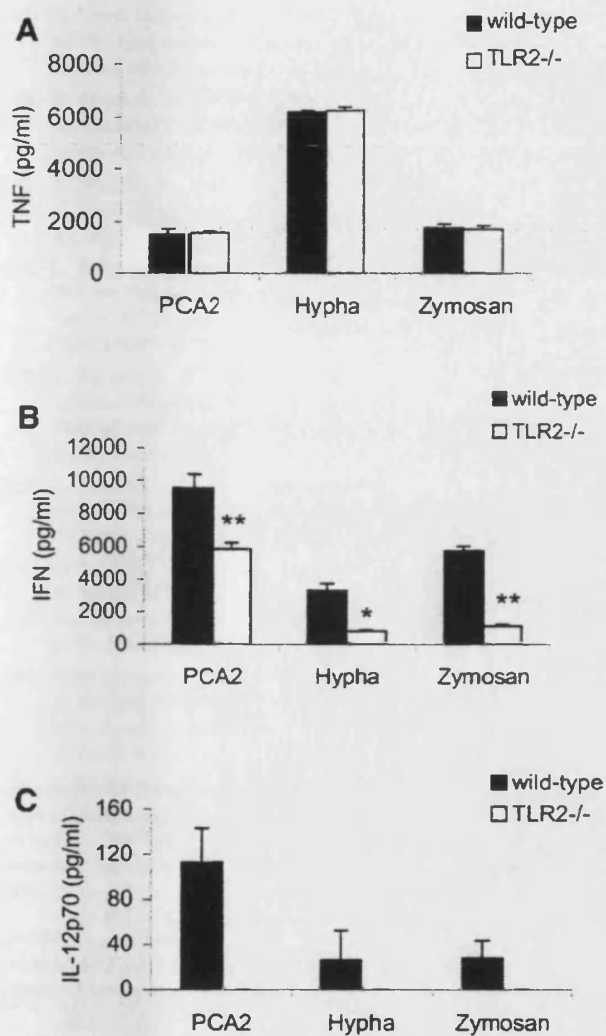


Fig. 3. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 production by splenocytes from vaccinated mice in response to *C. albicans*. Vaccinated TLR2<sup>-/-</sup> and wild-type mice were i.v. infected with  $10^6$  ATCC 26555 high-virulence cells. Vaccinated mice were i.v. infected with  $10^6$  cells of low virulence PCA2 17 days before reinfection. Seventeen days after the secondary infection, splenocytes were isolated and challenged for 48 h with *C. albicans* PCA2 yeasts (30  $\mu$ g [dry weight] of cells/ml), *C. albicans* ATCC 26555 hyphae (30  $\mu$ g [dry weight] of cells/ml) or zymosan ( $3.75 \times 10^6$  particles per ml). Concentration of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 in the culture supernatants was measured by ELISA. Means of duplicates from one representative experiment of two are depicted. (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$  with respect to the stimulated wild-type cells.

nated candidiasis, probably due to impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *C. albicans* cells [34,35]. Therefore, the restored normal TNF- $\alpha$  production against *C. albicans* by splenocytes from vaccinated TLR2<sup>-/-</sup> mice may contribute to the acquired resistance to the fungus. The precise mechanism responsible for the restored TNF- $\alpha$  production is not yet understood, but we can suggest that the inflammatory process generated during sublethal primary candidiasis, although impaired, may have increased the expression of other receptors for *C. albicans* also implicated in

TNF- $\alpha$  secretion (mannose receptors or complement receptors) on the surface of myeloid cells [31].

### 3.3. *Candida*-specific antibodies in TLR2<sup>-/-</sup> immunized mice

*C. albicans*-specific antibody titers in infected mice were measured to assess the ability of TLR2<sup>-/-</sup> mice to mount a humoral response against the fungal pathogen. Sera were collected from infected mice on day 21 after infection, and *C. albicans*-specific IgG levels were measured by ELISA (Fig. 4). We used microtiter plates coated with either *C. albicans* ATCC 26555 yeasts or hyphae or with soluble cell extracts obtained from yeasts or hyphae, and we found in all the cases that sera from TLR2<sup>-/-</sup> mice have similar titers to those of sera from wild-type mice. Actually, the sera from TLR2-deficient mice have titers slightly higher than those of wild-type mice; this may be due to a greater number of *C. albicans* cells present in tissues of more susceptible mice. The results indicate that TLR2<sup>-/-</sup> mice are capable of mounting a specific antibody response to *C. albicans*.

Although it is accepted that a humoral response is not critical to host defense against *C. albicans* during primary systemic infection, administration of antibodies against certain *C. albicans* antigens confers protection against infection in naive mice [36–38]. The mechanisms by which specific antibodies mediate protection against fungi are not well characterized; recently Montagnoli et al. [10] found that B-cell-deficient mice were resistant to the primary systemic infection, but resistance to reinfection was severely impaired, despite the occurrence of activated Th1 cells. This correlated with the failure to generate IL-10-producing dendritic cells and regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, suggesting a role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity. We show in our model that the acquired humoral response and also the acquired resistance upon vaccination can occur in the absence of TLR2, although there is no evidence indicating whether these antibodies may be protective.

In summary, we found that TLR2<sup>-/-</sup> mice are capable of mounting vaccine-induced resistance to *C. albicans* and an acquired specific humoral response similarly to control mice, despite their very impaired production of Th1 cytokines.

### Acknowledgements

We are grateful to Dr. Shizuo Akira for making the TLR2 mice available to us. This work was supported by grant Grupos 03/172 from the AVCyT (Generalitat Valenciana), Spain. E.V. and P.R. are recipients of fellowships from Conselleria d'Innovació (Generalitat Valenciana), and from the Ayuntamiento de Valencia (Carmen y Severo Ochoa), respectively.



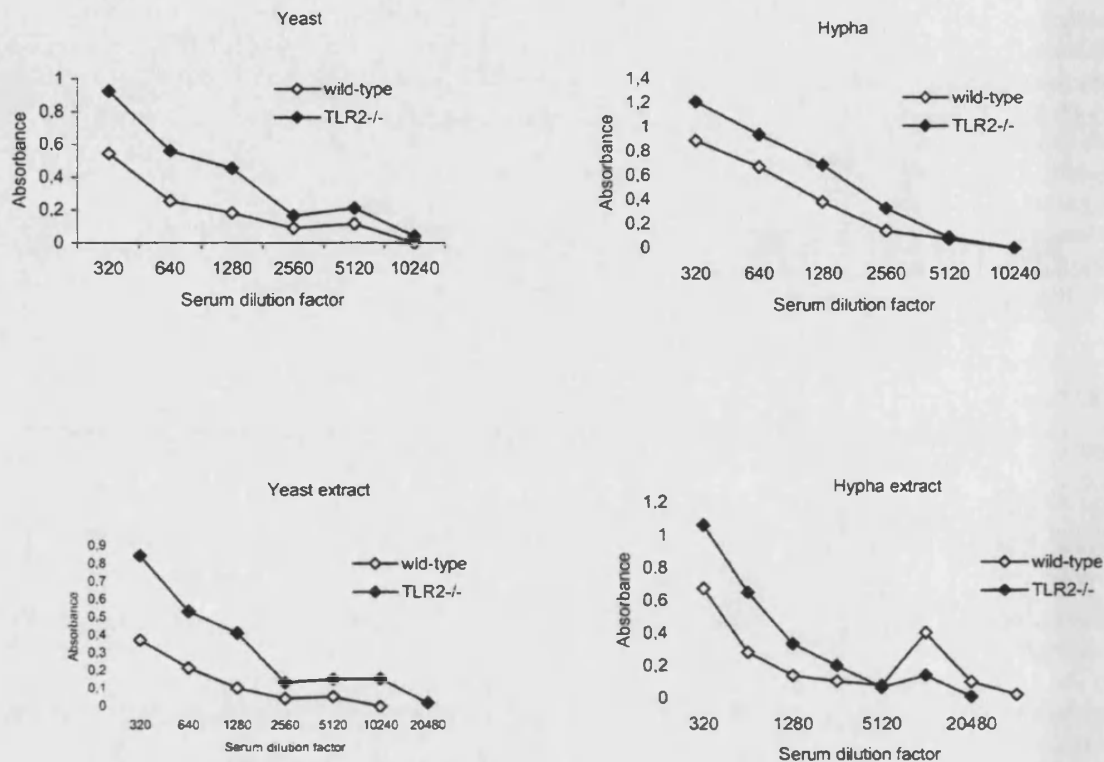


Fig. 4. Presence of *C. albicans*-specific IgG in sera of vaccinated TLR2<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Vaccinated TLR2<sup>-/-</sup> and wild-type mice were i.v. infected with 10<sup>6</sup> ATCC 26555 high-virulence cells. Vaccinated mice were i.v. infected with 10<sup>6</sup> cells of low-virulence PCA2 17 days before reinfection. Blood samples were obtained on day 17 after the secondary infection, and assayed by ELISA, using microtiter plates coated with either *C. albicans* ATCC 26555 yeasts (yeast) or hyphae (hypha) or with soluble cell extracts obtained from yeasts (yeast extract) or hyphae (hypha extract). Each serum sample was a pool from four mice randomly selected. One representative ELISA of two is depicted.

## References

- [1] R.A. Calderone, *Candida* and candidiasis, ASM Press, New York, 2001.
- [2] G. Garber, An overview of fungal infections, *Drugs* 61 (Suppl. 1) (2001) 1–12.
- [3] L. Romani, Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism, *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 175–179.
- [4] P. Puccetti, L. Romani, F. Bistoni, A Th1-Th2-like switch in candidiasis; new perspectives for therapy, *Trends Microbiol.* 3 (1995) 237–240.
- [5] R. Kaposzta, P. Tree, L. Marodi, S. Gordon, Characterization of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 1708–1717.
- [6] R. Nisini, G. Romagnoli, M.J. Gomez, R. La Valle, A. Torosantucci, S. Mariotti, R. Teloni, A. Cassone, Antigenic properties and processing requirements of a 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of anti-*Candida* human T-cell response, as disclosed by specific human T-cell clones, *Infect. Immun.* 69 (2001) 3728–3736.
- [7] A. Menacci, E. Cenci, G. Del Sero, C. Fe d'Ostiani, P. Mosci, G. Trinchieri, L. Adorini, L. Romani, IL-10 is required for development of protective Th1 response in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection, *J. Immunol.* 161 (1998) 6228–6237.
- [8] A. Menacci, G. Del Sero, E. Cenci, C. Fe d'Ostiani, A. Bacci, C. Montagnoli, M. Kopf, L. Romani, Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4<sup>+</sup> T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 307–317.
- [9] C. Montagnoli, A. Bacci, S. Bozza, R. Gaziano, P. Mosci, A.H. Sharpe, L. Romani, B7/CD28-dependent CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*, *J. Immunol.* 169 (2002) 6298–6308.
- [10] C. Montagnoli, S. Bozza, A. Bacci, R. Gaziano, P. Mosci, J. Morschhauser, L. Pitzurra, M. Kopf, J. Cutler, L. Romani, A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 1193–1204.
- [11] K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, Toll-like receptors, *Ann. Rev. Immunol.* 21 (2003) 335–376.
- [12] E. Kopp, R. Medzhitov, Recognition of microbial infection by toll-like receptors, *Curr. Opin. Immunol.* 15 (2003) 396–401.
- [13] G.M. Barton, R. Medzhitov, Control of adaptive immune responses by toll-like receptors, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 380–383.
- [14] A. Roeder, C.J. Kirschning, R.A. Rupec, M. Schaller, H.C. Korting, Toll-like receptors and innate antifungal responses, *Trends Microbiol.* 12 (2004) 44–49.
- [15] E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, Toll-like receptor 2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections, *Microb. Infect.* 6 (2004) 1–7.
- [16] T. Jouault, S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P.A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira, D. Poulain, *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 165–172.
- [17] M.G. Netea, C.A.A. Van der Graaf, A.G. Vonk, I. Verschueren, J.W.M. Van der Meer, B.J. Kullberg, The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis, *J. Infect. Dis.* 185 (2002) 1483–1489.

- [18] E. Cenci, L. Romani, A. Vecchiarelli, P. Puccetti, F. Bistoni, Role of L3T4+ lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice, *Infect. Immun.* 57 (1989) 3581–3587.
- [19] E. Cenci, L. Romani, A. Vecchiarelli, P. Puccetti, F. Bistoni, T cell subsets and IFN- $\gamma$  production in resistance to systemic candidiasis in immunized mice, *J. Immunol.* 144 (1990) 4333–4339.
- [20] L. Romani, S. Mocci, E. Cenci, R. Rossi, P. Puccetti, F. Bistoni, *Candida albicans*-specific Lyt-2+ lymphocytes with cytolytic activity, *Eur. J. Immunol.* 21 (1991) 1567–1570.
- [21] L. Romani, S. Mocci, C. Biotta, L. Lanfaloni, P. Puccetti, F. Bistoni, Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance, *Infect. Immun.* 59 (1991) 4647–4654.
- [22] L. Romani, A. Mencacci, E. Cenci, P. Mosci, G. Vitellozzi, U. Grohmann, P. Puccetti, B. Bistoni, Course of primary candidiasis in T-cell depleted mice infected with attenuated variant cells, *J. Infect. Dis.* 166 (1992) 1384–1392.
- [23] L. Romani, A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, P. Mosci, P. Puccetti, F. Bistoni, CD4+ subset expression in murine candidiasis, *J. Immunol.* 150 (1993) 925–931.
- [24] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity* 11 (1999) 443–451.
- [25] F. De Bernardis, F.D. Adriani, R. Lorenzini, E. Pontieri, G. Carruba, A. Cassone, Filamentous growth and elevated vaginopathic potential of a non-germinative variant of *Candida albicans* expressing low virulence in systemic infection, *Infect. Immun.* 61 (1993) 1500–1508.
- [26] I. Gil-Navarro, M.L. Gil, M. Casanova, J.E. O'Connor, J.P. Martínez, D. Gozalbo, The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 4992–4999.
- [27] D. Gozalbo, I. Gil-Navarro, I. Azorín, J. Renau-Piqueras, J.P. Martínez, M.L. Gil, The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein, *Infect. Immun.* 66 (1998) 2052–2059.
- [28] P. Chiani, C. Bromuro, A. Torosantucci, Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 5628–5634.
- [29] L. Liu, K. Kang, M. Takahara, K.D. Cooper, M.A. Ghannoum, Hyphae and yeasts of *Candida albicans* differentially regulate interleukin-12 production by human blood monocytes: inhibitory role of *C. albicans* germination, *Infect. Immun.* 69 (2001) 4695–4697.
- [30] C. Fe d'Ostiani, G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, L. Romani, Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1661–1673.
- [31] L. Romani, C. Montagnoli, S. Bozza, K. Perruccio, A. Spreca, P. Allavena, S. Verbeek, R.A. Calderone, F. Bistoni, P. Puccetti, The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host-immune relationships with *Candida albicans*, *Int. Immunol.* 16 (2004) 149–161.
- [32] M.G. Netea, W.L. Block, B.J. Kullerg, M. Bemelmans, M.T.E. Vogels, W.A. Buurman, J.W.M. Van der Meer, Pharmacological inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 393–399.
- [33] S. Steinshamn, A. Waage, Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice, *Infect. Immun.* 60 (1992) 4003–4008.
- [34] M.G. Netea, L.J.H. Van Tits, J.H.A.J. Curfs, F. Amiot, J.F.G.M. Meis, J.W.M. Van der Meer, B.J. Kullberg, Increased susceptibility of TNF- $\alpha$  lymphotoxin- $\alpha$  double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida*, *J. Immunol.* 163 (1999) 1498–1505.
- [35] S. Steinshamn, M.H.A. Bemelmans, L.H.J. Van Tits, K. Bergh, W.A. Buurman, A. Waage, TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense, *J. Immunol.* 157 (1996) 2155–2159.
- [36] Y. Han, J.E. Cutler, Antibody response that protects against disseminated candidiasis, *Infect. Immun.* 63 (1998) 2714–2719.
- [37] C. Bromuro, A. Torosantucci, P. Chiani, S. Conti, L. Polonelli, A. Cassone, Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated candidiasis in recipients of *Candida albicans* vaccine, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5462–5470.
- [38] R. Matthews, J. Burnie, Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2 (2001) 472–476.



**ARTÍCULO 3:** E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, C. Murciano, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, 2004. Myeloid differentiation factor (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines. European Cytokine Network 15: 263-271.



## Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines

Eva Villamón<sup>1</sup>, Daniel Gozalbo<sup>1</sup>, Patricia Roig<sup>1</sup>, Celia Murciano<sup>1</sup>, José Enrique O'Connor<sup>2</sup>, Didier Fradelizi<sup>3</sup>, M. Luisa Gil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Ecología;

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València, C/ Dr. Moliner 50, 46100 Burjasot, Valencia, Spain

<sup>3</sup> Département d'Immunologie, INSERM 567, CNRS UMR 8104, Université Paris 5, Institut Cochin, 27, rue Faubourg-Saint-Jacques, 75674 Paris Cedex 14, France

Correspondence: M. Luisa Gil, Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Edificio de Investigación, C/ Dr. Moliner 50, 46100 Burjasot, Valencia, Spain. Tel: + 34 96 354 30 26. Fax: + 34 96 354 30 99.  
E-mail: m.luisa.gil@uv.es.

**ABSTRACT.** We have studied the role of myeloid differentiation factor 88 (MyD88), the universal Toll-like receptor (TLR) adaptor protein, in murine defenses against *Candida albicans*. MyD88-deficient mice, experimentally infected *in vivo*, had a very significant impaired survival, and a higher tissue fungal burden when compared with control mice. The recruitment of neutrophils to the site of infection was also significantly diminished in MyD88<sup>-/-</sup> mice. *In vitro* production of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70, by antigen-stimulated splenocytes from mice intravenously infected with the low-virulence *C. albicans* PCA2 strain, could not be detected in MyD88<sup>-/-</sup> mice. This default of production of Th1 cytokines in MyD88-deficient mice correlated with a greatly diminished frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD4 + T lymphocytes. Also, the frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD8 + T lymphocytes was lower in MyD88<sup>-/-</sup> mice than in control mice. Although *C. albicans*-specific antibody titers in PCA2-infected mice appeared more quickly in MyD88<sup>-/-</sup> mice than in control mice, the MyD88<sup>-/-</sup> group was not able to maintain the *Candida*-specific IgM nor IgG titers at the third week of infection. The complexity of antigens recognized by sera from MyD88<sup>-/-</sup> mice was quite similar to that from infected control mice. Taken together, these data show that MyD88<sup>-/-</sup> mice are extremely susceptible to *C. albicans* infections, suggesting that MyD88-dependent signaling pathways are essential for both the innate and adaptive immune responses to *C. albicans*.

**Keywords:** TLR, MyD88, *Candida albicans*, murine candidiasis, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , antibodies

### INTRODUCTION

The dimorphic fungus *Candida albicans* is both a commensal and an opportunistic pathogen in humans. Depending on the underlying host defect, this microorganism is able to cause a variety of infections that range from mucosal candidiasis to life-threatening, invasive infections. The frequency of the latter has increased in the last decades as a result of an expanding immunocompromised population [1, 2].

Experimental data and clinical evidence have indicated that both innate and adaptive immunity regulate the resistance to *C. albicans* infections [3]. The coordination of the innate and adaptive arms of antifungal defense may also be important; it has been demonstrated that Th cell reactivity plays a central role in regulating immune responses to *C. albicans*, Th1 reactivity being responsible for resistance

and Th2 response being associated with susceptibility [4–6]. Interestingly, although protective immunity to *C. albicans* is mediated by Th1 cells, some Th2 cytokines are required for the maintenance of the antifungal immune protection [7, 8]; regulatory T cells (Treg), activated by IL-10-producing dendritic cells, are also involved in the induction of memory protective immunity by negative regulation of antifungal Th1 reactivity [9]. Recently a role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity has been established [10].

Toll-like receptors (TLRs) are a family of evolutionarily conserved transmembrane proteins that function as sensors of infection and induce the activation of innate immune responses. Ten mammalian TLRs have been described so far, and TLR ligands include molecular products derived from bacteria, protozoa, viruses and fungi, and also several putative endogenous ligands. TLRs are ex-

pressed primarily on macrophages and dendritic cells and control the activation of these antigen-presenting cells. Signal transduction through TLRs results in the up-regulation of MHC class II, costimulatory molecules, cytokines and antimicrobial responses [11, 12]. TLR signaling pathways arise from the intracytoplasmic Toll/IL1-receptor (TIR) domain, which is conserved among all TLRs. Recent evidence has demonstrated that TIR domain-containing adaptors, such as MyD88, TIRAP, and TRIF, modulate TLR signaling pathways. MyD88 is essential for induction of inflammatory cytokines triggered by all TLRs [13]. The identification of TLRs as a family of receptors involved in controlling dendritic cell activation and maturation has focused attention on these receptors as possible regulators of adaptive immune responses [14].

Members of TLR family contribute to the generation of host immunity to fungal species in a manner that is dependent on fungal species, morphotype of fungal cells and site of infection [3, 15, 16]. This variability may account for the conflicting data reported by different groups. There is evidence indicating that TLR2, the receptor for phospholipomannan (a unique glycolipid present in the cell surface of *C. albicans* that stimulates TNF- $\alpha$  production by macrophages [17]), and TLR4, the receptor for bacterial lipopolysaccharide, participate in murine defenses against *C. albicans* infections [16]. TLR2-deficient mice show an increased susceptibility to infection, and macrophages from TLR2<sup>-/-</sup> mice have an impaired production of TNF- $\alpha$ , macrophage inhibitory protein-2 (MIP-2) and recruitment of neutrophils in response to *C. albicans* [18]; however, TLR2 is dispensable for acquired host immune resistance to *C. albicans* in a murine model of disseminated candidiasis [19]. TLR4-defective C3H/HeJ mice are more susceptible to *C. albicans* infection, although neither production of TNF- $\alpha$  and other proinflammatory cytokines, nor candidacidal ability of neutrophils and macrophages were affected; only the production of chemokines, such as cytokine-induced neutrophil chemoattractant (KC) and MIP-2, were decreased and accompanied by impaired neutrophil recruitment [20]. However, different results concerning the role of TLR2 and TLR4 in response to *C. albicans* have been reported, as deficient mice did not show increased susceptibility to infection, and production *in vivo* of TNF- $\alpha$  was impaired in TLR4<sup>-/-</sup> mice, but increased or normal in TLR2<sup>-/-</sup> mice [15, 21]. In addition, murine macrophages deficient in MyD88 showed a decreased *in vitro* cytokine production in response to *C. albicans* but not in response to *A. fumigatus* [22], whereas in another study, MyD88<sup>-/-</sup> mice showed a decrease in *in vivo* cytokine production in response to both *C. albicans* and *A. fumigatus* [15]. All these results underline the complexity of host-parasite relationships during fungal infections, indicating that several TLRs may simultaneously play a role in protecting mice, and that probably several ligands of the fungus are also recognized.

The discovery of TLRs has opened new perspectives to study host defenses against microbial infections. In this work, we studied the role of MyD88 in the protective response against yeasts and hyphae of *C. albicans* by using gene-targeted mice lacking MyD88 expression (MyD88<sup>-/-</sup>). We report here the influence of MyD88 gene deletion on (i) susceptibility *in vivo* to experimental fungal infection, (ii) neutrophil recruitment to the site of infection, (iii) the production of Th1 cytokines: IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$ ,

(iv) the development of a Th1 response, and (v) the development of the acquired humoral response.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

MyD88<sup>-/-</sup> mice (C57BL/6 background) were kindly provided by Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan) [23]; wild-type C57BL/6 mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were used as controls. Mice of both sexes, between 7 and 12 weeks old were used for experiments.

### Yeast strains and infections

Cells of *C. albicans* strain ATCC 26555 were grown in YPD medium (1% Difco yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), at 28 °C up to the late exponential growth phase ( $A_{600\text{ nm}}$  0.6–1), collected and washed with pyrogen-free water. Cells were resuspended in water, and maintained for 3 h at 28 °C with shaking, and afterwards at 4 °C for 24 or 48 h (starved yeast cells), as previously described [24, 25]. The suspension was finally washed and diluted in pyrogen-free, phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, Barcelona, Spain) to the appropriate cell concentration before injection. Mice were challenged intravenously with 10<sup>6</sup> *C. albicans* yeasts in a volume of 0.2 mL, and survival was checked daily for 20 days. Cells of *C. albicans* PCA2, a low-virulence, non-germinative strain [26], were obtained as described for the high-virulence strain, and diluted in PBS to the appropriate cell concentration before intravenous injection. To assess the tissue outgrowth of the microorganism, three and six days after the infection, two mice from each group were killed and the kidneys removed aseptically, weighed, and homogenized in 1 mL of PBS; dilutions of the homogenates were plated on Sabouraud dextrose agar. The colony-forming units (CFU) were counted after 24 h of incubation at 37 °C, and expressed as CFU per gram of tissue.

Experiments were performed under conditions designed to minimize endotoxin contamination: endotoxin-free water and PBS were used, and fungal culture media were passed through a detoxi-gel endotoxin-removing gel (Pierce, Rockford, IL, USA) and tested for the absence of endotoxin by the E-toxate assay (Sigma, Madrid, Spain).

### In vitro cytokine production by splenocytes

Six days after mice infection with *C. albicans* PCA2 cells, total spleen cells were obtained by collagenase D treatment of the spleens, washed once with complete cell culture medium (RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated FBS and 1% penicillin-streptomycin, Gibco, Barcelona, Spain), and plated at a density of 10<sup>7</sup> cells in 1 mL of medium per well in a 24-well tissue culture plate, in the presence of 2.5  $\mu$ g per mL of Amphotericin B (Gibco, Barcelona, Spain). Cells were challenged with the indicated stimuli for 48 h. Supernatants were then harvested and tested by commercial ELISA kits for TNF- $\alpha$ , IL-12p70 (eBioscience, San Diego, CA, USA) and IFN- $\gamma$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

The stimuli used were LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma, Madrid, Spain), and two heat-inactivated *C. albicans* ATCC 26555 forms, yeast and hypha, obtained as reported elsewhere [24, 25]. Briefly,

starved yeast cells were inoculated (200 µg [dry weight] of cells per mL) in a minimal synthetic medium and incubated for 3 h at 28 °C to obtain yeasts or at 37 °C to obtain hyphae. For heat inactivation, yeasts and hyphae were resuspended in water and treated at 100 °C for 1 h. After inactivation, fungal cells were extensively washed in PBS and brought to the desired cell density in complete cell culture medium.

#### Recruitment of neutrophils

To investigate the recruitment of neutrophils at the site of infection, groups of five mice were injected intraperitoneally with  $10^7$  heat-killed *C. albicans* ATCC 26555 yeast cells. After 4 h, peritoneal cells were collected and washed once with PBS. The percentage of neutrophils was determined by labeling cells with FITC-conjugated anti-mouse Ly-6G antibody (clone RB6-8C5; eBioscience, San Diego, CA, USA), and analysed by flow cytometry, using an EPICS XL-MCL flow cytometer (Coulter Beckman).

#### IFN- $\gamma$ secretion assay

Three days after the mice infection with *C. albicans* PCA2 cells, total spleen cells were obtained by collagenase D treatment of the spleens as described above and plated at a density of  $10^7$  cells in 1 mL of medium per well in a 24-well tissue culture plate, in the presence of 2.5 µg per mL of amphotericin B (Gibco, Barcelona, Spain). Cells were challenged with *C. albicans* ATCC 26555 yeast or hypha for 18 h, and analyzed for IFN- $\gamma$  secretion using the mouse IFN- $\gamma$  secretion assay-cell enrichment and detection kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cells were also incubated with a saturating amount of FITC-conjugated CD8 mAb (53-6.7, Pharmingen, Belgium) and PE-Cy5-conjugated CD3 mAb (145-2C11, Pharmingen, Belgium). After washing twice with PBS, the stained cells were analysed on an EPICS XL-MCL flow cytometer (Coulter Beckman).

#### Semi-quantitative determination of *Candida* -specific antibodies by ELISA

Serum obtained by retro-orbital bleeding of experimental animals was assayed by ELISA to determine *Candida*-specific antibody levels. Microtiter plates were coated with 50 µL of 60 mM sodium carbonate (pH 9.6) containing soluble cell extracts (1 µg of protein per well), obtained from yeasts or hyphae by boiling cells in PBS supplemented with 1% SDS and 1% DTT. After overnight incubation at 4 °C, the wells were washed with 0.05% (v/v) Tween 20 in PBS (washing buffer) and blocked with 50 µL of PBS supplemented with 1% BSA, for 1 h at room temperature. Three washes with washing buffer were followed by the addition of 50 µL per well of serum samples diluted in PBS with 0.01% of Tween 20 and 0.5% BSA and further incubation for 2 h at 37 °C. After washing, goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated (Zymed, San Francisco, CA, USA) or goat anti-mouse IgM horseradish peroxidase-conjugated (Sigma, Madrid, Spain) were added to the wells, incubated for 1 h, and the color intensity was determined at 450 nm following the addition of substrate mixture.

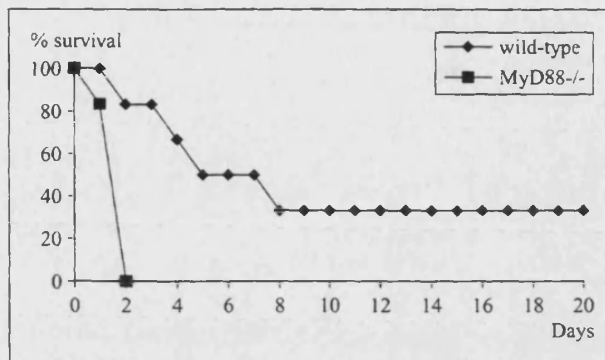


Figure 1

#### Survival of animals infected with *C. albicans*.

Wild-type mice and MyD88<sup>-/-</sup> mice were infected intravenously with  $10^6$  yeasts per mouse, and observed for 20 days. Data showed are from one representative assay of two, using six mice for each group. Log rank  $P < 0.05$ .

#### Western blot

Soluble cell extracts obtained from yeasts or hyphae by boiling cells in PBS supplemented with 1% SDS and 1% DTT, were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Blots were incubated with a 1/20 dilution of infected or control mice sera. Reactive bands were developed using goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated (1/1 000 dilution; Zymed, San Francisco, CA, USA), and hydrogen peroxide and 4-chloro-1-naphthol as the chromogenic reagent.

#### Statistical analysis

Survival curves were analyzed by Kaplan-Meier log rank test. Student's two-tailed  $t$ -test was used to compare cytokine production and neutrophil recruitment. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Significance was accepted at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

#### Susceptibility of MyD88-deficient mice to disseminated experimental candidiasis

The role of MyD88 in host defenses against *C. albicans* was assessed by monitoring the survival curves of MyD88<sup>-/-</sup> and control mice infected with *C. albicans* yeast cells (Figure 1). Intravenous inoculations were performed with  $10^6$  *C. albicans* ATCC 26555 yeast cells per mouse, a dose selected following preliminary studies evaluating the mortality rates in C57BL/6 mice, mortality having been followed for 20 days. All of the MyD88<sup>-/-</sup> mice died within two days while only 66.67% of the wild-type animals had died at day eight and no further deaths occurred until day 20. The mortality of MyD88<sup>-/-</sup> mice was significantly higher when compared with control mice ( $P = 0.0054$ , log rank test).

#### Role of MyD88 in the recruitment of neutrophils

To investigate the recruitment of neutrophils to the site of a *C. albicans* infection, groups of MyD88<sup>-/-</sup> and



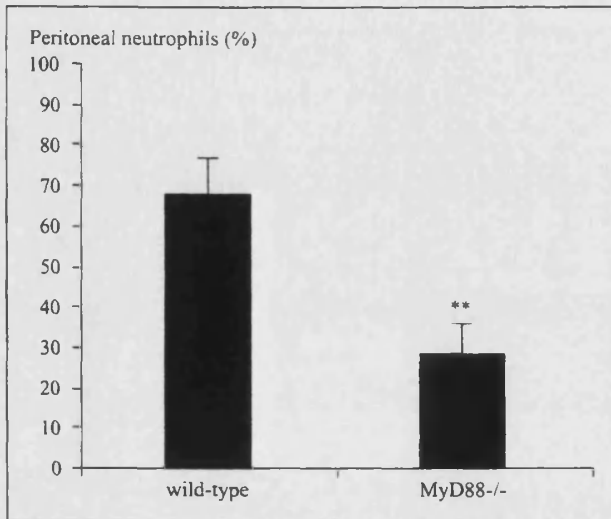


Figure 2

#### Recruitment of neutrophils in MyD88<sup>-/-</sup> mice in response to *C. albicans*.

C57BL/6 and MyD88<sup>-/-</sup> mice were injected intraperitoneally with  $10^7$  heat-killed *C. albicans* yeasts per mouse. Four hours later, the percentage of neutrophils present in the peritoneal cavity was quantified by labelling with FITC-labeled anti-Ly-6G antibody (clone RB6-8C5) and analysed by flow cytometry. Data represent means  $\pm$  SD of five mice, from one representative experiment of two. (\*\*\*)  $P < 0.01$  with respect to the stimulated wild-type mice.

C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with heat-killed *C. albicans* yeasts, and peritoneal cells were harvested 4 h later. The percentage of neutrophils was determined by flow cytometry using the RB6-8C5 monoclonal antibody. RB6-8C5 is directed against Ly-6G, previously known as Gr-1, an antigen on the surface of murine granulocytes whose expression increases with cell maturity and is absent in precursor cells. As shown in Figure 2, there was significantly fewer neutrophils in the peritoneal cavity of MyD88<sup>-/-</sup> than in the cavity of control mice (58.45% inhibition;  $P = 0.000049$ ).

#### Renal invasion of *C. albicans* in MyD88<sup>-/-</sup> mice with experimentally induced disseminated candidiasis

To further investigate the role of MyD88 in disseminated candidiasis, mice were infected with the low-virulence PCA2 strain by the intravenous route at a rate 400 000 yeast cells per mouse, and mice were killed at random on days three and six, and CFU per gram of kidney were determined (Figure 3). The fungal burden was significantly higher in MyD88-deficient mice, compared with control mice, on day three ( $P = 0.0111$ ), and also on day six ( $P = 0.032$ ). Interestingly, control mice were able to reduce renal involvement by the low-virulence strain on day six as compared with day three, whereas MyD88-deficient mice had a fungal growth in the kidneys which was significantly more advanced at day six than at day three, indicating that these mice were not able to resist invasion of renal tissue.

#### Cytokine production by splenocytes from MyD88<sup>-/-</sup> infected mice in response to *C. albicans*

To assess the antifungal production of cytokines upon primary infection in MyD88<sup>-/-</sup> mice in comparison with wild-type mice, animals were infected i.v. with the non-germinative, low-virulence strain PCA2 (400 000 yeasts

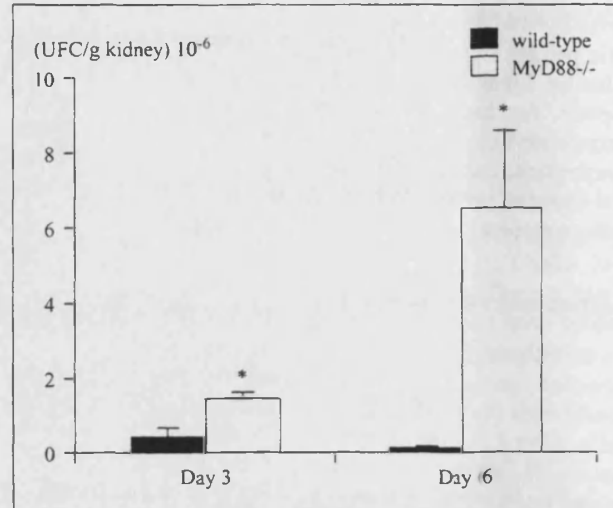


Figure 3

#### Recovery of *C. albicans* PCA2 from kidneys of infected MyD88<sup>-/-</sup> mice.

C57BL/6 and MyD88<sup>-/-</sup> mice were injected intravenously with 400 000 *C. albicans* PCA2 cells per mouse, and two mice from each group were killed on days three and six postinfection, to assess the outgrowth of the yeasts in the kidneys. Data represent means  $\pm$  SD, from one representative experiment of two. (\*)  $P < 0.05$  with respect to the wild-type mice.

per mouse), and the *in vitro* levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-12p70 production by *Candida*-stimulated splenocytes were assessed six days after infection (Figure 4). Wells containing splenocytes stimulated by LPS, a known TLR4 agonist, and unstimulated cells served as controls. No cytokine could be detected in MyD88<sup>-/-</sup> mice in contrast to wild-type mice in response to LPS, yeast and hypha.

#### Role of MyD88 in the development of the Th1 response in mice

To define the role of MyD88 in the development of T-helper type 1 anticandidal response, we determined the frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in mice infected with *C. albicans*. As IFN- $\gamma$  may be also secreted by CD8<sup>+</sup> T cells and CD8 could be involved in antifungal protection, we also determined the percentage of IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the same mice. To this purpose, mice were infected i.v. with the low-virulence strain PCA2 (400 000 yeasts per mouse). Three days after the infection, total spleen cells were challenged *in vitro* with *C. albicans* ATCC 26555 yeast or hypha for 18 h, and analyzed for IFN- $\gamma$  secretion using the mouse IFN- $\gamma$  secretion assay-cell enrichment and detection kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cells were simultaneously labelled with FITC-conjugated CD8 mAb and PE-Cy5-conjugated CD3 mAb. As shown in Figure 5, the frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD4 T lymphocytes (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>) in *C. albicans*-infected mice was significantly reduced in MyD88<sup>-/-</sup> mice compared with C57BL/6. This result indicates that MyD88 is essential for the development of Th1 adaptive immunity to *C. albicans*. Also the frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was diminished in MyD88-deficient mice as compared with wild-type mice, which is in agreement with the lack of detection of the cytokine *in vitro* (see above).

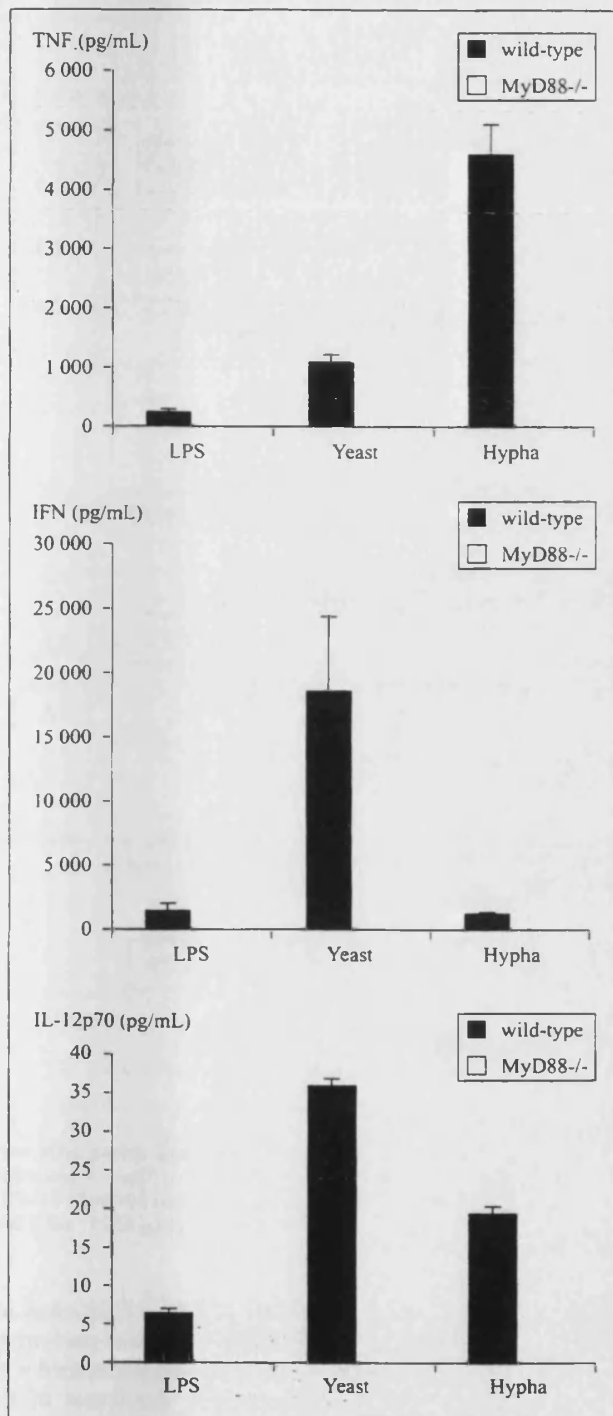


Figure 4

**TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 production by splenocytes in response to *C. albicans*.**

MyD88<sup>-/-</sup> and wild-type mice were infected i.v. with 400 000 PCA2 cells. Six days later, splenocytes were isolated, and challenged for 48 h with heat-inactivated *C. albicans* PCA2 yeasts (30  $\mu$ g [dry weight] of cells/mL), *C. albicans* ATCC 26555 hyphae (30  $\mu$ g [dry weight] of cells/mL) or LPS (500 ng per mL). Concentrations of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 in the culture supernatants were measured by ELISA. Means of duplicates from one representative experiment of two are shown.

***Candida*-specific antibodies in MyD88<sup>-/-</sup> infected mice**

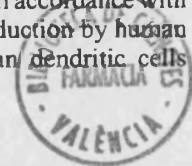
*C. albicans*-specific antibody titers in PCA2-infected mice were measured to assess the ability of MyD88<sup>-/-</sup> mice to mount a humoral response against the fungal pathogen. Sera were collected from infected mice on days seven,

14 and 21 after infection, and *C. albicans*-specific IgM and IgG levels were measured by ELISA (Figure 6A). We used microtitre plates coated with soluble cell extracts obtained from yeasts or hyphae. On day seven, a slight higher mean IgM titer was found in wild type mice, but on day 14 both IgM and IgG titers were clearly higher in the MyD88<sup>-/-</sup> group. However, on day 21, the wild type group showed increased titers of both IgM and IgG, whereas the MyD88<sup>-/-</sup> group was not able to maintain the *Candida*-specific antibody titers. The effect of MyD88 deficiency on the spectrum of *C. albicans*-specific antigens recognized by the humoral response was assessed by Western blot analysis, using the same cell extracts obtained from yeasts or hyphae (Figure 6B). The complexity of antigens recognized by sera from MyD88<sup>-/-</sup> mice was quite similar to that from infected control mice. The number of bands and the intensity of the staining was actually greater with sera from MyD88<sup>-/-</sup> mice than with those from wild type littermates at day 14, but on day 21 the staining was similar.

**DISCUSSION**

By using MyD88<sup>-/-</sup> mice, we have shown that MyD88 deficiency is associated with an overall increased susceptibility of a mouse host to systemic *C. albicans* infection. The survival rate was lower and the kidney fungal burden was higher in MyD88<sup>-/-</sup> mice than in C57BL/6 control mice. The recruitment of neutrophils into the peritoneal cavity of MyD88<sup>-/-</sup> mice was also significantly lower than in control mice, and this may represent an important mechanism for the decreased resistance to disseminated candidiasis as described for TNF- $\alpha$  lymphotoxin-alpha double knockout mice [27]. Moreover, recently Marr *et al.* [22] have shown that macrophages derived from MyD88<sup>-/-</sup> mice demonstrated impaired *in vitro* phagocytosis and intracellular killing of *C. albicans* compared to wild-type macrophages. Bellocchio *et al.* [15] found the same result using neutrophils from MyD88<sup>-/-</sup> mice. Therefore, phagocytes, such as neutrophils and macrophages, that are crucial for clearing the pathogen via phagocytosis, are less attracted to the site of infection and furthermore have impaired ability to phagocytose and kill *C. albicans*.

It is well documented that MyD88-knockout mice do not respond to TLR4 ligands in terms of macrophage production of inflammatory cytokines, and that all the responses to TLR2 ligands are abolished in MyD88<sup>-/-</sup> mice [13]. Resting macrophages from MyD88<sup>-/-</sup> mice were not able to secrete *in vitro* TNF- $\alpha$  in response to yeasts or hyphae of *C. albicans* [22]; and *in vivo*, MyD88<sup>-/-</sup> *C. albicans*-infected mice showed greatly impaired levels of this cytokine in the kidneys compared with wild-type mice [15]. In this work, we have studied the *in vitro* secretion of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 by splenocytes from *C. albicans*-infected mice, in response to both morphotypes of *C. albicans*, yeast and hypha. These three cytokines are required for resistance to *C. albicans* infection [3], and none of them were detected in supernatants of MyD88<sup>-/-</sup> cells stimulated by yeasts or hyphae of *C. albicans*. Wild-type mice produced more IL-12p70 upon exposure to yeasts, than upon exposure to hyphae, which is in accordance with previous results showing that IL-12 production by human blood monocytes, and mice and human dendritic cells



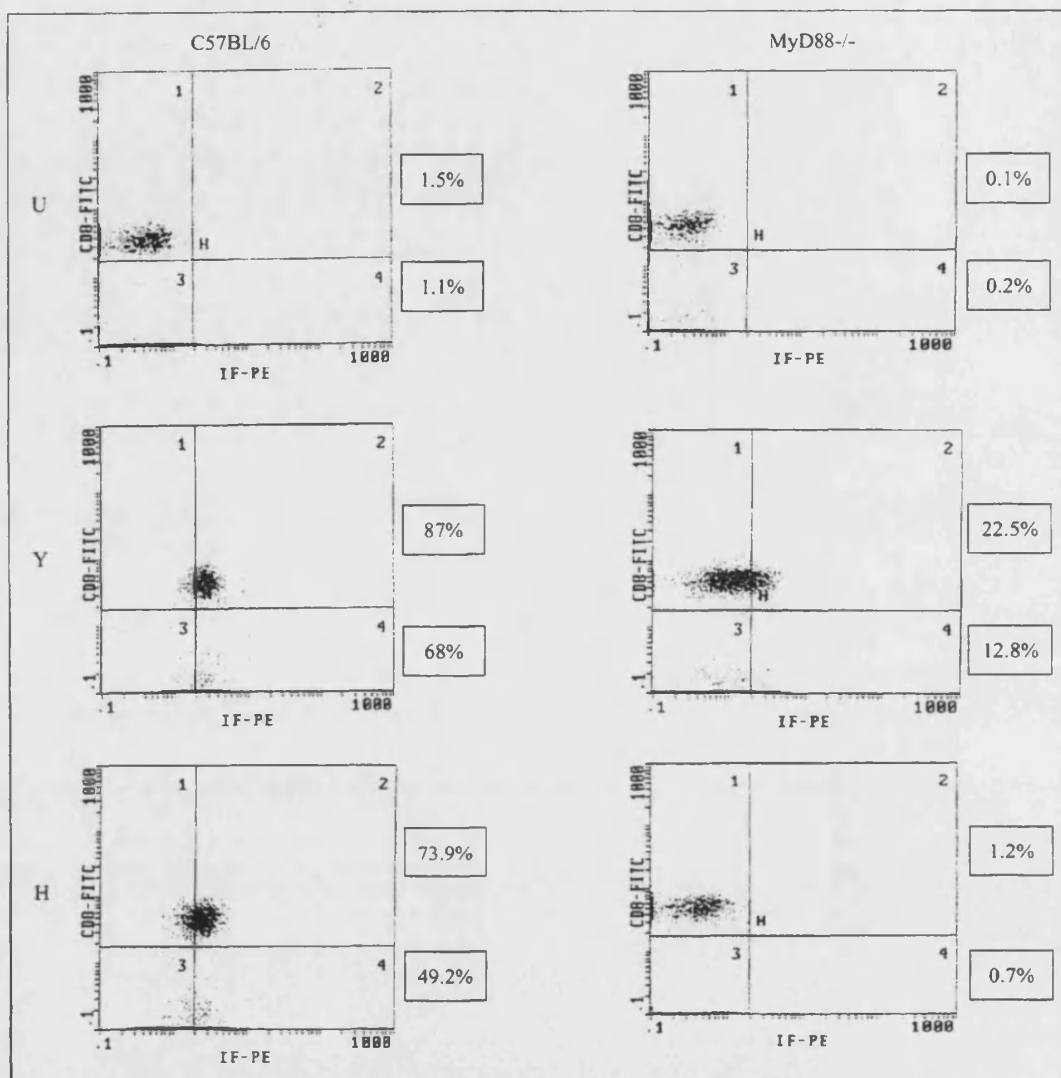


Figure 5

#### Detection and analysis of IFN- $\gamma$ -secreting T cells in response to *C. albicans*.

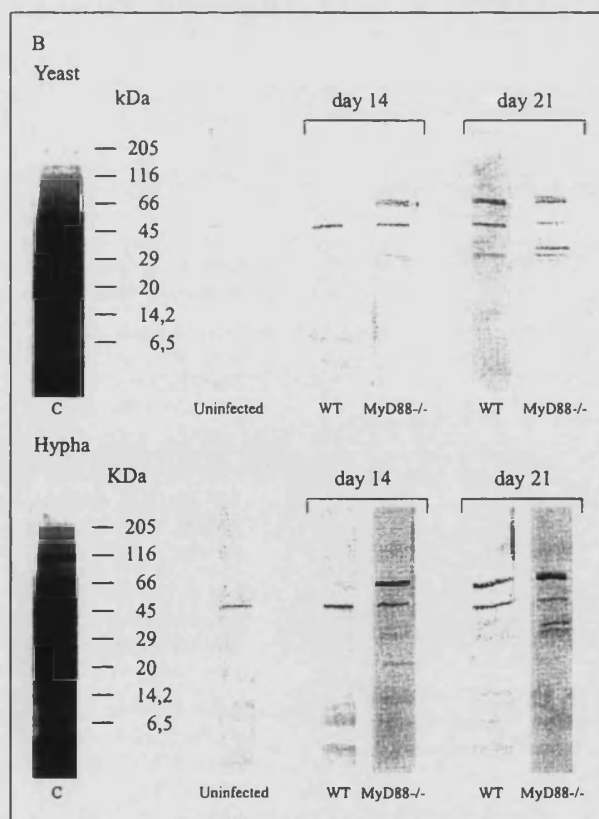
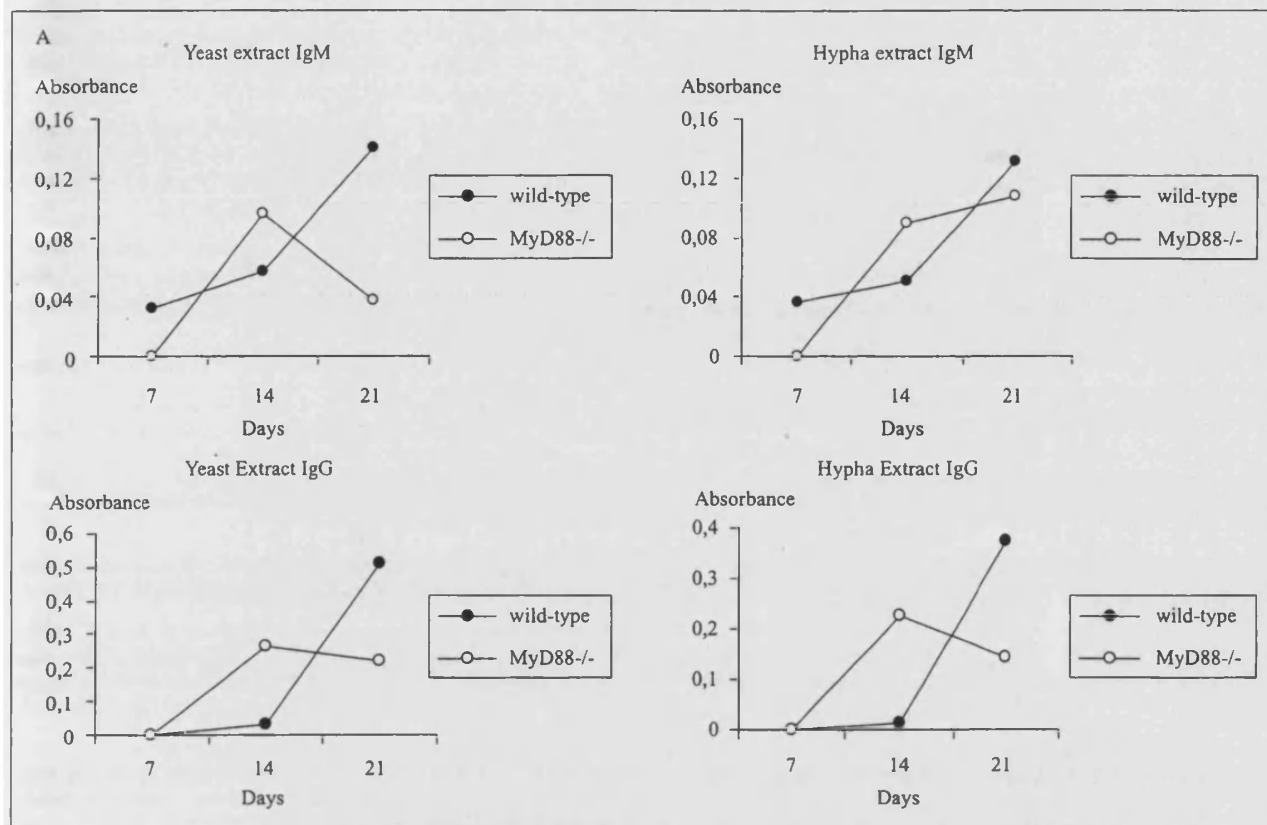
MyD88<sup>-/-</sup> and C57BL/6 mice were infected i.v. with 400 000 PCA2 cells per mouse. Three days after the infection, total spleen cells were unstimulated (U) or challenged *in vitro* with heat-inactivated *C. albicans* ATCC 26555 yeasts (Y) or hyphae (H) for 18 h, as in Figure 4. Secretion of IFN- $\gamma$  was examined using the mouse IFN- $\gamma$  secretion assay detection kit (Miltenyi Biotec) as described in Materials and Methods (IF-PE). IFN- $\gamma$  secretion was analyzed on electronically gated CD3<sup>+</sup> cells by flow cytometry. Percentages reflect IFN- $\gamma$ -secreting CD8<sup>+</sup> cells and IFN- $\gamma$ -secreting CD4 cells (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>). Similar results were obtained in two independent experiments.

basically occurs in response to the yeast form of *C. albicans* [28-31]. Interestingly the lower production of IL-12p70 in response to hyphae correlates with the lower production of IFN- $\gamma$  against this morphotype. Our results indicate that early in infection, production of proinflammatory cytokines, including Th1 cytokines (IL-12p70 and IFN- $\gamma$ ) is abolished in MyD88-deficient mice.

To correlate these findings concerning the innate antifungal response with the acquired immunity to *C. albicans*, we measured the frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in mice systemically infected with the low-virulence strain PCA2. In wild-type mice, the infection with this low-virulence aegerminative strain of *C. albicans* induced substantial Th1 acquired protection to reinfection with highly virulent yeast cells [32-34]. Our results showed a greatly diminished frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells in MyD88<sup>-/-</sup> mice as compared to control mice. Similar results have been described in MyD88<sup>-/-</sup> mice intragastrically infected with high-virulence *C. albicans* cells [15]. Interestingly, the fre-

quency of IFN- $\gamma$ -producing cells (CD4 or CD8) was always higher when the *in vitro* stimulation was performed with yeasts than when the stimulation was performed with hyphae, which is in accordance with the levels of the cytokine measured by ELISA.

In this work we have studied the role of MyD88 in the development of the acquired humoral response against *C. albicans* during invasive infection. We found that on day 14, both IgM and IgG titers were clearly higher in the MyD88<sup>-/-</sup> group. This is probably due to a greater number of *C. albicans* cells present in tissues of more susceptible mice. However, on day 21 the titers of both IgM and IgG increased in the wild type group whereas the MyD88<sup>-/-</sup> group was not able to maintain the *Candida*-specific antibody titers, although the complexity of antigens recognized by MyD88<sup>-/-</sup> mice was quite similar to that in infected control mice. The decrease in antibody titers in MyD88<sup>-/-</sup> mice may be due to the lack of help (IFN- $\gamma$  secretion by the Th cell initiating contact) for the antigen-primed B cells. We show in our model that the acquired



**Figure 6**

**Effect of MyD88-deficiency on the humoral immune response in *C. albicans*-infected mice.**

MyD88<sup>-/-</sup> and C57BL/6 mice were infected i.v. with 210 000 PCA2 cells per mouse, and blood samples were obtained on days seven, 14 and 21 after the infection. (A) *C. albicans*-specific IgM and IgG in sera of mice was assayed by ELISA, using microtiter plates coated with soluble cell extracts obtained from yeasts (yeast extract) or hyphae (hypha extract). (B) *C. albicans*-specific IgG in sera of uninfected and infected mice was assayed by Western blot of soluble cell extracts obtained from yeasts (yeast) or hyphae (hypha); C shows cell extracts stained with Coomassie brilliant blue to visualise proteins. The position of molecular mass markers is indicated. Each serum sample was a pool from four randomly selected mice.

humoral response can occur in the absence of MyD88, although the intensity of the response is slightly diminished probably due to the impaired Th1 response, and therefore there is no evidence indicating whether these antibodies are protective. Although it is accepted that the humoral response is not critical to host defense against *C. albicans* during primary systemic infection, administration of antibodies against certain *C. albicans* antigens confers protection against infection in naive mice [35-37]. The mechanisms by which specific antibodies mediate protection against fungi are not well characterized in all cases [36]. Mycograb (Neu Tec Pharma plc) is a human recombinant antibody against fungal heat shock protein 90 (HSP90), which has been designed as a new class of antifungal drug. Mycograb does not have an Fc component, and its antifungal activity is not dependent on Fc-mediated recruitment of leukocytes or complement, but to its ability to bind and inhibit HSP90 [38]. Recently Montagnoli *et al.*, [10] found that B-cell-deficient mice were resistant to the primary systemic infection, but their resistance to reinfection was severely impaired, despite the occurrence of activated Th1 cells. This correlated with the failure to generate IL-10-producing dendritic cells and regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, suggesting a role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity.

In summary, we show that MyD88-deficient mice have high mortality after *C. albicans* infection, and that there is abrogation of proinflammatory cytokines secretion, and a profound defect in the activation of *Candida*-specific Th1 cells, however they are capable of mounting a specific antibody response to *C. albicans*.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** We are grateful to Dr. Shizuo Akira for making the MyD88<sup>-/-</sup> mice available to us. This work was supported by grants from Generalitat Valenciana (Grupos 03/172; GV043/75), and Ministerio de Sanidad y Consumo (PI030647), Spain. E. V. and P. R. are recipients of fellowships from Generalitat Valenciana and Ajuntament de València, respectively.

## REFERENCES

- Calderone RA. 2001. *Candida* and candidiasis. ASM Press, New York
- Garber G. 2001. An overview of fungal infections. *Drugs*. 61 (Suppl. 1): 1.
- Romani L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 4: 1.
- Puccetti P, Romani L, Bistoni F. 1995. A Th1-Th2-like switch in candidiasis; new perspectives for therapy. *Trends Microbiol*. 3: 237.
- Kaposzta R, Tree P, Marodi L, Gordon S. 1998. Characterization of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. *Infect Immun*. 66: 1708.
- Nisini R, Romagnoli G, Gomez MJ, La Valle R, Torosantucci A, Mariotti S, Teloni R, Cassone A. 2001. Antigenic properties and processing requirements of a 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of anti-*Candida* human T-cell response, as disclosed by specific human T-cell clones. *Infect Immun*. 69: 3728.
- Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, Fe d'Ostiani C, Mosci P, Trinchieri G, Adorini L, Romani L. 1998. IL-10 is required for development of protective Th1 response in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. *J Immunol*. 161: 6228.
- Mencacci A, Del Sero G, Cenci E, Fe d'Ostiani C, Bacci A, Montagnoli C, Kopf M, Romani L. 1998. Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4<sup>+</sup> T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. *J Exp Med*. 187: 307.
- Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, Romani L. 2002. B7/CD28-dependent CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol*. 169: 6298.
- Montagnoli C, Bozza S, Bacci A, Gaziano R, Mosci P, Morschhauser J, Pitzurra L, Kopf M, Cutler J, Romani L. 2003. A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity. *Eur J Immunol*. 33: 1193.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*. 21: 335.
- Kopp E, Medzhitov R. 2003. Recognition of microbial infection by toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 15: 396.
- Takeda K, Akira S. 2004. TLR signalling pathways. *Semin Immunol*. 16: 3.
- Barton GM, Medzhitov R. 2002. Control of adaptive immune responses by toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 14: 380.
- Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, Vecchi A, Mantovani A, Levitz SM, Romani L. 2004. The contribution of the Toll-Like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol*. 172: 3059.
- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC. 2004. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol*. 12: 44.
- Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. 2003. *Candida albicans* phosphomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis*. 188: 165.
- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. 2004. Toll-like receptor 2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microb Infect*. 6: 1.
- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. 2004. Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. *Microb Infect*. 6: 542.
- Netea MG, Van der Graaf CAA, Vonk AG, Verschueren I, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. 2002. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 185: 1483.
- Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van Der Meer JW, Van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*. 172: 3712.
- Marr KA, Balajee SA, Hawn TR, Ozinsky A, Pham U, Akira S, Aderem A, Liles C. 2003. Differential Role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun*. 71: 5280.
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 9: 143.
- Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martínez JP, Gozalbo D. 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol*. 179: 4992.
- Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorin I, Renau-Piqueras J, Martínez JP, Gil ML. 1998. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun*. 66: 2052.

26. De Bernardis F, Adriani FD, Lorenzini R, Pontieri E, Carruba G, Cassone A. 1993. Filamentous growth and elevated vaginopathic potential of a non-germinative variant of *Candida albicans* expressing low-virulence in systemic infection. *Infect Immun.* 61: 1500.
27. Netea MG, Van Tits LJH, Curfs JHAJ, Amiot F, Meis JFGM, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. 1999. Increased susceptibility of TNF- $\alpha$  lymphotoxin- $\alpha$  double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida*. *J Immunol.* 163: 1498.
28. Chiani P, Bromuro C, Torosantucci A. 2000. Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 68: 5628.
29. Liu L, Kang K, Takahara M, Cooper KD, Ghannoum MA. 2001. Hyphae and yeasts of *Candida albicans* differentially regulate interleukin-12 production by human blood monocytes: inhibitory role of *C. albicans* germination. *Infect Immun.* 69: 4695.
30. Fe d'Ostiani C, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med.* 191: 1661.
31. Romani L, Montagnoli C, Bozza S, Perruccio K, Spreca A, Al-lavena P, Verbeek S, Calderone RA, Bistoni F, Puccetti P. 2004. The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol.* 16: 149.
32. Romani L, Mocci S, Bietta C, Lanfaloni L, Puccetti P, Bistoni F. 1991. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. *Infect Immun.* 59: 4647.
33. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Mosci P, Vitellozzi G, Grohmann U, Puccetti P, Bistoni B. 1992. Course of primary candidiasis in T-cell depleted mice infected with attenuated variant cells. *J Infect Dis.* 166: 1384.
34. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Mosci P, Puccetti P, Bistoni F. 1993. CD4+ subset expression in murine candidiasis. *J Immunol.* 150: 925.
35. Han Y, Cutler JE. 1995. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun.* 63: 2714.
36. Bromuro C, Torosantucci A, Chiani P, Conti S, Polonelli L, Cassone A. 2002. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated candidiasis in recipients of *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun.* 70: 5462.
37. Matthews R, Burnie J. 2001. Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2: 472.
38. Matthews RC, Rigg G, Hodgetts S, Carter T, Chapman C, Gregory C, Illidge C, Burnie J. 2003. Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrobial Agents Chemother.* 47: 2208.



**ARTÍCULO 4:** E. Villamón, P. Roig, M.L. Gil, D. Gozalbo, 2005. Toll-like receptor 2 mediates prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*. Research in Microbiology, en prensa.







## Toll-like receptor 2 mediates prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*

Eva Villamón, Patricia Roig, M. Luisa Gil, Daniel Gozalbo \*

Departament de Microbiologia i Ecologia, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain

Received 15 July 2004; accepted 12 August 2004

### Abstract

The involvement of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in triggering signal transduction pathways leading to prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production in response to *Candida albicans* has been studied in cells from wild-type, TLR2<sup>-/-</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> knockout mice. In vitro PGE<sub>2</sub> production by macrophages challenged with zymosan, yeast or hypha cells was strongly inhibited in TLR2-deficient cells, but not in TLR4<sup>-/-</sup> cells, as compared to macrophages from wild-type mice. PGE<sub>2</sub> production was dependent on de novo cyclooxygenase-2 (Cox2) synthesis, since unchallenged cells failed to produce PGE<sub>2</sub> and specific Cox2 inhibition during challenge totally blocked PGE<sub>2</sub> production. Similar results were obtained following in vitro challenge of splenocytes from mice intravenously infected with the low-virulent *C. albicans* PCA2 strain. This indicates that TLR2 is the major receptor that mediates PGE<sub>2</sub> production in response to *C. albicans*, probably by upregulating Cox2 expression.

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Candida albicans*; Prostaglandin E<sub>2</sub>; Toll-like receptor 2 (TLR2); TLR4; Macrophages; Splenocytes; Knockout mice

### 1. Introduction

Both the innate and adaptive host immune system regulate resistance to *Candida albicans* infections; a complex coordination of both arms of antifungal defense is critical since Th cell reactivity plays a central role in regulating immune responses to *C. albicans*: Th1 differentiation is responsible for resistance, whereas the Th2 response appears to be associated with susceptibility [12,13]. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is a lipid mediator that has an important role in multiple physiologic processes, including acute inflammatory responses. This lipid mediator modulates various immune responses, inhibiting production of cytokines such as TNF- $\alpha$ , the Th1 type immune response, chemokine production and lymphocyte proliferation [2,8,14,15,19]. *C. albicans* has been reported to induce PGE<sub>2</sub> production by endothelial, epithelial, and peripheral blood mononuclear cells

[3,4,23], and moreover PGE<sub>2</sub> stimulated *C. albicans* germ tube formation [7].

Toll-like receptors (TLRs) are a family of evolutionarily conserved transmembrane proteins which function as sensors of infection that induce the activation of innate immune responses by recognizing specific patterns of microbial components, and are also regulators of adaptive immune responses [16]; members of the TLR family contribute to the generation of host immunity to fungal species in a manner that is dependent on fungal species, morphology of fungal cells and site of infection [1,11]. There is evidence indicating that TLR2, the receptor for phospholipomannan, a unique glycolipid present in the cell surface of *C. albicans* cells, and TLR4, the receptor for bacterial lipopolysaccharide, are the main receptors participating in the murine response to *C. albicans* infections [6,9,10,21,22]. However, information about their involvement in PGE<sub>2</sub> production is still scant; neutralization assays using antibodies against TLR2 and TLR4 have shown the involvement of both receptors in the *Candida*-induced production of PGE<sub>2</sub> by activation of the *COX2* gene in HeLa cells [3], and as-

\* Corresponding author.

E-mail address: [daniel.gozalbo@uv.es](mailto:daniel.gozalbo@uv.es) (D. Gozalbo).

says using TLR4- and MyD88-deficient mice indicate that lipopolysaccharide-dependent PGE<sub>2</sub> production involves expression of a glutathione-dependent PGE<sub>2</sub> synthase induced through the TLR4/MyD88 signaling pathway [18].

In this work, we have studied the possible involvement of TLR2 and TLR4 in mediating signal transduction pathways triggering PGE<sub>2</sub> production in response to *C. albicans* yeast and hypha cells, by in vitro assays using peritoneal macrophages and splenocytes from wild-type and TLR2 and TLR4 knockout mice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice and yeast strains

Knockout TLR2<sup>-/-</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> mice (C57BL/6 background) were kindly provided by Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan) [17], and C57BL/6 mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were used as controls. Mice of both sexes between 7- and 12-weeks-old were used for experiments.

Endotoxin-free heat-inactivated *C. albicans* ATCC 26555 yeasts or hyphae, and endotoxin-free starved and heat-inactivated yeast cells of *C. albicans* PCA2, a low-virulence non-germinative strain, were prepared as previously described [20–22].

### 2.2. Isolation of mouse peritoneal macrophages and splenocytes

Resident peritoneal macrophages were obtained as previously described [21]. Cells were plated at a density of  $2.3 \times 10^5$  cells in 200  $\mu$ l of medium (RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated FBS and 1% penicillin-streptomycin, Gibco, Barcelona, Spain) per well in a 96-well tissue culture plate. Peritoneal macrophages were allowed to adhere for 2 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, the non-adherent cells were removed and the adherent macrophages were cultured for 72 h prior to challenge.

Splenocytes were obtained as described elsewhere [20,22]. Mice were challenged intravenously with  $10^6$  *C. albicans* PCA2 yeast cells in a total volume of 0.2 ml PBS; three days after mice infection with *C. albicans* PCA2 strain, total spleen cells were obtained by collagenase D treatment of the spleens, washed once with complete cell culture medium and plated at a density of  $10^7$  cells in 1 ml of medium per well in a 24-well tissue culture plate, in the presence of 2.5  $\mu$ g per ml of Amphotericin B (Gibco, Barcelona, Spain) to avoid fungal proliferation.

### 2.3. Measurement of in vitro PGE<sub>2</sub> production

Cells (peritoneal macrophages and splenocytes) were challenged with the indicated stimuli for 24 or 48 h at 37 °C, respectively. Supernatants were then harvested and tested

for PGE<sub>2</sub> by radioimmunoassay [5]. The stimuli used were lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma, Madrid, Spain), the yeast cell wall particle zymosan (Molecular Probes, Eugene, OR), heat-inactivated *C. albicans* PCA2 yeasts, and heat-inactivated *C. albicans* ATCC 26555 yeasts or hyphae. Samples with no stimuli and added with both a specific Cox2 inhibitor (NS398, Cayman Chemical Company, MI, USA) and stimuli were used as controls. Student's two-tailed *t*-test was used to statistically compare PGE<sub>2</sub> production. Data are expressed as mean  $\pm$ SD and significance was accepted at the *P* < 0.05.

## 3. Results and discussion

### 3.1. PGE<sub>2</sub> production by peritoneal macrophages in response to *C. albicans*

In order to determine a role of TLR4 and/or TLR2 in signaling cellular pathways for PGE<sub>2</sub> production upon *C. albicans* recognition by peritoneal macrophages, we determined the PGE<sub>2</sub> levels produced after in vitro challenge of macrophages from TLR2 and TLR4 knockout mice by *C. albicans* yeast and hypha cells. Challenges with zymosan (a known TLR2 agonist) and LPS (a TLR4 agonist) were included as controls. Results (Fig. 1) clearly indicate that TLR2 is the main receptor on the macrophage surface involved in PGE<sub>2</sub> production in response to *C. albicans*. As expected, zymosan stimulated PGE<sub>2</sub> release from wild-type and TLR4<sup>-/-</sup> cells but not from TLR2<sup>-/-</sup> cells, and LPS stimulated PGE<sub>2</sub> production from both wild-type and TLR2<sup>-/-</sup> macrophages, whereas TLR4<sup>-/-</sup> cells showed an impaired production of PGE<sub>2</sub>. Upon challenge with *C. albicans*, macrophages from wild-type and TLR4 deficient mice showed similar levels of PGE<sub>2</sub> production, whereas in macrophages from TLR2-deficient mice PGE<sub>2</sub> production was almost abolished. Production of PGE<sub>2</sub> was found to be dependent on Cox2 induction since (i) no signifi-

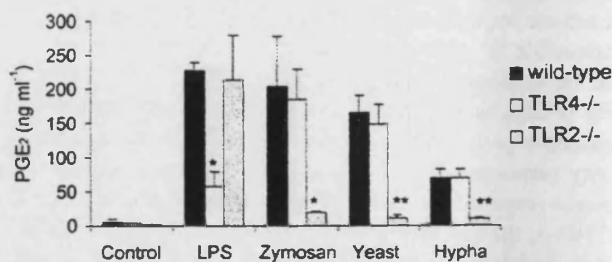


Fig. 1. PGE<sub>2</sub> production by macrophages from TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> and C57BL/6 (wild-type) mice in response to *C. albicans*. Resident peritoneal macrophages were in vitro challenged with LPS (250 ng ml<sup>-1</sup>), zymosan ( $3.75 \times 10^6$  particles ml<sup>-1</sup>), and heat-inactivated *C. albicans* ATCC 26555 yeasts or hyphae (150  $\mu$ g dry weight of cells ml<sup>-1</sup>) for 24 h. Non-stimulated samples were used as controls. Concentration of PGE<sub>2</sub> in the culture supernatants was measured by radioimmunoassay. Depicted are mean values of triplicates ( $\pm$ SD) from one representative assay. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, with respect to the stimulated wild-type cells.

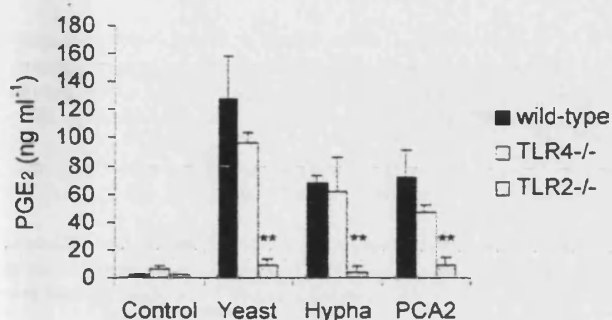


Fig. 2. PGE<sub>2</sub> production by splenocytes from TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> and C57BL/6 (wild-type) mice in response to *C. albicans*. Mice were intravenously infected with 10<sup>6</sup> cells of the low-virulence *C. albicans* PCA2 strain. Three days after infection, splenocytes were isolated and in vitro challenged for 48 h with heat-inactivated *C. albicans* ATCC 26555 yeasts or hyphae, and *C. albicans* PCA2 yeasts (30 µg dry weight of cells ml<sup>-1</sup>). Non-stimulated samples were used as controls. Concentration of PGE<sub>2</sub> in the culture supernatants was measured by radioimmunoassay. Depicted are mean values of triplicates (±SD) from one representative assay. \*\**P* < 0.01, with respect to the stimulated wild-type cells.

cant PGE<sub>2</sub> levels were found in unstimulated samples, and (ii) challenge of macrophages in the presence of a specific inhibitor of Cox2 activity (NS398) completely avoided PGE<sub>2</sub> production. Release of PGE<sub>2</sub> from wild-type and TLR4<sup>-/-</sup> macrophages in response to yeast and hypha was reduced (92–98% inhibition) to background levels (7.9 ± 3.1 ng ml<sup>-1</sup>) in the presence of NS398. Interestingly, yeast cells were able to induce higher levels of PGE<sub>2</sub> than hyphae (*P* < 0.05, Fig. 1) in both wild-type and TLR4<sup>-/-</sup> macrophages, which may have a possible role in favoring initiation of the infectious process by yeast cells through both induction of germ-tube formation and modulating the immune response [3,4,7,23].

### 3.2. PGE<sub>2</sub> production by splenocytes in response to *C. albicans*

We have previously reported that production of TNF-α, IFN-γ, and IL-12p70 by antigen-stimulated splenocytes from TLR2<sup>-/-</sup> mice three days after PCA2 infection is significantly impaired in response to PCA2, hyphae and zymosan [22]. Therefore, we checked in vitro PGE<sub>2</sub> production by splenocytes from TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> and wild-type mice after i.v. infection with 10<sup>6</sup> cells of low-virulence strain PCA2, in response to PCA2 cells, and yeast and hypha from strain ATCC 26555. Results confirm that TLR2<sup>-/-</sup> cells possess a severe impaired response to all stimuli tested (yeast cells from PCA2 and ATCC 26555 strains and hypha), whereas no significant differences in PGE<sub>2</sub> production were observed between wild-type and TLR4<sup>-/-</sup> splenocytes (Fig. 2). These results confirm those described above using resident peritoneal macrophages and agree with our previous reports indicating that TLR2 is the major surface receptor triggering cytokine production in response to *C. albicans* [21,22], suggesting the participation of common signal transduction pathways leading to PGE<sub>2</sub> and cytokine

production. Multiple converging signaling pathways involving TLRs are triggered by *C. albicans* in activation of the *COX2* gene in HeLa cells [3]; neutralization with antibodies against TLR2 or TLR4 almost completely abrogated PGE<sub>2</sub> production in these cells in response to *C. albicans*, indicating their critical role in signaling pathways [3]; however, it is not well understood how single antibodies to TLR2 or TLR4 are able to separately inhibit induction of PGE<sub>2</sub> production through both receptors. Our results using knockout mice clearly show that only TLR2 is critical for PGE<sub>2</sub> production; this discrepancy may be due, at least in part, to several factors, such as the different cell model studied and the different experimental approach used.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Generalitat Valenciana (Grupos 03/172 and GV04B-075), and Ministerio de Sanidad y Consumo (PI030647), Spain. We thank Dr. S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan) for providing TLR2<sup>-/-</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> mice, and Dr. M.C. Terencio for technical assistance.

### References

- [1] S. Bellocchio, C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S.S. Mambula, A. Vecchi, A.Q. Mantovani, S.M. Levitz, L. Romani, The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo, *J. Immunol.* 172 (2004) 3059–3069.
- [2] M. Betz, B.S. Fox, Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits production of Th1 lymphokines, but not of Th2 lymphokines, *J. Immunol.* 146 (1991) 108–113.
- [3] R. Deva, P. Shankaranarayanan, R. Ciccoli, S. Nigam, *Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: Pivotal roles of toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-κB, *J. Immunol.* 171 (2003) 3047–3055.
- [4] S.G. Filler, B.O. Ibe, A.S. Ibrahim, M.A. Ghannoum, J.U. Raj, J.E. Edwards, Mechanisms by which *Candida albicans* induces endothelial cell prostaglandin synthesis, *Infect. Immun.* 62 (1994) 1064–1069.
- [5] J.R. Hoult, M.A. Moroney, M. Payá, Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase, *Methods Enzymol.* 234 (1994) 443–454.
- [6] T. Jouault, S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P.A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira, D. Poulain, *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 165–172.
- [7] A. Kalo-Klein, S.S. Witkin, Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances and γ-interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 58 (1990) 260–262.
- [8] S.L. Kunkel, M. Spengler, M.A. May, R. Spengler, J. Larrick, D. Remick, Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 5380–5384.
- [9] M.J. Netea, R. Suttmüller, C. Hermann, C.A. van der Graaf, J.W. van der Meer, J.H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, B.J. Kullberg, Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells, *J. Immunol.* 172 (2004) 3712–3718.

- [10] M.G. Netea, C.A. van der Graaf, A.G. Vonk, I. Verschuere, J.W. van der Meer, B.J. Kullberg, The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis, *J. Infect. Dis.* 185 (2002) 1483–1489.
- [11] A. Roeder, C.J. Kirschning, R.A. Rupec, M. Schaller, H.C. Korting, Toll-like receptors and innate antifungal responses, *Trends Microbiol.* 12 (2004) 44–49.
- [12] L. Romani, Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism, *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 175–179.
- [13] L. Romani, Immunity to fungal infections, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 1–23.
- [14] M.G. Sergeeva, M.V. Gonchar, A.T. Mevkh, S.D. Vaffolomeyev, Prostaglandin E<sub>2</sub> biphasic control of lymphocyte proliferation inhibition by picomolar concentrations, *FEBS Lett.* 418 (1997) 235–238.
- [15] G. Strassmann, V. Patil-Koota, F. Finkelman, M. Fong, T. Kambayashi, Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E<sub>2</sub>, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 2365–2370.
- [16] K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, Toll-like receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 335–376.
- [17] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity* 11 (1999) 443–451.
- [18] S. Uematsu, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway, *J. Immunol.* 168 (2002) 5811–5816.
- [19] E. Vassiliou, H. Jing, D. Ganea, Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells, *Cell Immunol.* 223 (2003) 120–132.
- [20] E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, C. Murciano, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, MyD88 is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines, *Eur. Cytokine Netw.* (2004), in press.
- [21] E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, Toll-like receptor 2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections, *Microb. Infect.* 6 (2004) 1–7.
- [22] E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, D. Fradelizi, M.L. Gil, Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis, *Microb. Infect.* 6 (2004) 542–548.
- [23] S.S. Witkin, A. Kalo-Klein, L. Galland, M. Teich, W.J. Ledger, Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E<sub>2</sub> production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis, *J. Infect. Dis.* 164 (1991) 396–399.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1.- Estudio de la participación del receptor TLR2 en la respuesta inmune innata y adquirida frente a *Candida albicans*

Como se ha indicado en el apartado de Objetivos, el objetivo general de esta tesis es el estudio de la participación de los TLR en la respuesta inmune, o defensa frente a las candidiasis. El primer objetivo concreto ha sido el estudio del papel de TLR2 en dicha respuesta, ya que se ha descrito que dicho receptor reconoce el zimosán, y por lo tanto parecía probable que también reconociera a las células de *C. albicans*.

En primer lugar, para demostrar la participación del TLR2 en la respuesta frente a *C. albicans*, se determinó la susceptibilidad de ratones deficientes en dicho receptor en un modelo de candidiasis experimental. Para ello, se infectaron ratones salvajes (C57BL/6) y ratones TLR2<sup>-/-</sup> con levaduras de *C. albicans* ATCC 26555, tanto por vía intraperitoneal como intravenosa, y se siguió la curva de mortalidad durante 15 días. Los resultados obtenidos (Fig. 1, Art. 1) indican que los ratones TLR2<sup>-/-</sup> son más sensibles, lo que demuestra que el receptor TLR2 participa en la protección de los ratones frente a una infección sistémica por *C. albicans*.

Dado que el TLR2 participa *in vivo* en la protección frente a las candidiasis, se investigaron los posibles mecanismos por los que dicho receptor podría realizar su función. Para ello, se determinó el papel de TLR2 en los siguientes parámetros: (i) producción *in vitro* de citocinas y quimiocinas por macrófagos intraperitoneales residentes en respuesta a *C. albicans*; (ii) reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección; (iii) fagocitosis *in vitro* de levaduras de *C. albicans* por macrófagos, y (iv) formación intracelular de reactivos del oxígeno (ROI) por macrófagos *in vitro* en respuesta a *C. albicans*.

En los experimentos de producción de citocinas, realizados en condiciones de ausencia de endotoxina contaminante, se utilizaron como controles tanto células sin estimular, como células estimuladas con agonistas conocidos del TLR4 (LPS) y TLR2 (zimosán). Al estimular *in vitro* macrófagos residentes con levaduras o micelios de *C. albicans*, ambos muertos por calor, se observó que tanto la





producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , como de la quimiocina MIP-2 (“Macrophage Inflammatory Protein”) estaban claramente disminuidas en ratones TLR2-/- (88% y 73% de inhibición en la producción de TNF- $\alpha$ , frente a levadura y micelio respectivamente; 45% y 52% de inhibición en la producción de MIP-2, frente a levadura y micelio respectivamente, Fig. 2, Art. 1). Estos resultados indican que el receptor TLR2 es el principal receptor implicado en la producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a *C. albicans*, lo que podría, al menos en parte, explicar la mayor susceptibilidad de los ratones TLR2-/- a las candidiasis, puesto que se ha descrito que el TNF- $\alpha$  es una citocina clave en la defensa frente a las candidiasis (Steinshamn y Waage 1992; Netea *et al.*, 1995). Por otra parte, los resultados obtenidos también indican que TLR2 participa en la producción de quimiocinas. Por lo tanto, nuestros resultados, junto con los de Netea *et al.* (2002) obtenidos en ratones C3H/HeJ (deficientes en TLR4), indicarían que la producción de TNF- $\alpha$  estaría mediada fundamentalmente a través de TLR2, mientras que TLR2 y TLR4 participarían en la producción de quimiocinas.

A continuación se investigó la participación de TLR2 en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección. Para ello, 4 horas después de la inyección de levaduras de *C. albicans* en la cavidad intraperitoneal, se recuperaron las células de la misma y se analizaron por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo monoclonal para marcar específicamente los neutrófilos. Los resultados indican que el reclutamiento de neutrófilos es significativamente menor (41% de inhibición) en los ratones que no tienen TLR2 (Fig. 3, Art. 1), lo cual está de acuerdo con la menor producción de MIP-2 observada anteriormente en estos ratones, ya que dicha quimiocina es atrayente de neutrófilos (Wolpe y Cerami, 1989). Además, la menor producción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos de los ratones TLR2-/- también puede ser responsable del menor reclutamiento de neutrófilos en dichos ratones, ya que el TNF- $\alpha$  estimula la producción de quimiocinas (Bazzoni y Beutler, 1996; Strieterand y Kunkel, 1997). El menor grado de reclutamiento de neutrófilos en los ratones TLR2-/- puede contribuir a su mayor susceptibilidad frente a las candidiasis, puesto que los neutrófilos son la primera barrera de defensa frente a las infecciones sistémicas por *C. albicans*.

Al estudiar por citometría de flujo la posible implicación del receptor TLR2 en la fagocitosis de *C. albicans*, se observó que macrófagos de ratones salvajes y de ratones TLR2<sup>-/-</sup> presentaban la misma capacidad de internalizar levaduras del hongo (Fig. 4, Art. 1). Para comprobar el papel del receptor TLR2 en la producción de radicales libres del oxígeno tras la fagocitosis de levaduras, se utilizó la dihidrorrodamina 123 como sonda para el posterior análisis por citometría de flujo. Los resultados (Fig. 5, Art. 1) mostraron que los ratones sin TLR2 no tienen afectada su capacidad de producir radicales libres del oxígeno, indicando que TLR2 no está implicado en dicha actividad. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos que mostraban que los TLR no participan en la fagocitosis: en la fagocitosis del zimosán no participaría el TLR2, sino la dectina-1 (Underhill *et al.*, 1999; Gantner *et al.*, 2003) y en la fagocitosis de *C. albicans* tampoco participaría el TLR4 (Netea *et al.*, 2002). Recientemente, un resultado similar se ha descrito utilizando neutrófilos de ratones TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2<sup>-/-</sup> (Bellocchio *et al.*, 2004). Aunque la capacidad de matar células de *C. albicans* no depende sólo de la producción de ROI (también es necesaria la activación de proteasas de los gránulos intracelulares), Bellocchio *et al.* (2004) han mostrado que neutrófilos de ratones TLR2<sup>-/-</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> tienen la misma actividad candidica que los neutrófilos control. No obstante, en el caso del zimosán, si bien el reconocimiento de la partícula por TLR2 no induce la generación de ROI, si que es capaz de aumentar los niveles de ROI generados como consecuencia del reconocimiento del glucano del zimosán por la dectina-1, sugiriendo un solapamiento entre ambas vías de transducción de señal (Gatner *et al.*, 2003).

Sin embargo, macrófagos (Marr *et al.*, 2003) y neutrófilos (Bellocchio *et al.*, 2004) de ratones MyD88<sup>-/-</sup> muestran una menor capacidad de fagocitar *in vitro* y destruir a *C. albicans*, lo que podría sugerir que MyD88, además de ser una proteína adaptadora para los TLR, podría estar implicada en la transducción de señal mediada por receptores para la fagocitosis (Marr *et al.*, 2003).

Tras demostrar la implicación del receptor TLR2 en la respuesta innata frente a *C. albicans*, nos propusimos demostrar su posible papel en la respuesta adquirida. Para ello, utilizamos un modelo murino de infección sistémica por *C.*

*albicans*, desarrollado y caracterizado por el grupo de Romani (Cenci *et al.*, 1989; Cenci *et al.*, 1990; Romani *et al.*, 1991a; Romani *et al.*, 1991b; Romani *et al.*, 1992b; Romani *et al.*, 1993b). En este modelo se consigue una protección sustancial frente a la reinfección (infección secundaria) por una cepa virulenta de *C. albicans*, mediante la exposición previa (infección primaria) de los ratones a una cepa agerminativa de *C. albicans* de baja virulencia. En este modelo, el desarrollo de la respuesta protectora se correlaciona con la detección de una respuesta Th1 y T reguladora frente a *C. albicans*.

Tras la primera infección con la cepa poco virulenta PCA2 se observó que tanto los ratones control como los TLR2<sup>-/-</sup> sobrevivieron hasta la infección secundaria con la cepa virulenta (17 días). 3 días después de la infección primaria se estimularon *in vitro* esplenocitos con levaduras y micelios de *C. albicans* para inducir la producción de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12p70 e IFN- $\gamma$  (Fig. 1, Art. 2). Como cabía esperar, de acuerdo con los resultados expuestos anteriormente, la producción de TNF- $\alpha$  se vio claramente disminuida en los ratones deficientes en TLR2 al compararlos con el control. La producción de IFN- $\gamma$  estaba también claramente disminuida en dichos ratones. Los ratones salvajes produjeron IL-12p70 en respuesta a la levadura, pero los niveles fueron muy bajos en respuesta al micelio, lo cual está de acuerdo con resultados previos de otros autores utilizando monocitos humanos y células dendríticas humanas y de ratón (Chiani *et al.*, 2000; d'Ostiani *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2004); los bajos niveles de IL-12p70 en respuesta al micelio están correlacionados con la baja producción de IFN- $\gamma$  frente a dicha morfología del hongo. Estos resultados indican que, en los primeros estadios de la infección, los ratones deficientes en TLR2 presentan defectos en la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo las citocinas relacionadas con una respuesta tipo Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ).

A los 17 días de la infección primaria, los ratones fueron infectados con la cepa virulenta; como controles se utilizaron ratones a los que no se había inmunizado previamente con la cepa PCA2. La curva de mortalidad se siguió durante 15 días (Fig. 2, Art. 2), tras los cuales sobrevivieron el 100% de los ratones salvajes que habían sido inmunizados, mientras que el porcentaje de

supervivencia de los ratones control no vacunados fue del 28%. El 100% de los ratones TLR2<sup>-/-</sup> no inmunizados murieron a los 7 días postinfección, mientras que los ratones TLR2<sup>-/-</sup> inmunizados presentaron una elevada supervivencia (85.7% a día 15 postinfección). Así, se puede concluir que los ratones deficientes en TLR2 son capaces de desarrollar una respuesta protectora tras una primera exposición a una cepa no virulenta del hongo, similar a la desarrollada por los ratones control.

Para estudiar el posible mecanismo de protección en los ratones TLR2<sup>-/-</sup> previamente inmunizados, se determinó a los 17 días de la segunda infección la producción *in vitro* de citocinas por esplenocitos en respuesta a levadura y micelio de *C. albicans*. La producción de TNF- $\alpha$  fue similar en ambos tipos de ratones; en cambio, la producción de IFN- $\gamma$  estaba claramente disminuida en los ratones deficientes en TLR2 y la IL-12p70 no fue detectada en los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones TLR2<sup>-/-</sup> (Fig. 3, Art. 2). Estos resultados indican que los ratones TLR2<sup>-/-</sup> vacunados por inmunización con la cepa poco virulenta, siguen teniendo disminuida la producción de citocinas Th1, aunque recuperan la capacidad de producir TNF- $\alpha$ , generando niveles similares a los ratones salvajes. Este resultado podría explicar, al menos en parte, la protección de los ratones, ya que el TNF- $\alpha$  es una citocina clave en la defensa frente a las candidiasis. La neutralización del TNF- $\alpha$  endógeno con anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  o con determinados fármacos, produce un importante empeoramiento en el curso de la candidiasis experimental (Steinshamn *et al.*, 1992; Netea *et al.*, 1995). Además, se ha descrito que ratones deficientes en la producción de dicha citocina (dobles “knockout” para TNF- $\alpha$  y linfotóxina- $\alpha$ ), así como deficientes en los receptores para el TNF- $\alpha$ , presentan una mayor susceptibilidad a las candidiasis diseminadas, probablemente debido a un menor reclutamiento de neutrófilos y a deficiencias en la fagocitosis del hongo (Steinshamn *et al.*, 1996; Netea *et al.*, 1999). Aunque el mecanismo responsable de la recuperación de los niveles normales de TNF- $\alpha$  en los ratones TLR2<sup>-/-</sup> durante la segunda infección no está claro, podría deberse a que los procesos inflamatorios generados durante la primera infección produzcan un incremento de la expresión de otros receptores

para el hongo, implicados en la secreción de TNF- $\alpha$ , en la superficie de las células mieloides.

A continuación se estudió la capacidad de los ratones TLR2<sup>-/-</sup> para desarrollar una respuesta humoral frente a *C. albicans*. Para ello, se midieron mediante ELISA, los niveles de IgG en el suero de los ratones vacunados, 17 días después de la infección secundaria, utilizando como antígenos levadura o micelio del hongo, así como extractos solubles de los mismos. En todos los casos, se detectaron niveles similares de anticuerpos en los ratones control y en los ratones TLR2<sup>-/-</sup> (Fig. 4, Art. 2), siendo incluso ligeramente más altos en el caso de los ratones TLR2<sup>-/-</sup>, lo que podría deberse a la presencia de un mayor número de microorganismos presentes en los tejidos de los ratones más susceptibles. Por lo tanto, los ratones deficientes en TLR2 no tienen afectada su capacidad de generar una respuesta humoral específica frente a *C. albicans*, siendo capaces de producir anticuerpos frente al hongo. Aunque se acepta que la respuesta humoral no es decisiva en una infección primaria por *C. albicans*, la administración de anticuerpos frente a determinados antígenos fúngicos confiere protección a los ratones frente a la infección (Han y Cutler, 1998; Matthews y Burnie, 2001; Bromuro *et al.*, 2002). También se ha descrito que ratones deficientes en células B son resistentes a una infección sistémica primaria por *C. albicans*, aunque dicha resistencia disminuye frente a una segunda infección, lo que indicaría la participación de los anticuerpos en la generación de una inmunidad de memoria frente a *C. albicans* (Montagnoli *et al.*, 2003).

Nuestros resultados sobre la participación de TLR2 en la respuesta frente a *C. albicans* han sido confirmados muy recientemente por Roeder *et al.* (2004). Estos autores han empleado una aproximación experimental diferente y complementaria, basada en el estudio de la transducción de señal en respuesta a *C. albicans* en macrófagos deficientes en TLR2 y TLR4, así como en una línea celular que no expresa receptores TLR (HEK293), transfectada con plásmidos de expresión con diferentes TLR. De este modo, han demostrado que TLR2 es el receptor que, tras reconocer las células de *C. albicans*, induce la transducción de señal que conduce a la producción de TNF- $\alpha$  a través de la activación del factor

de transcripción NF- $\kappa$ B. Sin embargo, otro grupo ha obtenido resultados distintos (Netea *et al.*, 2004), describiendo que los ratones TLR2<sup>-/-</sup> son más resistentes a las candidiasis, que no tienen afectada la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , y que presentan una menor producción de IL-10 y de células T reguladoras. Los autores sugieren que tras el reconocimiento de *C. albicans*, TLR2 actuaría suprimiendo la resistencia a las candidiasis mediante la inducción de IL-10 y células T reguladoras, factores que tienen una influencia negativa en la respuesta inmune innata frente a la candidiasis diseminada, hipotetizando que éste sería un mecanismo nuevo en la patogénesis de las infecciones fúngicas. Aunque pueden sugerirse algunas explicaciones para estos resultados contradictorios, hay que indicar que la hipótesis de Netea *et al.* (2004), aunque es muy atractiva, está en contra de los resultados de otros autores, incluidos los presentados en esta tesis doctoral, y no ha sido confirmada por otros grupos.

## **2.- Estudio de la participación de MyD88 en la respuesta inmune innata y adquirida frente a *Candida albicans***

En primer lugar, para demostrar la participación de la molécula adaptadora MyD88 en la respuesta frente a *C. albicans*, se determinó la susceptibilidad de ratones deficientes en dicha molécula en un modelo de candidiasis experimental. Para ello, se infectaron ratones salvajes (C57BL/6) y ratones MyD88<sup>-/-</sup> con levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 por vía intravenosa, y se siguió la curva de mortalidad durante 20 días. Los resultados obtenidos (Fig. 1, Art. 3) indican que los ratones MyD88<sup>-/-</sup> son mucho más sensibles: a los 2 días de la infección habían muerto el 100% de los ratones MyD88<sup>-/-</sup> y sólo el 20% de los ratones control, cuya mortalidad llegaba al 66.67% a los 8 días, no produciéndose más muertes durante los 20 días en los que se siguió la curva. Otro parámetro que mide el curso de las candidiasis es la invasión fúngica del riñón, como órgano fundamentalmente afectado en el modelo empleado. Para medir este parámetro, los ratones se infectaron con una cepa poco virulenta (PCA2), determinándose

las unidades formadoras de colonias (UFC) en riñón a los días 3 y 6 postinfección (Fig. 3, Art. 3). Los ratones deficientes en MyD88 presentaron una cantidad significativamente mayor de levaduras en riñón que los ratones control. Cabe destacar que los ratones control presentaban menos levaduras en riñón a día 6 que a día 3, mientras que los ratones MyD88<sup>-/-</sup> presentaban más cantidad de levaduras a día 6 que a día 3, lo que indica que estos ratones no son capaces de frenar la invasión renal del hongo.

Dado que MyD88 participa *in vivo* en la protección frente a las candidiasis, se investigaron los posibles mecanismos por los que dicha molécula podría realizar su función. Para ello, se determinó el papel MyD88 en los siguientes parámetros: (i) reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección; (ii) producción de citocinas por esplenocitos *in vitro*, en respuesta a *C. albicans*; (iii) desarrollo de una respuesta Th1 en respuesta a *C. albicans*; (iv) desarrollo de una respuesta humoral anti-*C. albicans*.

Para estudiar la participación de MyD88 en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección, 4 horas después de la inyección de levaduras de *C. albicans* a la cavidad intraperitoneal, se recuperaron las células de la misma y se analizaron por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal para marcar específicamente los neutrófilos. Los resultados indican que el reclutamiento de neutrófilos es significativamente menor (58.45% de inhibición) en los ratones que no tienen MyD88 (Fig. 2, Art. 3). El menor grado de reclutamiento de neutrófilos en los ratones MyD88<sup>-/-</sup> puede contribuir a su mayor susceptibilidad frente a las candidiasis, puesto que los neutrófilos son la primera barrera de defensa frente a las infecciones sistémicas por *C. albicans* (Vázquez-Torres y Balish, 1997; Mansour y Levitz, 2002).

La producción de citocinas se determinó *in vitro* en esplenocitos de ratones infectados con la cepa PCA2, obtenidos a los 6 días de la infección. Las células se estimularon *in vitro* con levaduras y micelios de *C. albicans* y se midieron los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12p70 en el medio de cultivo. Los ratones deficientes en MyD88 no produjeron niveles detectables de estas citocinas en respuesta a levadura y micelio de *C. albicans* (Fig 4, Art 3). Los ratones salvajes

producen más IL-12p70 e IFN- $\gamma$  en respuesta a la levadura que al micelio, como se ha discutido en el apartado anterior. Estos resultados demuestran que en los primeros estadios de la infección, la producción de citocinas proinflamatorias, entre las que se encuentran citocinas relacionadas con una respuesta Th1 (IL-12p70 e IFN- $\gamma$ ), está bloqueada en ratones MyD88 $^{-/-}$ . Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores: (i) ratones “knockout” para MyD88 no producen citocinas en respuesta a ligandos del TLR4 y del TLR2 (Takeda y Akira, 2004a); (ii) macrófagos de ratones MyD88 $^{-/-}$  no son capaces de secretar *in vitro* TNF- $\alpha$  en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans* (Marr *et al.*, 2003) y (iii) ratones MyD88 $^{-/-}$  infectados con el hongo muestran *in vivo* niveles más bajos de citocinas en riñón que los ratones control (Bellocchio *et al.*, 2004).

La deficiente producción de citocinas en los ratones MyD88 $^{-/-}$  podría explicar el menor reclutamiento de neutrófilos observado anteriormente, y además otros autores han demostrado que tanto macrófagos como neutrófilos de ratones deficientes en MyD88 muestran *in vitro* una menor capacidad para fagocitar y matar a *C. albicans* (Marr *et al.*, 2003; Bellocchio *et al.*, 2004).

Para estudiar la participación de MyD88 en el desarrollo de una respuesta Th1 frente a *C. albicans*, se determinó por citometría de flujo la población de linfocitos T CD4 $^{+}$  secretores de IFN- $\gamma$  presentes en el bazo de ratones control y MyD88 $^{-/-}$ , a día 3 tras la infección con la cepa PCA2.

Nuestros resultados (Fig. 5, Art. 3) indican que los ratones MyD88 $^{-/-}$  presentan disminuida la población de linfocitos T CD4 $^{+}$  secretores de IFN- $\gamma$  (12.8% y 0.7%, en respuesta a levadura y micelio, respectivamente) al compararlos con los ratones control (68% y 49.2%, en respuesta a levadura y micelio, respectivamente). Esto indica que MyD88 es esencial para el desarrollo de una respuesta inmune específica Th1 frente a *C. albicans*. Un resultado similar se observó en la población de linfocitos CD8 $^{+}$  secretores de IFN- $\gamma$  (Fig. 5, Art. 3). Estas observaciones concuerdan con los bajos niveles de IFN- $\gamma$  soluble detectados anteriormente mediante ELISA en ratones MyD88 $^{-/-}$ . Además, en ratones salvajes, los niveles de la citocina detectados por ELISA también



concuerdan con las poblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) secretores de IFN- $\gamma$ , detectadas en respuesta a levadura y micelio.

Un resultado similar, de deficiencia en el desarrollo de respuesta Th1 frente a *C. albicans* en ratones MyD88<sup>-/-</sup>, ha sido descrito recientemente en un modelo de infección intragástrica utilizando una cepa virulenta de *C. albicans* (Bellocchio *et al.*, 2004).

A continuación se analizó la capacidad de los ratones MyD88<sup>-/-</sup> para generar una respuesta humoral frente al hongo mediante la determinación del título de anticuerpos específicos frente a *C. albicans* en ratones infectados con la cepa PCA2. El suero de los ratones se recogió a diferentes días postinfección (7, 14 y 21) y se midieron por ELISA los niveles de IgG e IgM frente a extractos de levadura y de micelio. A los 14 días de la infección observamos que los niveles de IgG e IgM son mayores en los ratones MyD88<sup>-/-</sup> que en los ratones control, quizá debido a la presencia de un mayor número de células del hongo en los tejidos de dichos ratones, dada su mayor susceptibilidad a la infección. En cambio, a día 21 los ratones salvajes presentan un incremento de los niveles de IgG e IgM, mientras que los ratones MyD88<sup>-/-</sup> no son capaces de mantener el título de dichos anticuerpos (Fig. 6A, Art. 3). La disminución de los niveles de anticuerpos observada en los ratones deficientes en MyD88 puede deberse a la falta de cooperación de los linfocitos Th1 secretores de IFN- $\gamma$  con las células B que han reconocido al antígeno. Para completar este estudio, se determinó mediante Western-blot, con extractos de levadura y micelio de *C. albicans*, el patrón de antígenos reconocidos por los anticuerpos generados por ratones salvajes o MyD88<sup>-/-</sup>. Los resultados indican que el patrón de reconocimiento es similar en ambos tipos de ratones (Fig. 6B, Art. 3); aunque el número de bandas y la intensidad de las mismas a día 14 fue mayor en los ratones deficientes en MyD88, a día 21 los resultados con ambos tipos de suero se igualaron, lo que está de acuerdo con los títulos de anticuerpos obtenidos mediante ELISA.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la respuesta humoral frente a *C. albicans* puede darse en ausencia de MyD88, si bien la intensidad de la misma es menor, posiblemente debido a la falta de respuesta Th1. Sin embargo, no hay

evidencia de la posible capacidad protectora de estos anticuerpos y por lo tanto, de la influencia de esta menor capacidad de producir anticuerpos en la susceptibilidad de los ratones MyD88<sup>-/-</sup> a las candidiasis.

### **3.- Estudio de la participación de los receptores TLR2 y TLR4 en la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *Candida albicans***

Puesto que la PGE<sub>2</sub> tiene una función importante en las respuestas inflamatorias y se ha descrito que (i) *C. albicans* induce la producción de dicha prostaglandina en distintos tipos celulares (Witkin *et al.*, 1991; Filler *et al.*, 1994) y que (ii) el TLR4 participa en la inducción de la síntesis de PGE<sub>2</sub> en respuesta al LPS (Uematsu *et al.*, 2002), nos planteamos investigar la posible participación de los TLR en la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *C. albicans*. Para determinar la posible implicación de los receptores TLR2 y TLR4 en la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *C. albicans*, se midieron mediante radioinmunoensayo los niveles de dicha prostaglandina en los sobrenadantes de macrófagos intraperitoneales residentes de ratones salvajes, TLR2<sup>-/-</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>, tras haber sido estimulados *in vitro* con levaduras y micelios del hongo. Los resultados muestran (Fig. 1, Art. 4) que el receptor TLR2 está claramente implicado en la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *C. albicans*, ya que los niveles de PGE<sub>2</sub> fueron prácticamente indetectables en los cultivos de las células de los ratones TLR2<sup>-/-</sup>. La producción de PGE<sub>2</sub> por los macrófagos de ratones TLR4<sup>-/-</sup> fue similar a la de los macrófagos de ratones control. Cabe destacar que cuando se utilizaron levaduras como estímulo los niveles de PGE<sub>2</sub> fueron significativamente superiores a los obtenidos cuando el estímulo fue micelio.

Además, se observó que no hay niveles detectables de prostaglandina en las muestras sin estimular y que la producción de PGE<sub>2</sub> era abolida (92-98% de inhibición) cuando los macrófagos se estimulaban en presencia de un inhibidor específico de la ciclooxigenasa-2 (Cox-2), enzima implicado en la biosíntesis de PGE<sub>2</sub>. Este resultado indica que la producción de PGE<sub>2</sub> mediada por TLR2 en respuesta a *C. albicans* es dependiente de la inducción de la expresión de Cox2.

A continuación se estudió la producción de PGE<sub>2</sub> tras la estimulación *in vitro* de esplenocitos de ratones salvajes, TLR2<sup>-/-</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>, previamente infectados con la cepa PCA2. Los resultados (Fig. 2, Art. 4) confirmaron que los esplenocitos de ratones TLR2<sup>-/-</sup> producen niveles muy bajos de PGE<sub>2</sub> al compararlos con los salvajes y los TLR4<sup>-/-</sup>, que producen niveles similares entre sí. Estos resultados estaban de acuerdo con los anteriormente obtenidos utilizando macrófagos intraperitoneales residentes y demuestran que el TLR2 es el principal receptor que participa en la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *C. albicans*. Otros autores han descrito, en la línea celular HeLa, que la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a *C. albicans* está mediada por TLR2 y TLR4, observando que anticuerpos bloqueantes frente al TLR2 o al TLR4, de manera independiente, eran capaces de inhibir completamente la producción de PGE<sub>2</sub>, aunque no queda claro como un solo anticuerpo puede inhibir totalmente la producción de PGE<sub>2</sub> a través de ambos receptores (Deva *et al.*, 2003).

El hecho de que la levadura induzca en macrófagos una mayor producción de PGE<sub>2</sub> que el micelio, fenómeno que también se observa en la respuesta de los esplenocitos frente a ambas morfologías de la cepa ATCC 26555, puede tener consecuencias *in vivo* durante las candidiasis. La levadura es la forma comensal y la PGE<sub>2</sub> favorece la transición levadura-micelio (Kalo-Klein y Witkin, 1990), que es un factor de virulencia clave para *C. albicans*, y además la PGE<sub>2</sub> inhibe la producción de citocinas como TNF- $\alpha$ , la respuesta inmune Th1, la producción de quimiocinas y la proliferación linfocitaria (Kunkel *et al.*, 1988; Betz y Fox, 1991; Standiford *et al.*, 1992; Strassmann *et al.*, 1994; Sergeeva *et al.*, 1997; Vassiliou *et al.*, 2003).

## V. CONCLUSIONES





1. El receptor TLR2 es esencial para la resistencia del ratón frente a la candidiasis sistémica. Este receptor participa en la respuesta inmune innata mediando la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y quimiocinas atrayentes de neutrófilos (MIP-2) por los macrófagos en respuesta a *C. albicans*. Aunque los ratones deficientes en TLR2 tienen disminuida la producción de citocinas Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), son capaces de generar una respuesta inmune protectora y una respuesta serológica normal, por lo que el TLR2 no es imprescindible en la respuesta inmune adquirida frente a *C. albicans*.
2. La molécula adaptadora MyD88 es esencial para la resistencia del ratón frente a la candidiasis sistémica. Ratones deficientes en esta molécula son incapaces de secretar citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ ) y de desarrollar una respuesta protectora Th1 frente a *C. albicans* y, aunque son capaces de generar anticuerpos específicos frente al hongo, los títulos son menores que en los ratones control. Por lo tanto, MyD88 es esencial tanto en la respuesta inmune innata como en la respuesta específica frente a *C. albicans*.
3. El receptor TLR2 es la molécula responsable de la inducción de la producción de PGE<sub>2</sub> por macrófagos y esplenocitos de ratón en respuesta a *C. albicans*.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**





**Abreu M.T., P. Vora, E. Faure, L.S. Thomas, E.T. Arnold, M. Ardit,** Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide, *J. Immunol.* 167 (2001) 1609-1616.

**Aderem A., R.J. Ulevitch,** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* 406 (2000) 782-787.

**Akira S., H. Hemmi,** Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family, *Immunol. Let.* 85 (2003) 85-95.

**Alberti-Segui C., A.J. Morales, H. Xing, M.M. Kessler, D.A. Willins, K.G. Weinstock, G. Cottarel, K. Fachtel, B. Rogers,** Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence, *Yeast* 21 (2004) 285-302.

**Alem M.A., L.J. Douglas,** Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 41-47.

**Algarra L., E. Ortega, M.J. Serrano, G. Alvarez de Cienfuegos, J.J. Gaforio,** Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following *in vivo* depletion of natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell-deficient nude mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33 (2002) 159-163.

**Alonso R., I. Llopis, C. Flores, A. Murgui, J. Timoneda,** Different adhesins for type IV collagen on *Candida albicans*: identification of a lectin-like adhesin recognizing the 7S(IV) domain, *Microbiology* 147 (2001) 1971-1981.

**Arancia S., S. Sandini, A. Cassone, F. De Bernardis, R. La Valle,** Construction and use PCR primers from 65 kDa mannoprotein gene for identification of *Candida albicans*, *Mol. Cell Probes* 18 (2004) 171-175.

**Arancia G., A. Stringaro, P. Crateri, A. Torosantucci, C. Ramoni, F. Urbani, C.M. Ausiello, A. Cassone,** Interaction between human interleukin-2-activated natural killer cells and heat-killed germ tube forms of *Candida albicans*, *Cell Immunol.* 186 (1998) 28-38.

**Ashman R.B., A. Fulurija, J.M. Papadimitriou,** Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes reduce the severity of tissue lesions in murine systemic candidiasis, and CD4<sup>+</sup> cells also demonstrate strain-specific immunopathological effects, *Microbiology* 145 (1999) 1631-1640.

**Bacci A., C. Montagnoli, K. Perruccio, S. Bozza, R. Gaziano, L. Pitzurra, A. Velardi, C.F. d'Ostiani, J.E. Cutler, L. Romani,** Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation, *J. Immunol.* 168 (2002) 2904-2913.

**Baillie G.S., L.J. Douglas,** Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms, *J. Med. Microbiol.* 48 (1999) 671-679.

**Balish E., T. Warner, C.J. Pierson, D.M. Bock, R.D. Wagner,** Oroesophageal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects, *Med. Mycol.* 39 (2001) 261-268.

**Barton G.M., R. Medzhitov,** Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 380-383.

**Bazzoni F., B. Beutler,** The tumor necrosis factor ligand and receptor families, *N. England. J. Med.* 334 (1996) 1717-1725.

**Beg A.A.,** Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses, *Trends Immunol.* 23 (2002) 509-512.

**Bell J.K., G.E. Mullen, C.A. Leifer, A. Mazzoni, D.R. Davies, D.M. Segal,** Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors, *Trends Immunol.* 24 (2003) 528-533.

**Bellocchio S., C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S.S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S.M. Levitz, L. Romani,** The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo, *J. Immunol.* 172 (2004) 3059-3069.

**Betz M., B.S. Fox,** Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits production of Th1 lymphokines, but not of Th2 lymphokines, *J. Immunol.* 146 (1991) 108-113.

**Biragyn A., P.A. Ruffini, C.A. Leifer, E. Klyushnenkova, A. Shakhov, O. Chertov, A.K. Shirakawa, J.M. Farber, D.M. Segal, J.J. Oppenheim, L.W. Kwak,** Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2, *Science* 298 (2002) 1025-1029.

**Bodey G.P.,** *Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis and treatment*, Raven Press, New York (1993).

**Bozza S., C. Montagnoli, R. Gaziano, G. Rossi, G. Nkwanyuo, S. Bellocchio, L. Romani,** Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi, *Vaccine* 22 (2004) 857-864.

**Braun B.R., A.D. Johnson,** *TUPI, CPHI and EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*, *Genetics* 155 (2000) 57-67.

**Bromuro C., A. Torosantucci, P. Chiani, S. Conti, L. Polonelli, A. Cassone,** Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5462-5470.

**Buchman T.G., M. Rossier, W.G. Merz, P. Charade,** Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I., Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene, *Surgery* 108 (1990) 338-347.

**Calderone R.A.,** Recognition between *Candida albicans* and host cells, *Trends Microbiol.* 1 (1993) 55-58.

**Calderone R.A.,** *Candida* and candidiasis, 3th ed. ASM Press, Washington (2002).

**Calderone R.A., P.C. Braun,** Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*, *Microbiol. Rev.* 55 (1991) 1-20.

**Calderone R.A., W.A. Fonzi,** Virulence factors of *Candida albicans*, *Trends Microbiol.* 9 (2001) 327-335.

**Cambi A., K. Gijzen, L.J.M. De Vries, R. Torensma, B. Joosten, G.J. Adema, M.G. Netea, B.J. Kullberg, L. Romani, C.G. Figdor,** The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 532-538.

**Caramalho I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, J. Demengeot,** Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 403-411.

**Carile M.J. , Watkinson,** *The fungi*, Academic Press, San Diego, C.A. (1994).

**Casadevall A., A. Cassone, F. Bistoni, J.E. Cutler, W. Magliani, J.W. Murphy, L. Polonelli, L. Romani,** Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute?, *Med. Mycol.* 36 (1998) 95-105.

**Casanova M., A.M. Cervera, D. Gozalbo, J.P. Martínez,** Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*, *Infec. Immun.* 65 (1997) 4360-4364.

**Cenci E., L. Romani, A. Vecchiarelli, P. Puccetti, F. Bistoni,** Role of L3T4+ lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice, *Infect. Immun.* 57 (1989) 3581-3587.

**Cenci E., L. Romani, A. Vecchiarelli, P. Puccetti, F. Bistoni,** T cell subsets and IFN- $\gamma$  production in resistance to systemic candidosis in immunized mice, *J. Immunol.* 144 (1990) 4333-4339.

**Chaffin W.L., J.L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, J.P. Martínez,** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 130-180.

**Chalifour A., P. Jeannin, J.F. Gauchat, A. Blaecke, M. Malissard, T. N'Guyen, N. Thieblemont, Y. Delneste,** Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production, *Blood* 104 (2004) 1778-1783.

**Chandra J., D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M.A. Ghannoum,** Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 5385-5394.

**Chiani P., C. Bromuro, A. Torosantucci,** Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 5628-5634.

**Choi J.H., H.M. Ko, J.W. Kim, H.K. Lee, S.S. Han, S.B. Chun,** Platelet-activating factor-induced early activation NF-kappa B plays a crucial role for organ clearance *Candida albicans*, *J. Immunol.* 166 (2001) 5139-5144.

**Coutinho A., A. Poltorack,** Innate immunity: from lymphocyte mitogens to Toll-like receptors and back, *Curr. Opin. Immunol.* 15 (2003) 599-602.

**Crowe J.D., I.K. Sievwright, G.C. Auld, N.R. Moore, N.A.R. Gow, N.A. Booth,** *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins, *Mol. Microbiol.* 47 (2003) 1637-1651.

**d'Ostiani F.C., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, L. Romani,** Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1661-1673.

**De Bernardis F., L. Agatensi, I.K. Ross, G.W. Emerson, R. Lorenzini, P.A. Sullivan, A. Cassone**, Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis, *J. Infect. Dis.* 161 (1990) 1276-1283.

**De Bernardis F., M. Boccanera, D. Adriani, E. Spreghini, G. Santoni, A. Cassone**, Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats, *Infect. Immun.* 65 (1997) 3399-3405.

**De Repentigny L., L. Kaufman, G.T. Cole, D. Kruse, J.P. Latge, R.C. Matthews**, Immunodiagnosis of invasive fungal infections, *J. Med. Vet. Mycol.* 32 (1994) 239-252.

**Deepe G.S. Jr.**, Prospects for the development of fungal vaccines, *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (1997) 585-596.

**Deva R., R. Ciccoli, L. Kock, S. Nigam**, Involvement of aspirin-sensitive oxylipins in vulvovaginal candidiasis, *FEMS Microbiol. Lett.* 20 (2001) 37-43.

**Deva, R., P. Shankaranarayanan, R. Ciccoli, S. Nigam**, *Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF- $\kappa$ B, *J. Immunol.* 171 (2003) 3047-3055.

**Dixon D.M., M.M. McNeil, M.L. Cohen, B.G. Gellin, J.R. La-Montagne**, Fungal infections: a growing threat, *Public Health Rep.* 111 (1996) 226-235.

**Donnelly S.M., D.J. Sullivan, D.B. Shanley, D.C. Coleman**, Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences, *Microbiology* 145 (1999) 1871-1882.

**Douglas L.J.**, *Candida* biofilms and their role in infection, *Trends Microb.* 11 (2003) 30-36.

**Doyle S.E., R. O'Connell, S.A. Vaidya, E.K. Chow, K. Yee, G. Cheng**, Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than Toll-like receptor 4, *J. Immunol.* 170 (2003) 3565-3571.

**Ernst J.F.**, Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis, *Microbiology* 146 (2000) 1763-1774.

**Fernández-Arenas E., G. Molero, C. Nombela, R. Diez-Orejas, C. Gil**, Low virulent strains of *Candida albicans*: Unravelling the antigens for a future vaccine, *Proteomics* 4 (2004) 3007-20.

**Ferrante A.**, Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity: increased fungicidal activity against *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release, *Infect. Immun.* 57 (1994) 2115-2122.

**Filler S.G., B.O. Ibe, A.S. Ibrahim, M.A. Ghannoum, J.U. Raj, J.E. Edwards,** Mechanisms by which *Candida albicans* induces endothelial cell prostaglandin synthesis, *Infect. Immun.* 62 (1994) 1064-1069.

**Fitzgerald K.A., E.M. Palsson-McDermott, A.G. Bowie, C.A. Jefferies, A.S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M.T. Harte, D. McMurray, D.E. Smith, J.E. Sims, T.A. Bird, L.A. O'Neill,** Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction, *Nature* 413 (2001) 78-83.

**Fukazawa Y., K. Kagaya,** Molecular basis of adhesion of *Candida albicans*, *J. Med. Vet. Mycol.* 35 (1997) 87-99.

**Gale C.A., C.M. Bendel, M. McClellan, M. Hauser, J.M. Becker, J. Berman, M.K. Hostetter,** Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1, *Science* 279 (1998) 1355-1358.

**Gantner B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira, D.M. Underhill,** Collaborative induction of inflammatory response by dectin-1 and toll-like receptor 2, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 1107-1117.

**Garber G.,** An overview of fungal infections, *Drugs* 61 (2001) 1-12.

**Ghaleb M., M. Hamad, K.H. Abu-Elteen,** Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8<sup>+</sup> T cells in protection against vaginal candidosis, *Clin. Exp. Immunol.* 131 (2003) 26-33.

**Gow N.A.R.,** Yeast-hyphal dimorphism, eds Gow N.A.R., Gadd G.M., *The growing fungus*, Chapman and Hall, London (1994).

**Gow N.A.R., S. Bates, J.P. Brown, E.T. Buurman, L.C. Thompson, C. Westwater,** *Candida* cell mannosylation: importance in host-fungus interaction and potential as a target for development of antifungal drugs, *Biochem. Soc. Trans.* 27 (1999) 512-516.

**Gow N.A.R., A.J.P. Brown, F.C. Odds,** *Candida's* arranged marriage, *Science* 289 (2000) 256-257.

**Gow N.A.R., T.H.S. Perera, J. Sherwood-Higham, G.W. Gooday, D.W. Gregory, D. Marshall,** Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*, *Sean. Microscop.* 8 (1994) 705-710.

**Gozalbo D., P. Roig, E. Villamón, M.L. Gil,** *Candida* and candidiasis; the cell wall as potential molecular target for antifungal therapy, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 4 (2004) 117-135.

**Greenfield R.A., V.L. Abrams, D.L. Crawford, T.L. Kuhls,** Effect of abrogation of natural killer cell activity on the course of candidiasis induced by intraperitoneal administration and gastrointestinal candidiasis in mice with severe combined immunodeficiency, *Infect. Immun.* 61(1993) 2520-2525.

**Gutiérrez J., P. Morales, M.A. González, G. Quindos,** *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen, *J. Basic Microbiol.* 42 (2002) 207-227.

**Han Y., J.E. Cutler,** Antibody response that protects against disseminated candidiasis, *Infect. Immun.* 63 (1998) 2714-2719.

**Han Y., T.R. Kozel, M.X. Zhang, R.S. MacGill, M.C. Carroll, J.E. Cutler,** Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis, *J. Immunol.* 167 (2001) 1550-1557.

**Han Y., M.H. Riesselman, J.E. Cutler,** Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannose as an IgM protective antibody, *Infect. Immun.* 68 (2000) 1649-1654.

**Hashimoto C., K.L. Hudson, K.V. Anderson,** The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein, *Cell* 52 (1988) 269-279.

**Hayashi F., T.K. Means, A.D. Luster,** Toll-like receptors stimulate human neutrophil function, *Blood* 102 (2003) 2660-2669.

**Heil F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, S. Bauer,** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8, *Science* 303 (2004) 1526-1529.

**Holmes A.R., B.M. Bandara, R.D. Cannon,** Saliva promotes *Candida albicans* adherence to human epithelial cells, *J. Dent. Res.* 81 (2002) 28-32.

**Hornig T., G.M. Barton, R.A. Flavell, R. Medzhitov,** The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors, *Nature* 420 (2002) 329-333.



**Hornig T., G.M. Barton, R. Medzhitov, TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway, Nat. Immunol. 2 (2001) 835-841.**

**Hoshino K., T. Kaisho, T. Iwabe, O. Takeuchi, S. Akira, Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation, Int. Immunol. 14 (2002) 1225-1231.**

**Hoshino K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, S. Akira, Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product, J. Immunol. 162 (1999) 3749-3752.**

**Hostetter M.K., Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida albicans* with epithelial and endothelial surfaces, Clin Microbiol. Rev. 7 (1994) 29-42.**

**Hostetter M.K., Integrin-like proteins in *Candida* spp. and other microorganisms, Fungal Genet. Biol. 28 (1999) 135-145.**

**Huffnagle G.B., G.S. Deepe Jr, Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi, Curr. Opin. Microbiol. 6 (2003) 344-350.**

**Ibrahim A.S., F. Mirbod, S.G. Filler, Y. Banno, G.T. Cole, Y. Kitajima, J.E. Edwards, Y. Nozawa, M.A. Ghannoum, Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*, Infect. Immun. 63 (1995) 1993-1998.**

**Ito T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, S. Fukuhara, Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets, J. Exp. Med. 195 (2002) 1507-1512.**

**Janeway C.A., P. Traveres, M. Walport, M.J. Shlomchick, Inmunobiología, el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad, 2nd Masson (2003).**

**Janssens S, R. Beyaert, A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling, Trends Biochem. Sci. 27 (2002) 474-482.**

**Jarrossay D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells, Eur. J. Immunol. 31 (2001) 3388-3393.**

**Johnson G.B., G.J. Brunn, Y. Kodaira, J.L. Platt, Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4, J. Immunol. 168 (2002) 5233-5239.**

**Johnson G.B., G.J. Brunn, J.L. Platt**, An endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4, *J. Immunol.* 172 (2004) 20-24.

**Jouault T., S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P.A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira, D. Poulain**, *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 165-172.

**Kadowaki N., S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R.A. Kastelein, F. Bazan, Y.J. Liu**, Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens, *J. Exp. Med.* 194 (2001) 863-869.

**Kaisho T., S. Akira**, Toll-like receptors as adjuvant receptors, *Biochim. Biophys. Acta.* 1589 (2002) 1-13.

**Kalo-Klein A., S.S. Witkin**, Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances and  $\gamma$ -interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 58 (1990) 260-262.

**Kanbe T., T. Horii, T. Arishima, M. Ozeki, A. Kikuchi**, PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes, *Yeast* 19 (2002) 973-989.

**Kaposzta R., P. Tree, I. Marodi, S. Gordon**, Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon and interleukin-4 deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 1708-1717.

**Karbassi A., J.M. Becker, J.S. Foster, R.N. Moore**, Enhanced killing of *Candida albicans* by murine macrophages treated with macrophage colony-stimulating factor: evidence for augmented expression of mannose receptors, *J. Immunol.* 139 (1987) 417-421.

**Kawai T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira**, Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin, *Immunity* 11 (1999) 115-122.

**Kawai T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P.F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino, S. Akira**, Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes, *J. Immunol.* 167 (2001) 5887-5894.

**Kerridge D.**, Dimorphic fungi in biology and medicine, H. Vaden Bossche, F.C. Odds y D. Kerridge (eds), Plenum Press, New York (1993).

**Klis F.M., P. de Groot, K. Hellingwerf**, Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*, *Med. Mycol.* 39 (2001) 1-8.

**Komai-Koma M., L. Jones, G.S. Ogg, D. Xu, F.Y. Liew**, TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 3029-3034.

**Kozel T.R.**, Activation of complement by pathogenic fungi, *Clin. Microbiol. Rev.* 9 (1996) 34-46.

**Kozel T.R.**, Complement activation by pathogenic fungi, *Res. Immunol.* 149 (1998) 309-320.

**Kozel T.R., R.S. MacGill, A. Percival, Q. Zhou**, Biological activities of naturally occurring antibodies reactive with *Candida albicans* mannan, *Infect. Immun.* 72 (2004) 209-218.

**Krestchmar M., H. Bernhard, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schroder, H. Hof, T. Nichterlein**, Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis, *Infect. Immun.* 67 (1999) 6637-6642.

**Krug A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A.M. Krieg, G. Hartmann**, Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 3026-3037.

**Kunkel S.L., M. Spengler, M.A. May, R. Spengler, J. Larrick, D. Remick**, Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 5380-5384.

**Lee K.H., M.S. Yoon, W.H. Chun**, The effects of monoclonal antibodies against iC3b receptors in mice with experimentally induced disseminated candidiasis, *Immunology* 92 (1997) 104-110.

**Lee S.J., N.Y. Zheng, M. Clavijo, M.C. Nussenzweig**, Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice, *Infect. Immun.* 71 (2003) 437-445.

**Lehrer R.I.**, Primate defensins, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 727-738.

**Lemaitre B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann**, The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell* 86 (1996) 973-983.

**Linehan S.A., L. Martinez-pomares, P.D. Stahl, S. Gordon,** Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells, *J. Esp. Med.* 189 (1999) 1961-1972.

**Liu H.,** Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (2001) 728-735.

**Liu Y.J.,** Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity, *Cell* 106 (2001) 259-262.

**Liu Y.J., H. Kanzler, V. Soumelis, M. Gilliet,** Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 585-589.

**Lo H.J., J.R. Köhler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, G.R. Fink,** Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent, *Cell* 90 (1997) 939-949.

**Lockhart S.R., K.J. Daniels, R. Zhao, D. Wessels, D.R. Soll,** Cell biology of mating in *Candida albicans*, *Eukaryot. Cell* 2 (2003) 49-61.

**Lockhart S.R., C. Pujol, K.J. Daniels, M.G. Miller, A.D. Johnson, M.A. Pfaller, D.R. Soll,** In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type, *Genetics* 162 (2002) 737-745.

**Loo S., J. Rine,** Silencers and domains of generalized repression, *Science* 264 (1994) 1768-1771.

**Lucas R., M. Alves, E. del Olmo, A. San Feliciano, M. Paya,** LAEE-14, a new in vitro inhibitor of intracellular calcium mobilization, modulates acute and chronic inflammation, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1539-1549.

**Lucas, R., E. Villamón, M. Paya, M. Alves, E. del Olmo, D. Gozalbo, M.L. Gil,** LAEE-14, a new anti-inflammatory drug, increases the survival of *Candida albicans* infected mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40 (2004) 239-242.

**Manen V., J.P. Martínez, D. Gozalbo,** Identification of *Candida albicans* clinical isolates by PCR amplification of an *EFB1* gene fragment containing an intron-interrupted open reading frame, *Med. Mycol.* 38 (2000) 123-126.

**Mansour M.K., S.M. Levitz,** Interactions of fungi with phagocytes, *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (2002) 359-365.

**Marodi L., H.M. Korchak, R.B. Johnston Jr,** Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages, *J. Immunol.* 146 (1991) 2783-2789.

**Marodi L., S. Scheiber, D.C. Anderson, R.P. MacDermott, H.M. Kochak, R.B. Johnston Jr,** Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 2596-2601.

**Marr K.A., S.A. Balajee, T.R. Hawn, A. Ozinsky, U. Pham, S. Akira, A. Aderem, C. Liles,** Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens, *Infect. Immun.* 71 (2003) 5280-5286.

**Martínez J.P., M.L. Gil, J.L. López-Ribot, W.L. Chaffin,** Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1998) 121-141.

**Masuoka J., K.C. Hazen,** Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells, *Glycobiology* 9 (1999) 1281-1286.

**Matthews R.C., J. Burnie,** The role of Hsp90 in fungal infection, *Immunol. Today* 13 (1992) 345-348.

**Matthews R.C., J. Burnie,** Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2 (2001) 472-476.

**Matthews R.C., J.P. Burnie, W. Lee,** The application of epitope mapping in the development of a new serological test for systemic candidosis, *J. Immunol. Methods* 143 (1991) 73-79.

**Matthews R.C., S. Hodgetts, J. Burnie,** Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to Hsp90 in murine invasive candidiasis, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 1668-1671.

**Matthews R.C., G. Rigg, S. Hodgetts, T. Carter, C. Chapman, C. Gregory, C. Illidge, J. Burnie,** Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal hsp90, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 2208-2216.

**McCurdy J.D., T.J. Lin, J.S. Marshall,** Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells, *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001) 977-984.

**Means T.K., D.T. Golenbock, M.J. Fenton,** Structure and function of Toll-like receptor proteins, *Life Sci.* 68 (2000) 241-258.

**Medzhitov R., C.A. Janeway Jr.,** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition, *Cell* 91 (1997) 295-298.

**Medzhitov R., P. Preston-Hurlburt, C.A. Janeway Jr.,** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388 (1997) 394-397.

**Mencacci A., E. Cenci, F. Bistoni, G. del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, C. Fe d'Ostiani, L. Romani,** Specific and non-specific immunity to *Candida albicans* a lesson from genetically modified animal, *Res. Immunol.* 149 (1998b) 352-361.

**Mencacci A., E. Cenci, G. Del Sero, C.F. d'Ostiani, P. Mosci, C. Montagnoli, A. Bacci, F. Bistoni, V.F. Quesniaux, B. Ryffel, L. Romani,** Defective co-stimulation and impaired Th1 development in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha double-deficient mice infected with *Candida albicans*, *Int. Immunol.* 10 (1998a) 37-48.

**Meri T., A. Hartmann, D. Lenk, R. Eck, R. Würzner, J. Hellewage, S. Meri, P.F. Zipfel,** The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5185-5192.

**Meyer J.E., J. Harder, T. Gorogh, J.B. Weise, S. Schubert, D. Janssen, S. Maune,** Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic *Candida* infection, *Anticancer Res.* 24 (2004) 1025-1030.

**Miyake K.,** Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2, *Trends Microbiol.* 12 (2004) 186-192.

**Moazed D., A.D. Johnson,** A deubiquitinating enzyme interacts with *SIR4* and regulates silencing in *S. cerevisiae*, *Cell* 86 (1996) 667-677.

**Montagnoli C., A. Bacci, S. Bozza, R. Gaziano, M. Mosci, A. Sharpe, L. Romani,** B7/D-28-dependent CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are essential components of the memory protective immunity to *Candida albicans*, *J. Immunol.* 169 (2002) 6298-6308.

**Montagnoli C., S. Bozza, A. Bacci, R. Gaziano, P. Mosci, J. Morschhauser, L. Pitzurra, M. Kopf, J. Cutler, L. Romani,** A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 1193-1204.

**Montagnoli C., S. Sandini, A. Bacci, L. Romani, R. La Valle,** Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis, *Med. Mycol.* 42 (2004) 319-324.

**Moragues M.D., M.J. Omaetxebarria, N. Elguezabal, M.J. Sevilla, S. Conti, L. Polonelli, J. Ponton,** A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities, *Infect. Immun.* 71 (2003) 5273-5279.

**Morré S.A., L.S. Murillo, J. Spaargaren, H.S.A. Fennema, A.S. Peña,** Role of the toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism in susceptibility to *Candida albicans* infection, *J. Infect. Dis.* 186 (2002) 1377-1379.

**Mullick A., M. Elias, S. Picard, L. Bourget, O. Jovceviski, S. Gauthier, A. Tuite, P. Harakidas, C. Bihun, B. Massie, P. Gros,** Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in C5-deficient mouse strain, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5868-5876.

**Muzio M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L.P. Ruco, P. Allavena, A. Mantovani,** Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells, *J. Immunol.* 164 (2000) 5998-6004.

**Nagase H., S. Okugawa, Y. Ota, M. Yamaguchi, H. Tomizawa, K. Matsushima, K. Ohta, K. Yamamoto, K. Hirai,** Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand, *J. Immunol.* 171 (2003) 3977-3982.

**Naglik J.R., S.J. Challacombe, D. Hube,** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 400-428.

**Naik S., E.J. Kelly, L. Meijer, S. Pettersson, I.R. Sanderson,** Absence of Toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32 (2001) 449-453.

**Narumiya S., Y. Sugimoto, F. Ushikubi,** Prostanoid receptors structures, properties, and functions, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1193-1226.

**Netea M.G., W.L. Block, B. J. Kullerg, M. Bemelmans, M.T.E. Vogels, W.A. Buurman, J.W.M. Van der Meer,** Pharmacological inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 393-399.

**Netea M.G., R. Suttmuller, C. Hermann, C.A. Van der Graaf, J.W. Van der Meer, J.H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, B.J. Kullberg**, Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells, *J. Immunol.* 172 (2004) 3712-3718.

**Netea M.G., C.A.A. Van der Graaf, A.G. Vonk, I. Verschueren, J.W.M. Van der Meer, B.J. Kullberg**, The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis, *J. Infect. Dis.* 185 (2002) 1483-1489.

**Netea M.G., L.J.H. Van Tits, J.H.A.J. Curfs, F. Amiot, J.F.G.M. Meis, J.W.M. Van der Meer, B.J. Kullberg**, Increased susceptibility of TNF- $\alpha$  lymphotoxin- $\alpha$  double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida*, *J. Immunol.* 163 (1999) 1498-1505.

**Noverr M.C., J.R. Erb-Downward, G.B. Huffnagle**, Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes, *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2003) 517-533.

**Odds F.C.**, *Candida* and candidosis, a review and bibliography, 2nd ed. Ballière Tindall, London (1988).

**Odds F.C., A.J. Brown, N.A. Gow**, Antifungal agents: mechanisms of action, *Trends Microbiol.* 11 (2003) 272-279.

**Ortega E., I. Algarra, M.J. Serrano, M.A. de Pablo, G. Alvarez de Cienfuegos, J.J. Gaforio**, Enhanced resistance to experimental systemic candidiasis in tilorone-treated mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28 (2000) 283-289.

**Pérez-Martín J., J.A. Uría, A.D. Johnson**, Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a *SIR2* gene, *EMBO J.* 18 (1999) 2580-2592.

**Peters-Golden M.**, Lipid mediator synthesis by lung macrophages, Marcel Dekker, Inc., New York, (1997).

**Pitarch A., R. Diez-Orejas, G. Molero, M. Pardo, M. Sanchez, C. Gil, C. Nombela**, Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model, *Proteomics* 1 (2001) 550-559.

**Poltorak A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, B. Beutler**, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *TLR4* gene, *Science* 282 (1998) 2085-2088.





**Poulain D., T. Jouault**, *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk, *Curr. Opin. Microbiol.* 7 (2004) 347-349.

**Poulain D., C. Slomianny, T. Jouault, J.M. Gomez, P.A. Trinel**, Contribution of phospholipomannan to the surface expression on beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts, *Infect. Immun.* 70 (2002) 4323-4328.

**Presterl E., A. Lassnigg, P. Mueller-Uri, I. El-Menyaw, W. Graninger**, Cytokines in sepsis due to *Candida albicans* and bacterial sepsis, *Eur. Cytokine Netw.* 10 (1999) 423-430.

**Qureshi S.T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J. Moore, P. Gros, D. Malo**, Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4), *J. Exp. Med.* 189 (1999) 615-625.

**Rakoff-Nahoum S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov**, Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis, *Cell* 118 (2004) 229-241.

**Ramage G., K. Van de Walle, J.L. López-Ribot, B.L. Wickes**, The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for the normal biofilm formation and development in *Candida albicans*, *FEMS Microbiol. Lett.* 214 (2002) 95-100.

**Ramsey H., B. Morrow, D.R. Soll**, An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153 A, *Microbiology* 7 (1994) 1525-1531.

**Reeves E.P., H. Lu, H.L. Jacobs, C.G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E.O. Potma, A. Warley, J. Roes, A.W. Segal**, Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux, *Nature* 416 (2002) 291-297.

**Rissoan M.C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, Y.J. Liu**, Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation, *Science* 283 (1999) 1183-1186.

**Robzyc K., J. Rech, M. Osley**, Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast, *Science* 287 (2000) 501-504.

**Rodier M.H., C. Imbert, C. Kauffmann-Lacroix, G. Daniault, J.L. Jacquemin**, Immunoglobulins G could prevent adherence of *Candida albicans* to polystyrene and extracellular matrix components, *J. Med. Microbiol.* 52 (2003) 373-377.

**Roeder A., C.J. Kirschning, M. Schaller, G. Weindl, H. Wagner, H.C. Korting, R.A. Rupec**, Induction of nuclear factor- kappa B and c-Jun/activator protein-1 via toll-like receptor 2 in macrophages by antimycotic-treated *Candida albicans*, *J. Infect. Dis.* 190 (2004) 1318-1326.

**Roig P., Gozalbo D.**, Depletion of polyubiquitin encoded by the *UBI4* gene confers pleiotropic phenotype to *Candida albicans* cells, *Fun. Gen. Biol.* 39 (2003) 70-81.

**Roilides E., H. Katsifa, S. Tsaparidou, T. Stergiopoulos, C. Panteliadis, T.J. Wash**, Interleukin-10 suppresses phagocytic and antihyphal activities of human neutrophils, *Cytokine* 12 (2000) 370-387.

**Roitt L.M., P.J. Delves**, *Inmunología. Fundamentos*, 10 nd Médica Panamericana (2003).

**Romani L.**, Immunity to fungal infections, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 1-13.

**Romani L., F. Bistoni, P. Puccetti**, Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence, *Trends Microbiol.* 10 (2002) 508-514.

**Romani L., F. Bistoni, P. Puccetti**, Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts, *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (2003) 338-343.

**Romani L., E. Cenci, A. Mencacci, R. Spaccapelo, U. Grohmann, P. Puccetti, F. Bistoni**, Gamma interferon modifies CD4<sup>+</sup> subset expression in murine candidiasis, *Infect. Immun.* 60 (1992a) 4950-4952.

**Romani L., A. Mencacci, E. Cenci, P. Mosci, G. Vitellozzi, U. Grohmann, P. Puccetti, B. Bistoni**, Course of primary candidiasis in T-cell depleted mice infected with attenuated variant cells, *J. Infect. Dis.* 166 (1992b) 1384-1392.

**Romani L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, P. Mosci, P. Puccetti, F. Bistoni**, CD4<sup>+</sup> subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance, *J. Immunol.* 150 (1993b) 925-931.

**Romani L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, E. Schiaffella, L. Tonnetti, P. Puccetti, F. Bistoni**, Natural killer cells do not play a dominant role in CD4<sup>+</sup> subset differentiation in *Candida albicans*-infected mice, *Infect. Immun.* 61 (1993a) 3769-3774.

**Romani L., S. Mocchi, C. Bietta, L. Lanfaloni, P. Puccetti, F. Bistoni,** Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance, *Infect. Immun.* 59 (1991a) 4647-4654.

**Romani L., S. Mocchi, E. Cenci, R. Rossi, P. Puccetti, F. Bistoni,** *Candida albicans*-specific Lyt-2+ lymphocytes with cytolytic activity, *Eur. J. Immunol.* 21 (1991b) 1567-1570.

**Romani L., C. Montagnoli, S. Bozza, K. Perruccio, A. Spreca, P. Allavena, S. Verbeek, R.A. Calderone, F. Bistoni, P. Puccetti,** The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*, *Int. Immunol.* 16 (2004) 149-161.

**Ross I.K., F. De Bernardis, G.W. Emerson, A. Cassone, P.A. Sullivan,** The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secreted and virulence of a proteinase deficient mutant, *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 687-694.

**Saint Andre A., N.M. Blackwell, L.R. Hall, A. Hoerauf, N.W. Brattig, L. Volkmann, M.J. Taylor, L. Ford, A.G. Hise, J.H. Lass, E. Diaconu, E. Pearlman,** The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness, *Science* 295 (2002) 1892-1895.

**Sallusto F., M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia,** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: down-regulation by cytokines and bacterial products, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 389-400.

**San Millan R., N. Elguezabal, P. Regulez, M.D. Moragues, G. Quindos, J. Ponton,** Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene, *Microbiology* 146 (2000) 2105-2112.

**Sanglard D., F.C. Odds,** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences, *Lancet Infect. Dis.* 2 (2002) 73-85.

**Santoni G., E. Spreghini, R. Lucciarini, C.P. Amantini, M. Piccoli,** Involvement of alpha(v) beta 3 integrin-like receptor and glycosaminoglycans in *Candida albicans* germ tube adhesion to vitronectin and to a human endothelial cell line, *Microb. Pathog.* 31 (2001) 159-172.

**Schofield D.A., C. Westwater, E. Balish,** beta-defensin expression in immunocompetent and immunodeficient germ-free and *Candida albicans*-monoassociated mice, *J. Infect. Dis.* 190 (2004) 1327-1334.

**Sergeeva M.G., M.V. Conchar, A.T. Mevkh, S.D. Vaffolomeyev,** Prostaglandin E<sub>2</sub> biphasic control of lymphocyte proliferation inhibition by picomolar concentrations, *FEBS Lett.* 418 (1997) 235-238.

**Shepherd V.L., B.I. Tarnowski, B.J. McLaughlin,** Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32 (1991) 1779-1784.

**Singleton D.R., J. Masuoka, K.C. Hazen,** Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 3582-3588.

**Soll D.R.,** Dimorphism and high-frequency switching in *Candida albicans*, eds Kirsch, D.R., Kelly R., Kurtz M.B., *The genetics of Candida*, (1990).

**Soll D.R.** High-frequency switching in *Candida albicans*, *Clin. Microbiol. Rev.* 5 (1992) 183-203.

**Soll D.R.,** Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*, *Bioessays* 26 (2004) 10-20.

**Soll D.R., B. Morrow, T. Srikantha,** High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*, *Trends Genet.* 9 (1993) 61-65.

**Sousa C.R.,** Toll-like receptors and dendritic cells: for who the bug tolls, *Sem. Immunol.* 16 (2004) 27-34.

**Staab J.F., S.D. Bradway, P.L. Fidel, P. Sundstrom,** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1, *Science* 283 (1999) 1535-1538.

**Standiford T.J., S.L. Kunkel, M.W. Rolfe, H.L. Evanoff, R.M. Alien, R.M. Strieter,** Regulation of human alveolar macrophage- and blood monocyte-derived interleukin-8 by prostaglandin E<sub>2</sub> and dexamethasone, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6 (1992) 75-81.

**Steinshamn S., M.H.A. Bemelmans, L.H.J. Van Tits, K. Bergh, W.A. Buurman, A. Waage,** TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense, *J. Immunol.* 157 (1996) 2155-2159.

**Steinshamn S., A. Waage,** Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice, *Infect. Immun.* 60 (1992) 4003-4008.

**Strassmann G., V. Patil-Koota, F. Finkelman, M. Fong, T. Kambayashi,** Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E<sub>2</sub>, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 2365-2370.

**Strieterand R.M., S.L. Kunkel,** Chemokines, eds Crystal R.G., Wests J.B., Philadelphia. (1997).

**Stuyt R.J., M.G. Netea, J.H. van Krieken, J.W. van der Meer, B.J. Kullberg,** Recombinant interleukin-18 protects against disseminated *Candida albicans* infection in mice, *J. Infect. Dis.* 189 (2004) 1524-1527.

**Stuyt R.J., M.G. Netea, I. Verschueren, G. Fantuzzi, C.A. Dinarello, J.W. van der Meer, B.J. Kullberg,** Role of interleukin-18 in host defense against disseminated *Candida albicans* infection, *Infect. Immun.* 70 (2002) 3284-3286.

**Sundstrom P.,** Adhesion in *Candida* spp, *Cell. Microbiol.* 4 (2002) 461-169.

**Supajatura V., H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra, H. Ogawa,** Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1351-1359.

**Supajatura V., H. Ushio, A. Nakao, K. Okumura, C. Ra, H. Ogawa,** Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4, *J. Immunol.* 167 (2001) 2250-2256.

**Tada H., E. Nemoto, H. Shimauchi, T. Watanabe, T. Mikami, T. Matsumoto, N. Ohno, H. Tamura, K. Shibata, S. Akashi, K. Miyake, S. Sugawara, H. Takada,** *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner, *Microbiol. Immunol.* 46 (2002) 503-512.

**Taguchi T., J.L. Mitcham, S.K. Dower, J.E. Sims, J.R. Testa,** Chromosomal localization of *TIL*, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14, *Genomics* 32 (1996) 486-488.

**Takahashi K., M.J. Donovan, R.A. Rogers, R.A. Ezekowitz,** Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood, *Cell Tissue Res.* 292 (1998) 311-323.

**Takeda K., S. Akira,** Microbial recognition by Toll-like receptors, *J. Dermatol. Sci.* 34 (2004a) 73-82.

**Takeda K., S. Akira,** TLR signaling pathways, *Semin.Immunol.* 16 (2004b) 3-9.

**Takeda K., T. Kaisho, S. Akira**, Toll-like receptors, *Ann. Rev. Immunol.* 21 (2003) 335-376.

**Talreja J., M.H. Kabir, M.B. Filla, D.J. Stechschulte, K.N. Dileepan**, Histamine induces Toll-like receptor 2 and 4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall components, *Immunology* 113 (2004) 224-233.

**Tang N., L. Liu, K. Kang, P.K. Ukherjee, M. Takahara, G. Chen, T.S. McCormick, K.D. Cooper, M. Ghanoum**, Inhibition of monocytic interleukin-12 production by *Candida albicans* via selective activation of ERK mitogen-activated protein kinase, *Infect. Immun.* 72 (2004) 2513-2520.

**Tanida T., T. Okamoto, A. Okamoto, H. Wang, T. Hamada, E. Ueta, T. Osaki**, Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis, *J. Oral Pathol. Med.* 32 (2003) 596-594.

**Tarnowski B.L., V.L. Shepherd, B.J. McLaughlin**, Expression of mannose receptors for pinocytosis and phagocytosis on rat retinal pigment epithelium, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29 (1988) 742-748.

**Tauszig S., E. Jouanguy, J.A. Hoffmann, J.L. Imler**, Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 10520-10525.

**Tavares D., P. Ferreira, M. Arala-Chaves**, Increased resistance to systemic candidiasis in athymic or interleukin-10 depleted mice, *J. Infect. Dis.* 182 (2000) 266-273.

**Tavares D., A. Salvador, P. Ferreira, M.P. Arala-Chaves**, Immunological activities of a *Candida albicans* protein which plays an important role in the survival of the microorganism in the host, *Infect. Immun.* 61 (1993) 1881-1888.

**Taylor P.R., G.D. Brown, J. Herre, D.L. Williams, J.A. Willment, S. Gordon**, The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages, *J. Immunol.* 172 (2004) 1157-1162.

**Torosantucci A., G. Romagnoli, P. Chiani, A. Stringaro, P. Crateri, S. Mariotti, R. Eloni, G. Arancia, A. Cassone, R. Nisini**, *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response, *Infect. Immun.* 72 (2004) 833-843.



**Toshchakov V., B.W. Jones, P.Y. Perera, K. Thomas, M.J. Cody, S. Zhang, B.R. Williams, J. Major, T.A. Hamilton, M.J. Fenton, S.N. Vogel, TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages, Nat. Immunol. 3 (2002) 392-398.**

**Tran P., R. Ahmad, J. Xu, A. Ahmad, J. Menezes, Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity, Immunology 109 (2003) 263-270.**

**Trinchieri G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, Nat. Rev. Immunol. 3 (2003) 133-146.**

**Trinel P.A., E. Maes, J.P. Zanetta, F. Delplace, B. Coddeville, T. Jouault, G. Strecker, D. Poulain, *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family, J. Biol. Chem. 277 (2002) 37260-37271.**

**Tsan M.F., B. Gao, Endogenous ligands of Toll-like receptors, J. Leukoc. Biol. 76 (2004) 514-519.**

**Tzung K.W., R.M. Williams, S. Scherver, N. Federspiel, T. Jones, N. Hansen, V. Bivolarevic, L. Huizar, C. Komp, R. Surzycki, R. Tamse, R.W. Davis, N. Agabian, Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*, Proc. Acad. Natl. Sci. 98 (2001) 3249-3253.**

**Uematsu S., M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway, J. Immunol. 168 (2002) 5811-5816.**

**Underhill D.M., Toll-like receptors: networking for success, Eur. J. Immunol. 33 (2003a) 1767-1775.**

**Underhill D.M., Macrophage recognition of zymosan particles, J. Endotoxin Res. 9 (2003b) 176-180.**

**Underhill D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti, A. Aderem, The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens, Nature 401 (1999) 811-815.**

**Van Burik J.H., P.T. Magee, Aspects of fungal pathogenesis in humans, Annu. Rev. Microbiol. 55 (2001) 743-772.**

**Van Enckevort F.H., M.G. Netea, A.R. Hermus, C.G.J. Sweep, J.F. Meis, J.W. van der Meer, B.J. Kullberg,** Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice, *Med. Mycol.* 37 (1999) 419-426.

**Vassiliou E., H. Jing, D. Ganea,** Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells, *Cell Immunol.* 223 (2003) 120-132.

**Vázquez-Torres A., E. Balish,** Macrophages in resistance to candidiasis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 170-192.

**Visintin A., A. Mazzone, J.H. Spitzer, D.H. Wyllie, S.K. Dower, D.M. Segal,** Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells, *J. Immunol.* 166 (2001) 249-255.

**Wahyuningshi R., H.J. Freisleben, H.G. Sonntang, P. Schinitzler,** Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 3016-3021.

**Walsh T.J., J.W. Hathorn, J.D. Sobel, W.G. Merz, V. Sanchez, S.M. Maret, H.R. Buckley, M.A. Pfaller, R. Schaufele, C. Sliva,** Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis, *N. Engl. J. Med.* 324 (1991) 1026-1031.

**Wang X., C. Moser, J.P. Louboutin, E.S. Lysenko, D.J. Weiner, J.N. Weiser, J.M. Wilson,** Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung, *J. Immunol.* 168 (2002) 810-815.

**Weaver B.K., K.P. Kumar, N.C. Reich,** Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1, *Mol. Cell Biol.* 18 (1998) 1359-1368.

**Weig M., U. Gross, F. Muhlschlegel,** Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection, *Trends Microbiol.* 6 (1998) 468-470.

**Wetzler L.M.,** The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity, *Vaccine* 21 (2003) 55-60.

**Williams M.J., A. Rodriguez, D.A. Kimbrell, F.D. Eldon,** The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense, *EMBO J.* 16 (1997) 6120-6130.

**Witkin S.S., A. Kalo-Klein, L. Galland, M. Teich, W.J. Ledger,** Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E<sub>2</sub> production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis, *J. Infect. Dis.* 164 (1991) 396-399.



**Wolfs T.G., W.A. Buurman, A. van Schadewijk, B. de Vries, M.A. Daemen, P.S. Hiemstra, C. van 't Veer, *In vivo* expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation, J. Immunol. 168 (2002) 1286-1293.**

**Wolpe S., A. Cerami, Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines, FASEB J. 3 (1989) 2565-2573.**

**Yamamoto M, S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, S. Akira, Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4, Nature 420 (2002a) 324-329.**

**Yamamoto M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, TRAM is specifically involved in the TLR4-mediated MyD88-independent signaling pathway, Nat. Immunol. 4 (2003) 1140-1150.**

**Yamamoto M., S. Sato, K. Mori, O. Takeuchi, K. Hoshino, K. Takeda, S. Akira, A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling, J. Immunol. 169 (2002b) 6668-6672.**

**Yoneyama M., W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukuda, E. Nishida, T. Fujita, Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300, EMBO J. 17 (1998) 1087-1095.**

**Zhang D., G. Zhang, M.S. Hayden, M.B. Greenblatt, C. Bussey, R.A. Flavell, S. Ghosh, A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria, Science 303 (2004) 1522-1526.**

