

FLÁVIO VIEIRA LOURES

**O RECEPTOR DE RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS TLR-2 E A
PROTEÍNA ADAPTADORA MYD88 APRESENTAM UM IMPORTANTE
PAPEL NA INFECÇÃO MURINA CONTRA O
*PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Imunologia).**

São Paulo

2010

FLÁVIO VIEIRA LOURES

**O RECEPTOR DE RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS TLR-2 E A
PROTÉINA ADAPTADORA MYD88 APRESENTAM UM IMPORTANTE
PAPEL NA INFECÇÃO MURINA CONTRA O
*PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Imunologia).**

Área de concentração: Imunologia

**Orientador(a): Profa. Dra. Vera Lúcia
Garcia Calich**

São Paulo

2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Loures, Flávio Vieira.

O receptor de reconhecimento de patógenos TLR-2 e a proteína adaptadora MyD88 apresentam um importante papel na infecção murina contra o *Paracoccidioides brasiliensis* / Flávio Vieira Loures. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Vera Lucia Garcia Calich.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia das micoses.

Versão do título para o inglês: The pathogen recognition receptor TLR-2 and the adaptor protein MyD88 have an important role in the innate and adaptive immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection.

Descritores: 1. Imunologia 2. Imunidade inata 3. Imunidade adaptativa 4. Receptores tipo Toll 5. Paracoccidioidomicose I. Calich, Vera Lucia Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB09/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávio Vieira Loures.

Título da Tese: O receptor de reconhecimento de patógenos TLR-2 e a proteína adaptadora MyD88 apresentam um importante papel na infecção murina contra o *Paracoccidioides brasiliensis*.

Orientador(a): Vera Lucia Garcia Calich.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

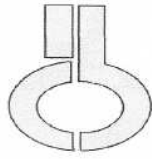
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **76** nas fls. **7** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Paracoccidioidomicose pulmonar. Fatores do fungo e do hospedeiro que influenciam a resposta imune e a gravidade da doença**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Adriana Pina, Laura Raquel Rios Ribeiro e Simone Bernardino** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.11.2004**.

São Paulo, 24 de novembro de 2004.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seeiaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.011/2005

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 76/04/CEEA, aprovo a inclusão do aluno FLÁVIO VIEIRA LOURES, ao protocolo intitulado: *"Paracoccidiodomicose pulmonar. Fatores do fungo e do hospedeiro que influenciam a resposta imune e a gravidade da doença"*, para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação da Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 20 de junho de 2005.

Atenciosamente,

Profa. Dra. MARÍLIA CERQUEIRA L. SEELANDER
Coordenadora da CEEA- ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À minha família que me proporcionou condições para que eu alcançasse meus objetivos, apoiando e incentivando o meu trabalho.

À Professora Dra. Vera Calich por confiar e acreditar na minha capacidade intelectual. Agradeço todos os seus ensinamentos e todas as suas orientações que contribuíram para meu crescimento acadêmico.

À toda equipe do laboratório: Adriana Pina, Máira Felonato, Simone Bernardino, Eliseu Frank de Araújo, Cláudia Feirotti, Alessandra Schanoski e Tânia Alves da Costa . Pelo convívio, pela amizade e pela força que sempre me deram. Obrigado a todas vocês pela ajuda, em especial à Adriana, por estar sempre disposta a ajudar quando precisei. Obrigado à vocês!!!

À equipe do Biotério de Experimentação, em especial à Silvia Massironi e a Regina De Lucca, pela gentileza e competência com que sempre me atenderam.

Às secretárias do departamento Jotelma e Eni, pela paciência que sempre tiveram com nossos atrasos e esquecimentos.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio financeiro fornecido.

O meu olhar é nítido como um girassol.
Tenho o costume de andar pelas estradas
Olhando para a direita e para a esquerda,
E de vez em quando olhando para trás...
E o que vejo a cada momento
É aquilo que nunca antes eu tinha visto,
E eu sei dar por isso muito bem...
Sei ter o pasmo essencial
Que tem uma criança se, ao nascer,
Reparasse que nascera deveras...
Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do Mundo...

Alberto Caeiro

RESUMO

LOURES, F. V. **O receptor de reconhecimento de patógenos TLR-2 e a proteína adaptadora MyD88 apresentam um importante papel na infecção murina contra o *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2010. 134 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os mecanismos imunológicos que governam a interação entre o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e o hospedeiro têm sido pouco estudados. Tanto os componentes do fungo como os receptores dos fagócitos envolvidos nesta interação são pouco conhecidos. Baseados nestes fatos, nosso trabalho teve por objetivo caracterizar *in vitro* e *in vivo* o envolvimento do receptor “Toll Like”-2 (TLR-2) e da proteína adaptadora MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) na infecção de camundongos pelo *P. brasiliensis*. O TLR-2 é um receptor da imunidade inata envolvido no reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos), enquanto que MyD88 é uma molécula envolvida na sinalização celular induzida por muitos TLRs e que culmina com a ativação de vários fatores de transcrição, entre eles o NFκB, envolvidos na ativação de genes ligados à resposta inflamatória. Para tanto, utilizamos camundongos C57Bl/6 deficientes e normais para TLR-2 e para MyD88. Demonstramos que, comparado ao grupo controle, animais TLR2^{-/-} apresentavam uma infecção pulmonar menos grave associada com menor síntese de óxido nítrico (NO). Resultados equivalentes foram obtidos com macrófagos peritoneais e alveolares infectados *in vitro*. Inesperadamente, apesar das diferenças na carga fúngica, ambas as linhagens apresentavam tempo médio de sobrevivência semelhante e lesões pulmonares de gravidade equivalente. Os estudos com leucócitos infiltrantes de pulmão revelaram um aumento de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) nos animais TLR-2^{-/-} associado com um menor número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ ativados. Animais TLR-2^{-/-} deficientes apresentaram uma discreta diferença quanto à síntese de citocinas pulmonares dos tipos Th1 e Th2, porém estes animais apresentaram maiores níveis de KC, uma quimiocina CXC envolvida na quimiotaxia de neutrófilos, assim com maiores níveis de citocinas Th17 (IL-6, IL-17, IL-23 e TGF-β). Além disso, a resposta imune Th17 desenvolvida por animais TLR-2^{-/-} esteve associada com menor expansão de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Assim, o TLR-2 controla a imunidade inata e adaptativa frente ao *P. brasiliensis* e regula negativamente a resposta imune Th17 e a

patologia pulmonar. Em relação aos estudos com animais deficientes para a proteína adaptadora MyD88 na paracoccidioomicose verificamos que sua ausência resultou numa produção deficiente *in vitro* e *in vivo* de NO, além de uma produção deficiente *in vivo* de citocinas do tipo Th1, Th2 e Th17. Animais MyD88-deficientes infectados desenvolveram uma resposta imune prejudicada, evidenciada pelo menor número de macrófagos ativados, assim como uma imunidade adaptativa menos eficiente, evidenciada pelo menor número de células T CD4 ativadas que afluíram aos pulmões. Este quadro culminou com uma carga fúngica maior nos pulmões dos animais MyD88-deficientes, como também permitiu uma exuberante disseminação do fungo para outros órgãos, como fígado e baço. Os pulmões e o fígado apresentaram graves lesões com a presença de granulomas coalescentes e ricos agregados fúngicos. Assim, camundongos MyD88-deficientes não foram capazes de controlar a doença e morreram em um tempo mais curto que os animais MyD88-competentes, como evidenciado em experimentos de sobrevivência. Assim, nossos achados demonstram que a sinalização intracelular mediada pela proteína MyD88 é importante para a ativação dos mecanismos fungicidas, assim como para a ativação das respostas imunes inata e adaptativa contra o *P. brasiliensis*. Em conjunto, nosso trabalho demonstra que tanto o TLR-2 quanto a molécula adaptadora MyD88 desempenham um papel relevante no controle da infecção, assim como na indução da resposta imune contra este patógeno fúngico primário.

Palavras-chaves: Paracoccidioomicose. Imunidade Inata. Imunidade Adaptativa. Receptores Tipo Toll. Interleucina-17.

ABSTRACT

LOURES, F. V. **The pathogen recognition receptor TLR-2 and the adaptor protein MyD88 have an important role in the innate and adaptive immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** 2010. 134 p. Ph. D. Thesis (Doctor in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The immunological mechanisms that govern the interaction between hosts and the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* have been scarcely studied. Both, fungal and phagocyte receptors involved in this interaction are poorly understood. Based on these facts, the aim of our study was to characterize *in vitro* and *in vivo* the role played by Toll Like Receptor-2 (TLR-2) and the adaptor protein MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) in murine pulmonary paracoccidioidomycosis. The TLR-2 is a receptor of innate immunity involved in the recognition of PAMPs (pathogen associated molecular patterns), whereas MyD88 is a molecule involved in cell signaling induced by many TLRs. TLR-mediated activation results in the production of several nuclear transcription factors, including NFκB, which activate important genes of the inflammatory response. Wild-type (WT) besides TLR-2- and MyD88-deficient C57Bl/6 mice were used in our investigation. We showed that, compared to control animals, TLR2^{-/-} mice developed a less severe pulmonary infection associated with reduced synthesis of nitric oxide (NO). Equivalent results were obtained with *in vitro* infected peritoneal and alveolar macrophages. Unexpectedly, despite the differences in fungal loads, TLR-2^{-/-} and WT mice showed equivalent survival times and pulmonary lesions. Studies with lung infiltrating leukocytes revealed an increase of polymorphonuclear neutrophil leukocytes (PMNs) in TLR-2^{-/-} mice associated with a low number of activated T CD4 and T CD8⁺ lymphocytes. Compared with WT mice, the TLR-2-deficient mice showed slight differences in the production of pulmonary Th1 and Th2 cytokines, but presented higher levels of KC, a CXC chemokine involved in neutrophil chemotaxis, besides increased levels of Th17 cytokines (IL-6, IL-17, IL-23 and TGF-β). Furthermore, the prevalent Th17 immune response developed by TLR-2^{-/-} mice was associated with lower expansion of regulatory T cells CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Thus, TLR-2 controls the innate and adaptive immunity against the *P. brasiliensis* infection and negatively regulates Th17 immune response and pulmonary pathology.

Studies with MyD88-deficient mice showed an impaired production of NO *in vivo* and *in vitro*, and a deficient *in vivo* production of Th1, Th2 and Th17 cytokines. In addition, infected MyD88-deficient mice developed an impaired immune response, evidenced by poorly activated macrophages, as well as by an inefficient adaptive immunity mediated by a diminished influx of activated CD4⁺ T cells to the lungs. These events led to increased fungal loads in the lungs of MyD88-deficient mice and allowed a marked dissemination of the fungus to other organs such as liver and spleen, which presented severe lesions composed by coalescent granulomas containing high numbers of fungal cells. As consequence, MyD88-deficient mice were unable to control fungal growth and presented a decreased survival time. Our findings demonstrate that MyD88 signaling is important to the activation of fungicidal mechanisms and to the induction of the innate and adaptive immunity against *P. brasiliensis*. Altogether, our work shows that both TLR-2 and the adapter molecule MyD88, play an important role in controlling of *P. brasiliensis* infection, as well as in the induction of immune responses against this primary fungal pathogen.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Innate Immunity. Adaptive Immunity. Toll-Like Receptors. Interleukin 17.

FIGURAS

TLR2 na PCM

In vitro

Figura 01. Avaliação da atividade fagocítica.....	44
Figura 02. Avaliação da atividade fungicida de <i>Mo</i> peritoneais.....	44
Figura 03. Avaliação da atividade fungicida de <i>Mo</i> alveolares.....	45
Figura 04. Quantificação de NO em <i>Mo</i> peritoneais.....	46
Figura 05. Quantificação de NO em <i>Mo</i> alveolares.....	46
Figura 06. Quantificação de citocinas	48

In vivo

Figura 07. Avaliação do grau de infecção por UFC.....	49
Figura 08. Quantificação de NO	50
Figura 09. Avaliação da atividade fungicida de leucócitos PMNs alveolares.....	52
Figura 10. Avaliação da atividade fungicida de leucócitos PMNs peritoneais....	52
Figura 11. Caracterização morfológica por Citospim	54
Figura 12. Efeito da depleção de leucócitos PMN por UFC.....	57
Figura 13. Sobrevida em animais depletados de leucócitos PMNs	58
Figura 14. Quantificação de citocinas Th1	60
Figura 15. Quantificação de citocinas Th2	61
Figura 16. Quantificação de citocinas Th17	62
Figura 17. Quantificação da quimiocina KC.....	64
Figura 18. Quantificação da quimiocina MCP-1.....	64
Figura 19. Citometria de fluxo – macrófagos.....	66
Figura 20. Citometria de fluxo – linfócitos.....	67
Figura 21. Expressão de IL-17 em linfócitos T CD4	69
Figura 22. Expressão de IL-17 em linfócitos T CD8.....	70
Figura 23. Análise das células T reguladoras	71
Figura 24. Quantificação de anticorpos	72
Figura 25. Sobrevida	73
Figura 26. Histopatológico	74

MyD88 na PCM

In vitro

Figura 27. Avaliação da atividade fagocítica	76
Figura 28. Avaliação da atividade fungicida de <i>Mo</i> peritoneais.....	77
Figura 29. Quantificação de NO em <i>Mo</i> peritoneais	78

In vivo

Fase aguda

Figura 30. Avaliação do grau de infecção por UFC	80
Figura 31. Quantificação de NO.....	80
Figura 32. Quantificação de citocinas	81

Fase crônica

Figura 33. Avaliação do grau de infecção por UFC	82
Figura 34. Quantificação de NO	83
Figura 35. Quantificação de citocinas no pulmão.....	84
Figura 36. Quantificação de citocinas no fígado	85
Figura 37. Quantificação de citocinas no baço	85
Figura 38. Citometria de fluxo – macrófagos	87
Figura 39. Citometria de fluxo – linfócitos	87
Figura 40. Caracterização morfológica por Citospim	88
Figura 41. Análise das células T reguladoras	89
Figura 42. Sobrevida	90
Figura 43. Análise Histopatológica dos pulmões	92
Figura 44. Análise Histopatológica do fígado	94
Figura 45. Análise Histopatológica do baço	95

ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo Monoclonal
Ag	Antígeno
AP-1	“activator protein 1”
APC	Célula apresentadora de antígeno
BHI	“Brain Heart Infusion”
CARD9	“Caspase recruitment domain-containing protein 9”
CD11b	Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides
CD11c	Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides
CD4	Marcador da linfócito Th1/Th2/Th17, co-receptor para molécula MHC classe II
CD8	Marcador da linfócito T citotóxico, co-receptor para molécula MHC classe I
CD14	“Cluster” de diferenciação 14
CD25	Marcador de ativação de celular em linfócitos, cadeia α do receptor de IL-2
CD40	Molécula coestimuladora presente em macrófagos, células dendríticas, linfócito B, liga-se ao CD40
CD45RO	Isoforma do CD45
CD80	Molécula coestimuladora ou B7.1, presente em monócitos, liga-se ao CD28 e CTLA-4
CD86	Molécula coestimuladora ou B7.2, presente em monócitos e células dendríticas, liga-se ao CD28 e CTLA-4
CFA	“Cell-free antigen”
CTLA-4	“Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4”
CXC	Família de quimiocinas
DNA	Àcido desoxirribonucléico
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle's Médium”
D.O.	Densidade óptica
E.P.	Erro padrão
ELISA	“Ensyne-linked immunosorbent assay”

FACS	“Fluorescence-activated cell sorting”
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3	“Forkhead family os transcriptional regulator Foxp3”
FSC	“foward scatter”, tamanho celular
H₃PO₄	Ácido fosfórico
H&E	Hematoxilina e eosina
HTT	Hipersensibilidade do tipo tardio
GM-CSF	“Granulocyte macrophage colony-stimulating factor”
IFN-γ	“Interferon – γ ”
IFN-α	“Interferon – α ”
IFN-β	“Interferon – β ”
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G isótipo 1
IgG2a	Imunoglobulina G isótipo 2a
IgG2b	Imunoglobulina G isótipo 2b
IgG3	Imunoglobulina G isótipo 3
IgG4	Imunoglobulina G isótipo 4
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina I
IL-1α	Interleucina I α
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-1R	Receptor para IL-1
Toll/IL-1R8	Membro da família dos IL-1R, atua como regulador negativo da sinalização via TLR/IL-1R, também conhecido como TIR8
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17

IL-23	Interleucina 23
i.p.	Intraperitoneal
IP-10	“Interferon-inducible protein 10”
i.t.	Intratraqueal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KC	“Keratinocyte chemoattractant”
KO	“Knockout” ou deficiente
LBA	Lavado bronco-alveolar
LIP	Leucócitos infiltrante de pulmão
LP	Lavado peritoneal
LPS	Lipopolissacáride
MAL	“MyD88-adaptor-like protein”
mRNA	Ácido ribonucleíco mensageiro
MCP-1	“Monocyte chemoattractant protein-1”
MHC	“Major histocompatibility complex”
Mig	Quimiocina da família CXC
MIP-1α	“Macrophage inflammatory protein 1 alpha”
MIP-2	“Macrophage-inflammatory protein-2”
M\emptyset	Macrófago
MyD88	“Myeloid differentiation primary response gene (88)”
NF-κB	“Nuclear factor-kappa B”
NK	“Natural killer”
NO	“nitric oxide”
NOS2	“Nitric oxide synthase 2”
OPD	Ortofenilenodiamina
PAMP	“Pathogen-associated molecular patterns”
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb 18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> isolado 18
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Solução salina em tampão fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
PI	Iodeto de propídio
PMA	“Phobol 12-myristane 13-acetate”
PMN	Polimorfonucleares

PRR	“Pattern recognition receptor”
ROI	Radicais intermediários do oxigênio
SARM	“Sterile α - and armadillo-motif-containing protein”
SFB	Soro fetal bovino
SPF	“Specific pathogen free”
TCB	Tampão carbonato-bicarbonato
T CD4⁺	Linfócito T auxiliar
T CD8⁺	Linfócito T citotóxico
TIR	“Toll/interleukin-1 receptor-like domain”
TGF-β	“Transforming growth factor β ”
Th1	Linfócitos T “helper” classe 1
Th2	Linfócitos T “helper” classe 2
Th17	Linfócitos T “helper” classe 17
TLR	“Toll-Like receptor”
TLR-2	“Toll-Like receptor 2”
TLR-3	“Toll-Like receptor 3”
TLR-4	“Toll-Like receptor 4”
TLR-5	“Toll-Like receptor 5”
TLR-9	“Toll-Like receptor 9”
TNF-α	“Tumor necrosis factor α ”
Treg	Célula T reguladora
TRAM	“TRIF-related adaptor molecule”
TRIF	“TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ”
TRIS	“tris(hidroximetil)aminometano”
UFC	Unidade formadora de colônias
WT	“Wild Type”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Experimentos <i>in vitro</i>.....	34
3.1.1 Animais.....	34
3.1.2 Fungo.....	34
3.1.3 Lavado Peritoneal para obtenção de macrófagos.....	34
3.1.4 Lavado Peritoneal para obtenção de PMNs.....	35
3.1.5 Lavado Bronco alveolar.....	36
3.1.6 Tratamento com IFN-γ	36
3.1.7 Infecção dos macrófagos e leucócitos PMNs.....	37
3.1.8 Determinação de UFC	37
3.1.9 Fagocitose.....	37
3.1.9.1 Fagocitose por microscopia.....	37
3.1.9.2 Fagocitose por citometria de fluxo.....	38
3.1.10 Dosagem de NO.....	38
3.1.11 ELISA.....	38
3.2 Experimentos <i>in vivo</i>.....	39
3.2.1 Animais.....	39
3.2.2 Infecção intra-traqueal.....	39
3.2.3 Avaliação do grau de infecção.....	39
3.2.4 Avaliação do tempo de sobrevivência.....	39
3.2.5 Leucócitos Infiltrantes de Pulmão.....	39

3.2.6 Citometria de fluxo.....	40
3.2.7 Caracterização morfológica das suspensões celulares por citospim	40
3.2.8 ELISA.....	40
3.2.9 Dosagem de NO.....	41
3.2.10 Análise histopatológica.....	41
3.2.11 Depleção de Granulócitos.....	41
3.2.11.1 Depleção.....	41
3.2.11.2 Avaliação da depleção.....	41
3.2.11.3 Avaliação do tempo de sobrevivência.....	42
3.2.12 Dosagem de anticorpos.....	42
3.2.13 Análise estatística.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Estudo do TLR2 na paracoccidiodomicose pulmonar murina.....	43
4.1.1 Estudos <i>in vitro</i>	43
4.1.1.1 Fagocitose.....	43
4.1.1.2 Avaliação da atividade fungicida de macrófagos.....	43
4.1.1.3 Dosagem de NO.....	45
4.1.1.4 Produção de citocinas.....	47
4.1.2 Estudos <i>in vivo</i>	49
4.1.2.1 Avaliação do grau de infecção por UFC.....	49
4.1.2.2 Dosagem de NO.....	50
4.1.2.3 Avaliação da atividade fungicida de leucócitos PMNs	51
4.1.2.4 Caracterização morfológica das populações celulares	53
4.1.2.5 Estudo da depleção de leucócitos PMNs.....	55

4.1.2.5.1 Avaliação da depleção.....	55
4.1.2.5.2 Avaliação da carga fúngica por UFC.....	56
4.1.2.5.3 Tempo de sobrevivência.....	58
4.1.2.6 Produção de citocinas.....	59
4.1.2.7 Produção de quimiocinas.....	63
4.1.2.8 Citometria de fluxo.....	65
4.1.2.9 Caracterização intracelular de IL-17.....	68
4.1.2.10 Análise das células T reguladoras.....	71
4.1.2.11 Dosagem de anticorpos.....	72
4.1.2.12 Sobrevivência.....	73
4.1.2.13 Análise histopatológica.....	74
4.2 Estudo da molécula adaptadora Myd88 na PCM.....	75
4.2.1 Estudos <i>in vitro</i>	75
4.2.1.1 Fagocitose.....	75
4.2.1.2 Avaliação da atividade fungicida de macrófagos.....	77
4.2.1.3 Dosagem de NO.....	78
4.2.2 Estudos <i>in vivo</i>	79
4.2.2.1 Estudo da fase aguda.....	79
4.2.2.1.1 Avaliação do grau de infecção por UFC.....	79
4.2.2.1.2 Dosagem de NO.....	79
4.2.2.1.3 Dosagem de citocinas.....	81
4.2.2.2 Estudo da fase crônica.....	82
4.2.2.2.1 Avaliação do grau de infecção por UFC.....	82
4.2.2.2.2 Dosagem de NO.....	83
4.2.2.2.3 Dosagem de citocinas.....	84

4.2.2.2.4 Citometria de fluxo	86
4.2.2.2.5 Caracterização morfológica das populações celulares	88
4.2.2.2.6 Análise das células T reguladoras.....	89
4.2.2.2.7 Sobrevida.....	90
4.2.2.2.8 Análise histopatológica.....	91
5 DISCUSSÃO.....	96
6 CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXO A.....	132
ANEXO B.....	144
ANEXO C.....	158
ANEXO D.....	166

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, é uma micose sistêmica do homem e geograficamente está confinada à América Latina e Central (México). Sua área de endemicidade se estende da América Central à Argentina, afeta principalmente as comunidades rurais, sendo uma das micoses profundas de maior prevalência destas regiões. Foi estimado em uma região endêmica da América do Sul, onde vivem aproximadamente 90 milhões de pessoas, que 10 milhões estão em eminente risco de infecção. Não só a incidência é variável entre os países, mas também entre distintas regiões no mesmo país. Observa-se, por exemplo, um franco contraste entre uma incidência rara nas regiões áridas e semi-áridas do Nordeste do Brasil, ou ainda incomuns nas regiões superúmidas da Amazônia, *versus* a alta incidência nas regiões Centro e Sudeste do país (RESTREPO, 1985; RESTREPO et al., 2001). Há evidências, portanto, de condições ecológicas que favorecem a sobrevivência do fungo na natureza em regiões endêmicas. Entre essas condições podemos citar: temperatura média entre 17 °C e 24 °C, invernos relativamente curtos e não muito rigorosos, pluviosidade entre 500-2500 mm/ano, altitude entre o nível do mar e os 1500 m, solos férteis e com cobertura vegetal (RESTREPO, 1994).

O *P. brasiliensis* é um fungo com características de dimorfismo térmico, que cresce como micélio à temperatura de 25 °C e como célula leveduriforme no tecido e *in vitro* a 37 °C (RESTREPO, 1985). Segundo San Blas et al. (1980) a temperatura parece ser o único fator que interfere no dimorfismo do *P. brasiliensis* e este processo é reversível.

Estudo epidemiológico relata 3181 óbitos pela PCM no Brasil entre 1980 e 1995 e taxa de mortalidade média anual 1,45/milhão de habitantes. As regiões Sul e Centro-Oeste apresentam as maiores taxas de mortalidade regional. O Sudeste apresentou a taxa mais baixa e com tendência de queda. O trabalho apresenta dados que indicam a prevalência da doença em áreas rurais e mortalidade predominante no sexo masculino em uma proporção de 562 homens/100 mulheres (COUTINHO et al., 2002).

A infecção é usualmente adquirida pela via respiratória, muito provavelmente pela inalação de propágulos aéreos do fungo (conídios) que atingindo os pulmões podem desenvolver-se em leveduras e a partir do foco primário da infecção disseminar-

se pela via linfo-hematogênica para diferentes órgãos ou sistemas (RESTREPO, 1985). O desenvolvimento da PCM depende da interação entre o fungo e o hospedeiro, sendo a adesão às células e à superfície de mucosas do hospedeiro importantes no estabelecimento da infecção. Desta forma, o *P. brasiliensis* pode penetrar ativamente à superfície muco cutânea e parasitar as células epiteliais, escapando assim das defesas do hospedeiro e atingir os tecidos mais profundos pela via linfo-hematogênica (BRITO et al., 1973).

A PCM apresenta-se em diferentes formas no hospedeiro. A grande maioria dos indivíduos desenvolve infecção pulmonar assintomática, enquanto que alguns indivíduos apresentam manifestações clínicas da doença. As formas polares da PCM são a hiperérgica ou localizada e anérgica ou disseminada (MONTENEGRO e FRANCO, 1994). O curso da infecção depende de diversos fatores, como a resposta do hospedeiro, via de infecção e a virulência do agente infectante (BRUMMER et al., 1993).

Estudos recentes têm demonstrado que a resposta imune celular tem papel principal na defesa dos hospedeiros contra a infecção pelo *P. brasiliensis*, enquanto que as formas mais graves da doença estão associadas a níveis altos de anticorpos e ativação policlonal de linfócitos B (ARANGO et al., 1982; CASTANEDA et al., 1988; FAZIOLI, 1997). Estas características indicam que a resposta imune relacionada com a produção de anticorpos, tais como as respostas imunes governadas por linfócitos T-helper 2 (Th2), preferencialmente conduz para a doença mais grave e aquelas associadas com a ativação da imunidade celular, comandada pelos linfócitos T helper 1 (Th1), levam a uma patologia mais branda.

Trabalhos recentes têm demonstrado claramente que pacientes com a forma grave da PCM produzem níveis de IgE, IgG4 (regulados por IL-4) e IgA (regulada pelo TGF- β , IL-5 e IL-10) mais altos do que aqueles com a forma branda da doença (BAIDA et al., 1999; MAMONI et al., 2002). Além disso, a secreção de níveis mais altos de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-10) e TGF- β , bem como a presença de eosinofilia, foi detectada em pacientes com infecção mais disseminada do que aqueles com a doença menos grave (OLIVEIRA et al., 2002). Em pacientes com a doença ativa, foi encontrada diminuição na secreção de IFN- γ (KARHAWI et al., 1999) e o aumento da expressão de CTLA-4 em células mononucleares do sangue periférico, aumento este que pode estar relacionado com a anergia dos linfócitos T (CAMPANELLI et al., 2003).

Em conjunto, estes dados indicam um padrão de resposta imune Th1/Th2 na PCM, isto é, as células Th2 estão preferencialmente associadas com a doença progressiva e grave e as células Th1 associadas com a forma benigna da infecção. Alternativamente, a anergia de células T poderia ser a responsável pela resposta imune inadequada de pacientes com a forma grave.

Utilizando um modelo de infecção intraperitoneal (i.p.) de PCM, Calich et al., (1985) demonstraram que havia diferenças significantes entre resistência e susceptibilidade ao fungo, entre várias linhagens isogênicas de camundongo. Foram caracterizadas como as mais resistentes as linhagens A/Sn e A/J, enquanto que animais B10.A mostraram-se altamente susceptíveis à infecção pelo *P. brasiliensis*.

Estudos mais recentes desenvolvidos em nosso laboratório têm utilizado um modelo de PCM pulmonar empregando as mesmas linhagens de camundongos, utilizando, porém, a via intratraqueal (i.t.) de infecção. Foi observado que camundongos A/Sn desenvolvem PCM crônica, benigna e restrita aos pulmões. Animais B10.A desenvolvem doença disseminada e progressiva. Os resultados obtidos sugeriram que a resistência a PCM estava associada à atividade de linfócitos T, macrófagos e linfócitos mediados por IFN- γ (CANO et al., 1995). Estudos *in vivo* demonstraram ainda que o IFN- γ tem efeito protetor na PCM pulmonar. A depleção de IFN- γ por anticorpos monoclonais agravou a doença, tanto em animais susceptíveis, como em animais resistentes ao fungo. Nesses animais depletados houve aumento da carga fúngica pulmonar e anergia da resposta imune celular (CANO et al., 1998). Souto et al. (2000) ao estudarem o papel do IFN- γ e TNF- α na resistência à infecção, demonstraram que o IFN- γ atua no mecanismo de resistência à doença e induz a produção de NO que determina anergia de células T. Outros estudos revelam que a produção de quimiocinas e o recrutamento de leucócitos para os pulmões em camundongos infectados por *P. brasiliensis* são modulados por IFN- γ . Souto et al. (2003) evidenciaram isto ao estudar a produção de quimiocinas em camundongos C57Bl/6 comparados a animais da mesma linhagem, porém com o gene para IFN- γ nocauteado. Estes últimos produziram baixos níveis de quimioatraentes para células mononucleares como IP-10, Mig e MCP-1, e níveis altos de quimioatraentes de neutrófilos como KC e MIP-1 α .

Estudos realizados com o modelo intraperitoneal (i.p.) e com o modelo pulmonar da PCM demonstraram que a infecção pelo *P. brasiliensis* leva a diferentes graus de ativação macrofágica, que dependem do padrão genético da linhagem de

camundongo empregada (KASHINO et al., 1995). O óxido nítrico, um dos mais importantes intermediários reativos do nitrogênio, é um dos principais responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos. A enzima óxido-nítrico-sintetase induzida (iNOS ou NOS2) é a responsável pela produção de NO e está amplamente envolvida em processos inflamatórios e infecciosos (MACMICKING et al., 1997). Foi demonstrada a participação do NO em várias infecções por microrganismos, inclusive pelo *P. brasiliensis*. Bocca et al. (1988) demonstraram que o tratamento *in vivo* com um inibidor de NO agravava a doença em camundongos (C57Bl/6) infectados pelo *P. brasiliensis*, porém revertia a anergia dos linfócitos T a antígenos do fungo.

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) têm ação evidente na imunidade protetora de camundongos susceptíveis, embora protejam camundongos resistentes somente ao início da infecção. Fato interessante observado neste trabalho foi o de que a depleção de leucócitos PMN induzia doença muito grave nos camundongos susceptíveis em concomitância com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a atuação excessiva do sistema imune pode ser deletéria ao hospedeiro (PINA et al., 2006).

No nosso modelo experimental, várias observações indicam que o paradigma Th1/Th2 de ativação da resposta imune adaptativa não explica completamente os fenômenos de resistência e susceptibilidade ao fungo. Assim, a IL-4 é protetora para camundongos susceptíveis (ARRUDA et al., 2004), o tratamento com IL-12 exógena leva à menor disseminação do fungo, mas induz intensa patologia pulmonar associada com exuberante influxo de células inflamatórias (ARRUDA et al., 2002); a depleção de células T CD4⁺ não altera o curso da doença de camundongos susceptíveis (CHIARELLA et al., 2007) e a produção excessiva de óxido nítrico induz anergia da imunidade celular (NASCIMENTO et al., 2002).

Diferentemente do que se supunham na doença humana, experimentos de depleção *in vivo* e com camundongos nocaute (KO) para genes de subpopulações linfocitárias (CD4⁺ e CD8⁺) têm demonstrado que os linfócitos T CD8⁺ são fundamentais para o controle da PCM pulmonar e podem se apresentar sob os padrões do tipo 1 (secretor de IFN- γ) ou tipo 2 (secretor de IL-4) de ativação. Além disso, estes linfócitos parecem ser fundamentais para o controle da carga fúngica pulmonar (CALICH e BLOTTA, 2005; CHIARELLA et al., 2007; ARRUDA et al., 2007). Os linfócitos T CD4⁺ do tipo 1 são ativados ao início da resposta imune de camundongos resistentes que mais tardiamente ativam subpopulações Th2. Esta ativação parece contribuir para o padrão resistente, talvez regulando negativamente processo

inflamatório lesivo para tecidos do hospedeiro. A subpopulação T CD4⁺ de camundongos susceptíveis é completamente anérgica e a doença destes animais não se altera pela depleção seletiva de linfócitos T CD4⁺. Assim, em camundongos susceptíveis outros mecanismos imunorregulatórios parecem estar associados à susceptibilidade genética da doença. Neste aspecto, recentes trabalhos realizados com pacientes têm demonstrado que a imunossupressão na PCM está associada à expressão aumentada de moléculas CTLA-4 por linfócitos de pacientes (CAMPANELLI et al, 2003), à apoptose de células T (CACERE et al., 2002) e à ação de células T reguladoras de fenótipo T CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ (CAVASSANI, 2006).

Toll-Like Receptors (TLRs) são receptores recentemente descritos que reconhecem moléculas-padrão expressas por diversos patógenos. Estes receptores foram encontrados inicialmente em *Drosophila melanogaster* e denominados “Toll” e associados com a defesa contra parasitas. A seguir, foram descritos receptores homólogos em mamíferos e então denominados de “Toll-Like Receptors”. Hoje, conhecemos 13 famílias de TLRs e todos eles apresentam pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõe as proteínas que os formam. Devido estas diferenças, cada TLR é capaz de reconhecer classes diferentes de moléculas biológicas presentes em diversos microorganismos, como por exemplo, LPS, lipoproteínas, flagelina, peptidoglicana, DNA entre outras (TAKEDA et al., 2003; AKIRA et al., 2006).

Quando ativados, os TLRs desencadeiam uma sinalização intracelular que culmina com a ativação do macrófago e com a síntese de compostos que podem eliminar o patógeno; esta ativação pode ocorrer através da ativação do fator de transcrição NFκB ou do fator de transcrição AP-1, por exemplo; ambos ativam genes a produzir citocinas que estão ligadas à inflamação, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e IL-1, com a proliferação celular (IL-2) e a apoptose. A ativação final do NFκB pode ser desencadeada por um sinal proveniente de um TLR e a via de sinalização pode ser dependente ou independente da proteína adaptadora denominada Fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88). A sinalização MyD88-dependente é compartilhada por todos os TLRs, exceto o TLR-9. Se a via de ativação for independente de MyD88, o sinal proveniente do TLR ativa o NFκB através de outras duas moléculas adaptadoras como TRIF e TRAM, ou ainda MyD88 pode associar-se a outra proteína adaptadora como a MAL (ou TIRAP) para sinalizar a produção de NFκB. A TRIF é uma proteína adaptadora contendo o domínio TIR (domínio de

homologia ao receptor Toll/IL-1 induzindo IFN- β) e está ligada à sinalização via TLR-9; a via dependente de TRIF pode atuar também via outros fatores de transcrição, como o IRF3, IRF5 e IRF7, e estes culminam com a ativação dos genes que codificam IFN- α/β ; TRIF ainda pode associar-se com TRAM para desencadear a produção de NF κ B e IRF3, e este caso ocorre quando há ativação do TLR-4. Outra proteína adaptadora é a MAL, que é requisitada pela sinalização via TLR-2 e TLR-4 e atua ligada à proteína MyD88. Recentemente, uma quinta proteína adaptadora foi revelada, a SARM, e parece atuar como reguladora negativa da sinalização via TRIF (DOYLE et al., 2006; O'NEILL e BOWIE, 2007).

Diversos trabalhos vêm demonstrando a importância da proteína MyD88 no controle das infecções: Fremont et al., 2007 relataram que MyD88 é crucial para o controle do crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*. A produção de algumas citocinas como TNF- α , IL-6, e IL-12p40 foi observada em níveis menores em macrófagos provenientes de animais MyD88KO e infectados com a bactéria, quando comparado ao grupo controle. Além disso, camundongos deficientes e infectados com a bactéria apresentaram um tempo médio de sobrevivência consideravelmente menor que os animais controle. Campos et al. (2004) relataram que a proteína MyD88 é indispensável no controle de infecções por *Trypanosoma cruzi*. Camundongos MyD88KO infectados com o protozoário apresentaram uma alta parasitemia e acelerada mortalidade quando comparados ao grupo controle. A sinalização via MyD88 também está envolvida no controle de infecções virais, WIRTZ et al. (2005) relataram que o vírus Epstein-Barr ativa a produção de NF- κ B através do TLR-2 dependentemente de MyD88 e esta ativação é crucial para uma eficiente imunidade frente a este vírus.

Em infecções fúngicas Bretz et al., 2008 demonstraram que a sinalização via MyD88 é essencial para controle do crescimento do fungo *Aspergillus fumigatus*. A ausência desta proteína levou a menores níveis de IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e da quimiocina KC quando comparado ao grupo controle. Trabalhando com *Cândida albicans*, De Luca et al. (2007) demonstraram que a proteína MyD88 é essencial para atividade antiinflamatória exercida pelas células T reguladoras (Treg) no local da infecção. Em outro trabalho, Biondo et al. (2005) relataram que TLR-2 e MyD88 são essenciais na defesa contra o fungo *Cryptococcus neoformans*. Animais TLR-2 e MyD88KO apresentaram menores níveis de TNF- α , IL-12p40 e IFN- γ comparados aos animais controle em resposta à infecção pelo fungo. Além disso, animais MyD88KO

apresentaram alta mortalidade quando comparados aos animais controle e TLR-2KO em resposta à infecção pelo criptococcus.

Cada vez mais vem sendo demonstrada a importância dos receptores da família Toll-Like no reconhecimento de diversos patógenos. Este reconhecimento muitas vezes determina o curso da doença causada por bactérias, fungos, protozoários e vírus (NETEA et al., 2006; ROPERT et al., 2008; THOMPSON et al., 2008). Em trabalho pioneiro, Campos et al. (2001) sugerem que grupamentos glicosilfosfatidilinositol (GPI) isolados do protozoário *Trypanosoma cruzi* ativam a produção de IL-12, TNF- α e óxido nítrico (NO) por macrófagos de camundongos via TLR-2. Assim, a ativação do TLR-2 poderia iniciar um mecanismo de defesa inata e uma resposta inflamatória durante o processo de infecção pelo protozoário. THOMAS-USZYNSKI et al. (2001) demonstraram que lipoproteínas da bactéria causadora da tuberculose *Mycobacterium tuberculosis* ativam macrófagos de camundongos e humanos via TLR-2. Por outro lado, Campos et al. (2004) relatam que LPS derivado da bactéria *Brucella abortus* ativa macrófagos via TLR-4. Este fato foi facilmente demonstrado utilizando um camundongo que tem uma mutação no gene que codifica o TLR-4 (C3H/HeJ) e uma linhagem normal (C3H/HePas) que expressa o receptor inalterado. Macrófagos de ambas as linhagens foram desafiados com LPS, porém os deficientes para TLR-4 produziram níveis menores de IL-12 e TNF- α , o que sugere a participação do TLR-4 na imunomodulação dos macrófagos.

Em relação às infecções fúngicas diversos trabalhos vêm demonstrando a importância de diferentes TLRs na imunidade contra fungos, e, de modo geral TLR-2 e TLR-4 têm sido descritos como os mais importantes. Belochio et al. (2004) demonstraram que a resposta imune inata e adaptativa às infecções por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* é coordenada por diferentes TLRs, particularmente por TLR-2, TLR-4 e TLR-9. Neste trabalho, as diferentes formas do fungo, hifa e conídios, são reconhecidas por diferentes Tolls. Estes autores demonstraram também que a presença do TLR-2 e do TLR-9 levou a uma doença mais grave, com níveis altos TNF- α e de UFC em comparação com os observados nos camundongos TLR-2 KO e TLR-9 KO. Em outro trabalho com *Aspergillus fumigatus*, demonstrou-se que macrófagos peritoneais de camundongos deficientes para o TLR-4, quando estimulados com conídios do fungo, produzem menores níveis de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , comparando-se

com macrófagos provenientes de animais que expressam o TLR-4 funcional, (NETEA et al., 2003).

Viriyakosol et al. (2004) relataram que a ativação de macrófagos peritoneais por *Coccidioides posadasii* é dependente do TLR-2 e independente do TLR-4. Ao desafiar macrófagos de camundongos TLR-2 KO com o fungo, observaram níveis menores de TNF- α e MIP-2 em comparação àqueles produzidos por macrófagos de animais que apresentam o receptor funcional. Contudo, o mesmo desafio não resultou em diferenças na produção destas citocinas quando macrófagos de animais TLR-4 KO foram comparados a macrófagos de animais que apresentam o TLR-4 funcional.

Trabalhando com hifas e leveduras de *Cândida albicans* Gozalbo et al. (2006) demonstraram que TLR-4 e TLR-2 participam da defesa do hospedeiro frente a este fungo. Ambas as formas dos fungos foram capazes de ativar os receptores que são responsáveis pela ativação de macrófagos e produção de citocinas próinflamatórias como o TNF- α . Esta interpretação contrasta com os achados *in vivo* de Belochio et al. (2004), que demonstraram que a presença de TLR-2 leva a candidíase mais grave. Ao trabalhar com *Cryptococcus neoformans*, Biondo et al. (2005), demonstraram que MyD88, TLR-2 e não o TLR-4 são essenciais para defesa contra este fungo oportunista, e isso ocorre através da indução da produção de TNF- α , IL-12 e IFN- γ .

TLRs não são exclusivos das células da imunidade inata como os macrófagos e as células dendríticas, estão presentes também em células da imunidade adquirida, como os linfócitos T, contribuindo assim, na modulação deste tipo de imunidade adquirida. Células T naive apresentam baixos níveis de mRNA e de proteínas intracelulares para TLR-2 e TLR-4, porém células T de memória e ativadas expressam altos níveis de TLR-2 e TLR-4 expressos na membrana (LIU e ZHAO, 2007). Além disso, trabalhos recentes evidenciam que a sinalização via TLR-2 regula a expansão e função das células T reguladoras (Tregs) (STUMULLER et al., 2006; LIU e ZHAO, 2007). Para exemplificar, recentes estudos teorizaram que ligantes derivados de *Leishmania sp* podem induzir a expansão das Tregs contribuindo para a supressão da resposta imune contra o patógeno (SUFFIA et al., 2006; STUMULLER et al., 2006; STUMULLER et al., 2007).

Cada vez mais vem sendo descrito o papel dos TLRs na determinação da geração de um padrão de resposta imune. Dependendo do parasita e do receptor

envolvido, podemos observar um padrão de resposta Th1, Th2 e Th17. Trabalhando com células humanas, KATTAH et al. (2008) demonstraram que a ativação via TLR-4 e via TLR-7/8 ativam a produção de citocinas como IL-6, IL-23, TGF- β , e este conjunto de citocinas determinou, então, a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ naive em linfócitos TCD4⁺ Th17, com produção majoritária de IL-17. Os mesmos resultados não foram encontrados quando o grupo trabalhou com ativação via TLR-2, TLR-3 e TLR-9.

A IL-17 é uma citocina recentemente descrita e largamente produzida por uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ ativados; entretanto, a IL-17 é conhecida também por sua atividade reguladora da imunidade inata e na defesa contra parasitas. Uma das atividades reconhecidas da IL-17 é a mobilização de neutrófilos para sítios inflamatórios através da indução da produção de quimiocinas, como as CXC, quimiocinas cujas cisteínas terminais são espaçadas por um aminoácido e que têm ação preferencialmente sobre leucócitos PMN (KOLLS e LINDES, 2004; MIYAMOTO et al., 2003; STOCKINGER et al., 2007). A citocina IL-23, da mesma forma que a IL-12, é membro da família das citocinas proinflamatórias. Compartilham a cadeia peptídica p40, enquanto que as cadeias p35 e p19 são específicas da IL-12 e IL-23, respectivamente. Enquanto que ambas as citocinas induzem a produção de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺, a IL-23, embora não envolvida na diferenciação Th17, tem uma importante função na manutenção e na função efetora de células Th17 (BETTELLI, et al., 2006; STOCKINGER et al., 2007).

Trabalhos recentes têm demonstrado que as citocinas IL-17/IL-23 têm uma importante função na defesa contra fungos. Zelante et al. (2007) demonstraram que estas citocinas atuam como reguladores negativos da resposta Th1 promovida por fungos, particularmente *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Além disso, a IL-17 promove uma inflamação rica em neutrófilo, enquanto que a IL-23 regula a atividade fungicida destas células. Em adição, em recente trabalho, Bozza et al. (2008) demonstraram que a perda do Toll IL-1R8, que é um regulador negativo da sinalização via TLR/IL-1R, exacerba a resposta Th17 em resposta a infecções fúngicas.

Alguns trabalhos têm contribuído para elucidar o papel dos TLRs na paracoccidioomicose. Trabalhando com animais susceptíveis, Ferreira et al. (2007) verificaram um aumento da expressão de TLR-2 em resposta a infecção pelo *P. brasiliensis* em camundongos B10.A, caracterizando a interação fungo-TLR-2 como um possível mecanismo de susceptibilidade. Em elegante trabalho, os autores relataram que

a administração terapêutica de lectinas KM⁺ derivadas de *Artocarpus integrifolia* (jaca) em camundongos BALB/c, protege estes camundongos durante a infecção pelo *P. brasiliensis* através da produção de IL-12 via TLR-2 (COLTRI et al., 2008).

Em nosso grupo, trabalhando com animais TLR-4-deficientes, verificamos que macrófagos provenientes de animais TLR-4 deficientes e infectados *in vitro* com o fungo *P. brasiliensis*, apresentaram uma menor carga fúngica associada a menores níveis de NO, IL-12 e MCP-1 quando comparados a macrófagos provenientes de animais TLR-4 competentes. *In vivo*, a presença de TLR-4 levou a uma infecção mais severa, com maior carga fúngica pulmonar, maior afluxo de macrófagos e linfócitos TCD4 e TCD8 ativados para o local da infecção. Observamos também que a presença do TLR-4 modulou a síntese de algumas citocinas, as Th1 (IL-12, TNF- α) e Th17 (IL-17, IL-6, TGF- β , e IL-23) que foram secretadas em maiores níveis por animais TLR-4 competentes, indicando um importante papel do TLR-4 na ativação e modulação de subpopulações de linfócitos T (LOURES et al., 2010).

2 OBJETIVOS

Estudar *in vitro* o envolvimento do TLR-2 e da proteína MYD88 na interação entre macrófagos de camundongos e o *P. brasiliensis*. Para tanto foram usados macrófagos de camundongos TLR-2/KO e MYD88/KO e controles normais da linhagem C57Bl/6. Nestes ensaios foram caracterizadas a fagocitose, a atividade fungicida, e a secretora de NO e de citocinas.

Investigar o papel do TLR-2 e da proteína MYD88 na infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*. Estudamos comparativamente o grau de infecção em camundongos deficientes e normais (TLR-2/KO, MYD88/KO e C57Bl/6 normais, respectivamente). Além do grau de infecção determinado pela contagem do número de fungos viáveis nos pulmões, baço e fígado, histopatologia e tempo de sobrevivência, foram também caracterizadas a imunidade humoral (dosagem de anticorpos) e celular (caracterização das subpopulações celulares infiltrantes no pulmão). As citocinas e quimiocinas foram dosadas em homogenatos de órgãos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos *in vitro*:

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos nocaute para o TLR-2 e para a proteína MyD88, assim como camundongos controle, todos da linhagem C57Bl/6. Estes animais foram uma gentil doação do Prof. Shizuo Akira, da Universidade de Osaka, Japão. Todos os camundongos tinham a condição de SPF (*Specific Pathogen Free*) e foram criados no Biotério do Departamento de Imunologia do ICB-USP. Os camundongos foram utilizados ao atingirem 6 a 8 semanas de idade. Para induzir em cada camundongo o afluxo de células, foram injetados 3 mL de meio Tioglicolato Brewer (DIFCO) 72 horas antes da lavagem do peritônio para a obtenção das células inflamatórias.

3.1.2 Fungo

Foi utilizado o isolado Pb 18 (virulento) do *P. brasiliensis*, (KASHINO, 1985). O fungo foi mantido em meio sólido de Fava Netto (FAVA NETTO, 1955) a 36 °C, por repiques semanais. Suspensões celulares foram obtidas na fase exponencial de crescimento leveduriforme, ou seja, após uma semana de cultivo, e lavadas três vezes em solução salina estéril. A concentração de células fúngicas foi ajustada após contagem em câmara hemocitométrica (Neubauer). A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando o corante Janus Green, e a viabilidade foi sempre superior a 85%. Para obtenção de leveduras não viáveis do fungo, suspensões fúngicas foram deixadas a 56 °C por 1 hora.

3.1.3 Lavado peritoneal para obtenção de macrófagos

Camundongos pré-inoculados com tioglicolato foram submetidos a um processo de obtenção de lavado peritoneal (LP). Para isto, os animais foram sacrificados por excesso do anestésico e o peritônio foi lavado com injeção de 5-6 mL de PBS estéril ou meio de cultura não suplementado (DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando o corante Trypan Blue, e foi usada sempre que superior a 85%. As suspensões celulares foram mantidas

em gelo para contagem diferencial de células e então centrifugadas a 1200 rpm, a 4°C por 10 minutos e ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

As células do LP foram ajustadas para 2×10^6 /mL e utilizadas nos ensaios de atividade fungicida, produção de citocinas e NO. Um volume de 500 μ L de células foi dispensado em cada poço de placas de cultivo de 24 poços. As culturas foram incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% CO₂ por duas horas. As células não aderentes foram removidas por aspiração e a monocamada aderente foi lavada com o meio de cultura não suplementado. O número de células não aderentes foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica, sendo subtraído do número de células peritoneais incubadas.

3.1.4 Lavado peritoneal para obtenção de leucócitos PMN

Camundongos pré-inoculados pela via i.p. com uma solução de 500 μ L de PBS contendo 1×10^7 leveduras não viáveis do *P. brasiliensis* foram submetidos a um processo de obtenção de lavado peritoneal (LP) 6 horas após a inoculação das leveduras não viáveis, como descrito no item 1.3.

As células do LP foram colocadas em placas de cultura de 24 poços e incubadas por 1 hora a 37 °C em estufa contendo 5% CO₂. As células não aderentes foram ajustadas para 1×10^6 /mL e utilizadas nos ensaios de atividade fungicida. Um volume de 200 μ L (2×10^5) de células foi dispensado em cada poço de placas de cultivo de 96 poços.

3.1.5 Lavado bronco alveolar para obtenção de macrófagos e leucócitos PMN

Um grupo de animais foi infectado pelo fungo *P. brasiliensis* (1×10^6 /animal) e após duas semanas de infecção submetido ao lavado bronco alveolar (LBA). Os animais foram sacrificados e dissecados, a cavidade torácica aberta e a traquéia cateterizada. Os pulmões foram então lavados com injeções de 1 mL de meio DMEM.

A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando o corante Trypan Blue, e foi usada sempre que superior a 85%. As suspensões celulares foram mantidas

em gelo para contagem diferencial de células e então centrifugadas a 1200 rpm, a 4°C por 10 minutos e ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Para obtenção de leucócitos PMN, as células provenientes do LBA foram despejadas em placas de cultura de 24 poços e incubadas a 37°C em estufa contendo 5 % CO₂ por uma hora. As células não aderentes, contendo os leucócitos PMNs, foram ajustadas para 1x10⁶/mL e utilizadas nos ensaios de atividade fungicida. Para tanto, um volume de 200µL (2x10⁵ células) da suspensão celular foi despejado em placas de cultura de 96 poços.

Para obtenção dos macrófagos alveolares, outro grupo de células obtidas do LBA foi diretamente ajustado para 2x10⁶ /mL e utilizadas nos ensaios de atividade fungicida, produção de citocinas e NO. Neste caso, um volume de 500 µL de células foi dispensado em cada poço de placas de cultivo de 24 poços. As culturas foram incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% CO₂ por duas horas. As células não aderentes foram removidas por aspiração e a monocamada aderente foi lavada com o meio de cultura não suplementado. O número de células não aderentes foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica, sendo subtraído do número de células alveolares incubadas.

3.1.6 Tratamento das culturas de macrófagos por IFN-γ

Monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos foram incubadas durante a noite a 37 °C em estufa de CO₂ tendo sido tratadas previamente com 500 µL de meio de cultura suplementado contendo IFN-γ (20.000 pg/mL – BD-Biosciences).

3.1.7 Infecção dos macrófagos e leucócitos PMNs

As leveduras de Pb foram suspensas em 2 mL de DMEM. Os macrófagos foram infectados com a suspensão de leveduras, em uma relação levedura-macrófago de 1:50 (CANO et al., 1992, 1994). Foi realizado o co-cultivo por 2 horas, as culturas foram lavadas e novamente incubadas por 48 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e armazenados a – 70 °C para determinar a presença de NO e citocinas.

A cultura de leucócitos PMNs foi infectada com o fungo em uma relação levedura-PMN de 1:2. Foi realizado o co-cultivo por 1 hora a 37 °C em estufa contendo 5% CO₂.

3.1.8 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após o co-cultivo de macrófagos e fungos a 37 °C em estufa contendo 5% CO₂, o sobrenadante foi retirado e as monocamadas foram tratadas por duas ou três vezes com água destilada para lisar os macrófagos. O material de cada lavagem foi recolhido em tubos FALCON de 25mL, um para cada poço da placa. Este material foi centrifugado, ressuspensão em 1mL de DMEM e a suspensão obtida plaqueada (100 µL/placa) em meio Brain Heart Infusion (BHI) com 5% de “fator de crescimento do fungo” e 4% de soro equino, especial para recuperação de *P. brasiliensis* viáveis (SINGERS-VERMES et al., 1992). Para a cultura de PMNs, 100µL do co-cultivo foi plaqueada em meio BHI. As placas foram incubadas a 37 °C e as colônias contadas diariamente até que nenhum aumento em UFC fosse observado.

3.1.9 Fagocitose

3.1.9.1 Ensaio da fagocitose por microscopia – TLR-2

Para o ensaio de fagocitose foram realizados experimentos seguindo a técnica descritas nos itens 3.1.3, 3.1.6 e 3.1.7; contudo, o cultivo de macrófagos foi realizado sobre lamínulas redondas em placas de cultura de 24 poços e utilizamos uma relação levedura-macrófago de 1:50. Após de 4h de infecção com o fungo o sobrenadante foi removido, incluindo as leveduras não aderidas ou não fagocitadas e as lamínulas foram coradas com HE (Hematoxilina e Eosina - Newprov). Uma média de 1000 macrófagos foi contada para determinar a porcentagem de células com fungos aderidos e/ou fagocitados. Usamos este critério em função do tamanho e aspecto morfológico do fungo que muitas vezes impede a correta discriminação entre fungos aderidos e aqueles internalizados (CALICH et al., 1979).

3.1.9.2 Ensaio da fagocitose por citometria de fluxo – MyD88

Para o ensaio de fagocitose por citometria de fluxo foram realizados experimentos seguindo a técnica descritas nos itens 3.1.3, 3.1.6 e 3.1.7. O cultivo de macrófagos foi realizado placas de cultura de 24 poços e utilizamos uma relação levedura-macrófago de 1:1. A infecção foi realizada com leveduras não viáveis do

fungo previamente marcadas com iodeto de propídio (PI). Para marcação do fungo utilizamos 100 µg de PI (Sigma) para cada 1 mL de suspensão fúngica contendo 1×10^6 leveduras de acordo com a técnica descrita por HATANO et al. (2009). Após 2 horas de infecção o sobrenadante foi removido, incluindo as leveduras não aderidas ou não fagocitadas. Após este período as células foram recolhidas das placas de 24 poços, ajustadas em 1×10^6 /mL e marcadas com anti-CD11b (FITC). A leitura foi realizada imediatamente após a marcação no FACsCalibur (BD Bioscience).

3.1.10 Dosagem de NO

A concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foi medida com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diidrocloreto de naftiletenodiamina, 2,5% H_3PO_4), sendo utilizado um volume de 50 µL do sobrenadante da cultura e igual volume do reagente de Griess. Foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e então determinada a absorbância em equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 (450nm). A concentração de óxido nítrico foi determinada utilizando-se curva padrão padronizada com diferentes concentrações de nitrito de sódio (DING et al., 1988).

3.1.11 Dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA

A dosagem de citocinas (TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10) e da quimiocina (MCP-1) foi realizada no sobrenadante de macrófagos peritoneais. A presença e concentração das citocinas foram determinadas por testes ELISA, segundo metodologia sugerida pelo fabricante (BD Biosciences). A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 2N. A leitura das densidades ópticas foi feita a 450 nm.

3.2 Experimentos *in vivo*

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 normais e animais nocaute para o TLR-2 e para proteína MyD88. Todos os camundongos tinham a condição de SPF (*Specific Pathogen Free*) e foram criados no Biotério do Departamento de Imunologia do ICB-USP. Foram utilizados ao atingirem 6 a 8 semanas de idade.

3.2.2 Infecção intratraqueal (i.t.)

Os animais foram infectados por administração i.t. de 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50 μ l de PBS. O procedimento foi realizado com os animais sob anestesia como previamente descrito por Cano et al. (1995).

3.2.3 Avaliação do grau de infecção através da determinação de UFC

O grau da infecção foi avaliado em todos os animais através da recuperação de fungos viáveis do pulmão, fígado e baço, após 48h, 2 e 11 semanas após a infecção para os experimentos com TLR-2 e após 48h e 8 semanas para o estudo da proteína MyD88. Usamos meio BHI suplementado da mesma forma que o experimento *in vitro*.

3.2.4 Avaliação do tempo de sobrevivência

Grupos de 8-12 animais foram infectados com *P. brasiliensis* via i.t. e foram acompanhados quanto ao tempo de sobrevivência.

3.2.5 Preparo de suspensões de Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP)

As suspensões celulares de linfócitos infiltrantes de pulmão foram preparadas de acordo com Huffnagle et al. (1991). Os pulmões foram removidos e digeridos por 60 minutos em tampão de digestão contendo colagenase (1mg/mL) e DNase (30 μ g/mL). Os linfócitos foram isolados por centrifugação em Percoll – 20% (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). As células foram contadas e a viabilidade determinada pela marcação de azul de Trypan. Os eritrócitos foram lisados com tampão de lise (cloreto de amônio + TRIS) antes da marcação celular.

3.2.6 Citometria de fluxo para caracterização de subpopulações celulares e citocinas intracelulares

Células infiltrantes dos pulmões (CANO et al., 2000) foram obtidas nas segunda e décima semanas após infecção. A concentração celular foi ajustada, e os linfócitos foram adicionados à placas de fundo em U na quantidade de 1×10^6 cels/poço. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS-azida (0,1%) contendo soro fetal bovino (SFB, 5%). As placas foram centrifugadas, os sobrenadantes foram dispensados e o Ac

marcado (20 µL no título adequado) foi adicionado. Após incubação por 20 minutos em geladeira, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS-azida e transferidas para tubos de leitura de FACS. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo e protegidas da luz. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton-Dickison). Foram usados anticorpos marcados com isotiocinado de fluoresceína, ficoeritrina ou outro fluorocromo (BD Biosciences) na combinação adequada para a população celular a ser analisada (marcadores celulares de linfócitos: anti- CD4, CD8, CD69, CD25, Foxp3, IL-17 e marcadores celulares de macrófagos: CD11b, CD40, CD80, CD86 e MCH-II).

Para determinação dos níveis intracelulares de Foxp3 e de IL-17 as células foram tratadas com Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) para alterar a permeabilidade da membrana e o anticorpo poder fazer a marcação intracitoplasmática. Para dosagem de IL-17 intracelular as células foram tratadas com meio contendo 50ng/mL de Phorbol 12-myristate 13-acetato (PMA), 500ng/mL de Ionomicina (Sigma) e com Monensina (3mM, eBioscience) por 6 horas, antes da marcação.

3.2.7 Caracterização morfológica das populações celulares por citocentrifugação

Para contagem diferencial, amostras da suspensão celular obtida de acordo com a técnica descrita no item 2.5. A concentração celular foi ajustada a 1×10^5 células em 100 µL de meio RPMI e centrifugadas em Cytospin (Shandon Cytospin, Pittsburgh, Pa.). As lâminas foram coradas com corante HE e um total de 200 a 400 células foram contadas em cada amostra.

3.2.8 Dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA nos homogenatos de pulmão

A dosagem de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IL-23, IL-12, IL-6 e TGF- β) foi realizada no sobrenadante dos macerados dos órgãos utilizados na determinação de UFC dos animais, assim como a dosagem das quimiocinas MCP-1 e KC. A presença e concentração das citocinas foram determinadas por testes de ELISA de captura, segundo metodologia sugerida pelo fabricante (BD Biosciences, eBiosciences ou IBL). A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 2N. A leitura das densidades ópticas foi feita a 450 nm.

3.2.9 Dosagem de NO

A concentração de nitritos no homogenatos de órgãos e sobrenadante foi utilizada como indicadora de síntese de NO através do reativo de Griess, seguindo a mesma técnica descrita para o experimento *in vitro*.

3.2.10 Análise histopatológica

Após 8 ou 11 semanas de infecção o pulmão esquerdo de cada camundongo foi removido e fixado em 10% de formalina e embebido em parafina. Secções (5µm) foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise das lesões e com a coloração Grocott para visualizar os fungos. A patologia foi qualitativamente avaliada em relação à formação de granulomas, densidade de células inflamatórias e organização da lesão.

3. 2.11 Depleção de Granulócitos

3.2.11.1 Depleção

Camundongos deficientes e normais para o TLR-2 foram depletados de granulócitos através da inoculação do anticorpo monoclonal anti-PMN (clone RB6-8C5) purificado (250µg/camundongo) gentilmente cedido pelo Dr. Júlio Scharfstein da Universidade Federal do Rio de Janeiro e pela Dra. Ises de Almeida Abrahamsohn do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O anticorpo foi inoculado pela via i.p. 24 horas antes da inoculação i.t. com o fungo. A depleção foi repetida nos dias 2 e 5 após a infecção.

Os animais controle foram inoculados com IgG normal de rato nos mesmo dias e na mesma concentração protéica do anticorpo monoclonal.

3.2.11.2 Avaliação da depleção de leucócitos PMNs

O número de leucócitos PMN foi avaliado antes do tratamento (tempo -1) e 24 horas após a inoculação do AcM, imediatamente antes da inoculação de leveduras do *P. brasiliensis* (tempo zero). Foi coletado o sangue da cauda de camundongos de ambas as linhagens, para contagem total e diferencial dos leucócitos. A contagem global foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial foi feita em esfregaço corada com HE (Hematoxilina e Eosina - Newprov).

3.2.11.3 Avaliação do tempo de sobrevivência

Grupos de 8 animais depletados e não depletados de PMN foram infectados com *P. brasiliensis* via i.t. e foram acompanhados quanto ao tempo de sobrevivência. As mortes foram registradas diariamente.

3.2.12 Determinação do nível de anticorpos específicos

Para determinar a resposta imune humoral dos animais infectados intratraquealmente com leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, amostras de sangue foram obtidas nos diversos camundongos. Os anticorpos totais específicos anti-*P. brasiliensis* e seus isótipos IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram detectados pelo método imunoenzimático (ELISA) previamente preconizado para este sistema antígeno-anticorpo por Mendes-Giannini et al., 1984 e modificado por Vaz et al., 1998.

3.2.13 Análise estatística

Os grupos tratados e não tratados foram analisados pelo teste *t* de Student ou análise de variância, dependendo do número de grupos. A mortalidade foi avaliada pelo teste *U* de Mann-Whitney. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo do receptor TLR-2 na paracoccidioidomicose pulmonar murina.

4.1.1 *In vitro*

4.1.1.1 Ensaio da Fagocitose

Os macrófagos peritoneais de animais TLR-2^{-/-} e WT foram infectados com leveduras viáveis do fungo (relação Pb/MØ de 1/25) sobre lamínulas redondas em placa de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação a 37 °C em estufa contendo 5% de CO² o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram coradas e examinadas ao microscópio óptico comum. Uma média de 1000 macrófagos foi contada em cada lamínula para determinar o número de fungos aderidos e/ou ingeridos após as 4 horas de incubação. Os resultados expressos na figura 1 mostram que macrófagos de animais que expressam o TLR-2 normal têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras do *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de animais TLR-2^{-/-}. O fenômeno também ocorreu quando as culturas foram pré-tratadas com IFN- γ (20.000 pg/mL), porém, neste caso, a diferença não foi estatisticamente significativa.

4.1.1.2 Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais e alveolares através da determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A figura 2 mostra um número menor de fungos recuperados nas culturas de macrófagos peritoneais dos camundongos deficientes quanto à expressão do TLR-2. O mesmo aconteceu quando os macrófagos foram pré-ativados com IFN- γ (20.000 pg/mL). Resultados semelhantes foram obtidos quando utilizamos macrófagos alveolares (figura 03).

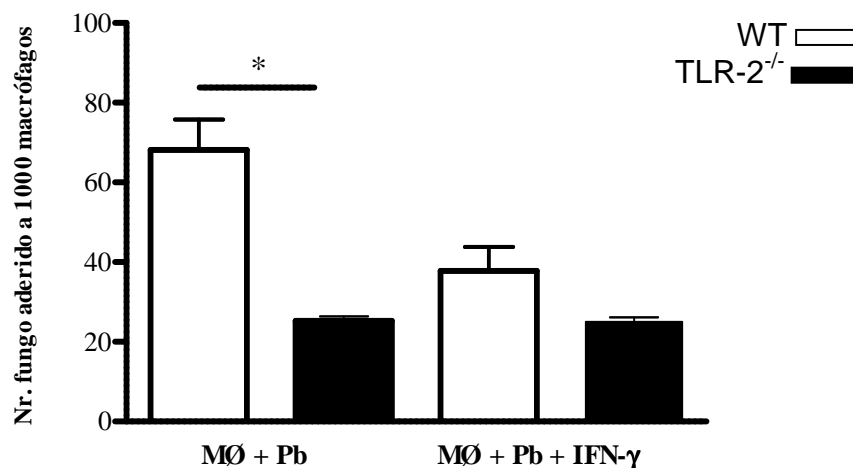


Figura 1. Avaliação de atividade fagocítica de macrófagos de animais normais e deficientes para o TLR-2. Os macrófagos peritoneais de animais TLR-2^{-/-} e WT (1x10⁶ células/poço) ativados ou não com IFN-γ (20.000 pg/mL) foram co-cultivados com leveduras viáveis do *P. brasiliensis* em uma relação fungo/MØ de 1:50 sobre lamínulas redondas em uma placa de cultura de 24 poços. Após 4 horas de incubação o sobrenadante do cultivo foi desprezado e as lamínulas foram coradas e examinadas em microscópio óptico. Uma média de 1000 MØ foi contada e analisada o número de MØ com leveduras aderidas e/ou ingeridas. As barras representam as médias ± EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (*P< 0,05).

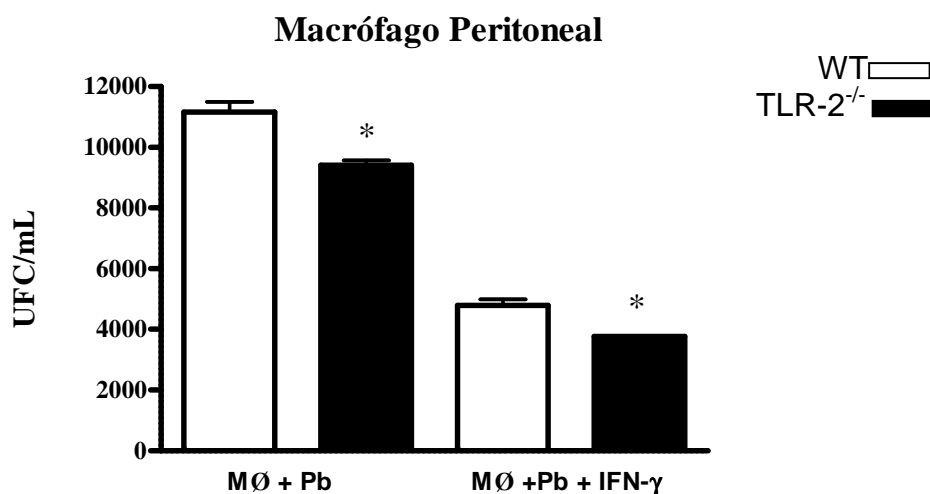


Figura 2. Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL após 48h de co-cultivo. As monocamadas de macrófagos de ambas as linhagens foram tratadas ou não com IFN-γ (20.000pg/mL) e infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 50 macrófagos após 24h. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*P< 0,05).

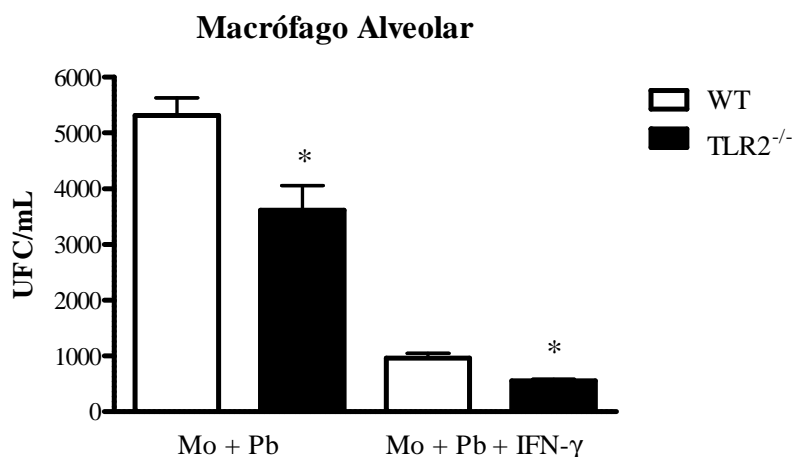


Figura 3. Avaliação da atividade fungicida de macrófagos alveolares através da recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL após 48h de co-cultivo. As monocamadas de macrófagos de ambas as linhagens foram tratadas ou não com IFN- γ (20.000pg/mL) e infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 50 macrófagos após 24h. As barras representam as médias \pm EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$).

4.1.1.3 Dosagem de NO

A figura 4 mostra que macrófagos provenientes de camundongos deficientes para o TLR-2 produziram concentrações menores de NO em comparação com os camundongos selvagens. Isso ocorreu tanto nos grupos de macrófagos apenas tratados com IFN- γ , quanto nos grupos tratados com IFN- γ e infectados com o fungo. Além disso, a adição de *P. brasiliensis* levou a um aumento significativo na síntese de NO quando comparamos com o grupo que não recebeu o fungo. Nos grupos de macrófagos sem tratamento e nos grupos apenas infectados com o fungo, não houve produção de NO em ambas as linhagens estudadas (dados não mostrados). Para ambas as linhagens a adição de IFN- γ levou a menor recuperação de fungos e maior síntese de NO. Assim, pode-se sugerir que o TLR-2 é um dos receptores envolvidos no reconhecimento do *P. brasiliensis* por parte dos macrófagos peritoneais e é capaz de desencadear a síntese de NO. Contudo, é conveniente ressaltar que em animais WT, que produziram maiores concentrações de NO, recuperamos um número maior de fungos, comparando-se com os camundongos TLR-2^{-/-}. Mais uma vez, obtivemos resultados semelhantes quando trabalhamos com macrófagos alveolares (figura 05).

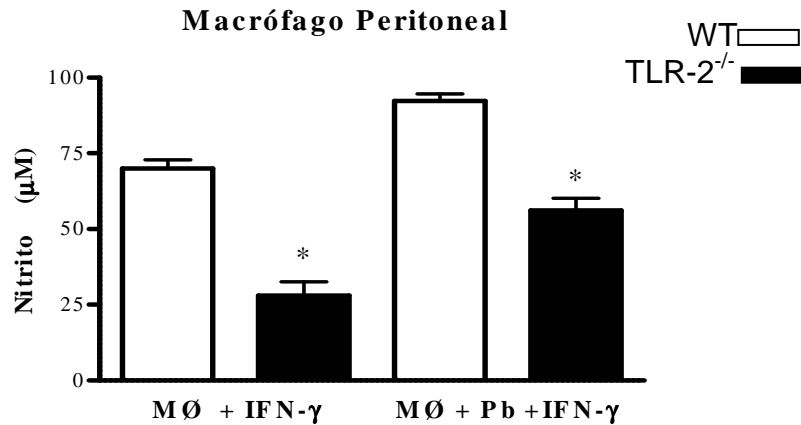


Figura 4. Quantificação de NO no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de animais TLR-2^{-/-} e WT. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN-γ (20.000pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 50 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de NO foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle de macrófagos foi mantido sem tratamento, onde não houve produção de NO. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P<0,05).

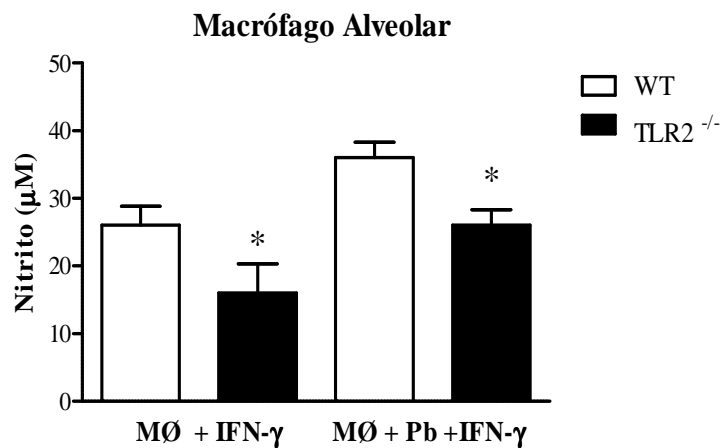


Figura 5. Quantificação de NO no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares de animais TLR-2^{-/-} e WT. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN-γ (20.000pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 50 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de NO foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle de macrófagos foi mantido sem tratamento, onde não houve produção de NO. Os dados representam a média ± EP de 5 poços por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P<0,05).

4.1.1.4 Produção de citocinas

A produção de IL-10 foi menor nas culturas de macrófagos provenientes de animais que não expressam o TLR-2, e o mesmo fenômeno permaneceu quando os macrófagos destes animais foram estimulados com IFN- γ , como demonstrado na figura 6. A produção de IL-10 foi ausente para as duas linhagens no grupo controle onde havia apenas macrófagos na cultura ou macrófagos pré-ativados com IFN- γ .

Da mesma forma que para a citocina antiinflamatória IL-10, a produção da quimiocina MCP-1 apresentou-se em concentrações baixas nas culturas de macrófagos de animais TLR-2 deficientes, comparando-se com a produção de macrófagos provenientes de animais TLR-2 normais. A produção deste mediador foi maior quando os macrófagos foram apenas desafiados pelo fungo, comparando-se quando foram pré-ativados com IFN- γ e desafiados pelo *P. brasiliensis*.

Não houve diferença na produção de IL-12 e de TNF- α nas culturas de macrófagos de ambos os grupos estudados. Em relação à citocina IL-6, observamos níveis maiores nas culturas de macrófagos provenientes de animais TLR-2 normais no grupo controle, ou seja, apenas macrófagos na cultura (dados não mostrados). Quando as culturas foram infectadas com o *P. brasiliensis* os níveis de IL-6 foram maiores e os animais TLR-2 normais continuaram a produzir níveis maiores desta citocinas quando comparados aos animais TLR-2^{-/-}. Entretanto, se a cultura foi antes primada com IFN- γ o mesmo fenômeno não ocorreu Assim, pode-se sugerir que o Toll-Like receptor 2 é um dos receptores envolvidos no reconhecimento do *P. brasiliensis* por parte dos macrófagos peritoneais e alveolares e é capaz de desencadear a síntese de citocinas.

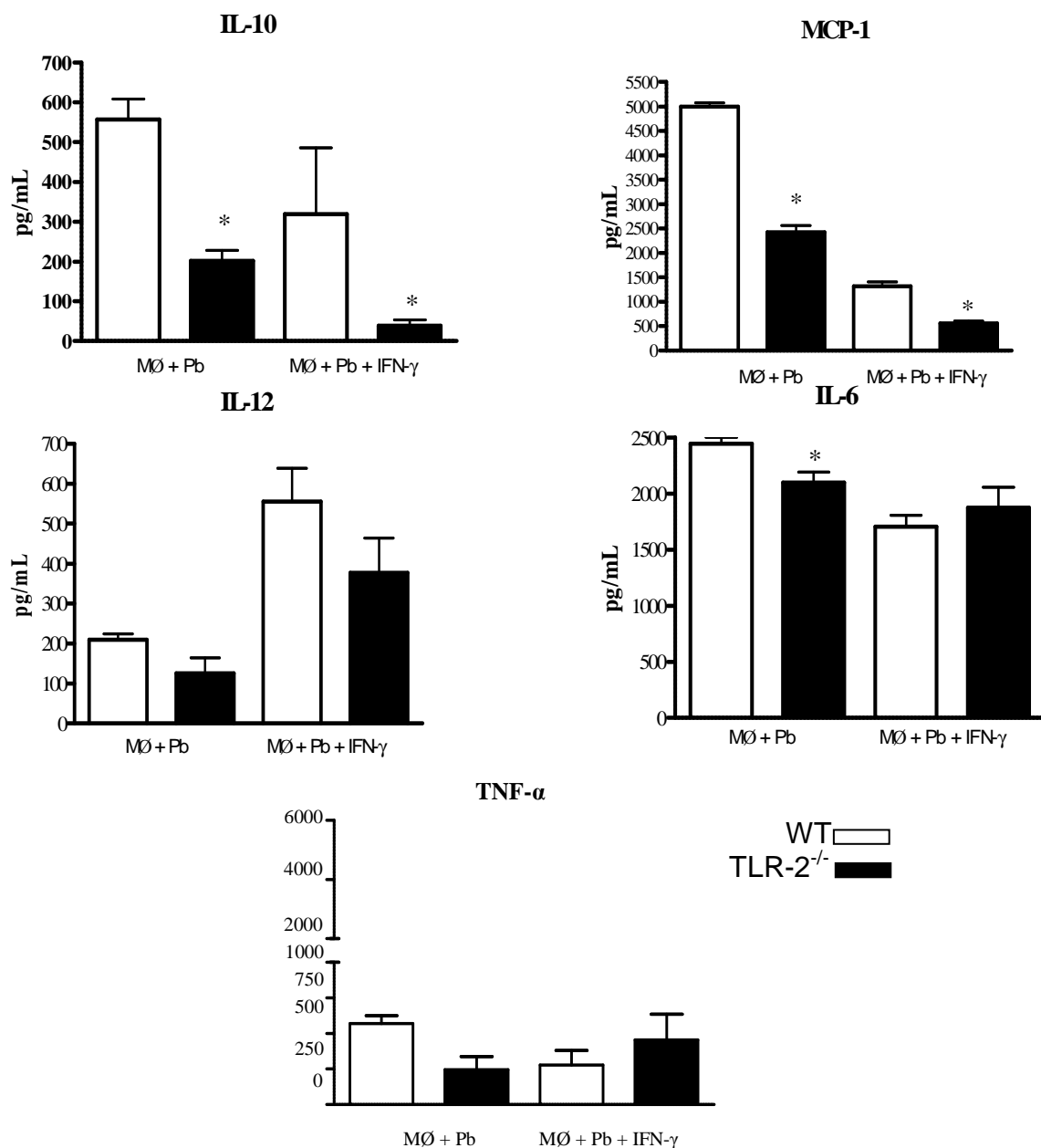


Figura 6. Quantificação de IL-10, MCP-1, IL-12, TNF- α e IL-6 na de cultura de macrófagos peritoneais de animais normais e deficientes para o TLR-2. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 50 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de citocinas foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle de macrófagos foi mantido sem tratamento. Os dados representam a média \pm EP de 5 poços por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes (* P<0,05).

4.1.2 Experimentos *in vivo*

4.1.2.1 Avaliação do grau de infecção através de UFC obtidas do macerado de pulmão

A figura 7 mostra a média de UFC/g de tecido (\log_{10}) no pulmão dos animais TLR-2^{-/-} e WT obtidos após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção. Observamos que em todos os tempos de infecção houve diferença no controle da carga fúngica entre as duas linhagens: houve um maior número de fungos recuperados a partir do macerado do pulmão dos animais que possuem o TLR-2 funcional. Não houve disseminação para fígado e baço em 48 horas e em 2 semanas de infecção. Entretanto houve uma pequena disseminação para o baço após 11 semanas de infecção, porém sem diferença estatística entre os grupos estudados (dados não apresentados).

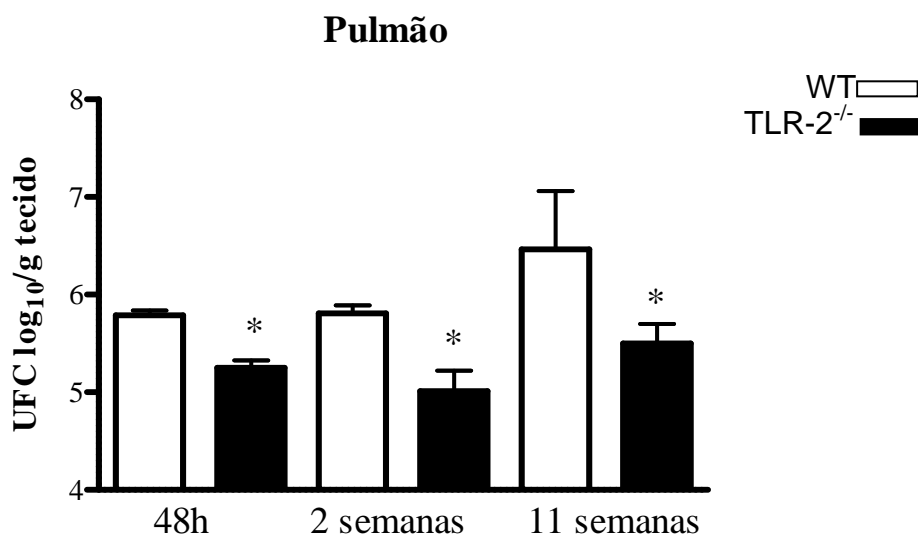


Figura 7. Avaliação do grau de infecção através de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os camundongos TLR-2^{-/-} e WT foram infectados com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. O grau de infecção foi determinado após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção pela contagem de UFC. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significante (* $P < 0,05$).

4.1.2.2 Dosagem de NO

Na figura 8 temos a quantificação de NO presente no macerado dos pulmões dos animais TLR-2^{-/-} e WT após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção. A dosagem foi feita imediatamente após a coleta do sobrenadante do macerado. A concentração de NO encontrada foi maior no grupo de animais que expressa o TLR-2 comparando-se com o grupo que não apresenta o receptor. O fenômeno ocorreu em todos os tempos de infecção.

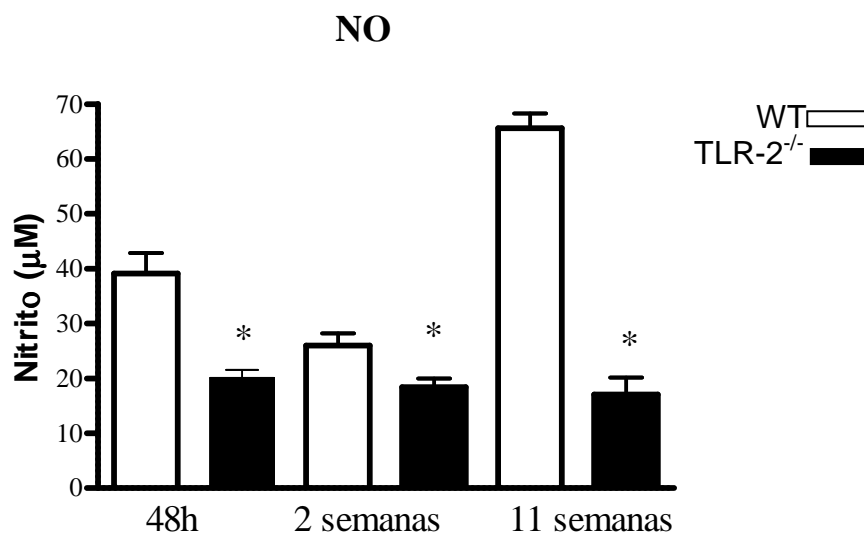


Figura 8. Quantificação de NO no macerado do pulmão de animais TLR-2^{-/-} e WT. Os animais foram infectados com 1×10^6 leveduras de *P.brasiliensis* inoculadas pela via i.t. e sacrificados após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção. Os dados representam a média \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P<0,05).

4.1.2.3 Avaliação da atividade fungicida de leucócitos Polimorfonucleares (PMNs) através da determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Após 15 dias de infecção pelo fungo *P. brasilienses*, animais TLR-2KO e WT sofreram o lavado bronco alveolar (LBA). Os leucócitos PMNs obtidos do lavado do LBA foram infectados *in vitro* com o fungo *P. brasiliensis* na proporção de 2 PMNs para 1 fungo. Após 1 hora de co-cultivo, 100 µL da solução foi plaqueada em meio BHI e observado o crescimento fúngico através da formação de UFC. A figura 9 mostra um número semelhante de fungos recuperados nas culturas de leucócitos PMNs alveolares dos camundongos deficientes e normais quanto à expressão do TLR-2.

O mesmo resultado aconteceu quando trabalhamos com os leucócitos PMNs peritoneais (figura 10), neste caso, grupos de animais TLR-2 KO e WT receberam via i.p. 1×10^7 leveduras não viáveis do *P. brasiliensis* e após 6 horas foi realizado o LP. Os leucócitos PMNs obtidos do LP foram infectados *in vitro* com o fungo *P. brasiliensis* na proporção de 2 PMNs para 1 fungo. Após 1 hora de co-cultivo, 100 µL da suspensão foram plaqueados em meio BHI e observado o crescimento fúngico através da formação de UFC. Tais resultados evidenciam que os leucócitos PMNs de ambas as linhagens possuem a mesma habilidade em controlar a carga fúngica pulmonar.

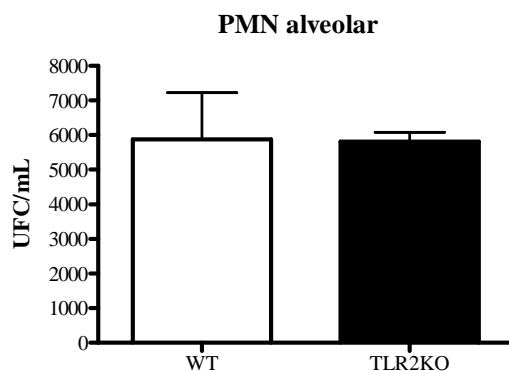


Figura 9. Avaliação da atividade fungicida de leucócitos PMNs alveolares através da recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL após 1h de co-cultivo. PMNs recuperados do lavado bronco alveolar a partir de animais infectados pelo *P. brasiliensis* após 15 dias de infecção. Os PMNs foram reinfetados *in vitro* com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 2 PMNs.

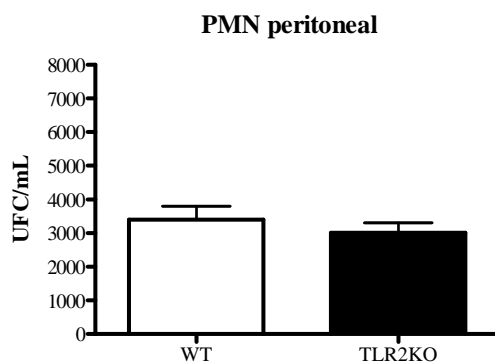


Figura 10. Avaliação da atividade fungicida de leucócitos PMNs peritoneais através da recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL após 1h de co-cultivo. PMNs recuperados de camundongos 6 horas após inoculação de suspensão morta do *P. brasiliensis*. Células não aderentes foram infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 2 PMNs.

4.1.2.4 Caracterização morfológica das populações celulares infiltrantes dos pulmões

Células infiltrantes dos pulmões foram obtidas na segunda e na décima primeira semana após a infecção. A concentração celular foi ajustada a 2×10^4 células em 150 μ l de meio RPMI e centrifugadas em Cytospin. As lâminas foram coradas e um total de 200 a 400 células foram contadas em cada amostra. Como observado na figura 11A, um menor número de macrófagos foi obtido a partir da suspensão celular provenientes de animais TLR-2^{-/-} comparando-se com o WT. Por outro lado, animais TLR-2^{-/-} apresentaram maior número de polimorfonucleares (PMN) e linfócitos nos pulmões, comparando-se com os animais controles. Após a décima primeira semana de infecção, como observamos na figura 11B, encontramos o mesmo número de macrófagos e de linfócitos no infiltrado de pulmão entre as duas linhagens, entretanto, animais TLR-2^{-/-} apresentaram maior número de PMN comparando-se com o valor observado nos animais WT.

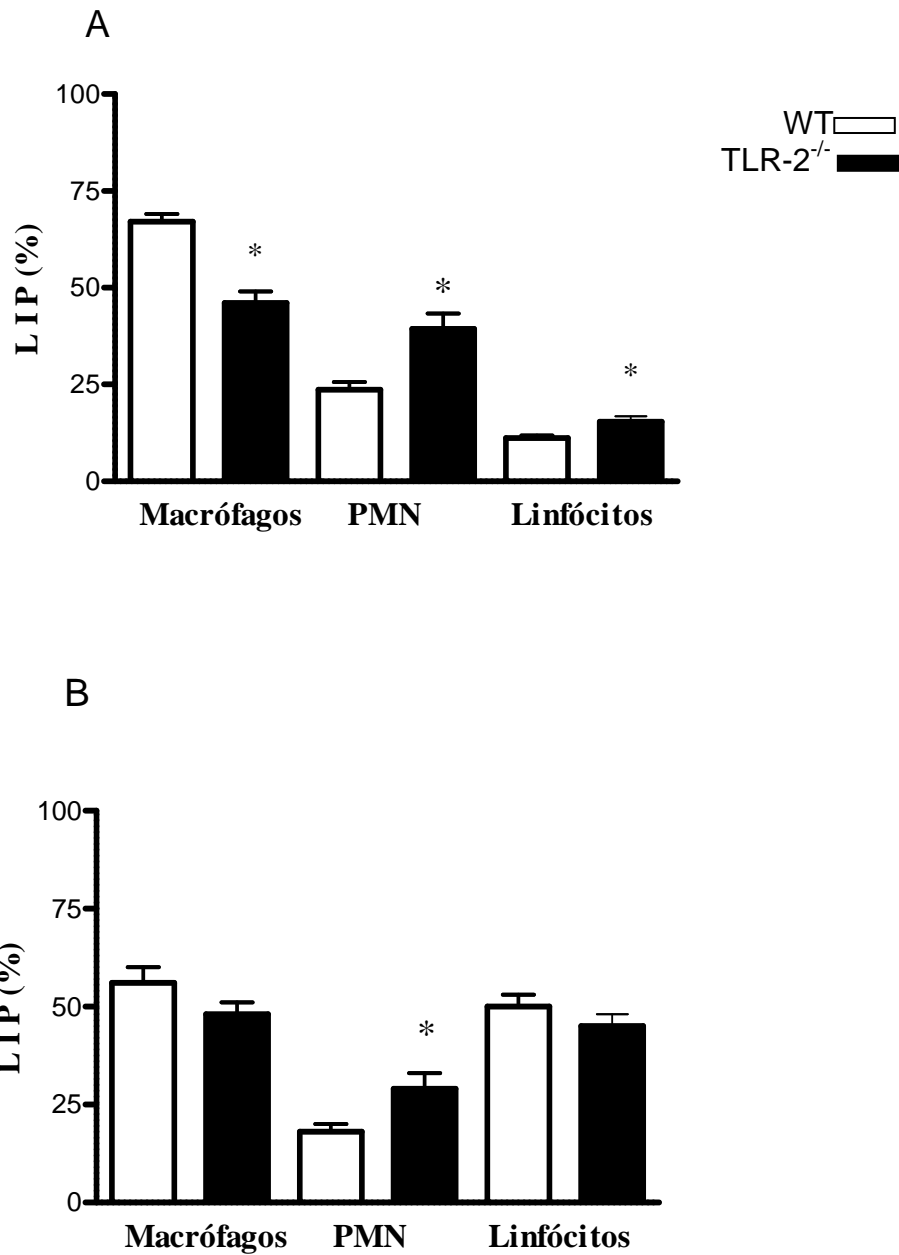


Figura 11. Caracterização morfológica das populações celulares de Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) após 2 (A) e 11 semanas (B) de infecção em animais TLR-2^{-/-} e WT. Os dados representam a média ± EP de 6 animais por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significante (*P<0,05).

4.1.2.5 Estudo do efeito da depleção de leucócitos PMNs em animais normais e deficientes para o TLR-2.

Com os resultados mostrados até agora observamos que os animais TLR-2-deficientes apresentaram uma menor carga fúngica pulmonar em relação aos camundongos normais e esta maior carga fúngica estava acompanhada com um número maior de PMNs no infiltrado pulmonar. Para elucidar se havia alguma relação entre menor carga fúngica devido ao maior afluxo de neutrófilos, prosseguimos com experimentos de depleção de PMNs. Animais TLR-2 normais e deficientes foram tratados com anticorpos anti-PMN um dia antes da infecção pelo *P. brasiliensis* e nos dias 2 e 5 pós infecção; foram então observados em relação à carga fúngica pulmonar e o tempo de sobrevivência.

4.1.2.5.1 Avaliação da depleção

O número total de granulócitos e de leucócitos PMN foi avaliado antes do tratamento (tempo -1) e 24 horas após a inoculação do AcM, imediatamente antes da inoculação de leveduras do *P. brasiliensis* (tempo zero). Foi coletado o sangue da cauda de camundongos de ambas as linhagens, para contagem total e diferencial dos leucócitos. A contagem global foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial foi feita em extensão sanguínea corada com Gimsa.

Antes do tratamento com o anticorpo anti-PMN, animais WT apresentaram $10,1 \times 10^6$ ($\pm 2,4 \times 10^6$) células na contagem global. Destas células, 17% eram leucócitos PMN; animais TLR-2 apresentaram neste tempo $9,96 \times 10^6$ ($\pm 1,8 \times 10^6$) células totais e destas células 22% eram leucócitos PMN. No dia zero, após a inoculação do anticorpo anti-PMN e imediatamente antes da infecção pelo fungo, o procedimento foi repetido. Neste caso, animais WT apresentaram $2,9 \times 10^6$ ($\pm 0,9 \times 10^6$) células totais e destas células o total de PMN correspondia a 5% das células. Os animais TLR-2KO apresentaram $3,3 \times 10^6$ ($\pm 0,8 \times 10^6$) células na contagem global e destas células 3% correspondiam a leucócitos PMN.

No grupo animais controle, tratado com anticorpo IgG normal de rato o mesmo procedimento foi realizado. Neste caso, animais WT apresentaram $12,3 \times 10^6$ ($\pm 0,7 \times 10^6$) células totais e destas células 17% correspondiam a leucócitos PMN, enquanto que, para os animais TLR-2KO encontramos $9,71 \times 10^6$ ($\pm 0,7 \times 10^6$) e destas células 24% corresponderam a leucócitos PMN.

Para ambos os grupos, o procedimento foi repetido após a terceira inoculação do anticorpo anti-PMN e com IgG normal de rato. Resultados semelhantes aos descritos acima foram encontrados, evidenciando a eficiência do anticorpo em depletar os leucócitos PMN.

4.1.2.5.2 Avaliação da carga fúngica por UFC.

Grupos de animais normais e deficientes para o TLR-2 tratados com a AcM anti-PMN ou IgG normal e infectados com o fungo *P. brasiliensis* foram sacrificados após 2 e 6 dias de infecção. Como observado na figura 12A, animais deficientes para o TLR-2 apresentaram, após dois dias de infecção, uma menor carga fúngica em relação aos animais normais para o TLR-2, quando ambas as linhagens foram tratadas com IgG normal de rato. Por outro lado, quando estas linhagens sofreram depleção de PMNs foi observado um aumento da carga fúngica nos animais TLR-2 deficientes. Não houve alteração na carga fúngica pulmonar entre animais TLR-2-normais quando tratados com anticorpo IgG normal e quando depletados com anti-PMN. Resultados equivalentes foram observados após 6 dias de infecção, como demonstrado na figura 12B. Estes resultados evidenciam o papel dos leucócitos PMN no controle da carga fúngica pulmonar nos animais TLR-2-deficientes.

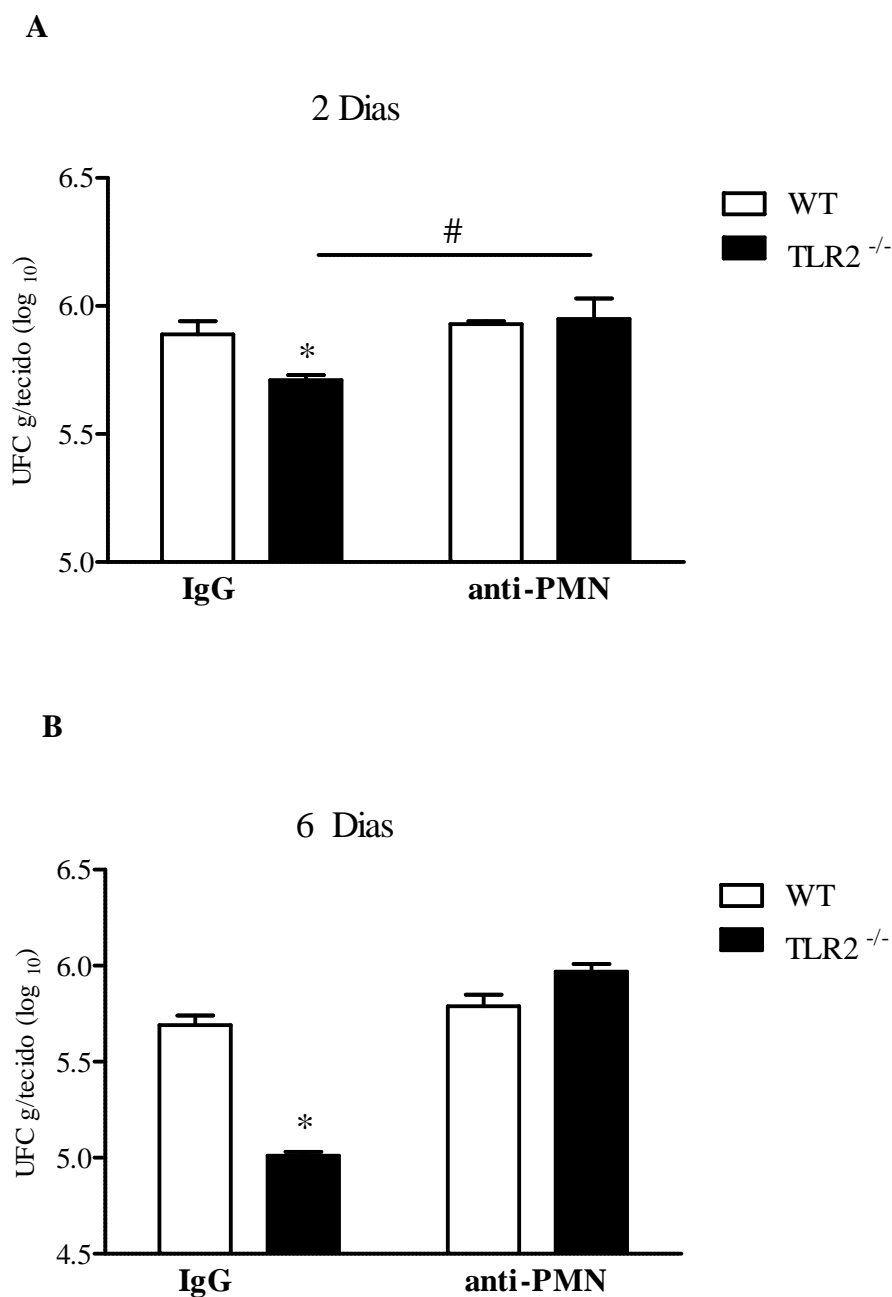


Figura 12. Efeito da depleção de leucócitos PMN no grau de infecção de animais TLR-2 normais e deficientes após a infecção pelo *P. brasiliensis*. Ambas as linhagens foram tratadas com AcM anti-PMN nos dias -1, 2 e 5 ou IgG normal de rato. A infecção com 1×10^6 do *P. brasiliensis* foi no dia zero e o grau de infecção avaliado no dia 2 (A) e no dia 6 (B) por determinação de UFC. As barras representam as médias \pm EP dos grupos ensaiados. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (*/# $P < 0,05$).

4.1.2.5.3 Tempo do Sobrevida

Grupo de 8 animais TLR-2 normais e deficientes, tratados com AcM anti-PMN e infectados i.t. com o fungo *P. brasiliensis* assim como 6 animais controle, tratado com IgG normal e infectados com o fungo foram observados durante um período de 10 dias, sendo registrados o tempo de sobrevida para cada animal (em dias).

Como observado na figura 13, houve a morte de quatro animais TLR-2-deficientes depletados com o anticorpo anti-PMN. Não houve morte entre os animais WT e depletados de PMN. Nos grupos tratados com IgG, houve apenas uma morte entre os animais TLR-2- normais. Assim, após 10 dias de observação houve mortalidade de 50% dos animais somente no grupo de TLR-2-deficientes tratados com anti-PMN. A análise estatística destes dados (método de comparação de curvas de sobrevida pelo Logrank) demonstrou que a sobrevida dos animais TLR-2-deficientes tratados foi significativamente menor do que dos animais WT depletados de PMN ($p=0,045$). Em relação ao grupo de animais tratados com IgG normal foi observada apenas uma morte no período estudado. Não houve assim, diferença no tempo de sobrevida entre animais TLR-2 normais e deficientes.

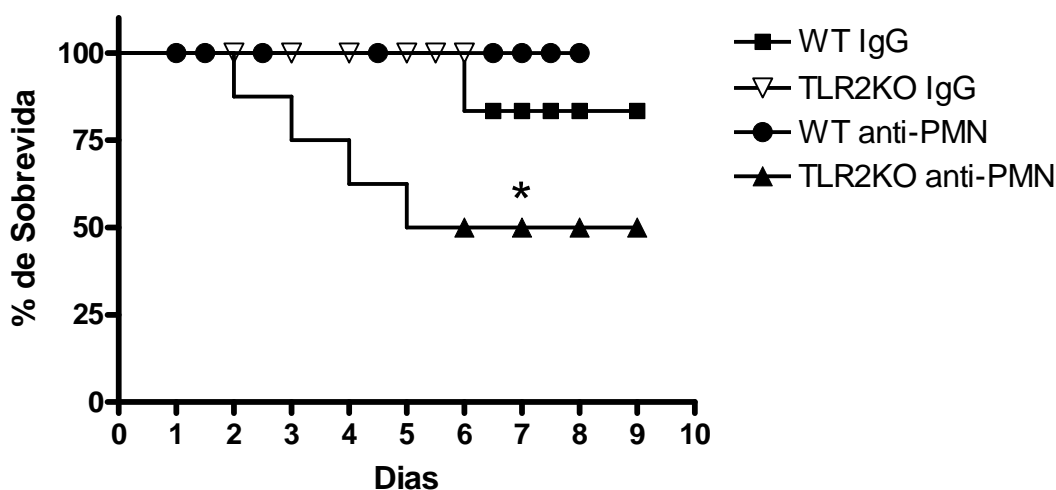


Figura 13. Tempo de sobrevida de camundongos TLR-2 normais e deficientes tratados com AcM anti-PMN e infectados com 1×10^6 leveduras do fungo *P. brasiliensis* (n=8 camundongos/linhagem) e camundongos infectados e tratados com IgG de rato como controle (n=6 camundongos/linhagem). (* $P < 0,05$).

4.1.2.6 Dosagem de citocinas no homogenato do pulmão

A figura 14 mostra a produção de algumas citocinas Th1 (IL2, IL-12, TNF- α e IFN- γ) no homogenato do pulmão de camundongos após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção com o *P. brasiliensis*. Pode-se verificar que camundongos TLR-2-normais e TLR-2-deficientes produziram níveis semelhantes destas citocinas. Com exceção da citocina IL-12, que foi encontrada em níveis menores no homogenato do pulmão de animais TLR-2-deficientes após 11 semanas de infecção. Encontramos também, um padrão semelhante de produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) no homogenato do pulmão das duas linhagens após 48 horas e 2 semanas de infecção. Quando trabalhamos com tempo longo de infecção, observamos menores níveis de IL-10 no homogenato de pulmão dos animais TLR-2-deficientes (figura 15).

Em relação às citocinas relacionadas com o padrão de resposta Th17 (IL-17, IL-23, IL-6 e TGF- β) verificamos que após 48 horas de infecção os animais TLR-2-deficientes produziram maiores níveis de IL-17 e TGF- β . Na segunda semana, além destas, IL-6 e IL-23 também ocorreu em níveis maiores nesta mesma linhagem. Já na décima primeira semana, níveis semelhantes destas citocinas ocorreram em ambas as linhagens, com exceção da IL-23, que continuou em maiores níveis em animais TLR-2-deficientes (figura 16).

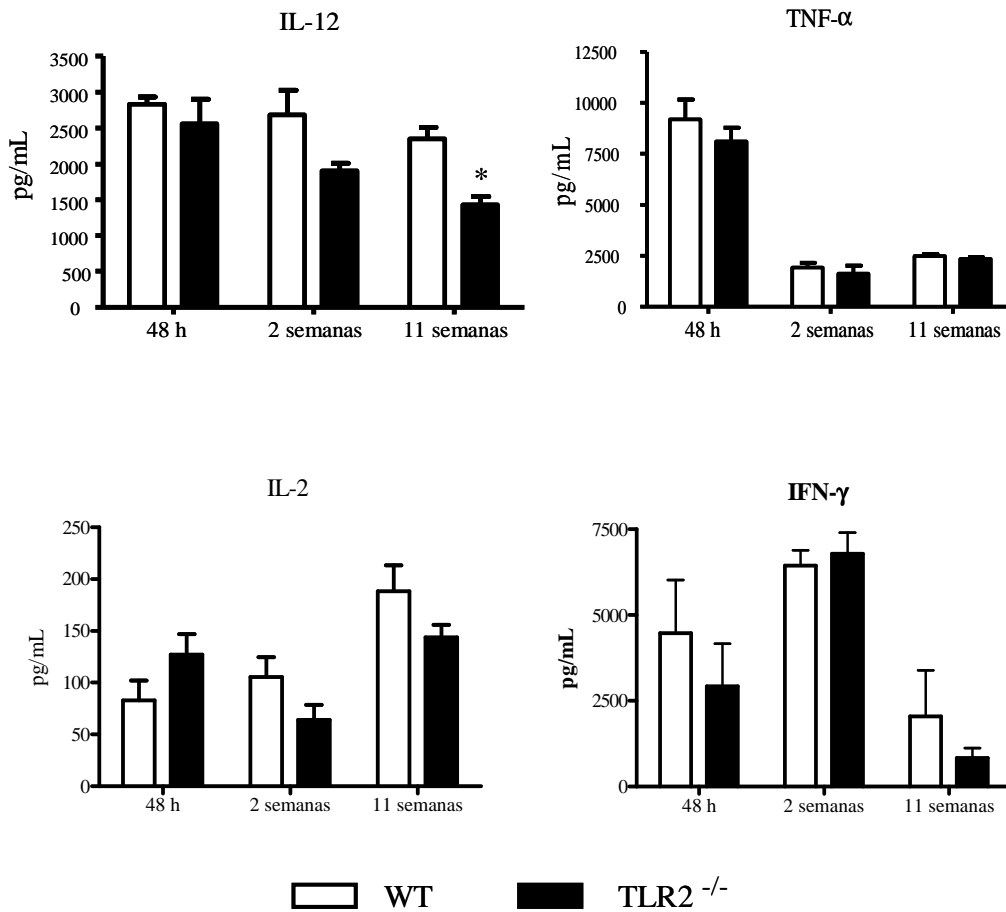


Figura 14. Quantificação de IL-12, TNF- α , IL-2 e IFN- γ em homogenato de pulmão de animais TLR-2-KO e WT após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção. As barras representam as médias \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$).

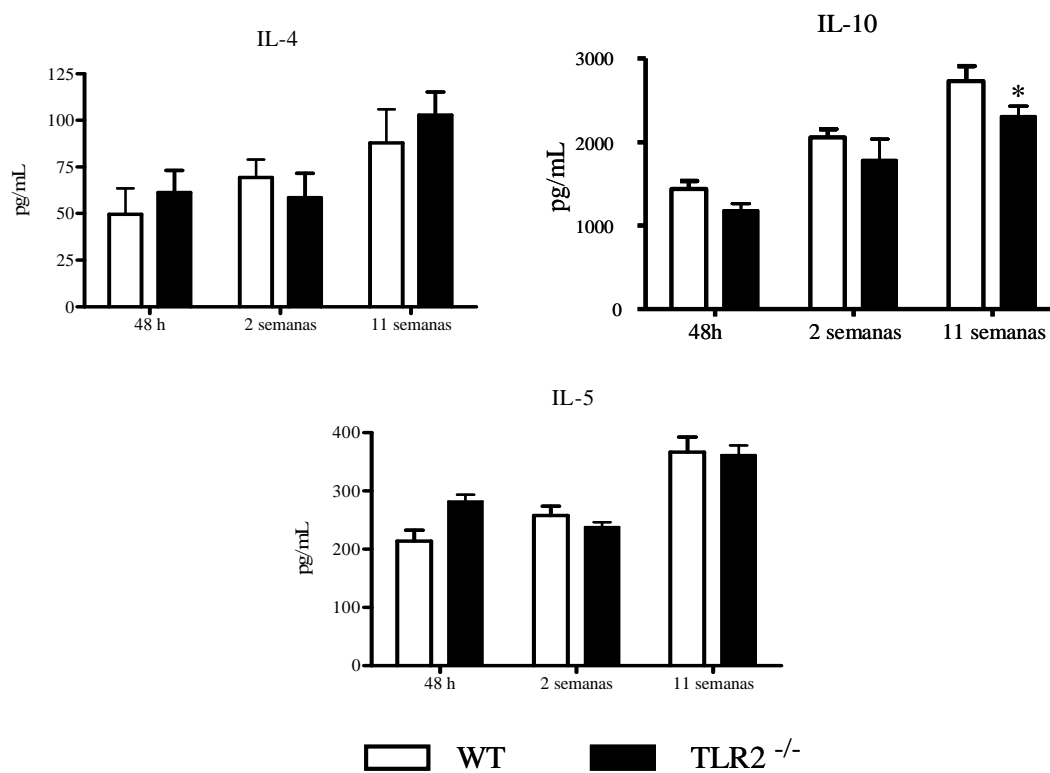


Figura 15. Quantificação de IL-4, IL-5 e IL-10 em homogenato de pulmão de animais TLR-2-KO e WT após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção. As barras representam as médias \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$).

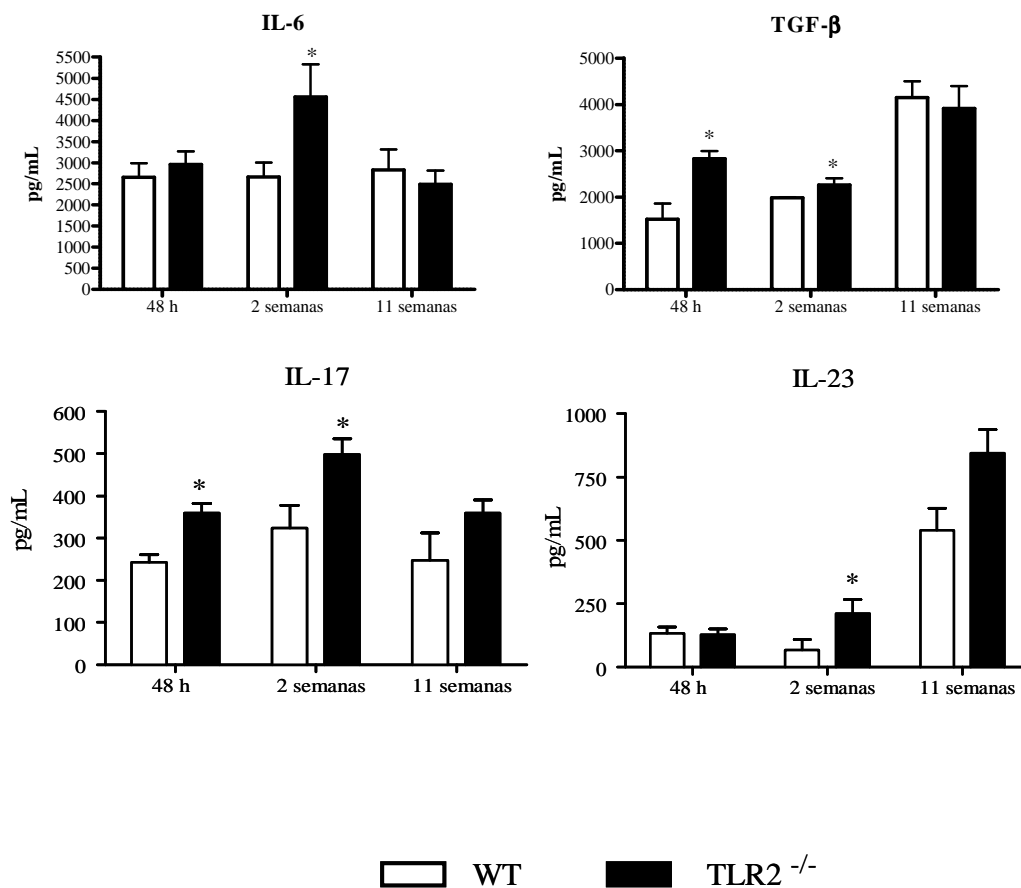


Figura 16. Quantificação de TGF-β, IL-6, IL-23 e IL-17 em homogenato de pulmão de animais TLR-2-KO e WT após 48 horas, 2 e 11 semanas de infecção. As barras representam as médias ± EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*P < 0,05).

4.1.2.7 Dosagem da quimiocina KC e MCP-1 em homogenatos do pulmão

Em experimentos anteriores verificamos que houve um maior afluxo de neutrófilos para os pulmões de animais deficientes para o TLR-2. Como o recrutamento de neutrófilos pode ser dependente de uma quimiocina CXC, prosseguimos com pesquisa da quimiocina KC, uma quimiocina CXC, no homogenato do pulmão de animais normais e deficientes para o TLR-2 e infectados com o fungo *P. brasiliensis*. Além disso, houve diferença na migração de macrófagos para o local da infecção. Com menor afluxo destas células para o pulmão dos animais TLR-2^{-/-} quando comparados ao grupo controle. Assim, também dosamos os níveis de MCP-1, quimiocina relacionada com a migração de monócitos para o sítio inflamatório, nos pulmões dos grupos estudados.

Como mostrado na figura 17, encontramos maiores níveis da quimiocina KC em homogenatos do pulmão de animais deficientes para o TLR-2, o mesmo grupo que apresentou maior afluxo de neutrófilos no infiltrado celular dos pulmões. Em relação à MCP-1, encontramos níveis menores desta quimiocina no homogenato do pulmão de animais TLR-2^{-/-}, os mesmos que apresentaram menor afluxo de macrófagos, como demonstrado na figura 18.

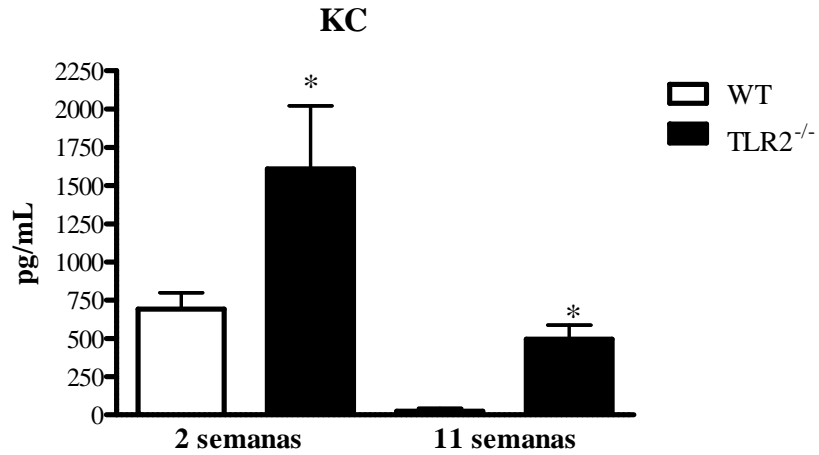


Figura 17. Quantificação da quimiocina KC em homogenato de pulmão de animais TLR-2-KO e WT após 2 e 11 semanas de infecção. As barras representam as médias \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$).

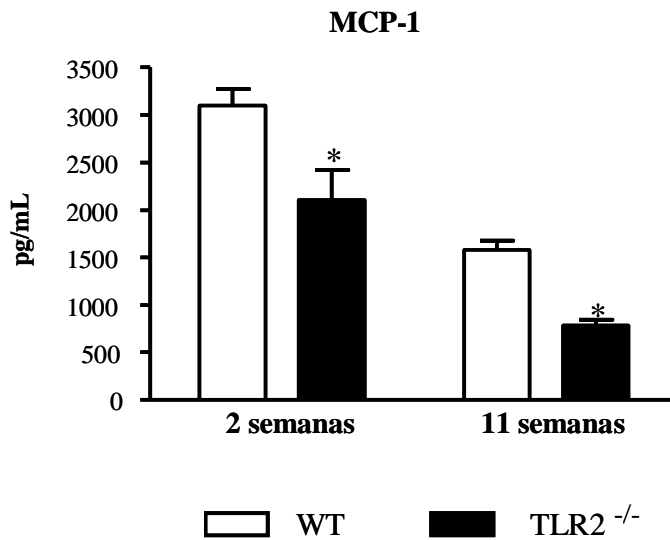


Figura 18. Quantificação da quimiocina MCP-1 em homogenato de pulmão de animais TLR-2-KO e WT após 2 e 11 semanas de infecção. As barras representam as médias \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$).

4.1.2.8 Citometria de fluxo para caracterização de subpopulações celulares no infiltrado inflamatório dos pulmões

Células infiltrantes dos pulmões dos pulmões foram obtidas na segunda e na décima primeira semana após infecção. A concentração celular foi ajustada a 1×10^6 cels/mL e marcadas com Ac no título previamente determinado e na combinação adequada para a população celular a ser estudada. Como observado na Figura 19A, após a segunda semana de infecção não houve diferença na expressão dos marcadores celulares CD11b, CD80, CD86, CD40 e Ia (MHC-classe II). Do mesmo modo, após a décima primeira semana de infecção animais TLR-2-deficientes e normais apresentaram a mesma frequência dos marcadores estudados.

Em relação às populações linfocitárias observamos um número semelhante de células T CD4 e TCD8 nas suspensões celulares provenientes de animais TLR-2^{-/-} e WT após a segunda semana de infecção (Figura 20A). No tempo longo de infecção observamos maior número de linfócitos T CD4, T CD8, de linfócitos ativados CD25⁺ e de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ nos animais TLR-2-normais quando comparados as populações celulares de animais TLR-2^{-/-} (Figura 20B).

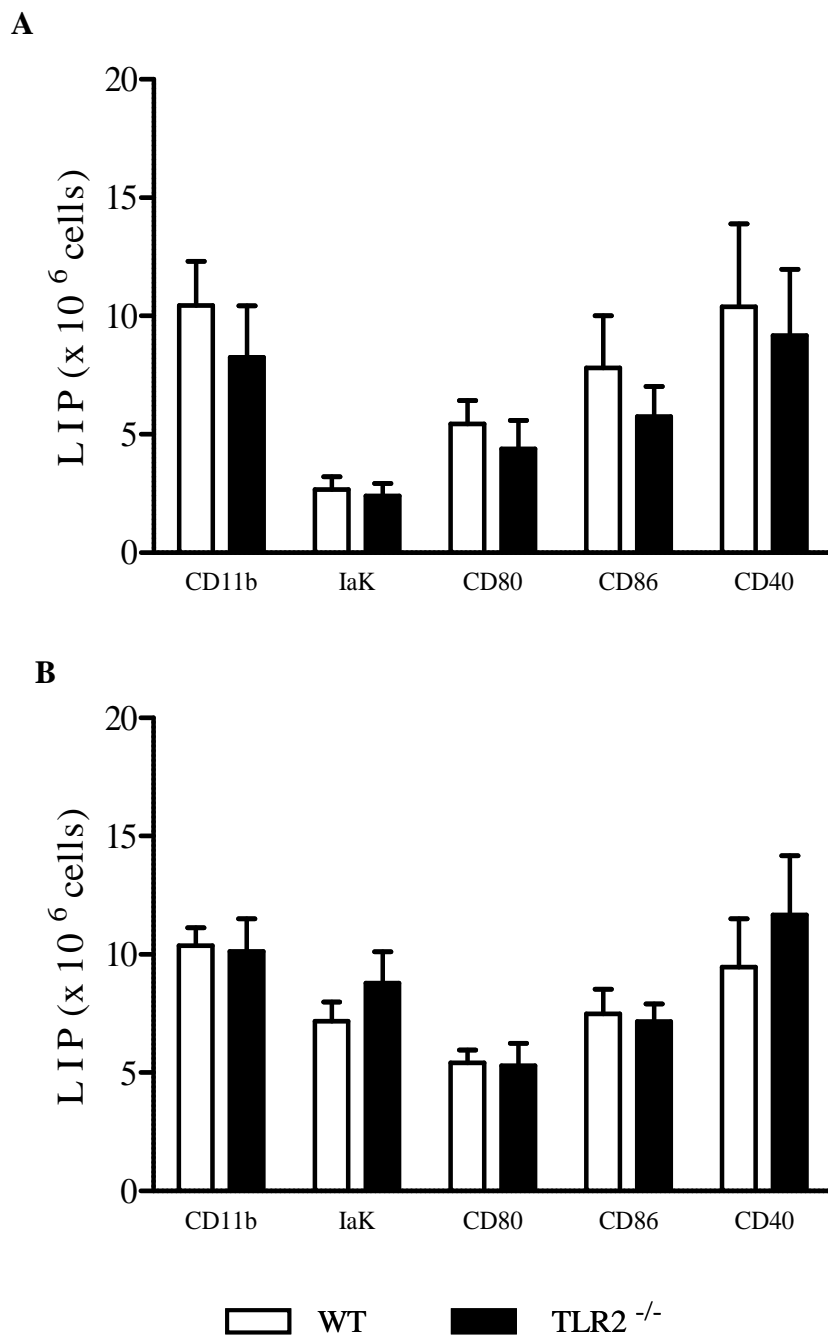


Figura 19. Caracterização da expressão de marcadores de macrófagos presentes nos Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) por citometria de fluxo após a de animais TLR-2^{-/-} e WT; A: 2 semanas; B: 11 semanas de infecção .

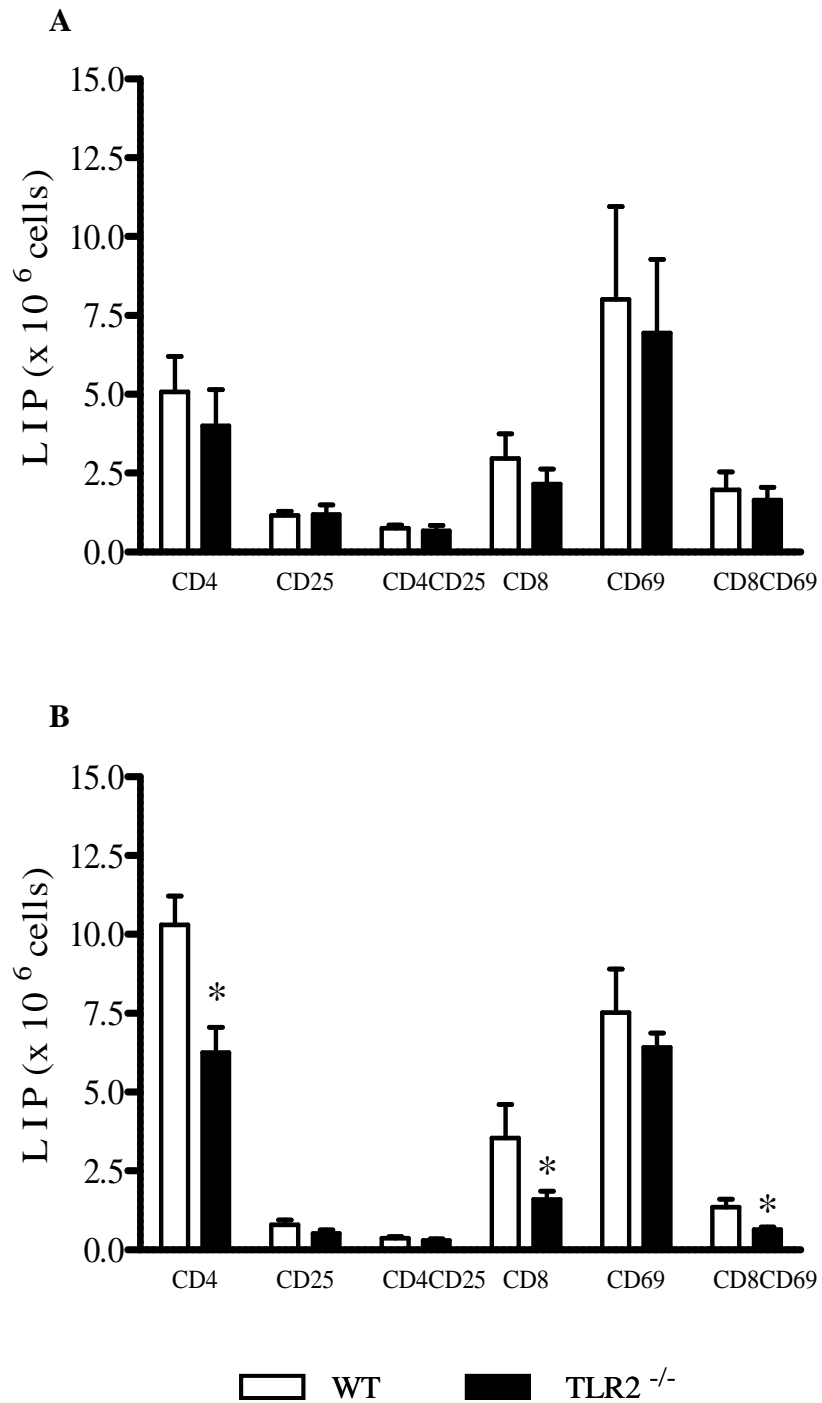


Figura 20. Caracterização da expressão de marcadores de subpopulações de linfócitos presentes nos Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) por citometria de fluxo após a de animais TLR-2^{-/-} e WT; A: 2 semanas; B: 11 semanas de infecção.

4.1.2.9 Caracterização intracelular da expressão da citocina IL-17.

Células dos pulmões obtidas como descrito no item 3.2.6 do material e métodos foram, após 72 horas e 2 semanas de infecção, estimuladas com PMA, ionomicina e tratadas com monensina durante 6 horas. A seguir, as células foram marcadas com anticorpos previamente titulados para linfócitos T CD4 e CD8, assim como para citocina IL-17. Os *dot plots* indicados na figura 21 demonstram que tanto após 72 horas de infecção, como após 2 semanas, houve uma maior porcentagem de linfócitos TCD4 produtores de IL-17 nos pulmões de animais TLR-2^{-/-} quando comparado ao grupo controle. Os gráficos à direita demonstram o número absoluto de células, animais TLR-2^{-/-} também apresentaram maior número de células TCD4⁺IL-17⁺ em comparação com os animais TLR-2-normais.

A figura 22 indica que após 72 horas de infecção a frequência de linfócitos TCD8⁺IL-17⁺ foi semelhante entre as duas linhagens estudadas e após 2 semanas de infecção houve uma maior frequência destas células nos animais TLR-2^{-/-}. Contudo, quando estudamos o número absoluto de células verificamos que não havia diferença no número total de linfócitos TCD8⁺IL-17⁺ no local da infecção.

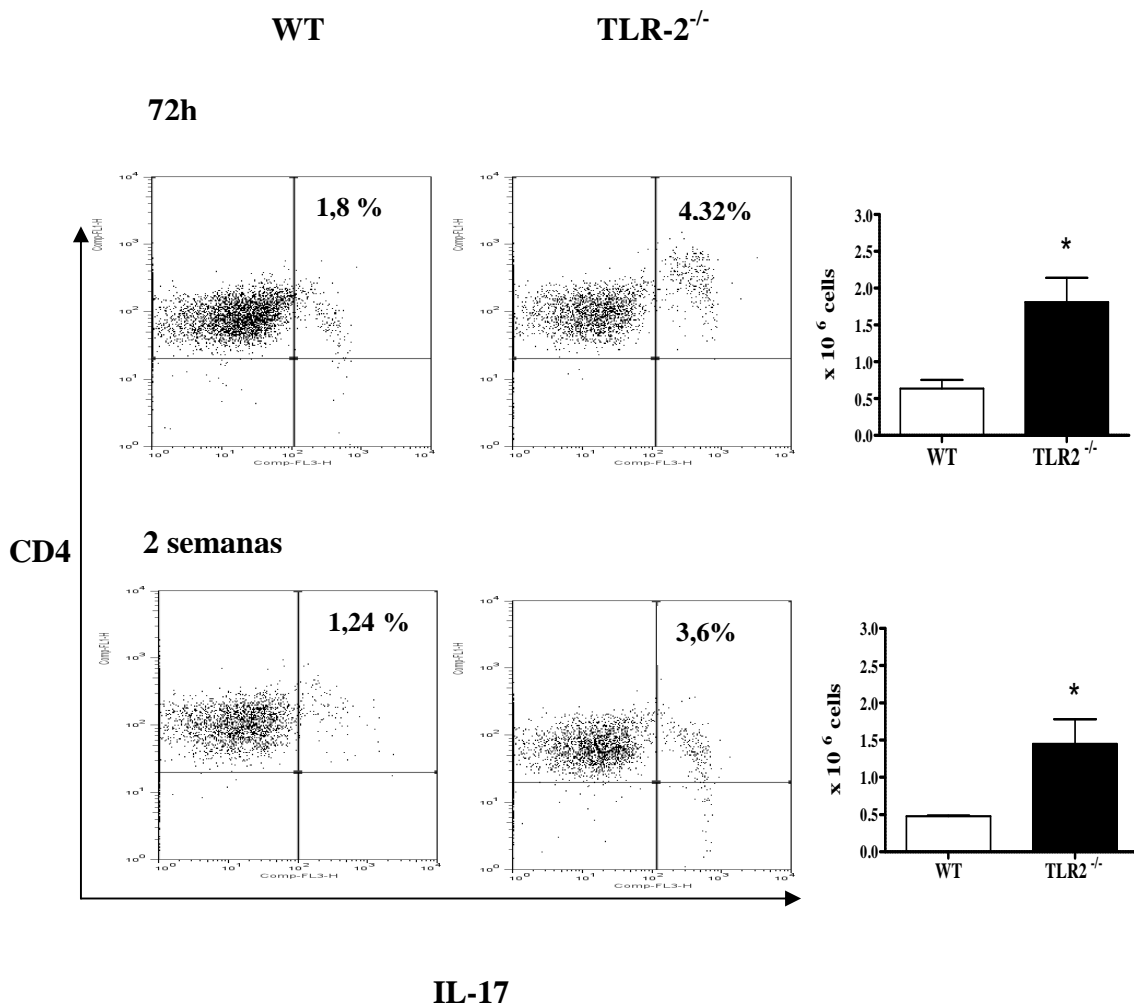


Figura 21. Caracterização da frequência da expressão da citocina intracelular IL-17 por linfócitos T CD4 presentes em Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) por citometria de fluxo após 72 horas e 2 semanas de infecção pelo *P. brasiliensis* em animais TLR-2^{-/-} e WT. Nos gráficos à direita, representação do número absoluto de linfócitos T CD4 produtores de IL-17. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*P < 0,05).

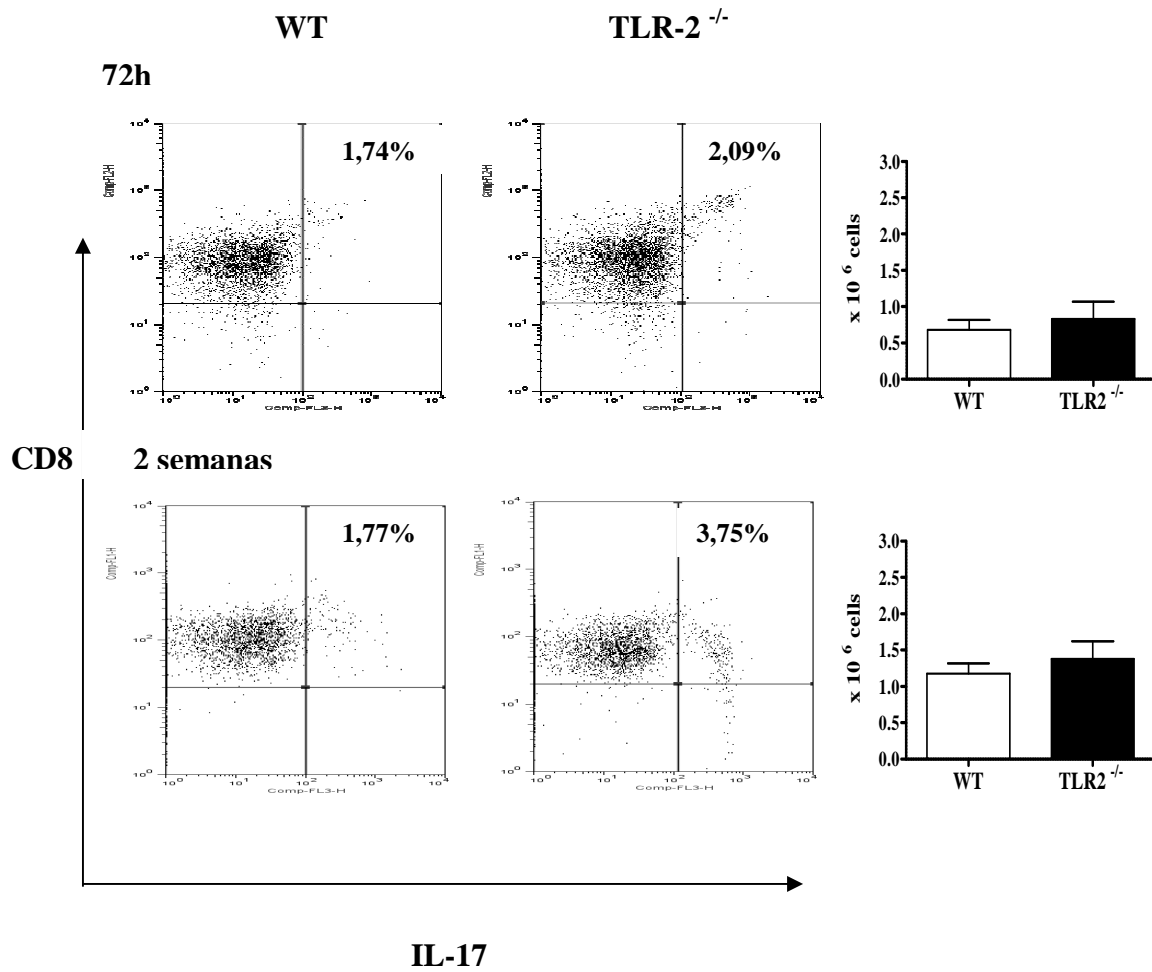


Figura 22. Caracterização da frequência da expressão da citocina intracelular IL-17 em linfócitos T CD8 presentes em populações celulares de Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) por citometria de fluxo após 72 horas e 2 semanas de infecção pelo *P. brasiliensis* em animais TLR-2^{-/-} e WT. Nos gráficos à direita, representação do número absoluto de linfócitos T CD8 produtores de IL-17.

4.1.2.10 Caracterização da presença de células T reguladoras

Células infiltrantes dos pulmões foram obtidas na segunda e na décima primeira semana de infecção. A concentração celular foi ajustada a 1×10^6 cels/mL e marcadas com Ac (anti-CD4, CD25 e FoxP3) na titulação adequada. Para determinação dos níveis intracelulares de Foxp3 as células foram permeabilizadas e o anticorpo pôde fazer a marcação intracitoplasmática. Como observado na figura 23, na segunda semana de infecção não houve diferença entre os grupos estudados em relação ao número de células expressando FoxP3, um típico marcador de célula T reguladora (Treg). Contudo, após 11 semanas de infecção animais TLR-2^{-/-} apresentaram menor número de células expressando este marcador, quando comparado ao grupo controle.

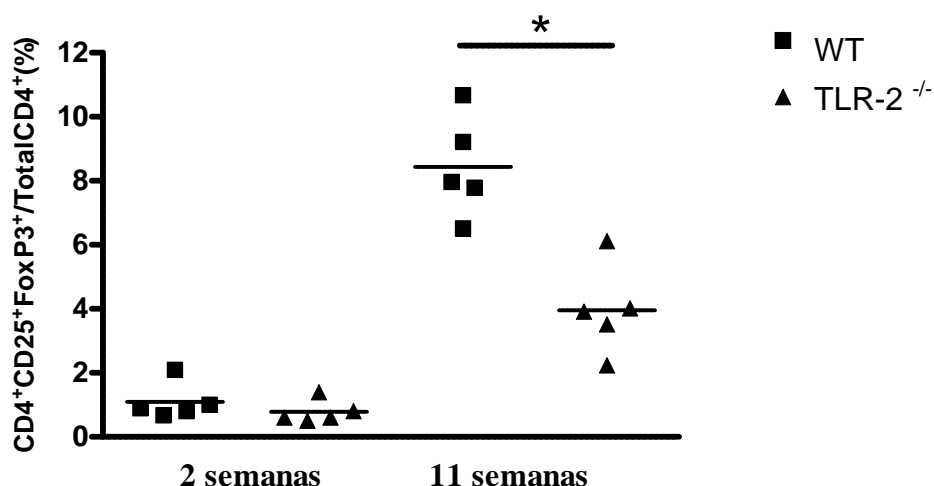


Figura 23. Análise da expressão do fator de transcrição FoxP3 em exsudatos inflamatórios de animais TLR-2^{-/-} e WT após a segunda e décima primeira semana de infecção. A porcentagem de células que expressam FoxP3⁺ foi obtida a partir de um *gate* de populações celulares CD4⁺CD25⁺ e calculado em relação ao total de linfócitos T CD4⁺. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*P < 0,05).

4.1.2.11 Dosagem de anticorpos

A resposta imune humoral dos animais TLR-2^{-/-} e WT infectados com o fungo foi avaliada pela produção de anticorpos anti *P. brasiliensis* (Ig total e os diferentes isótipos). Assim, após 11 semanas de infecção, os animais foram anestesiados, suas artérias e veias axilares seccionadas e coletadas amostras do sangue para obtenção do soro; as amostras foram estocadas a -20 °C até o momento da detecção dos níveis de anticorpos por ELISA.

Como o indicado na figura 24, os animais TLR-2^{-/-} apresentaram títulos semelhantes de anticorpos comparando-se com os títulos de anticorpos encontrados no soro de animais que expressam o TLR-2 funcional.

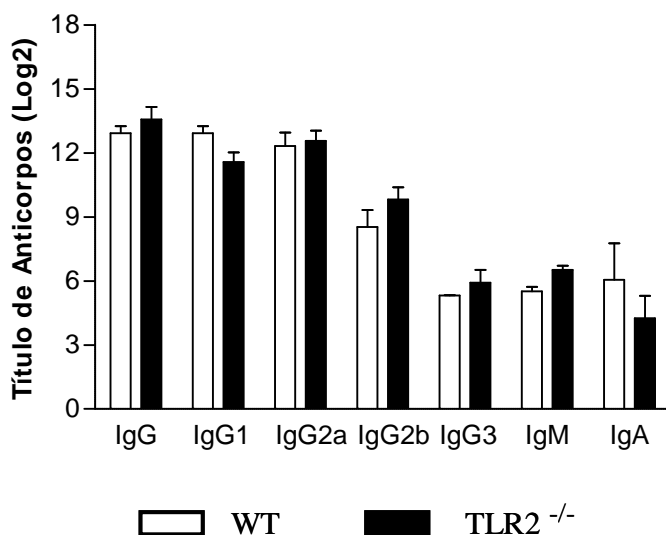


Figura 24. Quantificação de anticorpos séricos (IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA) após 11 semanas de infecção de animais TLR-2^{-/-} e WT. Os animais foram infectados com 1×10^6 leveduras de *P.brasiliensis* inoculadas pela via i.t. e sacrificados. Os dados representam a média \pm EP de 5 animais por grupo.

4.1.2.12 Sobrevida

Grupos de 12 animais TLR-2^{-/-} e 12 animais WT foram infectados com leveduras viáveis do *P. brasiliensis* e observados durante um período de 250 dias, sendo registrado o tempo de sobrevida (em dias) para cada animal.

Como observado na figura 25 a mortalidade dos animais WT inicia-se no dia 77 e no dia 150 nos animais TLR-2^{-/-}. Após 250 dias, 3 animais TLR-2^{-/-} continuavam vivos, enquanto que todos os animais WT morreram. A análise estatística destes dados de sobrevida (método de comparação de curvas de sobrevida pelo teste de Logrank) demonstrou não haver diferenças estatísticas entre os grupos estudados. O tempo médio de sobrevida foi de 221 dias para os animais TLR-2^{-/-} e de 195 dias para os animais WT.

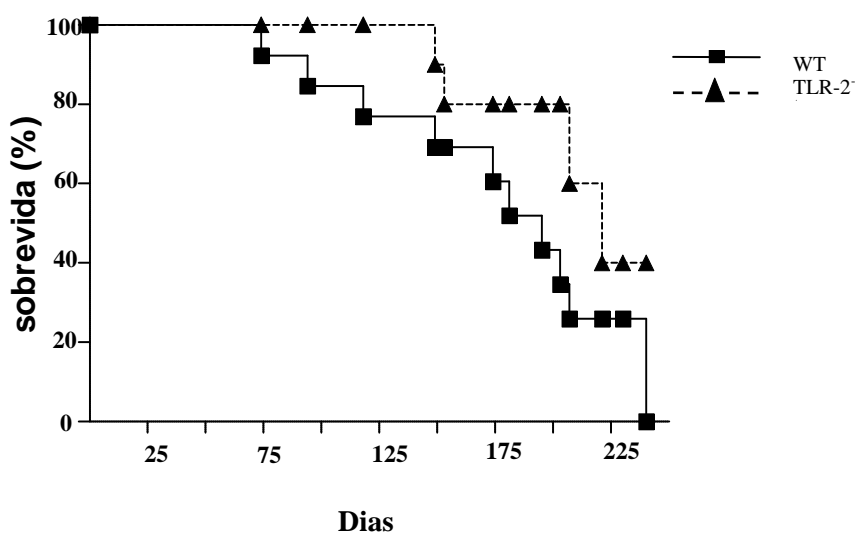


Figura 25. Tempo de sobrevida de camundongos TLR-2^{-/-} e WT infectados pela via i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P. brasiliensis* (n = 10-12 camundongo/linhagem). A sobrevida dos animais foi acompanhada por 250 dias. O experimento foi repetido duas vezes com resultados semelhantes.

4.1.2.13 Análise histopatológica

Após 11 semanas de infecção o pulmão esquerdo de cada camundongo foi removido e fixado em 10% de formalina e embebido em parafina. Secções (5µm) foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise das lesões e com a coloração Grocott, para visualizar os fungos. Verificamos que, neste período de infecção, apesar da menor carga fúngica encontrada nos animais TLR-2^{-/-}, não houve diferença na gravidade das lesões entre animais TLR-2 deficientes e o grupo controle. Ambas as linhagens apresentaram lesões extensas e confluentes ocupando quase todo o parênquima pulmonar que apresentou também um elevado número de leveduras (figura 26).

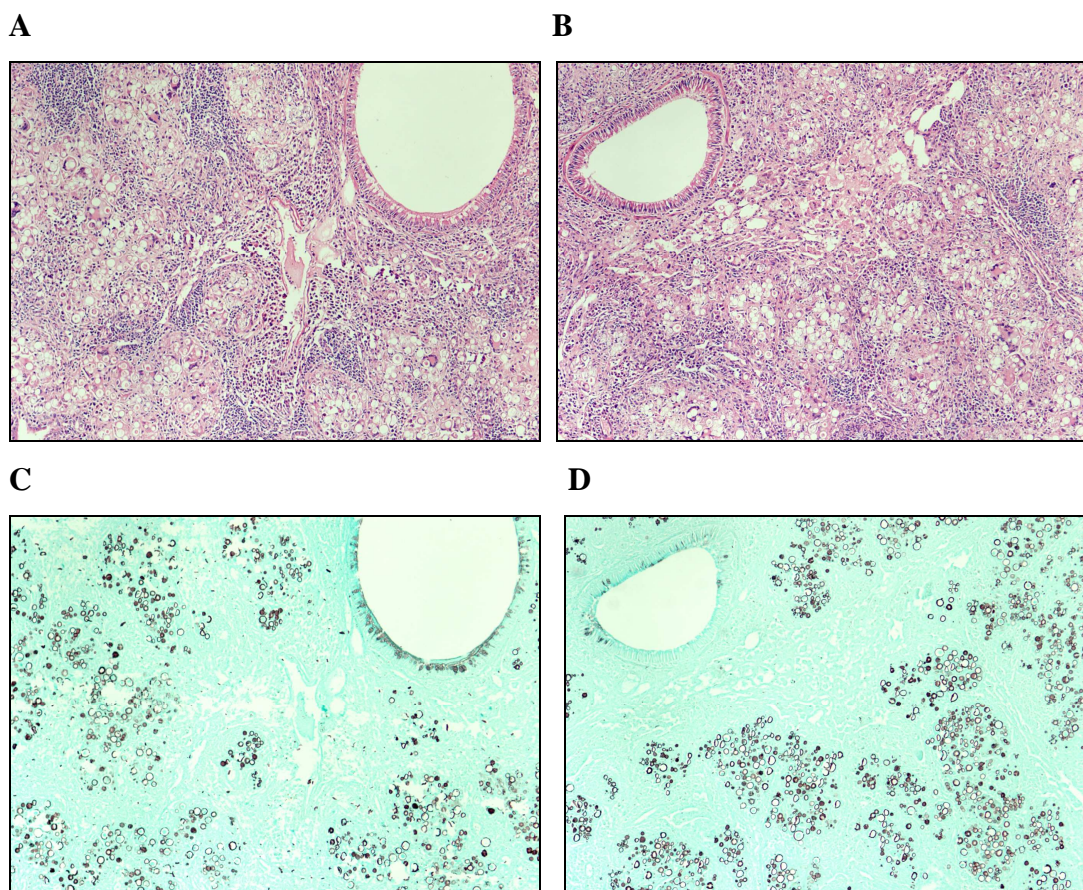


Figura 26. Fotomicrografias de lesões pulmonares de animais TLR-2-normais (A e C) e TLR-2-deficientes (B e D) após 11 semanas de infecção com o fungo *P. brasiliensis*. H&E (A e B; 100x) e Grocott (C e D; 100x).

4.2 Influência da molécula adaptadora MyD88 na PCM

4.2.1 *In vitro*

4.2.1.1 Ensaio da Fagocitose

Os macrófagos peritoneais de animais MyD88KO e WT foram desafiados com leveduras não viáveis do fungo previamente marcadas com iodeto de propídio (PI) (relação Pb/MØ de 1/1) por 2 horas. Após este período as células foram recolhidas das placas de 24 poços, ajustadas em 1×10^6 /mL e marcadas com anti-CD11b (FITC). A leitura foi realizada imediatamente após a marcação no FACs Calibur. O resultado representativo de um experimento expresso na figura 27 demonstra que macrófagos de animais MyD88KO competentes apresentaram menor capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras não viáveis do *P. brasiliensis* comparando-se com os macrófagos de animais MyD88 competentes. O fenômeno também ocorreu quando as culturas foram pré-tratadas com IFN- γ .

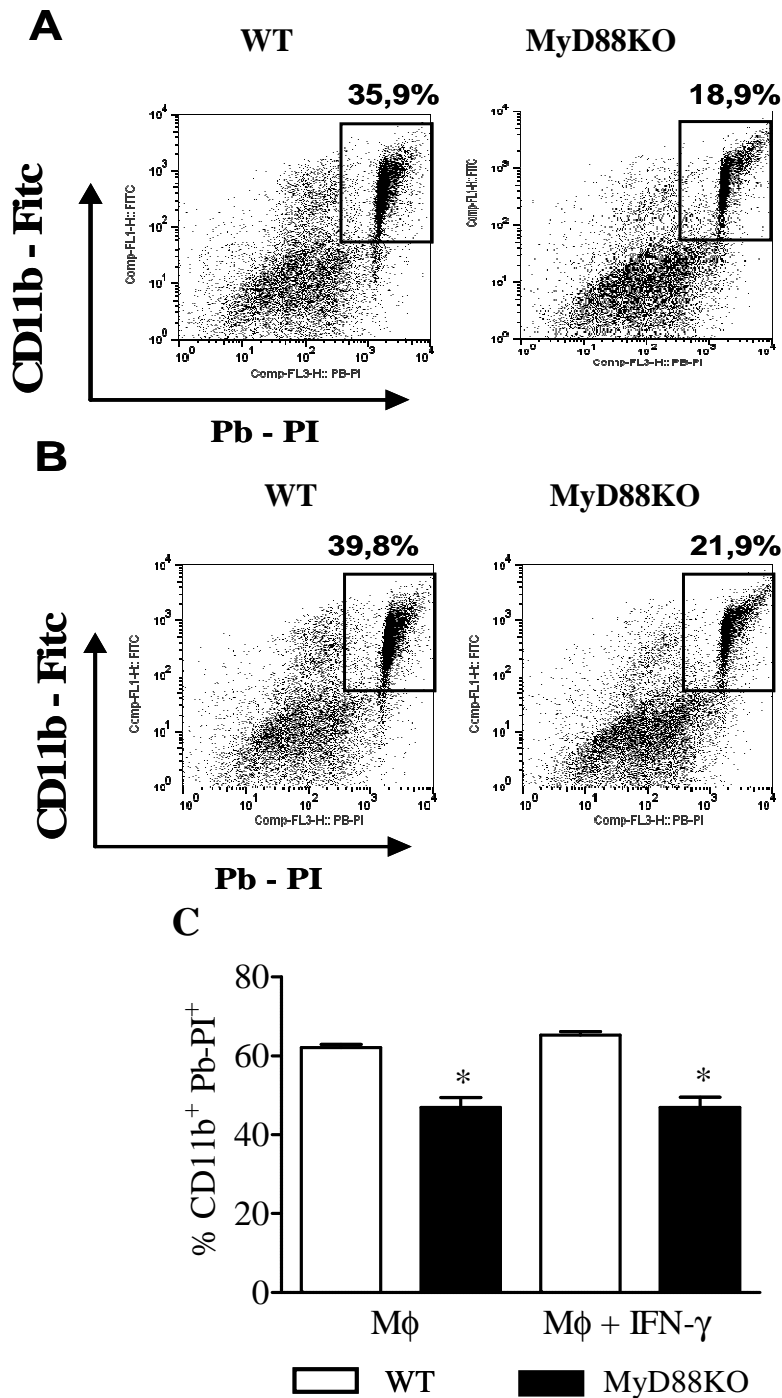


Figura 27. Avaliação de atividade fagocítica de macrófagos de animais normais e deficientes para a proteína MyD88. Os macrófagos peritoneais de animais MyD88KO e WT (1×10^6 células/poço) ativados ou não com IFN- γ (20.000 pg/mL) foram co-cultivados com leveduras não viáveis do *P. brasiliensis* marcados com PI em uma relação fungo/MØ de 1:1. Após 2 horas de incubação o sobrenadante do cultivo foi desprezado e as células recolhidas e marcadas com anti-CD11b (FITC). A leitura foi realizada imediatamente após a marcação no FACs Calibur. Em A temos um dot plot representativo de culturas não tratadas com IFN- γ ; na figura B, os macrófagos foram primados com esta citocina. Na figura C temos a média de macrófagos contendo Pb-PI em cada grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (* $P < 0,05$).

4.2.1.2 Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A figura 28 mostra um número maior de fungos recuperados nas culturas de macrófagos peritoneais dos camundongos deficientes quanto à expressão da proteína MyD88. O mesmo aconteceu com macrófagos pré-ativados com IFN- γ (20.000 pg/mL), porém neste tratamento observamos uma menor carga fúngica em ambas as linhagens em comparação aos grupo que não foram tratados com esta citocina.

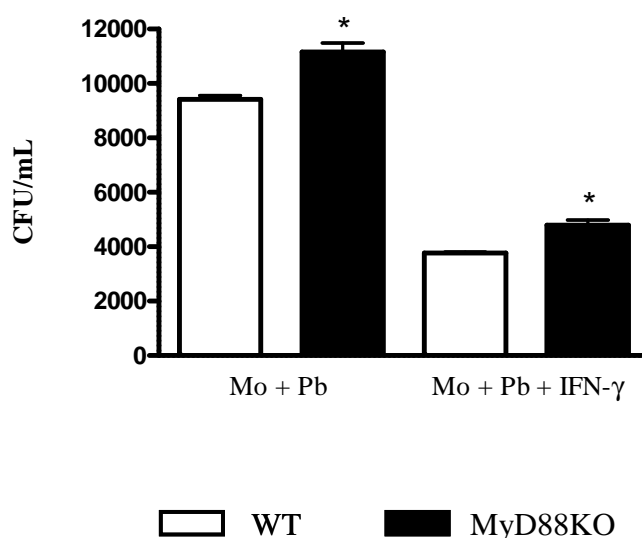


Figura 28. Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL após 48h de co-cultivo. As monocamadas de macrófagos de animais WT e MyD88KO foram tratadas ou não com IFN- γ (20.000pg/mL) e infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos após 24h. O asterisco representa diferença estatisticamente significante entre os grupos (*P< 0,05).

4.2.1.3 Dosagem de NO

A figura 29 mostra que macrófagos provenientes de camundongos deficientes para a proteína MyD88 produzem concentrações menores de NO em comparação com os macrófagos de camundongos selvagens. Isso ocorreu tanto nos grupos de macrófagos apenas tratados com IFN- γ , quanto nos grupos tratados com IFN- γ e infectados com o fungo. Além disso, a adição de *P. brasiliensis* levou a um aumento significativo na síntese de NO quando comparamos com o grupo que não recebeu o fungo. Nos grupos de macrófagos sem tratamento e nos grupos apenas infectados com o fungo, não houve produção de NO em ambas as linhagens estudadas.

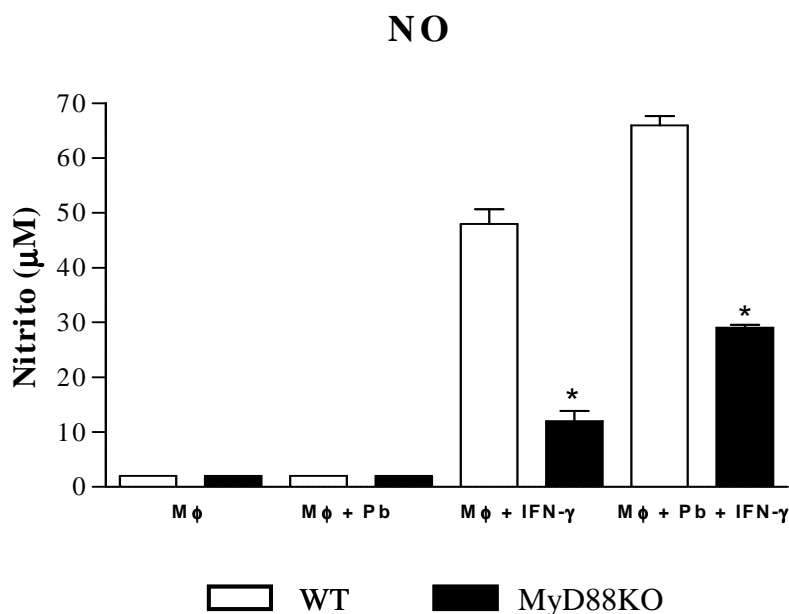


Figura 29. Quantificação de NO no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de animais MyD88KO e WT. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- γ (20.000pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P.brasiliensis* em uma proporção de 50 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de NO foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle de macrófagos foi mantido sem tratamento, onde não houve produção de NO. Os dados representam a média \pm EP de 5 poços por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (* $P < 0,05$).

4.2.2 Experimentos *in vivo*

4.2.2.1 Estudo da fase aguda

4.2.2.1.1 Avaliação do grau de infecção através de UFC

A figura 30 mostra a média de UFC/g de tecido (\log_{10}) no pulmão dos animais MyD88KO e WT obtidos após 48 horas de infecção. Observamos que neste tempo de infecção houve maior carga fúngica a partir do macerado do pulmão dos animais MyD88KO. Não houve disseminação para fígado e baço neste tempo de infecção em ambas as linhagens estudadas.

4.2.2.1.2 Dosagem de NO

Na figura 31 temos a quantificação de NO presente no homogenato dos pulmões dos animais MyD88KO e WT após 48 horas de infecção. A dosagem foi feita imediatamente após a coleta do homogenato. A concentração de NO encontrada foi maior no grupo de animais que apresentam a sinalização via MyD88 comparando-se com o grupo que não apresenta esta proteína.

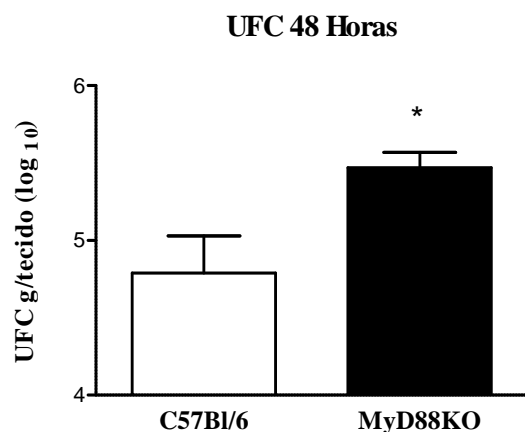


Figura 30. Avaliação do grau de infecção através de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os camundongos MyD88KO e WT foram infectados com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. O grau de infecção foi determinado após 48 horas de infecção pela contagem de UFC. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$).

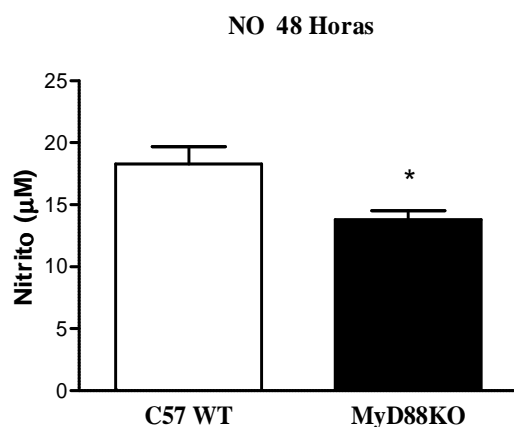


Figura 31. Quantificação de NO no homogenato dos pulmões de animais MyD88KO e WT. Os animais foram infectados com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. e sacrificados após 48 horas de infecção. Os dados representam a média \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$).

4.2.2.1.3 Dosagem de citocinas no homogenato do pulmão

A figura 32 mostra a produção de algumas citocinas no homogenato do pulmão de camundongos após 48 horas de infecção com o *P. brasiliensis*. Após este período de infecção, níveis semelhantes de IL-10, TGF- β , IL-6, IL-17, IL-23, IFN- γ e TNF- α foram encontrados no homogenato pulmonar de animais normais e deficientes para a proteína MyD88. Em relação à IL-12 encontramos níveis menores desta citocina nos pulmões de animais MyD88KO.

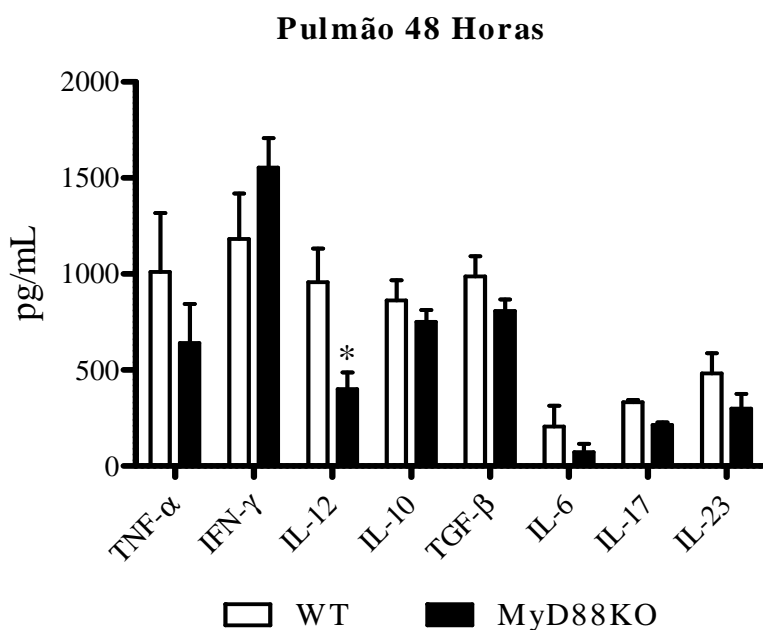


Figura 32. Quantificação de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10, TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23 em homogenato de pulmão de animais MyD88KO e WT após 48 horas de infecção. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (* $P < 0,05$).

4.2.2.2 Estudo da fase crônica

4.2.2.2.1 Avaliação do grau de infecção através de UFC

A figura 33 mostra a média de UFC/g de tecido (\log_{10}) no pulmão, fígado e baço dos animais MyD88KO e WT obtidos após 8 semanas de infecção. Observamos que neste tempo de infecção maior carga fúngica a partir do macerado do pulmão, fígado e baço dos animais MyD88KO. Deve-se destacar a diferença do número de fungos observados no fígado de animais deficientes e normais; os animais MyD88KO apresentaram cerca de 6 \log_{10} (1 milhão de vezes) mais fungos que os camundongos controle. Não houve disseminação para o fígado dos animais WT neste tempo de infecção.

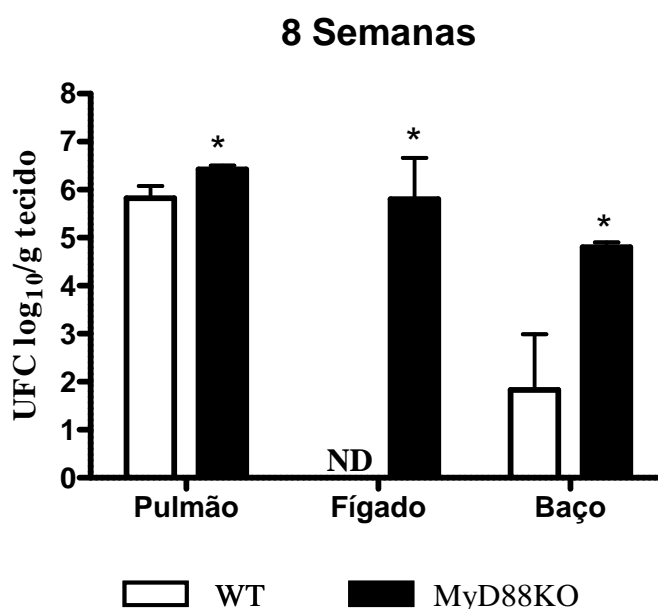


Figura 33. Avaliação do grau de infecção através de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os camundongos MyD88KO e WT foram infectados com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. O grau de infecção foi determinado após 8 semanas de infecção pela contagem de UFC. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (* $P < 0,05$).

4.2.2.2.2 Dosagem de NO

Na figura 34 temos a quantificação de NO presente no macerado dos pulmões, fígado e baço dos animais MyD88KO e WT após 8 semanas de infecção. A dosagem foi feita imediatamente após a coleta do sobrenadante do macerado. Apesar da maior carga fúngica nos pulmões de animais MyD88KO, encontramos concentrações semelhantes de NO nos pulmões de ambas as linhagens estudadas. Uma maior concentração de NO foi encontrada apenas no fígado do grupo de animais MyD88KO, comparando-se com o grupo controle. Não houve detecção de NO no baço de ambas as linhagens.

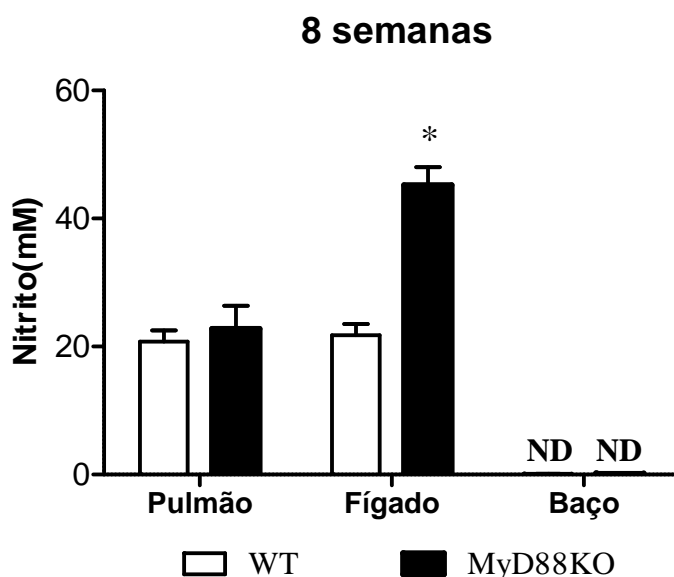


Figura 34. Quantificação de NO no homogenato dos pulmões, fígado e baço de animais MyD88KO e WT. Os animais foram infectados com 1×10^6 leveduras de *P.brasiliensis* inoculadas pela via i.t. e sacrificados após 48 horas de infecção. Os dados representam a média \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$).

4.2.2.2.3 Dosagem de citocinas

A figura 35 mostra a produção de algumas citocinas no homogenato do pulmão de camundongos após 8 semanas de infecção com o *P. brasiliensis*. Pode-se verificar que camundongos de ambas as linhagens produziram níveis semelhantes de TNF- α , IFN- γ e IL-6. Contudo, níveis menores de IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , IL-17 e IL-23 foram encontrados no homogenato de pulmão de animais MyD88KO quando comparado ao grupo controle. A análise do homogenato do fígado revelou níveis menores de IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , IL-6, IL-17, IL-23 nos animais MyD88KO como demonstrado na figura 36. A análise do homogenato de baço revelou níveis menores de TNF- α em animais MyD88KO associado com níveis maiores de IL-10, quando comparado ao grupo controle (figura 37).

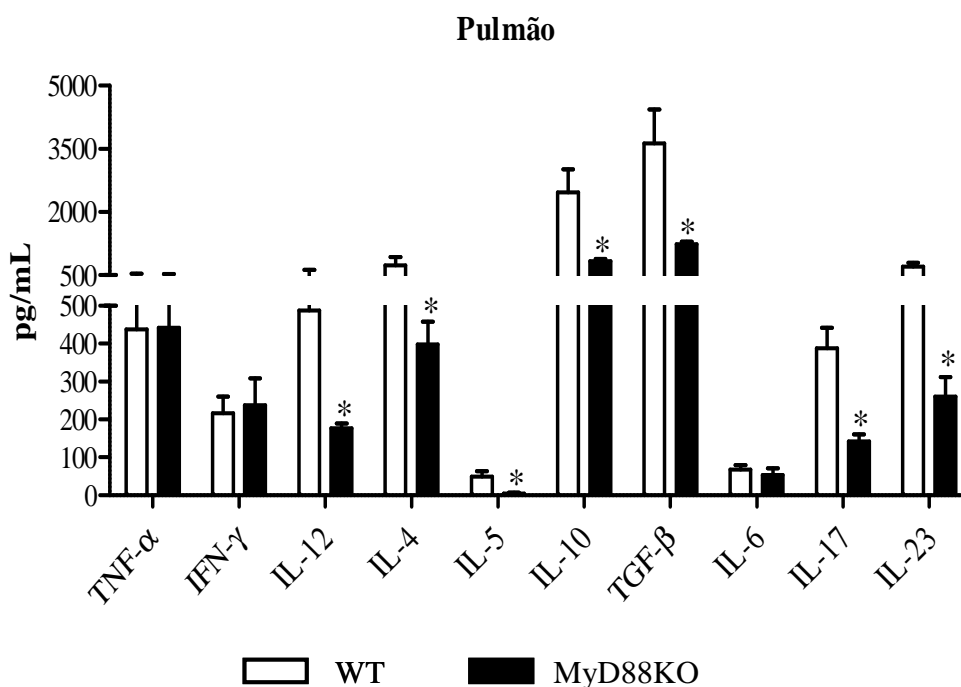


Figura 35. Quantificação de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23 em homogenato de pulmão de animais MyD88KO e WT após 8 semanas de infecção. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$).

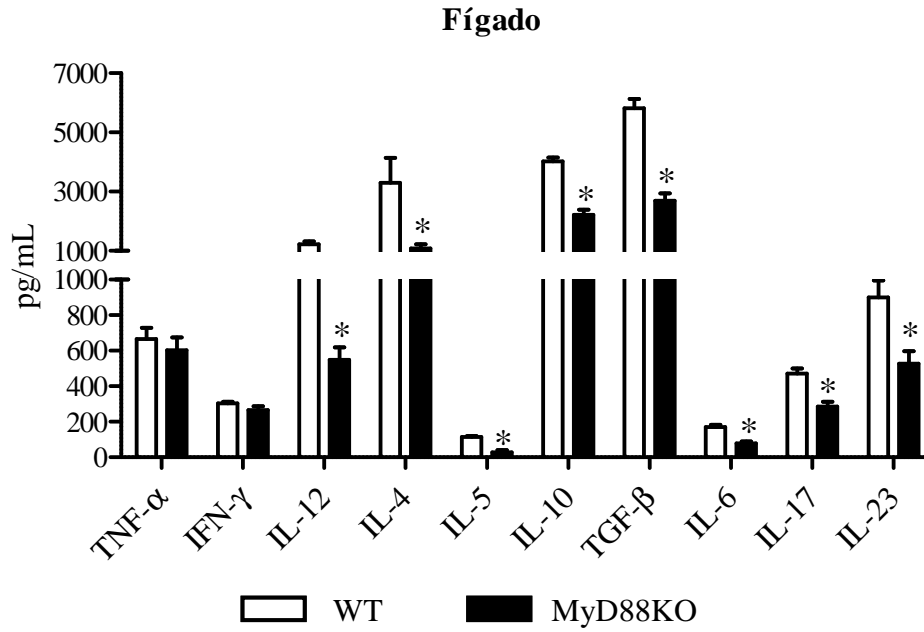


Figura 36. Quantificação de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23 em homogenato de fígado de animais MyD88KO e WT após 8 semanas de infecção. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (*P<0,05).

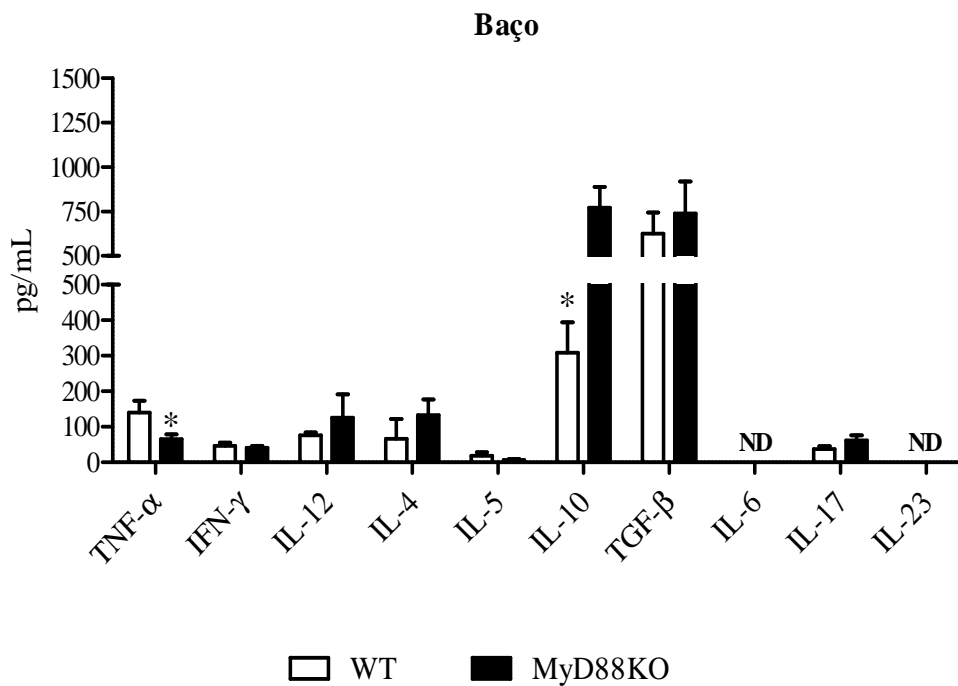


Figura 37. Quantificação de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23 em homogenato de baço de animais MyD88KO e WT após 8 semanas de infecção. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (*P<0,05).

4.2.2.2.4 Citometria de fluxo para caracterização de subpopulações celulares

Células infiltrantes dos pulmões foram obtidas na oitava semana após infecção. A concentração celular foi ajustada a 1×10^6 cels/mL e marcadas com Ac no título previamente determinado e na combinação adequada para a população celular a ser estudada. Como observado na Figura 38, houve menor número de células que expressam CD11b no infiltrado celular dos animais MyD88KO, além de menor número de células duplo-positivas CD11b⁺Iak⁺ e CD11b⁺CD40⁺. Não observamos diferenças no número de células CD11b⁺ que expressam CD80, TLR-2, TLR-4 e Dectina-1 entre as duas linhagens estudadas.

Em relação às populações linfocitárias observamos um menor número de células T CD4, assim como um menor número de células que expressam o marcador de ativação CD25 e de linfócitos duplo-positivos T CD4⁺CD25⁺ nas suspensões celulares provenientes de animais MyD88KO comparando-se com animais WT (Figura 39). O número de linfócitos T CD8 e de linfócitos T CD8 ativados (CD8⁺CD69⁺) foi encontrado em número semelhante nas duas linhagens estudadas.

Macrófagos

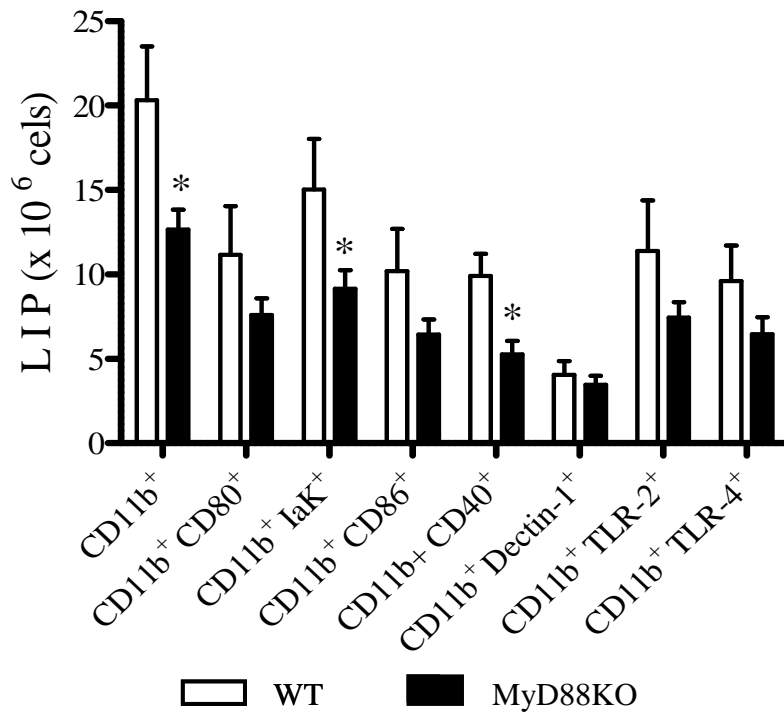


Figura 38. Caracterização do número e expressão de marcadores de macrófagos em Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) por citometria de fluxo de animais MyD88KO e WT após 8 semanas de infecção. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (*P<0,05).

Linfócitos

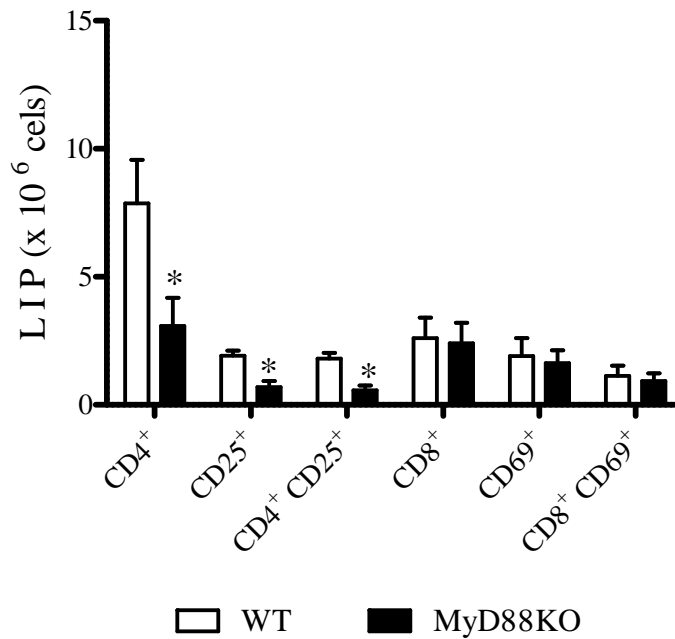


Figura 39. Caracterização do número e expressão de marcadores de linfócitos em Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) por citometria de fluxo de animais MyD88KO e WT após 8 semanas de infecção. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (*P<0,05).

4.2.2.2.5 Caracterização morfológica das populações celulares

Células infiltrantes dos pulmões foram obtidas na oitava semana após a infecção. A concentração celular foi ajustada a 2×10^4 células em 150 μ l de meio RPMI e centrifugadas em Cytospin. As lâminas foram coradas e um total de 200 a 400 células foram contadas em cada amostra. Como observado na figura 40, número semelhante de macrófagos e linfócitos foram observados nas suspensões celulares provenientes de animais MyD88KO e as do grupo controle. Por outro lado, animais MyD88KO apresentaram menor afluxo de leucócitos polimorfonucleares para os pulmões (PMN).

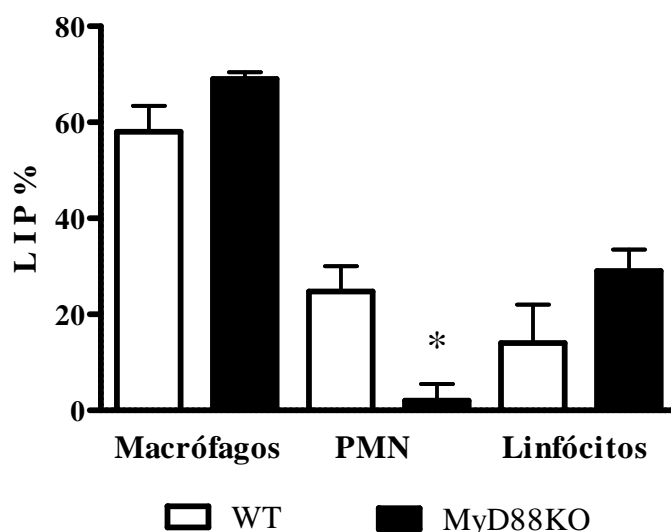


Figura 40. Caracterização morfológica das populações celulares de Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP) após 8 semanas de infecção em animais MyD88KO e WT. Os dados representam a média \pm EP de 6 animais por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significante (*P<0,05).

4.2.2.2.6 Caracterização da presença de células T reguladoras

Células infiltrantes dos pulmões foram obtidas na oitava semana de infecção. A concentração celular foi ajustada a 1×10^6 cels/mL e marcadas com Ac (anti-CD4, CD25 e FoxP3) na titulação adequada. Para determinação dos níveis intracelulares de Foxp3 as células foram permeabilizadas e o anticorpo pode fazer a marcação intracitoplasmática. Como observado na figura 41, houve menor expressão do fator de transcrição FoxP3, um típico marcador de célula T reguladora (Treg), no infiltrado celular de animais MyD88KO quando comparado ao grupo controle.

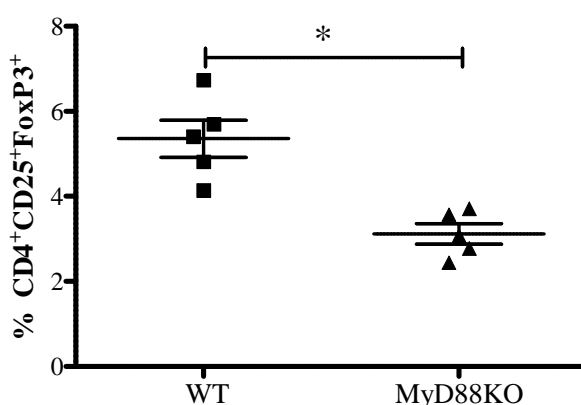


Figura 41. Análise da expressão de FoxP3 em células do exsudato inflamatório pulmonar de camundongos MyD88KO e WT após a oitava semana de infecção. A porcentagem de células que expressam FoxP3⁺ foi obtida a partir de um *gate* de populações celulares CD4⁺CD25⁺ e calculado em relação ao total de linfócitos T CD4⁺. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (*P<0,05).

4.2.2.2.7 Sobrevida

Grupos de 8 animais MyD88 deficientes e 8 animais WT foram infectados com leveduras viáveis do *P. brasiliensis* e observados durante um período de 70 dias, sendo registrado o tempo de sobrevida (em dias) para cada animal.

Como observado na figura 42, a mortalidade dos animais MyD88KO inicia-se no dia 2 e no dia 71 todos os 8 animais já estavam mortos. A mortalidade do grupo controle inicia-se no dia 12 e após 71 dias 62% deste grupo ainda permaneciam vivos. A análise estatística destes dados de sobrevida (método de comparação de curvas de sobrevida pelo teste de Logrank) demonstrou que os animais MyD88KO apresentaram menor tempo de sobrevida em relação ao grupo controle (* $P < 0,05$).

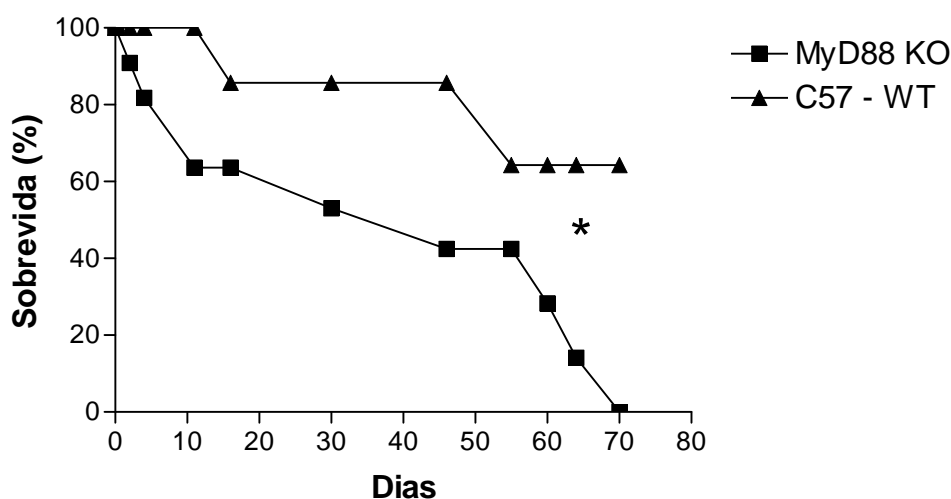


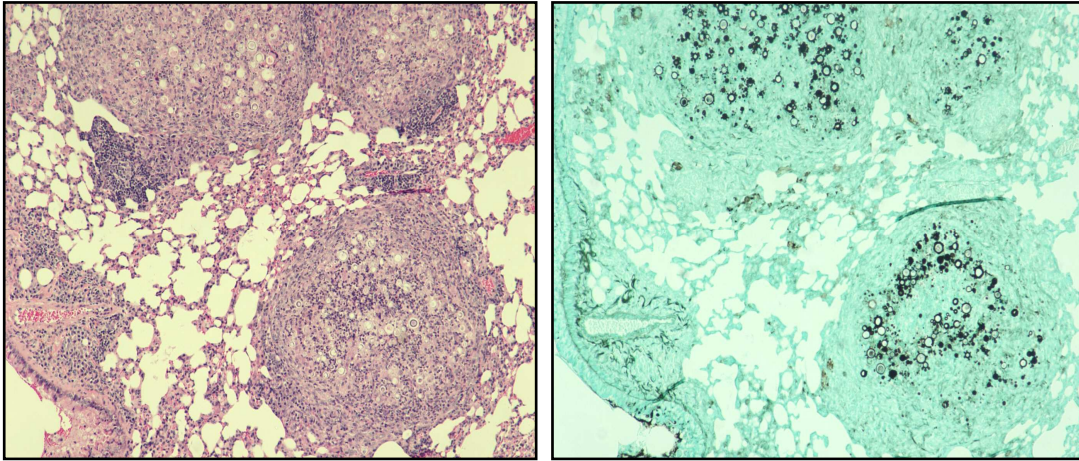
Figura 42. Tempo de sobrevida de camundongos MyD88KO e WT infectados pela via i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P. brasiliensis* (n = 8 camundongo/linhagem). A sobrevida dos animais foi acompanhada por 70 dias. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$).

4.2.2.2.8 Análise histopatológica

Uma parâmetro adicional de gravidade da doença foi obtido através da análise histopatológica dos pulmões, fígado e baço de animais MyD88KO e WT infectados pela via i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P. brasiliensis*. Após 8 semanas de infecção o pulmão esquerdo, o lóbulo menor fígado e metade do baço de cada camundongo foram removidos e fixado em 10% de formalina e embebido em parafina. Secções (5 μ m) foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise das lesões e com a coloração Grocott, para visualizar os fungos. Verificamos que após 8 semanas de infecção a análise das lesões de camundongos WT revelou uma pneumonia priogranulomatosa com lesões peribronquiolares, rico infiltrado linfoplasmocítico e eventual coalescência. Os granulomas em geral foram bem delimitados com presença moderada de fungos e espaços alveolares ainda preservados (figura 43 A e B). Por outro lado, animais MyD88KO apresentaram lesões piogranulomatosas extensas e confluentes ocupando quase todo o parênquima pulmonar, assim como presença de áreas necróticas. Em alguns casos observamos completa consolidação do parênquima pulmonar sendo substituído por extensas lesões necróticas com ampla colonização fúngica. As estruturas bronquiolares estavam comprometidas e apresentavam debris celulares, leucócitos e rico agregado de fungos como demonstrado nas figuras 43 C e D.

A

B



C

D

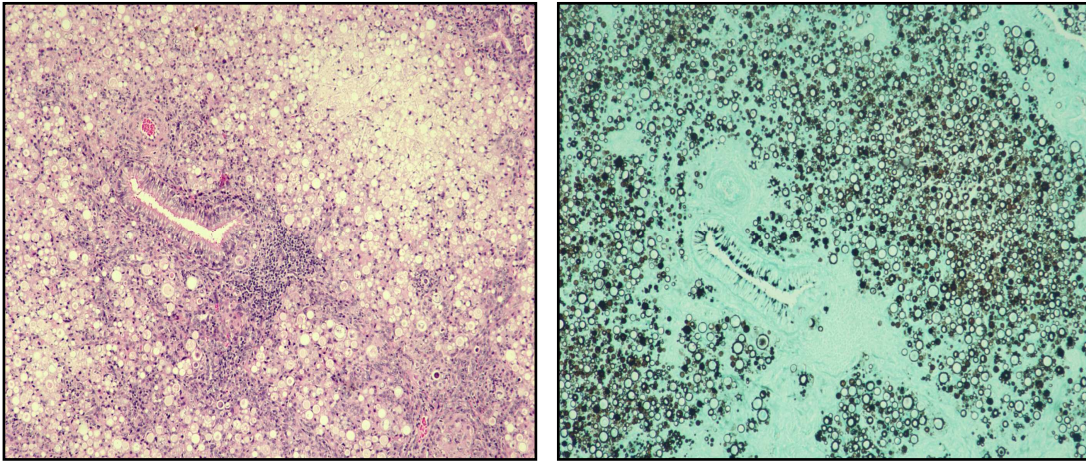


Figura 43. Fotomicrografias de lesões pulmonares de animais WT (A e B) e MyD88KO (C e D) após 8 semanas de infecção com o fungo *P. brasiliensis*. H&E (A e C; 10x) e Grocott (B e D; 10x).

A análise histopatológica revelou que a estrutura hepática dos animais WT estava totalmente preservada e não foi observada a presença de fungos no fígado destes animais (figuras 44 A e B). Por outro lado, a análise do fígado de animais MyD88KO revelou a presença de extensas lesões piogranulomatosas em parênquima hepático. Os granulomas confluentes apresentaram rico agregado fúngico (figura 44 C e D).

A estrutura esplênica dos animais WT estava totalmente preservada e não foi observada a presença de fungos nas lâminas estudadas, apesar dos experimentos de UFC indicarem a presença de uma pequena carga fúngica nestes animais (figura 45 A e B). A análise histopatológica do baço de animais MyD88KO revelou a presença de lesões piogranulomatosas esplênicas. Os granulomas confluentes apresentaram rico agregado fúngico (figura 45 C e D).

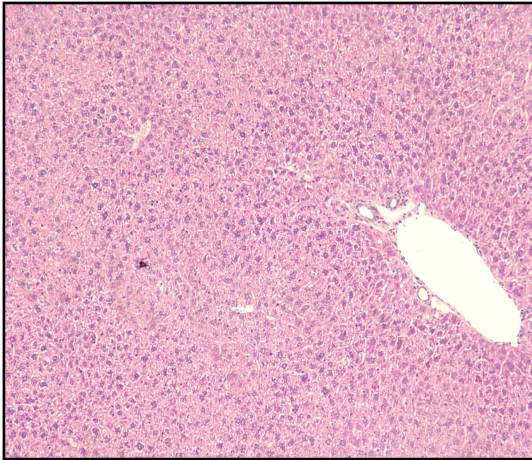
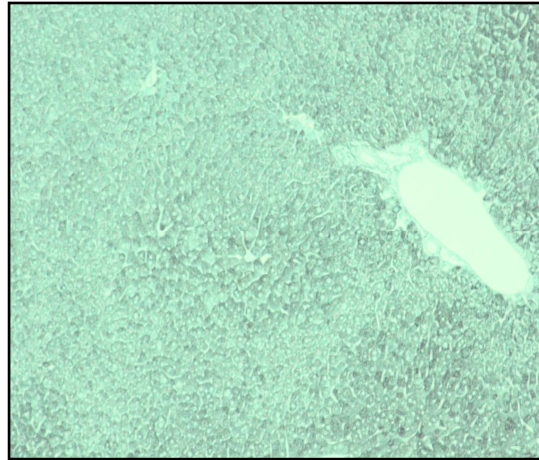
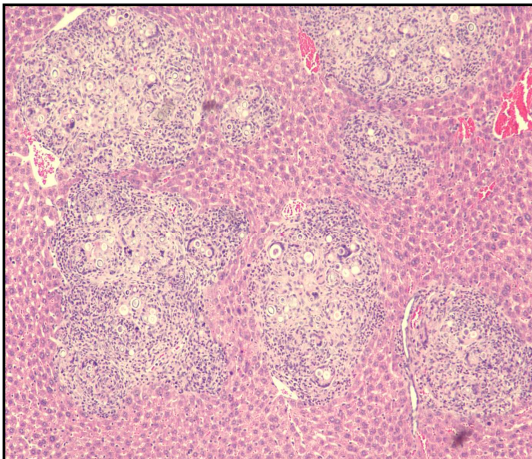
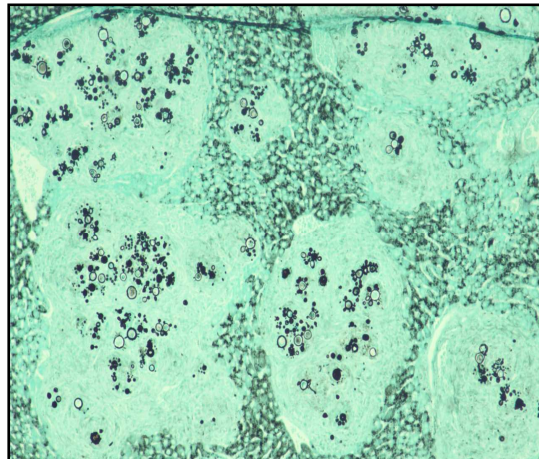
A**B****C****D**

Figura 44. Fotomicrografias de lesões de fígado de animais WT (A e B) e MyD88KO (C e D) após 8 semanas de infecção com o fungo *P. brasiliensis*. H&E (A e C; 10x) e Grocott (B e D; 10x).

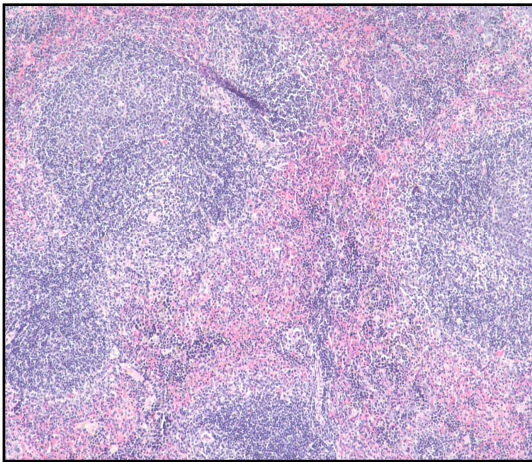
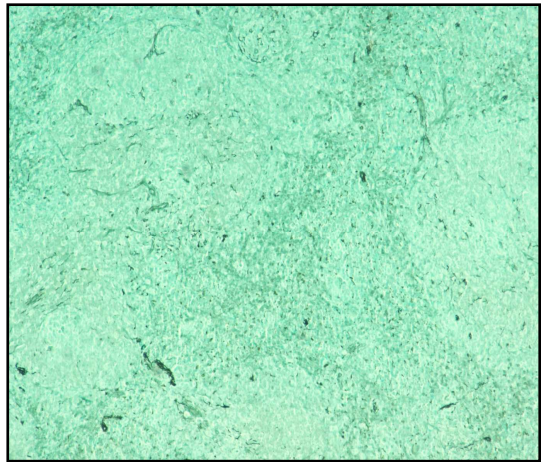
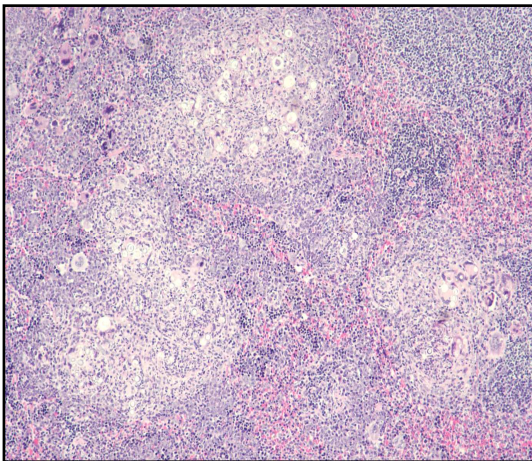
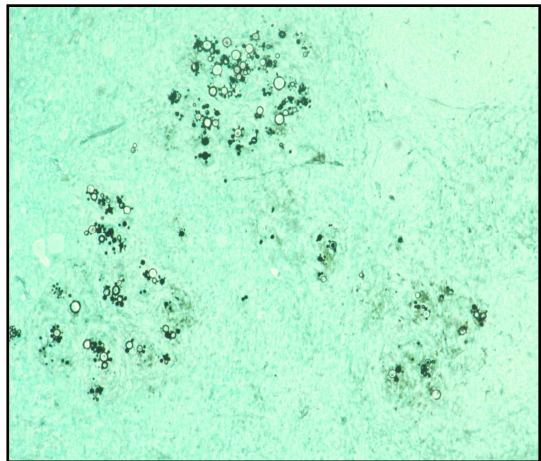
A**B****C****D**

Figura 45. Fotomicrografias de lesões de baço de animais WT (A e B) e MyD88KO (C e D) após 8 semanas de infecção com o fungo *P. brasiliensis*. H&E (A e C; 10x) e Grocott (B e D; 10x).

5 Discussão

Cada vez mais vem sendo demonstrada a importância dos receptores da família Toll-like no reconhecimento de diversos patógenos. Os TLRs reconhecem padrões moleculares de componentes biológicos associados ou não à membrana de patógenos e conferem certa especificidade à imunidade inata (HOFFMANN, 1999; ADEREM et al., 2000). Os diferentes TLRs podem ter um diferente grau de importância no curso de uma infecção. Em infecções fúngicas, por exemplo, o TLR-2 é essencial para a imunidade inata frente ao *Coccidioides posadasii* (VIRIYAKOSOL et al., 2004), por induzir a síntese de citocinas próinflamatórias como IL-12, IL-6 e TNF- α por macrófagos peritoneais. Trabalhando com *Aspergillus fumigatus*, Netea et al. (2003) demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos deficientes para o TLR-4 produziram menores níveis de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , comparando-se com macrófagos provenientes de animais que expressam o TLR-4 funcional, quando estimulados com conídios do fungo. Em outro trabalho, desta vez com *Candida albicans*, os mesmos autores demonstraram que o TLR-2 suprime a imunidade contra o fungo através da indução de IL-10 e da expansão de células T reguladoras (NETEA et al., 2004).

Trabalhando com camundongos TLR-2^{-/-} e com seus controles WT obtivemos resultados que sugerem a participação do TLR-2 no reconhecimento e ativação de macrófagos perante o *P. brasiliensis*. A síntese de NO foi consideravelmente menor nas culturas de macrófagos peritoneais e alveolares de camundongos da linhagem TLR-2^{-/-} se comparado com a síntese de NO por macrófagos provenientes de camundongos WT. Este comportamento repetiu-se tanto nas culturas tratadas somente com IFN- γ quanto nas culturas tratadas com a citocina e infectadas com o fungo. É conveniente ressaltar que nas culturas tratadas com o fungo a quantidade de NO foi maior, conforme esperado.

Se macrófagos de camundongos deficientes para TLR-2 têm menor quantidade de receptores para o fungo em sua membrana e os mesmos produziram níveis menores de NO em relação aos macrófagos de camundongos normais, pode-se sugerir que houve, no primeiro grupo, uma menor interação receptor-fungo e conseqüentemente, estímulos menos eficientes para induzir a síntese de NO. Hoje sabemos que os TLRs não estão ligados diretamente com a síntese de NO, contudo, é

conhecida uma cooperação entre receptores de membrana de várias famílias, entre eles os TLRs. Esta cooperação poderia ativar a atividade microbicida dos macrófagos, assim como a síntese de NO. Realmente, trabalhos recentes relatam a cooperação entre TLRs e outros receptores de imunidade inata. O contato de patógenos com o hospedeiro envolve múltiplos PAMPs e seus cognatos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). É a interação complexa das respostas mediadas por estes receptores, que dirige a resposta inata resultante e, finalmente, o desenvolvimento da imunidade adaptativa específica para este patógeno (TRINCHIERI e SHER, 2007). Nos macrófagos, a sinalização cooperativa entre Dectina-1 e TLR-2 mostrou-se necessária para a indução de TNF- α em resposta a infecções fúngicas. Este foi o primeiro trabalho a demonstrar a interação entre um TLR e receptores não-TLR (BROWN, 2006; GANTNER et al., 2003). Embora Dectina-1 apresente uma habilidade específica direta na indução da produção de citocinas em macrófagos e DCs, como descrito acima, Dectina-1 pode também interagir com outros TLRs-MyD88 acoplados (TLR-2, TLR-4, TLR - 5, TLR7, TLR-9), resultando na indução sinérgica de várias citocinas, incluindo TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-23 (DENNEHY et al., 2008; FERWERDA et al., 2008).

Os dados de UFC e ensaio de fagocitose apóiam a hipótese de menor ativação em macrófagos de animais TLR-2^{-/-}. O número de fungos recuperados foi consideravelmente menor nas culturas de macrófagos de camundongos deficientes, assim como foi menor o número de macrófagos com fungos fagocitados e/ou aderidos. Mais uma vez, pode-se sugerir que houve uma menor interação hospedeiro-fungo devido à menor oferta de receptores do tipo Toll na membrana dos fagócitos e, conseqüentemente, menor foi o número de fungos reconhecidos e fagocitados. Nas culturas pré-ativadas com IFN- γ e infectadas com o fungo, o número de fungos recuperados foi significativamente menor em relação às culturas somente infectadas. Estes dados sugerem que o IFN- γ adicionado levou a um aumento da atividade fungicida por parte dos macrófagos, que pode ser explicada pela maior concentração de NO e eventualmente alguma outra substância fungicida produzida pelos macrófagos. Este número menor de fungos era esperado, pois os macrófagos estavam estimulados com os dois sinais necessários para sua ativação (TUEHR e MARLETTA, 1987).

Na PCM há trabalhos (CANO et al., 1998; GONZALEZ, et al., 2000) que demonstram que o NO é molécula essencial e importante para a atividade fungicida

de macrófagos de camundongos. Nossos resultados parecem estar de acordo com estes estudos. Porém, os níveis mais elevados de NO produzidos por macrófagos TLR-2 normais não foram suficientes para conter o fungo, comparando-se aos macrófagos deficientes, que produzem menos NO, mas apresentam um número de menor de fungos recuperados. Este dado fala a favor da hipótese de que os macrófagos deficientes são menos ativados e por isso fagocitam números menores de leveduras.

Como maiores níveis de NO não foram suficientes para conter o fungo, em futuros experimentos, inibiremos a síntese deste gás e avaliaremos o comportamento dos macrófagos de ambas as linhagens em relação ao número de UFC. Mais uma vez fica evidenciado que mecanismos independentes de NO são capazes de controlar o crescimento do *P. brasiliensis*. Em trabalho realizado em nosso laboratório BERNARDINO (2005) demonstra que camundongos iNOS-KO apresentam doença menos grave na segunda semana de infecção, comparando-se com camundongos que expressam iNOS funcional. Temos então, outro trabalho que sugere outros mecanismos capazes de controlar o fungo. Vale lembrar também que os dados obtidos com relação ao ensaio de fagocitose, UFC e produção de NO com animais TLR-2^{-/-} e WT são bastante semelhantes àqueles que encontramos quando trabalhamos com animais deficientes para o TLR-4 (CALICH et al., 2008; LOURES et al., 2010).

Os níveis de algumas das citocinas analisadas foram diferentes entre as duas linhagens estudadas. A produção de IL-10 e MCP-1 foi menor no sobrenadante das culturas de macrófagos de animais deficientes para o TLR-2, comparada à produção das culturas de macrófagos que expressam o TLR-2 funcional. Não houve diferença na produção de IL-12 entre as duas linhagens e, em relação à produção de IL-6, observamos que animais TLR-2^{-/-} produziram menores níveis desta citocina, porém a produção já era menor em animais deficiente no grupo controle, ou seja, em macrófagos que não foram infectados com o fungo.

A menor produção de IL-6 e de MCP-1 (quimiocina envolvida no recrutamento de células mononucleadas para o local da infecção) por animais TLR-2 deficientes leva a supor que talvez a presença destas citocinas pudesse ser associada a uma doença mais grave. Entretanto, verificamos que houve maior recuperação de UFC de macrófagos TLR-2 normais, sugerindo que a ativação por estas citocinas e a maior produção de NO não foi suficiente para matar os fungos em co-cultivo com macrófagos *in vitro*. É bem possível que existam outros mecanismos que controlem o número de

fungos ou outra hipótese é que a presença do TLR-2 possa culminar em ingestão de grande número de fungos, comparado com a ingestão de fungos por macrófagos TLR-2 deficientes, hipótese esta corroborada pelo ensaio de fagocitose. Deste modo, mesmo produzindo maiores quantidades de citocinas ativadoras e de NO, o macrófago do animal TLR-2 normal não foi capaz de controlar o número de fungos ingeridos.

Os experimentos de UFC feitos a partir do macerado do pulmão em tempo curto de infecção (48 horas) estão de acordo com os dados obtidos *in vitro*, uma vez que o número de fungos recuperados foi maior nos pulmões dos animais WT, confirmando assim os experimentos *in vitro*. Os dados de produção de NO também estão de acordo com os experimentos *in vitro*, uma vez que foram observados maiores níveis de NO no homogenato de pulmão de animais normais para o TLR-2. Tal comportamento também foi observado quando trabalhamos com animais deficientes para o TLR-4 (CALICH et al., 2008; LOURES et al., 2010).

Em relação à síntese de citocinas, ainda observando o tempo curto de infecção, verificamos que animais TLR-2 deficientes e normais produziram níveis semelhantes das citocinas Th1 (IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α) e Th2 (IL-10, IL-4 e IL-5). Contudo, em relação às citocinas associadas ao padrão de resposta imune Th17 (IL-6, IL-17, IL-23 e TGF- β) encontramos níveis maiores de IL-23, IL-17 e TGF- β no homogenato de pulmão de animais TLR-2^{-/-}.

Ao trabalhar com tempo longo de infecção (2 e 11 semanas), encontramos uma doença menos grave nos animais deficientes para o TLR-2, que apresentaram uma carga fúngica pulmonar consideravelmente menor que os animais TLR-2 normais. Estes dados reproduzem os resultados de UFC obtidos em experimentos *in vitro* e em tempo curto de infecção: um número menor de fungos foi recuperado de macrófagos de animais TLR-2 deficientes. Em relação à síntese citocinas verificamos que os animais TLR-2^{-/-} e normais produziram níveis semelhantes de citocinas Th1 e Th2 na segunda semana de infecção. Contudo, níveis menores de IL-10 e IL-12 foram observados no homogenato do pulmão de animais TLR-2^{-/-} após 11 semanas de infecção. Em relação às citocinas Th17, observamos mais uma vez, níveis maiores nos animais TLR-2^{-/-}. Isso ocorreu com todas as citocinas estudadas na segunda semana e com a citocina IL-23, após 11 semanas de infecção.

Observamos então, *in vitro* e *in vivo*, que o TLR-2 está relacionado com a síntese de IL-10. Outros autores já haviam demonstrado esta relação, Ferreira et al. (2008), por exemplo, relataram que a interação entre o *P. brasiliensis* e células dendríticas de camundongos resultou no aumento da expressão de TLR-2 concomitante com maiores níveis de IL-10. Em outro trabalho, os autores relataram que em camundongos deficientes para galactina 3 e infectados com o *P. brasiliensis* foi observado um aumento nos transcritos para o TLR-2 e aumento nos níveis de IL-10 em macrófagos (RUAS et al., 2009).

Além disso, o estudo das citocinas em resposta a infecção pelo fungo *P. brasiliensis* nos revelou que os animais TLR-2^{-/-} apresentaram maiores níveis de citocinas que estão relacionadas com o padrão de resposta imune Th17 quando comparados à produção destas citocinas no pulmão dos animais TLR-2-normais.

A IL-17 é uma citocina recentemente descrita e largamente produzida por uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ ativados; entretanto a IL-17 é conhecida também a sua atividade reguladora da imunidade inata e na defesa contra parasitas. Uma das atividades reconhecidas é a mobilização de neutrófilos para sítios inflamatórios através da indução da produção de quimiocinas, como as CXC, quimiocinas cujas cisteínas terminais são espaçadas por um aminoácido e que têm ação preferencialmente sobre leucócitos PMN (KOLLS & LINDES, 2004; MIYAMOTO et al., 2003; STOCKINGER et al., 2007). A citocina IL-23, da mesma forma que a IL-12, é membro da família das citocinas próinflamatórias. Compartilham a cadeia peptídica p40, enquanto que as cadeias p35 e p19 são especificamente da IL-12 e IL-23, respectivamente. Enquanto que ambas as citocinas induzem a produção de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺, a IL-23, embora não envolvida na expansão de células Th17, tem uma importante função na manutenção na função efetora Th17 (BETTELLI, et al., 2006; STOCKINGER et al., 2007). Trabalhos recentes têm demonstrado que as citocinas IL-17/IL-23 têm uma importante função na defesa contra fungos. Zelante et al. (2007) demonstraram que estas citocinas atuam como reguladores negativos da resposta Th1 promovida por fungos, particularmente *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Além disso, promove uma inflamação rica em neutrófilo (IL-17) e regula a atividade microbicida destas células (IL-23). Em adição, em recente trabalho, Bozza et al., (2008) demonstraram que a perda do Toll IL-1R8 exarceba a resposta Th17 em resposta a infecções fúngicas.

Em revisão publicada por Cua e Kastelein, 2006, os autores relataram que na infecção em mucosa de roedores por *Citrobacter rodentium* (MANGAN et al., 2006) ou na infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae* (HAPPEL et al., 2003), o desenvolvimento da resposta imune Th17 acontece prevalentemente no início da infecção. Em tempos tardios, os animais foram deixando de ter uma resposta predominantemente Th17 e passaram a ter uma resposta Th1 ou Th2. Durante a homeostase, altos níveis de TGF- β aliados a baixos níveis de IL-6 e IL-23 promovem o domínio de células Treg que, por sua vez, suprimem a resposta Th1 e Th2. Em estágios iniciais da infecção, células dendríticas produzem altos níveis de IL-6 e IL-23 via ativação por TLRs. Nesta etapa, a IL-6 inibe a diferenciação e atividade das células Treg; em ação concomitante, altas concentrações de IL-6 e TGF- β estimulam a diferenciação de linfócitos TCD4 em células Th17. Além disso, a IL-23 promove a proliferação das células Th17 e contribui com a manutenção das funções inflamatórias desta resposta. Contudo, em fases tardias das infecções, células Th1 e Th2, provenientes do baço e linfonodo, comandam o clearance final da infecção. Produzem IFN- γ e IL-4, respectivamente, citocinas que inibem a diferenciação e função Th17.

O mesmo fenômeno parece ter ocorrido em nosso modelo experimental; após 11 semanas de infecção não observamos mais o padrão Th17 nos animais TLR-2KO. Ambas as linhagens produziram semelhantes níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17 neste tempo de infecção. Com exceção da citocina IL-23, que continua em níveis maiores nos animais TLR-2KO após 11 semanas de infecção e da citocina IL-12, que aparece em níveis reduzidos nestes animais. Neste tempo de infecção não observamos um padrão definido de resposta imune. Assim, de modo geral, podemos concluir que na ausência do receptor TLR-2 observamos um padrão de resposta Th17 e podemos sugerir então que a presença do TLR-2 inibe a resposta Th17.

Embora a produção de IL-17 seja usualmente associada com uma subpopulação Th17 de linfócitos T CD4⁺ (YAO et al., 1995; ZELANTE et al., 2007; KORN et al., 2009; MILLS, 2008) ou TCD8⁺ (SUTTON et al., 2006; HAPPEL et al., 2003; MILLS, 2008), alguns trabalhos vêm descrevendo a produção desta citocina por outras células do sistema imune inato como linfócitos T $\gamma\delta$ (ROMANI et al., 2008), células dendríticas (DE LUCA et al., 2007; ZELANTE et al., 2007; BOZA et al., 2008) leucócitos PMNs (FERRETI et al., 2003; ROMANI et al., 2008) e até linfócitos NKT (MICHEL et al., 2007; MICHEL et al., 2008). Com estas informações, caracterizamos

por citometria de fluxo quais subpopulações celulares foram responsáveis pela produção de IL-17 na infecção pelo *P. brasiliensis*. Nossos resultados indicaram que a produção de IL-17 foi predominante por linfócitos TCD4. Foi observada uma maior porcentagem de células TCD4 produtoras de IL-17 nos animais TLR-2^{-/-} quando comparadas à produção dos linfócitos de animais TLR-2-normais. Quando determinamos o número absoluto de células, verificamos que também nos animais TLR-2^{-/-} linfócitos TCD4⁺IL-17⁺ ocorreram em maior número. Observamos também nos camundongos TLR-2^{-/-} uma maior porcentagem de linfócitos TCD8⁺IL-17⁺, porém quando analisamos o número absoluto de células que migraram para o pulmão, verificamos que ambas as linhagens apresentaram números semelhantes destas células. Assim, podemos concluir que na ausência do TLR-2 houve uma predominância da resposta imune Th17.

Diversos trabalhos vêm relacionando o afluxo de neutrófilos para o sítio inflamatório de infecções que desenvolveram um padrão de resposta imune Th17 (LEY et al., 2006; WU et al., 2007; LIANG et al., 2007). Muitas vezes este afluxo está relacionado com produção de altos níveis de KC, uma quimiocina CXC envolvida na quimiotaxia de neutrófilos (CARLSON et al., 2008; KOBAYASHI, 2008). A associação da produção de IL-17 e afluxo de PMN para o local da infecção vem sendo descrita em diversas infecções como, por exemplo, pneumonia bacteriana (YE et al., 2001), inflamação crônica dos pulmões (LINDEN et al., 2005) e infecções fúngicas (COOPER, 2007; ZELANTE et al., 2007).

Estes dados estão de acordo com o encontrado em nosso modelo, os animais TLR-2^{-/-} que desenvolveram uma resposta Th17 concomitante com afluxo de neutrófilo para os pulmões, também apresentaram maiores concentrações da quimiocina KC no homogenato do pulmão após 2 e 11 semanas de infecção com o *P. brasiliensis*.

Os resultados de afluxo de células para os pulmões indicaram que a menor carga fúngica nos pulmões destes animais estava associada com um maior afluxo de neutrófilos para o local da infecção nos animais KO. Tais resultados indicaram a possibilidade dos neutrófilos serem os responsáveis, ao menos parcialmente, pelo controle da carga fúngica pulmonar nos animais TLR-2^{-/-}. Os experimentos com depleção de neutrófilos elucidaram esta questão. Quando animais TLR-2-normais e deficientes foram tratados com AcM anti-PMN houve aumento da carga fúngica pulmonar somente nos animais TLR-2^{-/-}, ou seja, somente neste grupo de animais a presença dos neutrófilos foi importante, parcialmente, para o controle da carga fúngica.

Acreditamos ainda, que somente o número e não o estado intrínseco de ativação dos neutrófilos esteja contribuindo para o controle da carga fúngica. Experimentos em que avaliamos a atividade fungicida dos neutrófilos peritoneais e alveolares revelaram que neutrófilos de ambas as linhagens estudadas possuem a mesma habilidade em matar o fungo. Assim, o efeito dos leucócitos PMN pode ser atribuído à sua presença em maior número no sítio da infecção e não a uma maior habilidade intrínseca de matar o *P. brasiliensis*. Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura. Como exemplo, trabalhando com *Candida albicans*, Huang et al. (2004) verificaram que camundongos desenvolveram uma candidíase sistêmica grave associada com a produção deficiente de IL-17 e menor afluxo de neutrófilos para os órgãos infectados, ou seja, evidenciaram o papel protetor dos neutrófilos e a sua contribuição no controle da carga fúngica.

Como vem sendo descrito em outros modelos em que predomina a imunidade Th17, acreditamos que os leucócitos PMNs exerçam um duplo efeito na paracoccidiodomicose. A proteção garantida pelo maior afluxo neutrófilos e a eficiente habilidade em controlar a carga fúngica pulmonar pode estar provavelmente acompanhada por danos do tecido pulmonar causado pela ação de enzimas produzidas pelos neutrófilos como elastases, metaloproteinases e mieloperoxidasas (ZELANTE et al., 2007; ROMANI et al., 2008; LINDEN et al., 2005; IVANOV et al., 2007).

Apesar da menor carga fúngica pulmonar, nossos dados em conjunto sugerem que a resposta Th17 e os leucócitos PMN possam exercer um efeito deletério nos pulmões dos animais TLR-2^{-/-}. A menor carga fúngica nesses animais estava acompanhada por lesões tão graves quanto aquelas apresentadas pelos animais controle. Em ambos as linhagens, reações inflamatórias não organizadas foram observadas por todo parênquima pulmonar sugerindo que a alta carga fúngica (desenvolvida pelos animais WT) ou a prevalente imunidade Th17 (desenvolvida pelos animais TLR-2^{-/-}) provocaram efeitos deletérios similares nos pulmões dos animais quando infectados pelo *P. brasiliensis*. Deste modo, na ausência do TLR-2, os animais desenvolveram uma resposta Th17, que apesar de induzir uma carga fúngica menor, apresentou lesões pulmonares graves. Assim, uma menor carga fúngica provocou efeitos deletérios tão graves quanto aqueles provocados por uma carga fúngica maior nos animais TLR-2 normais. Podemos concluir, então, que o receptor TLR-2, além de inibir a resposta Th17, regula negativamente a patologia pulmonar.

O desenvolvimento de uma resposta imune Th17 na ausência do TLR-2 sugere que o fungo *P. brasilienses*, assim como outros patógenos, pode interagir como uma gama de outros receptores. Outros TLRs (CALICH et al., 2008; LOURES et al., 2010), receptores de manose (JIMENEZ et al., 2006) ou até mesmo o dectina-1 (DINIZ et al., 2004) podem associar-se ao fungo, ativar macrófagos e induzir uma resposta imune que elimine o patógeno. Para exemplificar, trabalhos recentes têm demonstrado que o receptor detém-1 ao ser ativado pelo agonista curdlan culmina com uma cascata de sinalização dependente da molécula adaptadora CARD9 e é MyD88 independente, ou seja, não há participação de TLRs na ativação celular; esta ativação culmina com a produção de IL-23 e indução, portanto, de um padrão de resposta Th17 (LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007; PALM e MEDHITOV, 2007).

A despeito da diferença da carga fúngica pulmonar encontrada entre as duas linhagens estudadas, analisamos as sub-populações de linfócitos infiltrantes de pulmão de animais TLR-2^{-/-} e WT, assim como o perfil fenotípico de macrófagos alveolares, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção. Na segunda semana de infecção não observamos diferenças na população leucocitária infiltrante nos pulmões em ambas as linhagens estudadas. Na décima primeira semana de infecção, houve menor número de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos animais TLR-2^{-/-}, assim como, menor expressão de marcadores de ativação CD25⁺ e CD69⁺. Assim, verificamos que a presença do TLR-2 participa na determinação do infiltrado pulmonar rico em linfócitos T ativados; entretanto, a maior afluxo e ativação de linfócitos está associado com maior carga fúngica. Em recente trabalho, nosso laboratório caracterizou o papel dos linfócitos TCD4⁺ no padrão de susceptibilidade e resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*. Em animais resistentes (A/J) a depleção dessas células gerava resposta suprimida de HTT (hipersensibilidade do tipo tardio) nas 4^o e 8^o semana de infecção, diminuição da produção de anticorpos IgG2a, IgG1 e IgG2b e dos níveis de IL-2. Entretanto, a ausência destes linfócitos pouco alterava a carga fúngica pulmonar e não diminuía a sobrevivência desses animais. Nos animais susceptíveis, entretanto, a depleção de linfócitos T CD4⁺ não alterou o curso da doença (CHIARELLA et al., 2007).

A avaliação de células TCD8 (linfócitos T citotóxicos) durante a décima primeira semana de infecção comportou-se de modo semelhante àquela dos linfócitos TCD4; obtivemos expressiva diminuição dessas células no animais TLR-2^{-/-} e, ainda mais, os linfócitos nesses animais estavam menos ativados (TCD8⁺CD69⁺). Podemos

então supor que a maior frequência e ativação de linfócitos TCD8 nos animais WT, não foi capaz, assim como os linfócitos TCD4, de controlar a carga fúngica pulmonar presente no pulmão destes animais. Assim, a presença do TLR-2 determina o maior afluxo e ativação de linfócitos TCD8, contudo, isso não foi capaz de conter a carga fúngica pulmonar. O papel dessas células citotóxicas efetoras baseia-se na produção de substâncias citotóxicas como as perforinas e granzimas que atuam destruindo células infectadas, reduzindo o foco infeccioso (WHERRY et al., 2003). Trabalho recente desenvolvido em nosso laboratório mostrou que a depleção de linfócitos TCD8 gerou aumento da carga fúngica pulmonar, tanto em animais resistentes, quanto em animais susceptíveis (CHIARELLA et al., 2007). Entretanto, em nosso trabalho, maior número de linfócitos TCD8 foi encontrado no pulmão de camundongos WT, associado a uma maior carga fúngica. Deste modo, o maior afluxo de linfócitos T CD8 nestes animais não foi capaz de controlar a carga fúngica.

A seguir, caracterizamos a presença de células T reguladoras (Treg) nos infiltrados inflamatórios de pulmão. As células Treg apresentam o fenótipo TCD4⁺CD25⁺, expressam constitutivamente o marcador CD25 (cadeia alfa do receptor de IL-2), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen- inibidor da ativação prolongada de linfócitos T) (BELKAID et al., 2007), CD45RO (DIECKMAN et al., 2001), TGF-β1 de membrana (NAKAMURA et al., 2004) e o fator de transcrição nuclear FoxP3⁺, fundamental para sua diferenciação e atividade supressora (FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003). As células Treg atuam através da inibição da produção de citocinas, como a IL-2, bloqueando o ciclo celular de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺; além disso, podem suprimir a atividade proliferativa de linfócitos T ativados CD4⁺CD25⁺ (NAKAMURA et al., 2004). Outro possível mecanismo da ação supressora das células Treg se dá pela produção das citocinas antiinflamatória IL-10 e TGF-β (ASSEMAN et al., 1999; BELKAID, 2007).

Tem sido descrita a importância das células reguladoras em casos crônicos de infecção onde, devido à persistência do patógeno, essas células estariam controlando as respostas imunes que poderiam causar quadros inflamatórios exarcebados na tentativa de erradicar o agente infeccioso. Além disso, a presença de células T reguladoras tem um papel importante na manutenção da memória imunológica, uma vez que impedem a eliminação total dos patógenos (ZHOU et al., 2009).

Os TLRs foram inicialmente associados com a ativação do sistema imune inato; entretanto, a literatura tem demonstrado que TLRs estão expressos em células T efetoras

e reguladoras. Células T efetoras e reguladoras expressam TLR1, TLR-2 e TLR6. Entretanto, as células Treg expressam mais TLR-4, TLR5, TLR7 e TLR8 do que os linfócitos efetores (SUTMULLER et al., 2007). Além disso, a adição de ligantes do TLR-2 podem regular positiva ou negativamente a ação supressora das células Treg (SUTMULLER et al., 2007; ZANIN-ZHOROV et al., 2006).

Em elegante trabalho, Belkaid et al. (2002) mostraram que na infecção crônica por *Leishmania major* a presença de linfócitos Treg além de suprimir a resposta de linfócitos TCD4⁺, inibindo a síntese de IFN- γ , produziram IL-10 que foi importante para a permanência do patógeno. Assim, além de atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, ainda interferiria na atividade microbicida de macrófagos. A presença dessas células parece proporcionar um equilíbrio na atividade efetora das células TCD4⁺ que, na tentativa de eliminar o patógeno, poderiam causar danos teciduais ao hospedeiro.

Nossos resultados na segunda semana de infecção, ao contrário do trabalho acima citado, e apesar dos animais WT apresentarem maior carga fúngica no pulmão, mostraram número equivalente de células T reguladoras no infiltrado pulmonar de animais TLR-2^{-/-} e WT. Por outro lado, após a décima primeira semana de infecção observamos menor número de Treg nos animais TLR-2^{-/-}, os mesmos que apresentaram uma menor carga fúngica pulmonar. É importante ressaltar que o maior número de células Treg nos animais TLR-2 normais esteve associado também com maiores níveis de IL-10 pulmonar. Deste modo, um maior número de Treg nos animais WT estava associado a uma maior carga fúngica. Entretanto, estes mesmo animais apresentaram também maior número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados. Assim, pode-se supor que a presença do TLR-2 levou a infecções mais grave e maior ativação do sistema imune, com concomitante aumento da expressão de células Treg que controlaria parcialmente a inflamação mas causaria a manutenção do processo infeccioso. Desta forma, nossos dados parecem estar em desacordo com os resultados obtidos por NETEA et al. (2004), onde a presença do TLR-2 suprimiu a imunidade contra o fungo *Candida albicans* através da indução de IL-10 e de células T reguladoras.

Estudos realizados por KASHINO et al. (1995) demonstraram que a resistência ao *P. brasiliensis* estava relacionada a níveis elevados de IFN- γ e IgG2a, e a susceptibilidade associada a níveis elevados de IL-5, IgG2b e IgA. Trabalhando com TLR-4, observamos que a presença deste receptor leva a uma maior produção de IgG1, IgG2b e IgM na décima primeira semana de infecção (CALICH et al., 2008; LOURES

et al., 2010), entretanto, resultados obtidos com animais deficientes para o TLR-2 demonstraram que este receptor não influencia a síntese de anticorpos.

Em conjunto, nossos dados parecem demonstrar que o TLR-2 é usado pelo *P. brasiliensis* para infectar os fagócitos dos hospedeiros. Esta interação é importante porque mesmo a maior ativação do sistema imune inato (NO, citocinas) e adaptativo (maior número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ ativados) não consegue sobrepujar a maior carga fúngica conferida pela presença do TLR-2. A presença de células T reguladoras nos animais TLR-2-normais parece colaborar com a manutenção dos fungos em alto número.

Observamos nos animais TLR-2^{-/-} uma maior presença de leucócitos PMN no infiltrado inflamatório dos pulmões e uma imunidade do tipo Th17. Esta imunidade parece estar associada à proteção, uma vez que a carga fúngica pulmonar permaneceu menor do que a observada nos animais TLR-2-normais. Como, entretanto, expressão da imunidade Th17 pode levar a patologia tecidual por excesso de atividade inflamatória através da secreção de metaloproteinase e mieloperoxidase por leucócitos PMN (ROMANI et al., 2008), a análise da histologia pulmonar corrobora esta hipótese. Como a mortalidade dos animais TLR-2^{-/-} e TLR-2-normais foi equivalente, é possível que, apesar de proteger contra o crescimento fúngico, a imunidade Th17 possa ter levado a patologia pulmonar e menor tempo de sobrevivência.

Surpreendentemente, estes dados não estão de acordo com as informações encontradas na literatura, onde a presença dos TLRs leva a uma doença menos grave, geralmente pela produção de citocinas pró-inflamatórias que culminam com o aumento de imunidade celular e produção de compostos que venham eliminar ou conter o parasita (CAMPOS et al., 2004; BELOCCHIO et al., 2004; VIRIYAKOSOL et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004). A presença de TLRs associada a uma doença mais grave, entretanto, foi demonstrado por Belochio et al. (2004). Ao trabalhar com leveduras e hifas de *Cândida albicans*, estes autores demonstraram que a presença do TLR-2 e do TLR-9 levou a uma doença mais grave, com níveis altos TNF- α e de UFC nos animais que possuem os receptores funcionais, comprando-se com os camundongos TLR-2 KO e TLR-9 KO. Além disso, Netea et al. (2004), demonstraram que a presença do TLR-2 leva a supressão da imunidade contra *Candida albicans* através da produção de IL-10 e aumento de células T reguladoras.

Este conjunto de informações caracterizando o TLR-2 na PCM foi reunido e publicado recentemente (LOURES et al., 2009). Os achados sobre a deficiência de

TLR-2 levando a uma resposta Th17 foi também relatada simultaneamente por outros grupos. Trabalhando com a bactéria *Staphylococcus aureus* os autores relataram que macrófagos, astrócitos e micróglia de animais TLR-2^{-/-} produziram níveis maiores de IL-17 no abscesso cerebral após infecção com a bactéria quando comparado ao grupo controle (NICHOLS et al., 2009). Ao mesmo tempo o grupo da Dra. Bali Pulendram relata que o metabolismo do ácido retinóico está ligado à supressão da resposta Th17 quando há ativação via TLR-2. Neste trabalho os autores demonstraram que o TLR-2 induziu em células dendríticas a enzima metabolizadora do ácido retinóico, a retinaldeído desidrogenase. Induziu também a produção de IL-10 e a expansão de células T regulatórias FoxP3⁺. O ácido retinóico atuou nas células dendríticas ativando SOCS3 (fator de supressão da síntese de citocinas 3) que, suprimindo a ativação da proteína quinase p38, levou à produção diminuída de algumas citocinas pró-inflamatórias e as citocinas Th17. Assim como em nosso trabalho, eles demonstram que a sinalização via TLR-2 induzia as células Treg e suprimia a imunidade Th17 (MANICASSAMY et al., 2009).

Na segunda etapa do nosso trabalho estudamos o envolvimento *in vitro* e *in vivo* da proteína adaptadora MyD88. Verificamos nos experimentos de fagocitose que a ausência desta proteína resultou numa menor capacidade em aderir e/ou fagocitar as leveduras não viáveis do fungo por parte dos macrófagos peritoneais. Tal comportamento sugere que os mecanismos de ativação celular que propiciam a fagocitose seriam dependentes da sinalização via MyD88. A menor ativação macrófagica se confirmou nos demais experimentos *in vitro*; a cultura de macrófagos peritoneais de animais MyD88KO apresentou um maior número de fungos recuperados nos experimentos de UFC quando comparada à do grupo controle. Estes mesmos macrófagos apresentaram pequena habilidade de produção de NO. Assim, os baixos níveis de NO produzidos pelos animais MyD88KO não foram suficientes para controlar a carga fúngica na cultura. A ausência de sinalização via molécula MyD88 pode também ter afetado a ativação de outros genes também envolvidos nos mecanismos fungicidas. Deve-se lembrar que a molécula MyD88 também atua na ativação de macrófagos estimulados através do IL-1R (receptor de IL-1) (O'NEILL e BOWIE, 2007). A menor capacidade de fagocitar, a pouca habilidade em matar leveduras do fungo, assim como, a menor produção de NO, confirmou que a sinalização via MyD88

é indispensável para a ativação macrofágica e, conseqüentemente, para o controle do parasita.

Diversos trabalhos têm relatado a importância da sinalização via MyD88 na ativação de macrófagos ou de células dendríticas. Raoust et al. (2009) relataram que LPS ou flagelina derivados de *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de ativar a produção de KC, TNF- α , IL-6 e G-CSF por macrófagos alveolares murinos via TLRs dependentemente de MyD88. Em outro trabalho, Belochio et al. (2004) relataram que as imunidades inata e adaptativa para *C. albicans* e *A. fumigatus* exigem a ação coordenada dos membros distintos da superfamília IL-1R/TLR agindo através da sinalização via MyD88 com uma eficiente produção de citocinas e mecanismos fungicidas.

Os experimentos de UFC feitos a partir do macerado do pulmão em tempo curto de infecção (48 horas) estão de acordo com os dados obtidos *in vitro*, uma vez que o número de fungos recuperados foi maior nos pulmões dos animais MyD88KO, confirmando assim os experimentos *in vitro*. Os dados de produção de NO também estão de acordo com os experimentos *in vitro*, uma vez que foram observados menores níveis de NO no homogenato de pulmão de animais MyD88KO.

Em relação à síntese de citocinas, ainda observando o tempo curto de infecção (48 horas), verificamos que animais MyD88 deficientes e normais produziram níveis semelhantes das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-17, IL-23 e TGF- β . Contudo, o macerado de pulmão de animais MyD88KO apresentou níveis menores de IL-12 quando comparado ao grupo controle.

Ao trabalhar com tempo longo de infecção (8 semanas), encontramos resultados semelhantes ao da fase aguda da infecção, ou seja, uma doença mais grave nos animais deficientes para MyD88, que apresentaram uma carga fúngica pulmonar, hepática e esplênica consideravelmente maior que os animais do grupo controle. Vale chamar a atenção que não houve disseminação de fungo para o fígado dos animais MyD88 competentes, uma rica disseminação foi observada apenas nos animais deficientes. Estes dados reproduzem os resultados de UFC obtidos em experimentos *in vitro* e em tempo curto de infecção. Contudo, apesar da diferença da carga fúngica observada nos pulmões entre as duas linhagens estudadas, verificamos que a produção de NO foi semelhante no homogenato do pulmão de ambas as linhagens. Assim, fica

sugerido que outros mecanismos fungicidas estariam agindo nos animais MyD88 competentes e contribuindo para o controle da carga fúngica neste grupo de animais. Ou ainda, podemos supor que mesmo com altos níveis de NO nos animais MyD88KO, semelhantes aos níveis dos animais do grupo controle, a deficiência de outros mecanismos fungicidas dependentes da sinalização via MyD88 poderia contribuir para a maior carga fúngica nos pulmões destes animais. Por outro lado, os níveis de NO poderiam estar sendo influenciado pela carga fúngica. O estudo do fígado revelou que tal hipótese é relevante e nem sempre maiores níveis de NO estão associados a uma menor carga fúngica. Neste caso, a disseminação de fungo para o fígado provocou uma grande produção de NO, porém estes altos níveis de NO não foram capazes de controlar o crescimento fúngico neste órgão. Podemos ainda argumentar, que como não houve disseminação do fungo para o fígado dos animais do grupo controle, não houve estímulos suficientes para a produção de NO neste órgão. Esta seria também a razão de encontrarmos níveis de NO não muito elevados no pulmão de animais MyD88 normais.

Em relação à síntese citocinas nos pulmões verificamos que os animais MyD88KO e WT produziram níveis semelhantes de TNF- α , IFN- γ e IL-6. Contudo, níveis menores de IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , IL-17 e IL-23 foram observados no homogenato do pulmão de animais MyD88KO após 8 semanas de infecção. No fígado, além destas citocinas, a IL-6 também apresentou-se em menores níveis no homogenato dos animais MyD88KO. Por outro lado, a análise do homogenato de baço revelou que apenas o TNF- α apresentou-se em níveis menores nos animais MyD88KO associado a uma maior produção de IL-10. Em conjunto, os resultados de dosagem de citocinas demonstram que a sinalização via MyD88 é indispensável para a síntese de citocinas do tipo Th17, Th2 e Th17 na PCM.

As citocinas TGF- β , IL-17 e IL-23, ligadas ao padrão de resposta imune Th17, encontravam-se em menores níveis nos animais MyD88KO. Como o padrão Th17 de ativação da resposta imune vem sendo descrito associado a um afluxo de neutrófilos para o sítio inflamatório, decidimos então verificar a morfologia das células que infiltravam nos pulmões dos animais MyD88KO. Verificamos que os animais MyD88KO apresentavam um menor número de leucócitos PMNs quando comparado ao grupo controle. Assim, mais uma vez verificamos que o padrão Th17 estava ligado ao afluxo destas células ao sítio inflamatório na PCM. A dependência de MyD88 para o afluxo de neutrófilos para o sítio inflamatório tem sido descrito em diversas infecções.

Cai et al. (2009) relataram que a ausência de MyD88 culmina com a sobrevivência comprometida, baixos níveis de TNF- α , IL-6 e KC e reduzido número de neutrófilos nos pulmões de camundongos infectados com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Em outro trabalho, a inabilidade de combater a infecção pela bactéria Gram-negativa *Burkholderia pseudomallei* foi acompanhada pelo reduzido número de neutrófilos em camundongos MyD88KO infectados pela bactéria (WIERSINGA et al., 2008).

A despeito da diferença da carga fúngica pulmonar encontrada entre as duas linhagens estudadas, analisamos as sub-populações de leucócitos infiltrantes de pulmão de animais MyD88KO e WT, assim como o perfil fenotípico de macrófagos alveolares, na fase crônica da infecção (oitava semana). Observamos um menor número de macrófagos nos pulmões dos animais MyD88KO caracterizado pelo menor número de células CD11b⁺. Verificamos também que o infiltrado celular apresentava menor número de células mielóides ativadas CD11b⁺IaK⁺ e CD11b⁺CD40⁺. Ao estudar a população linfocitária na oitava semana de infecção observamos que os linfócitos T CD4 dos animais MyD88KO apareciam em menor número e estavam menos ativados, com menor expressão de CD25⁺; de acordo, observamos uma menor população de linfócitos CD4⁺CD25⁺. Contudo, não observamos diferenças no número de linfócitos T CD8, como também não houve diferença na ativação destas células entre animais MyD88 deficientes e normais.

Assim, verificamos que a sinalização via MyD88 participa na determinação do infiltrado pulmonar rico em macrófagos e linfócitos T CD4 ativados. Desta forma, o maior afluxo e ativação de macrófagos e linfócitos está associado com uma menor carga fúngica, indicando a importância da sinalização MyD88 na construção de uma resposta imune eficiente capaz de controlar a carga fúngica. Como já mencionado anteriormente, macrófagos alveolares são essenciais no controle da carga fúngica de animais susceptíveis e resistentes na PCM (PINA et al., 2007). Além disso, em outro trabalho do nosso grupo, demonstrou-se que os linfócitos T CD4⁺ são indispensáveis para o controle da doença em animais resistentes, mas não nos susceptíveis; a depleção de linfócitos T CD4 gerava resposta suprimida de HTT (hipersensibilidade do tipo tardio) nas 4^o e 8^o semana de infecção, diminuição da produção de anticorpos IgG2a, IgG1 e IgG2b e dos níveis de IL-2 (CHIARELLA et al., 2007).

Como a adição de ligantes a TLRs pode regular positiva ou negativamente a ação supressora das células Treg (SUTMULLER et al., 2006; ZANIN-ZHOROV et al.,

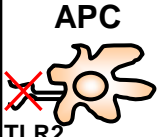


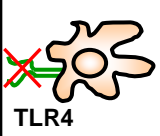



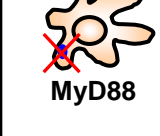




2006) e a sinalização via MyD88 pode ser dependente dos TLRs, decidimos analisar as populações de células T reguladoras na ausência de MyD88. Após 8 semanas de infecção verificamos que houve um menor afluxo de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ no infiltrado células dos pulmões dos animais MyD88KO. Este resultado sugere que a expansão das células Treg é dependente da sinalização via MyD88 como já havia sido descrito por Suttmuller et al. (2006). Neste trabalho, um ligante do TLR-2, o Pam₃Cys, atuou diretamente na proliferação *in vitro* e *in vivo* de Tregs durante infecção por *Cândida albicans* e esta proliferação foi dependente de MyD88.

Verificamos até agora que a ausência de MyD88 resultou numa deficiente produção de compostos fungicidas por macrófagos, como o NO, além de uma deficiente produção de algumas citocinas. Esta deficiente produção de citocinas durante a imunidade inata deve ter ocasionado uma menor ativação da resposta imune adaptativa. Isto fica evidenciado pela menor ativação de macrófagos, assim como, pelo afluxo de menor número de células T CD4 ativadas para o pulmão. Este quadro culminou com uma carga fúngica maior nos pulmões dos animais MyD88 deficientes, assim como, permitiu a disseminação do fungo para outros órgãos, como fígado e baço. Pulmões e fígado, principalmente, apresentaram graves lesões com a presença de granulomas coalescentes e ricos de agregados fúngicos. Assim, camundongos MyD88 deficientes não foram eficientes no controle da doença e morreram em um tempo mais curto que os animais MyD88 competentes, como mostrado através dos experimentos de sobrevivência.

Em conjunto, nossos achados demonstram que a proteína MyD88 é importante para a ativação nos mecanismos fungicidas contra o *P. brasiliensis* e, conseqüentemente, para o controle da doença. Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura. Bretz et al. (2008) ao trabalharem com *Cryptococcus neoformans*, evidenciaram que a proteína MyD88 é indispensável para o controle da carga fúngica pulmonar de camundongos infectados, além de ser responsável pela organização da inflamação e lesões pulmonares na fase inicial da infecção. Trabalhando com *Cândida albicans*, Gow et al. (2007) relataram que a proteína MyD88 é indispensável para o controle da infecção, sendo responsável pela sinalização na produção de citocinas como IL-10 e TNF- α . Entretanto, em trabalho recente com o *P. brasiliensis*, Gonzalez et al. (2008) relataram que a proteína MyD88 não é essencial para uma defesa eficiente frente ao fungo, com equivalente crescimento fúngico e produção de citocinas entre animais MyD88KO e WT. Este resultado oposto é difícil de explicar, porém o grupo utilizou-se de uma via de infecção diferente do nosso modelo, a

via endovenosa. Deve-se, entretanto, argumentar que em trabalhos anteriores (LOURES et al. 2009; 2010) verificamos que o TLR-2 e o TLR-4 influenciam a PCM e ambos os receptores sinalizam utilizando a molécula adaptadora MyD88.

Gostaríamos de terminar a nossa discussão apresentando uma visão geral e integrada sobre a participação dos TLRs (TLR-2 e TLR-4) e da molécula MyD88 na PCM murina. A ausência do receptor TLR-2 levou a uma infecção menos grave associada com maior afluxo de PMNs para o foco da doença e de maiores níveis de citocinas Th17. Contudo, animais TLR-2-deficientes apresentaram mortalidade equivalente e lesões pulmonares tão graves quanto aquelas apresentadas pelos animais do grupo controle. A ausência do receptor TLR-4 também esteve associada a uma doença menos grave, com menor produção de IL-12 e citocinas do tipo Th17; a deficiência de imunidade T CD4 encontrava-se associada à expansão de maior número de células T regulatórias. Por fim, a ausência da sinalização via MyD88 resultou numa infecção mais grave, e menor produção de citocinas Th1, Th2, Th17, assim como, menor expansão de células T efetoras e células T regulatórias. Esta visão geral está esquematizada na figura a seguir:

	Gravidade da Infecção	Imunidade Prevalente	Imuno-regulação	Gravidade das lesões	Destino da doença (mortalidade)		
 TLR2	↓	 Th17 ↑	 Treg ↓	Graves com poucos fungos (↑ PMN)	Não alterada		
 TLR4	↓	 Th17 ↓	 Th1 ↓	 Treg ↑	Menos graves com poucos fungos	Não alterada	
 MyD88	↑	 Th1 ↓	 Th2 ↓	 Th17 ↓	 Treg ↓	Muito graves e com muito fungos	Aumentada

Nossos dados, portanto, demonstram que na PCM pulmonar as funções exercidas pelos receptores TLR-2 e TLR-4 assim como a sinalização celular mediada pela proteína adaptadora MyD88 são importantes para uma resposta equilibrada contra o *P. brasiliensis*. A ausência de cada uma destas moléculas leva a alterações distintas da

resposta imune e o conhecimento da sua função proporcionou um maior entendimento da imunopatologia na paracoccidiodomicose.

6 CONCLUSÕES

1. Os estudos sobre a função do TLR-2 na paracoccidiodomicose sugerem que este receptor ao interagir com o *P. brasiliensis* leva à ativação do macrófago, maior fagocitose e maior produção de citocinas e NO. Contudo, estes mecanismos não foram suficientes para controlar o crescimento fúngico. A infecção *in vivo* de camundongos normais e deficientes para o TLR-2 indicou que a presença do TLR-2 funcional levou a uma infecção mais grave associada com maior produção de IL-10 e expansão de células T regulatórias. Em contrapartida, animais TLR-2 deficientes apresentaram um infiltrado rico em PMN associado com uma produção de citocinas Th17 e, apesar de uma menor carga fúngica, apresentaram lesões tão graves quanto aquelas dos animais TLR-2 normais. Pudemos concluir, então, que o receptor TLR-2, além de inibir a resposta Th17, regula negativamente a patologia pulmonar.

2. A ausência da molécula MyD88 resultou numa produção deficiente de compostos fungicidas, como o NO, além de uma produção diminuída de algumas citocinas. Esta interação deficiente com o fungo resultou em respostas imunes inata e adaptativa ineficientes, evidenciadas pela menor ativação de macrófagos, assim como, pelo afluxo de menor número de células T CD4 ativadas para o foco da doença. Este quadro resultou em maior carga fúngica nos pulmões, assim como permitiu a disseminação do fungo para outros órgãos, como fígado e baço. Assim, camundongos MyD88 deficientes não foram capazes de controlar a doença o que ocasionou a sua mortalidade precoce. Pudemos então concluir que a proteína MyD88 é importante para a ativação dos mecanismos de imunidade inata e adaptativa contra o *P. brasiliensis* e, conseqüentemente, para o controle da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADEREM, A.; ULEVITH, R. J. Toll-Like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-785, 2000.

AKIRA, S.; UEMATSU, S. Toll-like receptors and innate immunity. **J. Mol. Med.**, v. 84, p. 712-725, 2006.

ASSEMAN, C.; MAUZE, S.; LEACH, M. W.; COFFMAN, R. L.; POWRIE, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 995-1004, 1999.

ARANGO, M.; YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmuno-globulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, v. 79, p.115-123, 1982.

ARRUDA, C.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CALICH, V. L. A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 308-316, 2007.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; FRANCO, M. F.; CALICH, V. L. G. Dual role of IL-4 in pulmonary paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 3932-3940, 2004.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S.; NASCIMENTO, F. R. F.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clinical Immunology**, v. 103, p. 185-195, 2002.

BAIDA, H.; BISELLI, P. J. C.; JUVENALE, M.; DELNEGRO, G. M. B.; MENDES, R. P.; GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infec.**, v. 1, p. 273-278, 1999.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 7, p. 875-888, 2007.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.

BELLOCCHIO, S.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; MAMBULA, S. S.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A.; LEVITZ, S. M.; ROMANI, L. The Contribution of the Toll-Like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3059-3069, 2004.

BERNARDINO, S. **Paracoccidioidomicose pulmonar em camundongos geneticamente deficientes da enzima iNOS**. 2005. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 11, p. 235-238, 2006.

BIONDO, C.; MIDIRI, A.; MESSINA, L.; TOMASELLO, F.; GARUFI, G.; CATANIA, M. R.; BOMBACI, M.; BENINATI, C.; TETI, G.; MANCUSO, G. MyD88 and TLR-2, but not TLR-4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p. 870-878, 2005.

BOCCA, A. L.; HAYASSHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURIANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3056-3063, 1988.

BOZZA, S.; ZELANTE, T.; MORETTI, S.; BONIFAZI, P.; DELUCA, A.; D'ANGELO, C.; GIOVANNINI, G.; GARLANDA, C.; BOON, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P.; MANTOVANI, A.; ROMANI, L. Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. **J. Immunol.**, v. 180, p. 4022-4031, 2008.

BRETZ, C.; GERSUK, G.; KNOBLAUGH, S.; CHAUDHARY, N.; RANDOLPH-HABECKER, J.; HACKMAN, R.C.; STAAB, J.; MARR, K.A. MyD88 signaling contributes to early pulmonary responses to *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 952-958, 2008.

BRITO, T. FURTADO, J.S.; CASTRO, R.M.; MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). **Virchows Arch. A. Pathol. Anat.**, v. 361, p. 129-38, 1973.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis an update. **Clin. Microbiol.**, v. 6, p. 89-98, 1993. Review.

BROWN, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 33-43, 2006.

CACERE, C. R.; ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin. Immunol.**, v. 105, p. 215-222, 2002.

CAI, S.; BATRA, S.; SHEN, L.; WAKAMATSU, N.; JEYASEELAN, S. Both TRIF- and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary Klebsiella infection. **J. Immunol.**, v. 183, p. 6629-6638, 2009.

CALICH, V. L. G.; BLOTTA, M. H. S. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In Fidel, P. L.; Huffnagle, G. B. **Fungal Immunology: From an Organ Perspective**. New York: Springer, 2005. p. 201-228.

CALICH, V.L.G.; PINA, A.; FELONOTO, M.; BERNARDINO, S.; COSTA, T.A. ; LOURES, F.V. Toll-like receptors and fungal infection: the role of TLR-2, TLR-4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1-7, 2008. Review.

CALICH, V. L. G.; KIPNIS, T. L.; MARIANO, M.; FAVA NETO, C.; DIAS, W. D. The activation of complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* "in vitro": its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 12, p. 20-30, 1979.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 585-594, 1985.

CAMPANELLI, A. P.; GISLAINE, A. M.; SOUTO, J. T.; PEREIRA, M. S. F.; LIVONESI, R. M.; SILVA, J. S.. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1496-1505, 2003.

CAMPOS, M. A. S.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCÓPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.**, v. 167, p. 416-426, 2001.

CAMPOS, M. A., CLOSEL, M.; VALENTE, E.P.; CARDOSO, J. E.; AKIRA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1711-1718, 2004.

CAMPOS, M. A.; ROSINHA, G. M. S.; ALMEIDA, I. C.; SALGUEIRO, X. S.; JARVIS, B. W.; SPLITTER, G. A.; QURESHI, N.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 176-186, 2004.

CANO, L. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Fate of conidia from *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2096-2100, 1992.

CANO, L. E.; GOMEZ, V.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1494-1496, 1994.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D. C.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 352-359, 2000.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 800-806, 1998.

CARLSON, T.; KROENKE, M.; RAO, P.; LANE, T. E.; SEGAL, B. The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 811-823, 2008.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D. A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1771-1777, 1988.

CAVASSANI, K. A. **Participação de células T-reguladoras no controle da resposta imune durante a paracoccidioidomicose humana.** 2006. (Tese de doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CHIARELLA, A. P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T. A.; FERREIRA, R. C.; CALICH, V. L. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 1078-1088, 2007.

COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PINZAN, C. F.; VENDRUSCOLO, P. E.; MARTINEZ, R.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am. J. Pathol.**, v. 173, p. 423-432, 2008.

COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 have a multi-faceted largely negative role in fungal infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 2680-2682, 2007.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

CUA, D.J.; KASTELEIN, R.A. TGF- β , a “double agent” in the immune pathology war. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 557-559, 2006.

DE LUCA, A.; MONTAGNOLI, C.; ZELANTE, T.; BONIFAZI, P.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; D'ANGELO, C.; VACCA, C.; BOON, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P.; FALLARINO, F.; ROMANI, L. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. **J. Immunol.**, v. 179, p. 5999-6008, 2007.

DENNEHY, K.M.; FERWERDA, G.; FARO-TRINDADE, I.; PYZ, E.; WILLMENT, J.A.; TAYLOR, P.R.; KERRIGAN, A.; TSONI S.V.; GORDON S.; MEYER-WENTRUP, F. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p.500–506, 2008.

DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G.. *Ex vivo* isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1303-1310, 2001.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DINIZ, S.N.; NOMIZO, R.; CISALPINO, P.S.; TEIXEIRA, M.M.; BROWN, G.D.; MANTOVANI, A.; GORDON, S.; REIS, L.F.; DIAS, A.A. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 649-656, 2004.

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors: From the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulation in innate immunity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 1102-1113, 2006.

FAZIOLI, R. A. **Paracoccidioidomicose experimental murina. Estudo da proliferação e da contribuição de células T CD4⁺ e T CD8⁺ na resposta imune de camundongos resistentes e susceptíveis.** 1997. (Tese de Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídeo. **Arq. Cir. Clin. Exp. São Paulo**, v. 18, p. 197-254, 1955.

FERREIRA, K.S.; BASTOS, K.R.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S.R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 1108-1115, 2007.

FERRETTI, S.; BONNEAU, O.; DUBOIS, G. R.; JONES, C. E.; TRIFILIEFF, A., IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2106-2112, 2003.

FERWERDA, G.; MEYER-WENTRUP, F.; KULLBERG, B.J.; NETEA, M.G.; ADEMA, G.J. Dectin-1 synergizes with TLR-2 and TLR-4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. **Cell Microbiol.**, v. 10, p. 2058-2066, 2008.

FONTENOT, J.D.; RUDENSKY, A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 331-337, 2005.

FREMOND, C.M.; TOGBE, D.; DOZ, E.; ROSE, S.; VASSEUR, V.; MAILLET, I.; JACOBS, M.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V.F. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.**, v. 179, p. 1178-1189, 2007.

GANTNER, B.N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S.J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 1107-1117, 2003.

GONZÁLEZ, A.; YÁÑEZ, A.; GOZALBO, D.; GIL, M.L. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 365-374, 2008.

GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2456-2452, 2000.

GOW, N.A.; NETEA, M.G.; MUNRO, C.A.; FERWERDA, G.; BATES, S.; MORAMONTES, H.M.; WALKER, L.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; TSONI, V.; BROWN, G.D.; ODDS, F.C.; VAN DER MEER, J.W.; BROWN, A.J.; KULLBERG, B.J. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 1565-1571, 2007.

GOZALBO, D.; GIL, M. L. TLR-2, but not TLR-4, triggers cytokine production by murine cells in response of *Candida albicans* yeast and hyphae. **Microbes and Infect.**, v. 8, p. 2299-2304, 2006.

HAPPEL, K. I.; ZHENG, M.; YOUNG, E.; QUINTON, L. J.; LOCKHART, E.; RAMSAY, A. J.; SHELLITO, J. E. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. **J. Immunol.**, v. 170, p. 4432-4436, 2003.

HATANO, Y.; TANIUCHI, S.; MASUDA, M.; TSUJI, S.; ITO, T.; HASUI, M.; KOBAYASHI, Y.; KANEKO, K. Phagocytosis of heat-killed *Staphylococcus aureus* by eosinophils: comparison with neutrophils. **APMIS**, v. 117, p. 115-23, 2009.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p.1057-1061, 2003.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspective in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313-1316, 1999.

HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P.L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 624-631, 2004.

HUFFNAGLE, G.B.; YATES, J.L.; LIPSCOMB, M. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 793-800, 1991.

IVANOV, S.; BOZINOVSKI, S.; BOSSIOS, A.; VALADI, H.; VLAHOS, R.; MALMHÄLL, C.; SJÖSTRAND, M.; KOLLS, J.K.; ANDERSON, G.P.; LINDÉN, A. Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 36, p. 442-451, 2007.

JIMENEZ, M. P.; RESTREPO, A.; RADZIOCH, D.; CANO, L.E.; GARCIA, L. F. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by *Nramp1* congenic macrophages lines. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 56-66, 2006.

KARHAWI, A. S. K.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 225-229, 1999.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGERS-VERMES, L. M. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathol.**, v. 92, p. 173-178, 1985.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathol.**, v. 130, p. 131-140, 1995.

KATTAH, M.G.; WONG, M.T.; YOCUM, M.D.; UTZ, P.J. Cytokines secreted in response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human Th17 cells. **Arthritis Rheum.**, v. 58, p.1619-1629, 2008.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 2400-2407, 2008.

KOLLS, J.K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, p. 467-476, 2004.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 485-517, 2009, Review.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; GROSS, O.; ROBINSON, M.J.; OSORIO, F.; SLACK, E.C.; TSONI, S.V.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; BROWN, G.D.; RULAND, J.; REIS E SOUSA, C. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 630-638, 2007.

LEY, K.; SMITH, E.; STARK, M.A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory T lymphocytes. **Immunol. Res.**, v. 34, p. 229-242, 2006.

LIANG, S.C.; LONG, A.J.; BENNETT, F., WHITTERS, M.J.; KARIM, R.; COLLINS, M.; GOLDMAN, S.J.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K. WILLIAMS, C.M.; WRIGHT, J.F.; FOUSSER, L.A. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. **J. Immunol.**, v. 179, p. 7791-7799, 2007.

LINDÉN, A.; LAAN, M., ANDERSON, J.P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. **Eur. Respir. J.**, v. 25, p. 159-172, 2005.

LIU, G.; ZHAO, Y. 2007. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. **Immunology**, v. 122, p.149-156, 2007.

LOURES, F.V.; PINA, A.; FELONATO, M.; ARAÚJO, E.F.; LEITE, K.R.; CALICH, V.L. TLR-4 signaling leads to a more severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect. Immun.** 2010.

LOURES, F.V.; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V.L. TLR-2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J. Immunol.**, v. 183, p. 1279-1290, 2009.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MAMONI, R. L.; NOUER, A. S. A.; OLIVEIRA, S. A.; MUSATTI, C. C.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. S. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA e TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycology**, v. 40, p. 1-7, 2002.

MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; O'QUINN, D.B.; HELMS, W.S.; BULLARD, D.C.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WAHL, S.M.; SCHOEB, T.R.; WEAVER, C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature.**, v. 441, p. 231-234, 2006.

MANICASSAMY, S.; RAVINDRAN, R.; DENG, J.; OLUOCH, H.; DENNING, T.; KASTURI, S.P.; ROSENTHAL, K.M.; EVAVOLD, B.D.; PULENDRAN, B. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. **Nat. Med.**, v. 15, p. 401-409, 2009.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DEL NEGRO, G. B.; SIQUEIRA, A. M. Serodiagnosis In: M. Franco, C. da Silva Lacaz, A. Restrepo, and G. del Negro (ed.), **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Inc., Boca Raton. 345-363, 1984..

MICHEL, M.L.; KELLER, A.C.; PAGET, C.; FUJIO, M.; TROTTEIN, F.; SAVAGE, P.B.; WONG, C.H.; SCHNEIDER, E.; DY, M.; LEITE-DE-MORAES, M.C. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 995-1001, 2007.

MICHEL, M.L.; MENDES-DA-CRUZ, D.; KELLER, A.C.; LOCHNER, M.; SCHNEIDER, E.; DY, M.; EBERL, G.; LEITE-DE-MORAES, M.C. Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 105, p. 19845-19850, 2008.

MILLS, K.H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 2636-2649, 2008.

MIYAMOTO, M.; PRAUSE, O.; SJÖSTRAND, M.; LAAN, M.; LÖTVALL, J.; LINDÉN, A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. **J. Immunol.**, v. 170, p. 4665-4672, 2003.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. and Del Negro, G. (Ed.), **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 131-147, 1994.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; FUSS, I.; PEDERSEN, A.; HARADA, N.; NAWATA, H.; STROBER, W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. **J. Immunol.**, v. 172, p. 834-842, 2004.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L. G.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NETEA, M.G.; FERWERDA, G.; VAN DER GRAAF, C.A.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Recognition of fungal by toll-like receptors. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, p. 4195-4201, 2006.

NETEA, M.G.; SUTMULLER, R.; HERMANN, C.; VAN DER GRAAF, C.A.; VAN DER MEER, J.W.; VAN KRIEKEN, J.H.; HARTUNG, T.; ADEMA, G.; KULLBERG, B.J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 72, p. 3712-3718, 2004.

NETEA, M. G.; WARRIS, A.; VAN DE MEER, J. W. M.; FENTON, M. J.; VERVER-JANSSEN, T. J.G.; JACOBS., L. E. H.; ANDRESEN, T.; VERWEIJ, P. E.; KULLBERG, B. J. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of Toll-Like Receptor-4-mediated signal transduction. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 320-326, 2003.

NICHOLS, J.R.; ALDRICH, A.L.; MARIANI, M.M.; VIDLAK, D.; ESEN, N.; KIELIAN, T. TLR-2 deficiency leads to increased Th17 infiltrates in experimental brain abscesses. **J. Immunol.**, v. 182, p. 7119-7130, 2009.

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, J. R.; ARRUDA, L. B.; CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T.; AKIRA, S.; PREVIATO, J. O.; PREVIATO, L. M.; NOBREGA, A.; BELLIO, M. Expression of functional TLR-4 confers proinflammatory responses to *Trypanosoma cruzi* and higher resistance to infection with *T. Cruzi*. **J. Immunol.**, v. 173, p. 5688-5696, 2004.

OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAORDANOU, P.M.; BLOTTA, M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 139-144, 2002.

O'NEILL, L.A.; BOWIE, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 353-364. 2007, Review.

PALM, N.W.; MEDZHITOV, R. ANTIFUNGAL DEFENSE TURNS 17. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 549-551, 2007.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V.L. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J Leukoc Biol.**, v. 83, p. 1088-1099, 2008.

PINA, A.; SALDIVA, P.H.N.; RESTREPO, L.E.C; CALICH V. L. G. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, p. 1202-1213, 2006.

RAOUST, E.; BALLOY, V.; GARCIA-VERDUGO, I.; TOUQUI, L.; RAMPHAL, R.; CHIGNARD, M. Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. **PLoS One**, v. 4, p. 7259-7266, 2009.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, p. 232-241, 2001.

RESTREPO, A. Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In: McGinnis, M. R. (ed.), Current Topics in Medical Mycology. Springer Verlag, New York. 239-275, 1988.

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, cap. 8, 1994.

RESTREPO-MORENO, A. **Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis***. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, cap. 8, 1994.

ROPERT, C.; FRANKLIN, B.S.; GAZZINELLI, R.T. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. **Semin. Immunopathol.**, v. 30, p. 41-51, 2008.

ROMANI, L.; FALLARINO, F.; DE LUCA, A.; MONTAGNOLI, C.; D'ANGELO, C.; ZELANTE, T.; VACCA, C.; BISTONI, F.; FIORETTI, M.C.; GROHMANN, U.; SEGAL, B.H.; PUC CETI, P. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. **Nature**, v. 451, p. 211-215, 2008.

ROMANI, L.; ZELANTE, T.; DE LUCA, A.; FALLARINO, F.; PUC CETI, P. IL-17 and therapeutic kynurenes in pathogenic inflammation to fungi. **J. Immunol.**, v. 180, p. 5157-5162, 2008.

RUAS, L.P.; BERNARDES, E.S.; FERMINO, M.L.; DE OLIVEIRA, L.L.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Lack of galectin-3 drives response to *Paracoccidioides brasiliensis* toward a Th2-biased immunity. **PLoS One.**, v. 4, p. 4519-4524, 2009.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; INLOW, D. Dimorphism in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 8, p. 23-28, 1980.

SINGER-VERMES, L.M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. The source of the growth-promoting factor (s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med.Vet. Mycol.**, v. 30, p. 261-264, 1992.

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.

SOUTO, J. T.; ALIBERT, J. C.; CAMPANELLI, A. P.; LIVONESI, M. C.; MAFFEI, C. M. L.; FERREIRA, B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. ^a; SILVA, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by IFN- γ . **Am. J. Pathol.**, v. 163, p. 583-590, 2003

STOCKINGER, B.; VELDHOEN, M. Differentiation and function of Th17 T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, p. 281-286, 2007.

SUFFIA, I.J.; RECKLING, S.K.; PICCIRILLO, C.A.; GOLDSZMID, R.S.; BELKAID, Y. Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. **J. Exp. Med.**, v. 203, p.777-788, 2006.

SUTMULLER, R.P.; MORGAN, M.E.; NETEA, M.G.; GRAUER, O.; ADEMA, G.J. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. **Trends Immunol.**, v. 27, p. 387-393, 2006.

SUTMULLER, R.; GARRISTEN, A.; ADEMA, G.J. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 66, p. 91-95, 2007.

SUTTON, C.; BRERETON, C.; KEOGH, B.; MILLS, K. H. G.; LAVELLE, C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 1685-1691, 2006.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335-343, 2003.

THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O.; OCHOA, M. T.; ENGELE, M.; SIELING, P. A.; BARNES, P. F.; ROLLINGHOFF, M.; BOLCSKEI, P. L.; WAGNER, M.; AKIRA, S.; NORGARD, M. V.; BELISLE, J. T.; GODOWSKI, P. J.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v. 21, p. 1544-1547, 2001.

THOMPSON, J. M.; IWASAKI, A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 60, p. 786-794, 2008, Review.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 179-190, 2007.

TUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, IFN- γ . **J. Immunol.**, v. 139, p. 518-526, 1987.

VAZ, C. A.; SINGER-VERMES, L. M.; CALICH, V. L. G. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 971-977, 1998.

VIRIYAKOSOL, S.; FIERER, J.; BROWN, G. D.; KIRKLAND, T. N. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. **Infect. Immun.**, v. 73, p.1553-1560, 2004.

WHERRY, E.J.; TEICHGRÄBER, V.; BECKER, T.C.; MASOPUST, D.; KAECH, S.M.; ANTIA, R.; VON ANDRIAN, U.H.; AHMED, R.. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 225-234, 2003.

WIERSINGA, W.J.; WIELAND, C.W.; ROELOFS, J.J.; VAN DER POLL, T. MyD88 dependent signaling contributes to protective host defense against *Burkholderia pseudomallei*. **PLoS One**, v. 3, p. 3494-3499, 2008.

WIRTZ, S.; BECKER, C.; FANTINI, M.C.; NIEUWENHUIS, E.E.; TUBBE, I.; GALLE, P.R.; SCHILD, H.J.; BIRKENBACH, M., BLUMBERG, R.S.; NEURATH, M.F. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. **J. Immunol.**, v. 174, p. 2814-24, 2005.

WU, Q.; MARTIN, R.J.; RINO, J.G.; BREED, R.; TORRES, R.M.; CHU, H.W. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 78-86, 2007.

YAO, Z.; PAINTER, S. L.; FANSLOW, W. C.; ULRICH, D.; MACDUFF, B. M.; SPRIGGS, M. K.; ARMITAGE, R. J., Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. **J. Immunol.**, v. 155, p. 5483-5486, 1995.

YE, P.; RODRIGUEZ, F.H.; KANALY, S.; STOCKING, H.L.; SCHURR, J.; SCHWARZENBERGER, P.; OLIVER, P.; HUANG, W.; ZHANG, P.; SHELLITO, J.E.; BAGBY, G.J.; NELSON, S.; CHARRIER, K.; PESCHON, J.J.; KOLLS, J.K. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 519-527, 2001.

ZANIN-ZHOROV, A.; CAHALON, L.; TAL, G.; MARGALIT, R.; LIDER, O.; COHEN, I.R. Heat shock protein 60 enhances CD4CD25 regulatory T cell function via innate TLR-2 signaling. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 2022-2032, 2006.

ZELANTE, T.; DE LUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; CONTE, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P.; KASTELEIN, R.A.; KOPF, M.; ROMANI, L. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 2695-2706, 2007.

ZHOU, X.; BAILEY-BUCKTROUT. S.; JEKER, L.T.; BLUESTONE, J.A. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, p. 281-285, 2009, Review.

Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection

Vera Lúcia Garcia Calich · Tânia Alves da Costa ·
Maíra Felonato · Celina Arruda · Simone Bernardino ·
Flávio Vieira Loures · Laura Raquel Rios Ribeiro ·
Rita de Cássia Valente-Ferreira · Adriana Pina

Received: 8 May 2007 / Accepted: 7 August 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Innate immunity is based in pre-existing elements of the immune system that directly interact with all types of microbes leading to their destruction or growth inhibition. Several elements of this early defense mechanism act in concert to control initial pathogen growth and have profound effect on the adaptative immune response that further develops. Although most studies in paracoccidioidomycosis have been dedicated to understand cellular and humoral immune responses, innate immunity remains poorly defined. Hence, the main purpose of this review is to present and discuss some mechanisms of innate immunity developed by resistant and susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection, trying to understand how this initial host-pathogen interface interferes with the protective or deleterious adaptative immune response that will dictate disease outcome. An analysis of some mechanisms and mediators of innate immunity such as the activation of complement proteins, the microbicidal activity of natural killer cells and phagocytes, the production of inflammatory eicosanoids, cytokines, and chemokines

among others, is presented trying to show the important role played by innate immunity in the host response to *P. brasiliensis* infection.

Keywords Cytokines · Dendritic cells · Innate immunity · Macrophages · NK and PMN Cells · *Paracoccidioides brasiliensis* infection

Introduction

Innate immunity has been defined as the first phase of immune response and is based in pre-existing elements of the immune system that directly interact with all types of microbes leading to their destruction or growth inhibition. Innate immunity, which is not clonally specific for a particular pathogen and does not generate specific memory, is mediated by physical barriers, chemical elements, and cell components of the immune system. The adaptative immunity, involving more slowly developing, long-lived, and highly antigen-specific responses are mediated by cell-mediated immunity and antibody production. Several elements of innate immunity act in concert to control initial pathogen growth and have profound effect on the adaptative immune response that further develops. Furthermore, most effector mechanisms of innate immunity are identical to those of adaptative immunity that are activated at later phases of immune response.

V. L. G. Calich (✉) · T. A. da Costa ·
M. Felonato · C. Arruda · S. Bernardino ·
F. V. Loures · L. R. R. Ribeiro ·
R. de Cássia Valente-Ferreira · A. Pina
Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP),
Av. Prof. Lineu Prestes 1730, CEP 05508-900, Sao Paulo,
SP, Brazil
e-mail: vlcalich@icb.usp.br

Several mechanisms of innate immunity such as the activation of complement proteins, the microbicidal activity of natural killer (NK) cells and phagocytes, the production of inflammatory cytokines and chemokines among others, have been shown to play an important role in the early host response to pathogens [1]. Besides their intrinsic complexities, innate immunity mechanisms present important peculiarities which depend on the site they take place [2]. The innate immune response against *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Histoplasma capsulatum*, primary fungal pathogens which infect hosts through the respiratory tract, occurs in the lungs. The lung response to infection is initiated by the secretion of several antimicrobial proteins by the pulmonary epithelium and the phagocytic activity of resident alveolar macrophages. The cell-wall-degrading enzyme lysozyme, the iron-chelating protein lactoferrin and the membrane-permeabilizing members of the defensin, cathelicidin, and pentraxin families are the initial antimicrobial proteins secreted in the alveolar lining layer of the pulmonary epithelium. Innate immunity recognition of microorganism is mediated by germ-line encoded receptors (“pattern recognition receptors, PRR”) which interact with conserved pathogen structures, the so-called “pathogen associated molecular patterns” or “PAMP” [3–5]. The initial macrophage-pathogen interaction results in internalization by the activated cell which can kill the organism through the action of reactive oxygen species and lytic enzymes or extracellular microbial containment. In addition, the secretion of chemokines and cytokines orchestrates the expression of cell adhesion and chemotactic molecules which further control the influx and activation of inflammatory cells to the site of infection [1–5].

Although most studies in human PCM have been dedicated to understand cellular and humoral immune responses, innate immunity remains poorly defined. This is easily understood when one reminds that PCM infection and disease in human beings are recognized at a later and undefined period after initial infection, making difficult to evoke the early events which resulted in controlled infection or overt disease. In this aspect, experimental models are powerful tools to study the initial events that govern hosts-*P. brasili-*

ensis interactions. Thus, the main purpose of this review is to present and discuss some mechanisms of innate immunity to *P. brasiliensis* infection, trying to understand how this initial host-pathogen interface interferes with the protective or deleterious adaptive immune response that will dictate disease outcome. This review does not intend to be a comprehensive revision of the PCM literature that has been reported elsewhere [6–10], but to present a personal view, mainly based in the murine model of genetic resistance and susceptibility to *P. brasiliensis*, of how innate immunity can influence PCM severity and the adaptive immune response to this pathogen.

The isogenic murine model of resistance/susceptibility of paracoccidioidomycosis mimics the human disease

Our laboratory established a genetically controlled murine model of paracoccidioidomycosis (PCM), which allowed us to investigate several parameters of host-parasite interactions. Most of these studies were recently reviewed [10–13] and clearly showed the diverging immune responses mounted by genetically susceptible (B10.A) and resistant (A/Sn or A/J) mice to *P. brasiliensis* infection. One important characteristic of our model is the similarity with the human disease, B10.A mice mimicking the progressive, severe forms of the disease and A/Sn mice showing similar features of the regressive or localized forms of the infection (Fig. 1). As in the human disease, our experimental model demonstrated that resistance is associated with immune responses that favor cellular immunity and activation of phagocytes, whereas susceptibility is associated with impairment of cellular immune responses and preferential activation of B cells [10–12].

After an intra-tracheal (i.t.) infection, the susceptibility and resistance patterns observed following i.p. infection were maintained, as reflected by the high mortality rates of B10.A mice and the regressive disease developed by the A/J strain. The susceptible mice were not able to restrain the infection to the lungs and, 2 months after infection, dissemination to liver and spleen was seen, characterizing a chronic, progressive and disseminated form of the disease; in the resistant mice, on the other hand, no organ

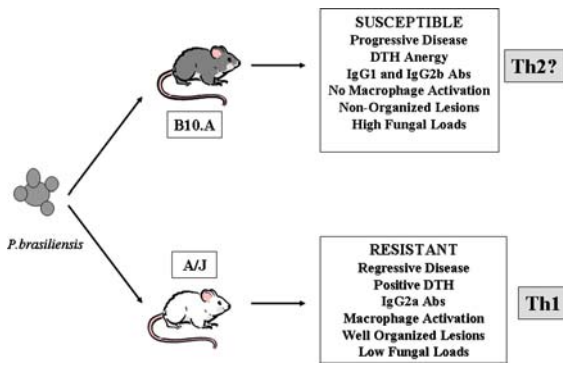


Fig. 1 Main features of the isogenic murine model of resistance and susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* infection

dissemination occurred and a pulmonary-restricted chronic disease was observed. Unexpectedly, early in the i.t. infection (2nd and 4th weeks), A/J mice presented higher pulmonary CFU counts than B10.A mice suggesting that susceptible mice developed a more efficient innate immunity than resistant animals. The adaptative immunity of resistant mice appears to compensate their ineffective innate immunity (Fig. 2). Accordingly, from week 8 of infection onward, positive DTH responses, marked control of fungal burdens, secretion of pulmonary type 1 and type 2 cytokines and preferential production of IgG2a antibodies were seen, leading to a regressive pattern of disease. On the contrary, the anergy of DTH reactions, the preferential synthesis of IgG1 and IgG2b antibodies and the progressively increased fungal burdens of susceptible mice resulted in severe disseminated disease leading to decreased survival times [14, 15].

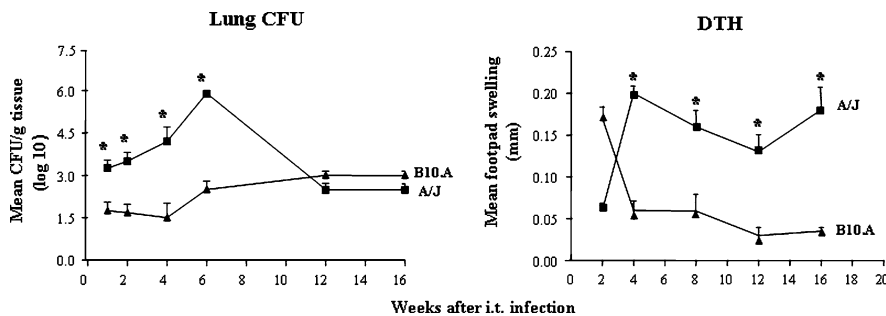


Fig. 2 At the onset of infection, susceptible (B10.A) mice show a better control of pulmonary fungal loads than resistant (A/J) mice. A/J and B10.A mice were i.t. infected with one million *P. brasiliensis* yeast cells. The graph on the left shows

Innate immunity

Genetic control of susceptibility

Clinical studies suggested that susceptibility to *P. brasiliensis* is dependent on several factors, including genetic background, and host’s hormonal function [4–7]. A fungal receptor for estrogen was identified and appears to block the conversion of conidia or mycelium to the infecting yeast form [16]. This finding was further explored in an animal model of infection demonstrating the enhanced resistance of female animals [17, 18] and may explain the unusual susceptibility of male individuals of endemic areas [6, 8, 19].

Genetic studies performed by our group have shown the existence of an autosomal dominant gene (*Pbr* gene), which control *P. brasiliensis* resistance [20] and appears to be similar to the *Nramp* gene, that control resistance to *Mycobacterium sp*, *Leishmania sp*, and *Salmonella sp* infection [21]. Further studies with *Nramp1* congenic macrophages (B10R and B10S expressing or not the *Nramp1* protein, respectively) showed that B10R macrophages, in comparison with B10S cells, expressed higher levels of mannose receptors, presented higher phagocytic ability and increased inhibitory effect on the conidia to yeast conversion [22].

Complement system and chemokines

P. brasiliensis cells are able to activate the alternative pathway of complement and yeast cells-adherent C3b

the recovery of viable fungal cell from lungs (colony forming unit counts, CFU), and the graph on the right the delayed hypersensitivity (DTH) responses measured during 16 weeks of infection

molecules can contribute to fungi phagocytosis by macrophages [23–25]. On the other hand, chemokines which play a major role in regulating the migration of specific leukocytes subsets in both the acute and chronic inflammatory processes [26], were shown to control mononuclear cell recruitment to the lungs of *P. brasiliensis*-infected C57BL/6 mice [27]. Unpublished results from our laboratory suggest that increased and sustained expression of IP-10, RANTES and the chemokine receptor CXCR3 is associated with the resistant behavior of A/Sn mice (C. Arruda and V. L. G. Calich, unpublished observations). This is in accordance with the sustained T cell response mounted by resistant mice at the acquired phase of the immune response [14, 15].

Lipid mediators (Eicosanoids) and *P. brasiliensis* lipids

During an inflammatory reaction, the enzymatic oxidation of arachidonic acid (AA) by cyclooxygenase produces prostaglandins, thromboxanes, and prostacyclins, whereas the 5-LO is an enzyme that catalyzes the oxidation of AA for the synthesis of leukotrienes (LT). The importance of LT as cellular activators and chemotactic factors for neutrophils and eosinophils is very well established, however, little is known about the function of these lipid mediators in the host defense against infectious agents [28, 29].

As the role of LT in pulmonary PCM was never investigated, we asked whether they would have a regulatory function in the severity of PCM of resistant (A/J) and susceptible (B10.A) mice and in the fungicidal and secretory ability of their macrophages. Our results showed that *in vivo* and *in vitro* *P. brasiliensis* infection induces LT synthesis. Compared with A/J mice, levels of pulmonary LT were higher in B10.A animals and increases in the course of infection. To evaluate the importance of LT in PCM, an inhibitor of LT synthesis (MK-0591) and an antagonist of LT receptor (montelukast) were studied in *P. brasiliensis* infection. *In vitro*, LT inhibitors significantly reduced the recovery of *P. brasiliensis* yeasts from normal and IFN- γ primed macrophages. At 48 h of *in vivo* infection, montelukast treatment of B10.A mice induced diminished fungal loads, impaired influx of PMN leukocytes, and increased number of monocytes in the lungs of *P. brasiliensis*-

infected mice. Furthermore, in susceptible mice montelukast treatment led to increased levels of pulmonary IL-10 concomitant with diminished amounts of IL-12, TNF- α , and GM-CSF. In contrast, at the chronic phase of the disease, LT inhibition did not alter the fungal loads of B10.A and A/J mice. In conclusion, our results showed for the first time that LT are important mediators of the acute inflammatory reaction induced by *P. brasiliensis* infection affecting fungal recovery, cellular influx, and cytokines synthesis by susceptible mice [30, L. R. R. Ribeiro and V. L. G. Calich, unpublished observations]. Importantly, our findings with LT inhibition appear to demonstrate that the activation of innate immunity can result in increased ingestion and survival of *P. brasiliensis* yeasts which can evolve to a more severe disease.

Several lines of evidence suggest that prostaglandins production has a deleterious role for *P. brasiliensis*-infected hosts. In murine PCM, at early steps of infection, secretion of PGE₂ was shown to have an immunosuppressive activity by inhibiting IL-12 production and up-regulating IL-4 and IL-10 synthesis [31]. In addition, studies with normal and IFN- γ activated human macrophages demonstrated that prostaglandins secretion inhibited their fungicidal ability which depends on the levels of hydrogen peroxide produced [32, 33]. Interestingly, recent studies showed that virulent and low virulence strains of *P. brasiliensis* are able to synthesize prostaglandins by a cyclooxygenase-dependent pathway and that these lipid mediators are required for *P. brasiliensis* survival [33].

Besides the importance of hosts lipid mediators such as the eicosanoids in innate immunity, other lipid components of pathogen membranes or walls have also been shown to play a role in the host-parasite interaction [34, 35]. Studies on the influence of *P. brasiliensis* lipid fractions in the fungicidal and secretory activities of B10.A macrophages were developed in our laboratories. Although all *P. brasiliensis* lipid fractions are potent inducers of NO synthesis, they can inhibit or enhance the fungicidal ability of macrophages. The previous *in vitro* treatment of macrophages by F1 (phospholipids + neutral lipids) and F2 (short chain glycolipids) fractions resulted in increased phagocytic activity of cells, and recovery of higher numbers of viable yeasts from infected macrophages, despite the presence of high

NO levels. On the other hand, fractions 3a (glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins) and F3b (long chain glycolipids) caused an opposite behavior; they inhibited the phagocytic ability of macrophages leading to decreased recovery of viable yeasts. As a whole, secretion of IL-10, IL-12, MCP-1, and GM-CSF induced by *P. brasiliensis* infection was inhibited by the previous pre-incubation with all lipid fractions [36, F. V. Loures, I. Almeida and V. L. G. Calich, unpublished data]. The different behavior of the studied lipid fractions could be attributed to the different physicochemical structures of these components which would interact with macrophages membranes through different PRR, and the subsequent balance of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines secreted. Indeed, a further characterization of these lipid fractions will permit us to better understand the innate host response to *P. brasiliensis* infection.

Toll Like and other macrophage receptors

In mammalian cells, the Toll-Like Receptors (TLR) are transmembrane proteins, which interact with invariant molecular structures from pathogens (PAMP) and are involved in the activation of the innate immune system. Several typical pathogen components such as lipopolysaccharides, flagelin, peptidoglycans, DNA motifs, among others, are recognized by different TLR [37–42]. Early TLR activation results in the production of several inflammatory mediators and the final balance among pro- and anti-inflammatory components will regulate the type of adaptative immune response [37–42]. The TLR 4 is the key receptor that recognizes bacterial lipopolysaccharides, whereas TLR 2 is involved in the interaction with bacterial peptidoglycans and lipoproteins [38, 39]. TLR have been implicated in the resistance of mammalian hosts to several microorganisms [42–44] including fungal pathogens such as *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Cryptococcus neoformans* [5]. Interestingly, our previous studies with *P. brasiliensis* infection showed that the LPS-resistant, TLR 4 deficient, C3H/HeJ strain is more resistant to i.p. infection than the congenic LPS-susceptible, TLR 4 normal, C3HeB/FeJ strain [45]. Our recent in vitro studies with TLR 4 normal (C3HeB/FeJ) and deficient (C3H/HeJ)

macrophages have demonstrated that this receptor interacts with *P. brasiliensis* cells resulting in macrophage activation as shown by increased synthesis of nitric oxide, IL-12, MCP-1, and enhanced phagocytic activity; this activation, however, was associated with augmented recovery of viable yeast cells from infected macrophages. In the acute phase of pulmonary infection, the presence of TLR 4 induces a more severe disease, with increased numbers of viable yeasts in the lungs associated with elevated synthesis of NO and IL-12. Moreover, even in the chronic phase, higher fungal burdens were seen in the lungs of TLR-4-normal mice, associated with increased levels of pulmonary IL-12 and serum antibodies (IgM and IgG). Thus, the early macrophage activation induced by TLR 4 usage is not able to control *P. brasiliensis* infection [36, F. V. Loures and V. L. G. Calich, unpublished observations]. As LPS unresponsiveness of C3H/HeJ mice was linked to a point mutation in the *TLR 4* gene, it is tempting to suggest that recognition of *P. brasiliensis* components (LPS like?) by TLR 4 has a not yet described contribution to the control of PCM. We have also preliminary in vitro and in vivo studies with TLR 2 knockout mice in a C57Bl/6 background demonstrating a more severe infection in TLR-normal hosts or cells. Altogether, our findings with TLR-deficient animals are unusual since PRR are most commonly used by phagocytes to recognize molecular patterns of pathogens, and their interaction usually results in cell activation, enhanced secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, and increased microbicidal activity. In our model, the increase production of nitric oxide and IL-12 by TLR-normal macrophages was not sufficient to control fungal growth and subsequent disease severity (F. V. Loures and V. L. G. Calich, unpublished results). These receptors appear to be used by *P. brasiliensis* yeast cells to gain access into macrophages and to escape from other fungicidal or fungistatic mechanisms of innate immunity.

Some reports have described the importance of mannose receptors in *P. brasiliensis* ingestion by phagocytic cells. Phagocytosis of yeasts by adherent peritoneal macrophages of susceptible and resistant mice was inhibited by gp-43, a *P. brasiliensis* glycoprotein most recognized by patients antibodies, as well as by *Saccharomyces cerevisiae* derived α -mannan. Gp 43 was also shown to inhibit NO

production and killing ability of cytokine-stimulated macrophages [46]. Immature dendritic cells of resistant mice appear to use mannose receptors to internalize *P. brasiliensis* yeasts [47]. In addition, comparative studies with *Nramp1* gene congenic macrophages (B10R and B10S) have demonstrated that B10R cells were better inhibitors of conidia to yeast conversion and expressed more mannose receptors than B10S macrophages, whereas both cell lines expressed similar levels of complement receptor 3 (C3R) [20]. As described below, CR3 was also shown to play an important function in *P. brasiliensis* adherence and ingestion by phagocytic cells [23, 24].

Polymorphonuclear leukocytes and NK cells

Differently from macrophages, murine PMN leukocytes are able to kill *P. brasiliensis* yeasts through the oxidative metabolism [48, 49]. In an air-pouch model of infection and compared with PMN leukocytes from susceptible mice, cells from A/J mice presented superior fungicidal ability associated with their enhanced oxidative burst [50]. The antifungal activity of murine and human PMN leukocytes was shown to be enhanced by IFN- γ , GM-CSF, or IL-1 β , but not by TNF- α or IL-8 [51]. In contrast, TNF- α was shown to better enhance *P. brasiliensis* killing by human macrophages than IFN- γ [52].

Comparing the early influx of inflammatory cells to the lungs of susceptible and resistant mice, Cano [53] demonstrated an equivalent mononuclear cell influx, but a more prominent migration of neutrophil and eosinophil PMN cells into the lung of susceptible mice. This early PMN influx was also seen early in the infection of BALB/c mice [54]. Furthermore, only in susceptible mice this early (24 h after infection) PMN influx affects disease outcome and acquired immunity further established. Interestingly, the more severe disease of PMN-depleted susceptible mice was associated with the increased presence of pulmonary IL-12 and IFN- γ suggesting that the production of pro-inflammatory mediators not always leads to immunoprotection. Differently from primary infection, neutrophil depletion did not alter immunoprotection in secondary paracoccidioidomycosis. As a whole, our data showed that the genetic pattern of hosts exerts an important influence on the immunoprotective and

immunoregulatory functions of neutrophils which appear to be essential in situations devoid of cell-mediated immunity [55].

The role of NK cell has not been well studied in *P. brasiliensis* infection, but the few available investigations in this area suggest that this lymphocyte subpopulation has a complex function in PCM that varies according to the type of host or site where these cells were obtained. In the peripheral blood of PCM patients, NK cells were found in elevated number but they displayed low cytotoxic activity [56]. In vitro studies showed a direct inhibitory effect of murine NK cells on *P. brasiliensis* growth [57] and in a hamster model of infection, NK cells were shown to be activated at the first weeks of infection followed by an impairment of its activity associated with depressed cell-mediated immunity [58].

Our findings of illness exacerbation after in vivo depletion of IL-12 or IFN- γ in euthymic and athymic BALB/c mice [59, 60] suggested that NK cells would have a protective role in pulmonary PCM. In vivo depletion of NK cells by anti-Asialo GM1 polyclonal antibody resulted in a more severe disease of both mouse strains, but the depletion effect was more pronounced in the NK-depleted athymic than euthymic mice. Anti-NK cell treatment led to increased antibody production by the former strain but did not modify the humoral immunity of euthymic animals, indicating that the isotype class switch in T cell deficient mice is influenced by NK cells cytokines. In addition, NK cells were shown to control PMN leukocytes influx to the lungs of infected mice. Hence, NK cells seem to have a protective effect in pulmonary PCM and their function appears to be more prominent in T-cell deficient than in T-cell sufficient mice [61, R. C. Valente-Ferreira and VLG Calich, unpublished data].

Macrophages and nitric oxide

The crucial role of the mononuclear phagocytic system in the resistance to *P. brasiliensis* infection was demonstrated by the fact that reticuloendothelial system blockade, induced by colloidal carbon inoculation previous to *P. brasiliensis* infection (i.p. route), increased the severity of the disease in both resistant and susceptible animals [62].

The infection by *P. brasiliensis* occurs by inhalation of airborne propagules of the mycelial phase of the fungus, which reach the lungs, eventually evade the host defenses and disseminate via the bloodstream and/or lymphatics to virtually all parts of the body [4, 8, 10, 19]. Alveolar macrophages (AM) are believed to be important in the initial containment of the microorganisms through nonspecific or innate immune mechanisms. AM or dendritic cells (DC) also phagocytose particles and microbial organisms and carry them via lymphatics to regional hilar lymph nodes, where specific immune responses are believed to be generated.

P. brasiliensis proliferates *ex vivo* in a variety of mouse macrophages, including resident peritoneal alveolar and peripheral blood derived monocytes until the cells are lysed and killed by a yet unknown mechanism. However, the immunological activation of these cells efficiently inhibits fungal growth [48]. When alveolar macrophages were analyzed after pulmonary infection, absence of hydrogen peroxide production was observed with cells obtained from susceptible mice, whereas macrophages from resistant mice produced increased levels of this metabolite in the course of disease [14]. These different activities parallel the DTH anergy and the evident DTH reactivity developed by susceptible and resistant mice, respectively.

Brummer et al. [48, 63] have demonstrated that activation of mouse peritoneal macrophages by IFN- γ enhances the fungicidal activity of these cells but fungal killing is independent of the respiratory burst. Further investigations showed the fundamental role of nitric oxide in the fungicidal ability of activated macrophages, which appear to use an iron-restriction mechanism to inhibit the transformation of ingested conidia to yeast cells [64, 65]. We have confirmed the fundamental role of NO in the murine PCM [64]. In the course of infection, peritoneal macrophages from resistant mice secrete low levels of NO associated with high amounts of TNF- α ; the opposite was seen with glass adherent cells from susceptible mice. Interestingly, *in vitro* inhibition of NO production by aminoguanidine treatment of B10.A macrophages led to increased production of TNF- α indicating the inhibitory role of NO on cytokine secretion. More importantly, the disease of *i.p.* infected C57BL/6 mice genetically deficient for inducible nitric oxide-synthase (iNOS KO) and in resistant and susceptible

mice *in vivo* treated with aminoguanidine and incapable of secreting NO, is more severe [66].

The dual role of NO in murine PCM was further confirmed in the pulmonary model of infection. Compared with wild type mice, a lower fungal load was observed at week 2, although at week 10, increased number of fungi was detected in the lungs of mice genetically deficient of inducible NO-synthase (iNOS KO). The better control of fungal loads by iNOS KO mice at week 2 of infection appeared to be TNF- α mediated, since its *in vivo* neutralization abolished this difference [67, S. Bernardino and V. L. G. Calich, unpublished results). In agreement, Gonzales et al. [68] showed that TNF- α -activated peritoneal macrophages, although not producing NO, were able to inhibit the transition of *P. brasiliensis* conidia to yeast cells. Interestingly, our studies also demonstrated that iNOS KO mice, despite the more intense fungal infection by week 10 of infection, developed better organized granulomas. Thus, the increased secretion of TNF- α , the increased influx of activated T cells to the lungs, and the better organized lesions appear to compensate the genetic deficiency of NO. This was further confirmed by the equivalent survival times showed by iNOS KO and WT mice, despite the higher fungal loads in the former strain [67, S. Bernardino and V. L. G. Calich, unpublished data).

Recent studies were also performed aimed to understand the interaction between alveolar macrophages from resistant and susceptible mice and *P. brasiliensis*. Normal alveolar macrophages of B10.A mice, *in vitro* infected with *P. brasiliensis* yeasts, can be activated by small doses of exogenously added IFN- γ , secrete high levels of IL-12, nitric oxide and display a very efficient fungal killing activity. In contrast, macrophages from A/J mice were poorly activated by low doses of IFN- γ , secrete low amounts of IL-12, NO and present a poor fungicidal ability concomitant with the production of high levels of active TGF- β . The fungicidal ability of B10.A macrophages was modulated by aminoguanidine, whereas TGF- β was the main negative regulator of A/J macrophages. Thus, alveolar macrophages of susceptible mice seem to be more efficient than those of resistant mice and interaction of *P. brasiliensis* with these cells probably occurs through different macrophage receptors [69 A. Pina and V. L. G. Calich, unpublished observations]. These findings

appear to explain the apparently discrepant result we had observed when the pulmonary model of infection was first described: at the beginning of infection higher number of viable yeast cells were recovered from lungs of resistant mice as compared with susceptible ones [14]. Furthermore, IFN- γ , the most efficient macrophage activator was found in higher levels in the lung homogenates of susceptible mice [59]. Thus, the innate immunity appears to be much more efficient in the susceptible strain than in the resistant one. This hyperactivity is concomitant with high levels of NO production that is able to restrain fungal growth but also interferes with acquired immune responses leading to a subsequent immunosuppression of T-cell mediated immunity [66, A. Pina and V. L. G. Calich, unpublished data].

Dendritic cells and other APCs

T cells have clonal receptors (TCR) educated to see antigen epitopes presented by major histocompatibility complex (MHC) molecules of antigen presenting cells (APC). Several cell types can exert the APC function such as macrophages, B cells and endothelial cells, but the dendritic cells (DC) are considered the “professional APC” due to their special ability to activate T cells. DC are derived from hematopoietic stem cells in the bone marrow and form a network of a heterogeneous cell populations. Many DC reside and traffic through nonlymphoid peripheral tissues, continuously surveying the environment for invading microorganisms [70]. During infection, DCs in the periphery are activated by interaction with microorganisms or inflammatory mediators to increase their expression of MHC and co-stimulatory molecules such as CD80, CD86, and CD40. They also modify their expression of chemokines receptors and adhesion molecules, causing migration from the periphery to the T cell zone of draining lymph nodes. Activated DC then display pathogen encoded antigens to naïve antigen-specific T cells which initiate primary T cell responses [71, 72]. In the course of maturation, DC are subject to profound changes. The endocytic capacity is downmodulated, while there is a marked up-regulation of MHC class II expression, from an already high constitutive level [72].

As with other infectious pathologies, some studies on the importance of different antigen presenting

cells (DC, macrophages, and B cells) in the resistance to *P. brasiliensis* infection were reported. It was shown that gp43, the immunodominant antigen for humoral immunity in PCM [73], was mainly presented by macrophages and stimulated a preferential Th1 cytokine production in resistant mice. In contrast, in susceptible mice gp43 was predominantly presented by B lymphocytes and led to preferential secretion of Th2 cytokines. In addition, no differences in T cell reactivity of resistant and susceptible mice were detected. [74]. Another report from the same group showed that the s.c. injection of mature DC, macrophages and B cells primed naïve susceptible and resistant mice and induced T cell proliferation. In this study, however, macrophages and B cells from both mouse strains displayed equivalent stimulatory activity inducing a preferential secretion of IL-10 and IL-4; DC from resistant animals, however, when compared with B10.A DC, stimulated a higher production of IFN- γ , equivalent levels of IL-12 and higher expression of MHC class II and CD80 molecules. B10.A macrophages were also shown to secrete high levels of IL-6 while IL-12 was secreted in similar levels by DC of both strains. Hence, it was suggested that DC of resistant mice preferentially drive Th1 development while B cells and macrophages from both mouse strains appeared to induce the differentiation of a Th0 or Th2 phenotype [75]. Further studies with resistant [76] and susceptible mice derived DC [77] demonstrated an equivalent behavior of gp-43 stimulated DC. Thus, gp43 treatment as well as *P. brasiliensis* infection down-regulated MHC class II, CD80, CD86, CD54, and CD40 expression as well as IL-12 and TNF- α secretion by LPS-treated DC. So, no major differences were reported in the activities of DC obtained from resistant and susceptible mice, unless they were previously activated by LPS. The i.v. infusion of DC previously treated with gp-43 plus LPS, but not with each of these components individually, increased pulmonary CFU counts and altered granulomas morphology of *P. brasiliensis*-infected mice [77].

We have also preliminary results comparing the behavior of DC from resistant and susceptible mice. Bone marrow derived DC were obtained and activated with LPS, *P. brasiliensis* yeast cells or a soluble whole yeast cells antigen. DC from both mouse strains exhibited MHC class II and co-stimulatory molecules (CD80, CD86, CD11c,

CD40) when activated by LPS or fungal yeast cells although A/J DC presented higher CD11c and CD86 expression. Compared with A/J cells, B10.A DC secreted higher levels of IL-12, IL-10, and NO, whereas the former are more able to produce active TGF- β . DC of susceptible mice induced a high proliferative activity of A/J T cells but not of B10.A lymphocytes while A/J DC stimulated T cell proliferation of both mouse strains. Thus, T cell anergy was only detected when B10.A DC were co-cultivated with homologous lymphocytes indicating that B10.A DC does not lack the ability to properly present *P. brasiliensis* antigens and that B10.A lymphocytes are appropriately activated when *P. brasiliensis* antigens were presented by A/J DCs (A. Pina and V. L. G. Calich, unpublished results).

Cytokines

As a more detailed review on the role of cytokines in PCM was reported elsewhere [10, 13], only a brief analysis of those studies will be presented here. IFN- γ is the most important protective cytokine to susceptible, intermediate, and resistant mice to *P. brasiliensis* infection [59, 78]. TNF- α and IL-12 are also very important protective cytokines [60, 78, 79]. IL-4 has a dual role (protective or disease promoting) in pulmonary PCM depending on the genetic pattern of the host [80, 81]. Despite the less severe disease induced by administration of rIL-12 [79], the strong inflammatory reaction in the lungs demonstrated the harmful effect of this cytokine. IL-10 appears to be one important macrophage-deactivating cytokine in pulmonary PCM, and its genetic absence appears to result in the aseptically cured of infected mice (Fig. 3) (T. A. Costa and V. L. G. Calich, unpublished results). Altogether, studies with cytokine-deficient mice showed that the Th1/Th2 paradigm can be applied to explain fungal growth (or dissemination) in liver and spleen: IL-4 and IL-10 are disease-promoting cytokines while IL-12 and IFN- γ are protective ones. However, the control of fungal growth in the lungs is more complex and both, Th1 (e.g., IL-12) and Th2 cytokines (e.g., IL-4) can have antagonistic effects. IL-10 is a disease-promoting cytokine and appears to have a more prominent role in the control of pulmonary PCM than IL-4.

Summarizing, our studies on innate immunity to *P. brasiliensis* infection suggest that a highly efficient innate immunity can lead to severe paracoccidioidomycosis. The following findings appear to support such inference: at the onset of infection, susceptible mice display a better control of lung fungal loads; IL-4 protects susceptible mice from severe infection; exogenous IL-12 leads to increased lung pathology; TLR usage leads to increased macrophage activation associated with increased fungal loads; susceptible mice secrete higher levels of LT and its inhibition results in milder pathology; PMN depletion causes more severe PCM associated with increased secretion of pro-inflammatory cytokines; early NO secretion can induce more severe infection. As a whole, it appears that “the more reactive the host innate immunity the more severe is the initial *P. brasiliensis* infection.”

The influence of innate immunity in the resistance to *P. brasiliensis* infection

Protective immunity in paracoccidioidomycosis (PCM) is believed to be mainly mediated by cellular immunity [82]. In the human disease the Th1/Th2 dichotomy of CD4⁺ T cells appears to partially explain the behavior of PCM patients and healthy infected individuals. So, the most evident Th1 immunity is observed when lymphocytes from healthy infected subjects or cured patients are in vitro activated by gp 43 and a clear production of IL-2 and IFN- γ is concomitant with a vigorous lymphoproliferative response [83, 84]. The acute form of the disease appears to be the Th2 pole of reactivity, where IL-4, IL-5, and IL-10 are produced and associated with low T cell proliferation which, however, can be reverted by in vitro treatment with rIL-12 and anti-IL-10 antibodies [85]. The severe form of the chronic disease also appears to present a Th2 pattern of reactivity. Most individuals of the chronic form of PCM, however, do not display polarized Th1/Th2 immune responses and their hyporesponsiveness appears to be not linked to imbalanced cytokine synthesis and may be due to other immunoregulatory mechanisms such as T cell anergy, T cell deletion by apoptosis or suppressive activity of natural regulatory T cells [10, 86–88]. Indeed, a recent paper showed a direct correlation

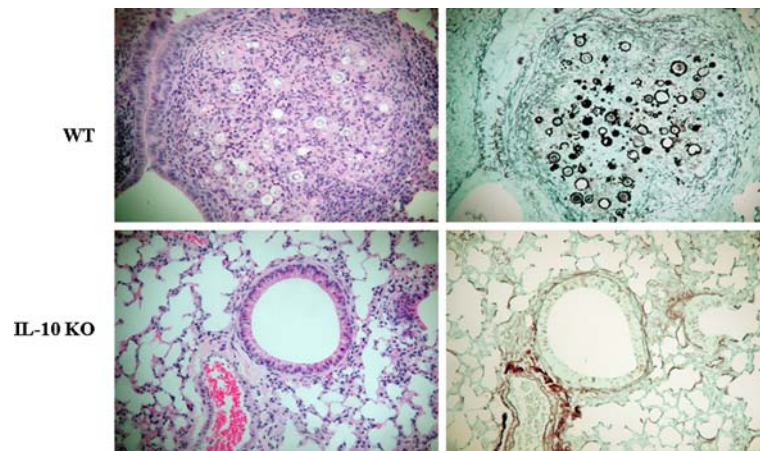


Fig. 3 Photomicrographs of pulmonary lesions developed by wild type (WT, upper micrographs) and IL-10-deficient (IL-10 KO, lower micrographs) C57BL/6 mice at week 8 after intra-tracheal infection with one million fungal cells. WT mice presented extensive, fungi rich, confluent lesions, occupying

almost all lung parenchyma, whereas in IL-10 KO mice a diffuse inflammation, with no evident fungal cells, affected smaller areas of lungs. Left, H&E; right, Grocott stained lesions (100 \times)

between the number of natural regulatory T cells in the lesions and peripheral blood and the severity of PCM [88]. In human PCM the function of CD8⁺ T cells, however, was poorly investigated.

We have some studies that characterized the function of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the immunity developed by susceptible (B10.A), intermediate (C57Bl/6) and resistant (A/J) mice after pulmonary infection with *P. brasiliensis* yeasts. In susceptible mice, anti-CD4 treatment did not alter disease severity and cellular immunity. However, anti-CD8 treatment led to increased fungal loads and DTH reactivity indicating the antagonistic effects of CD8 α ⁺ cells. In resistant mice, besides a protective type 1 immunity mediated by CD8 α ⁺ T cells, neutralization studies revealed the concomitant presence of Th1 and Th2 cells. In addition, deficiency of whole T and CD8 α ⁺ T cells but not of CD4⁺ T or B cells in the C57Bl/6 background led to more severe PCM and increased mortality rates. In conclusion, our studies demonstrated that in pulmonary PCM: (a) fungal loads are mainly controlled by CD8 α ⁺ T cells; (b) genetic susceptibility of hosts appears to be associated with deletion or anergy of CD4⁺ T cells, and finally, (c) a balanced type1/type2 immunity is associated with genetic resistance to *P. brasiliensis* infection [10].

The concomitant analysis of innate and adaptative immunity in murine PCM lead us to propose a

model on the immunopathogenesis of pulmonary paracoccidioidomycosis. Alveolar macrophages of susceptible mice are very reactive to *P. brasiliensis* components and pro-inflammatory mediators are secreted by cells involved in the innate immunity of lungs. The high production of IL-12 stimulates NK cells to secrete elevated amounts of IFN- γ that induces the secretion of high levels of nitric oxide and other pro-inflammatory mediators by macrophages which develop a very efficient fungicidal ability. Leukotrienes and the TLR expression appear to activate macrophages and to contribute with *P. brasiliensis* endocytosis. Anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and/or TGF- β are secreted in low levels. Although not extensively studied, equivalent activities were found with B10.A dendritic cells. This behavior results in a very effective innate immunity and precocious control of fungal growth and would result in preferential activation of Th1 CD4⁺ cells. The excessive and continuous production of NO, however, inhibits the initial development of CD4⁺ T-cell-immunity by active induction of T cell anergy or deletion. The elevated expression of co-stimulatory molecules (MHC class I, CD40, CD80, for example) by macrophages or DC could directly activate CD8⁺ T cells without the help of CD4⁺ T lymphocytes [89, 90]. This pattern of immunity could explain the very efficient mechanism of innate immunity resulting, however, in

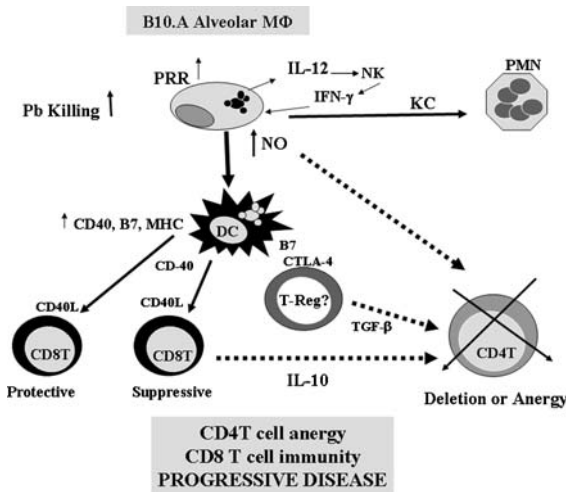


Fig. 4 Hypothesis on the innate and acquired immunological mechanisms leading to susceptibility to *P. brasiliensis* infection. At the initial stage of infection, macrophages from susceptible mice secrete high amounts of IL-12 and nitric oxide (NO) resulting in efficient fungal clearance. The same secretory pattern was seen with B10.A dendritic cells (DC). The excessive NO secretion, however, induces anergy or deletion of CD4⁺ T cells. The expression of co-stimulatory molecules such as CD40 by antigen presenting cells induces a preferential activation of CD8⁺ T cells that is not sufficient to efficiently activate macrophages and to control disease progression. (PRR, pattern recognition receptors; co-stimulatory molecules: CD40, B7, CTLA-4; MHC, major histocompatibility complex; KC, chemokine chemotactic for PMN cells; NK, natural killer cells; TGF-β, tissue growth factor beta; Treg, natural regulatory CD4⁺ T cells)

poor T-cell mediated immunity (Fig. 4). It would also explain the DTH anergy, the non-organized lesions, the high levels of antibodies, and the progressive and severe disease developed by susceptible mice.

Alveolar macrophages and DC from resistant mice respond to *P. brasiliensis* infection by secreting low amounts of IL-12, but high levels of TGF-β and TNF-α. This results in poor NK cell activation, IFN-γ production, NO secretion, and initial inefficient fungal killing. This activity characterizes the low efficient natural immunity of resistant mice. However, the production of cytokines and NO in low levels do not impair T-cell immunity. So, resistant animals slowly develop *P. brasiliensis* specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, which control fungal growth and organize lesion morphology (Fig. 5). This model does not exclude the previously proposed Th1/Th2 model of *P. brasiliensis* control. It tries, however, to put together

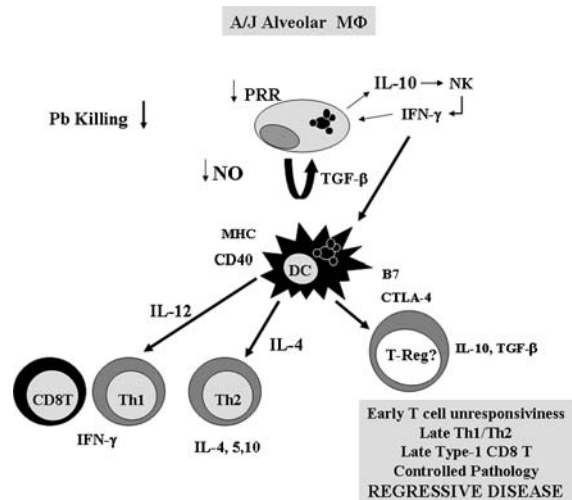


Fig. 5 Hypothesis on the innate and acquired immunological mechanisms leading to resistance to *P. brasiliensis* infection. At the innate phase of immunity, macrophages, and dendritic cells (DC) from resistant mice secrete low amounts of IL-12 associated with high levels of TGF-β resulting in impaired nitric oxide (NO) secretion and inefficient fungal clearance. This mild pattern of activation, however, results in slow activation of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells and type1 CD8⁺ T lymphocytes which are able to induce efficient macrophage activation, controlled inflammation, and regressive disease. (PRR, pattern recognition receptors; co-stimulatory molecules: CD40, B7, CTLA-4; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer cells; TGF-β, tissue growth factor beta; Treg, natural regulatory CD4⁺ T cells)

many results obtained with studies on innate and adaptative immunity in the murine model of pulmonary infection, which eventually may contribute to enhance our knowledge on the immunopathogenesis of human paracoccidioidomycosis.

Acknowledgments This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

References

1. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004;40:845–59.
2. Zaas AK, Schwartz DA. Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:195–202.
3. Janeway CAJR. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13:11–6.
4. Janeway CAJR, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216.

5. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev* 2004;4:1–13.
6. Franco M, Montenegro MR, Calich VLG, Bernard G. Paracoccidioidomycose. In: Brasileiro Filho G, editor. *Bogliolo patologia*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara koogan; 2006. p. 1387–98.
7. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 2002;10:80–7.
8. Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:89–117.
9. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 2002;40:225–42.
10. Calich VLG, Blotta MHSL. Pulmonary paracoccidioidomycosis In: Fidel PL, Huffnagle GB, editors. *Fungal immunology: from an organ perspective*. New York, NY: Springer; 2005. p. 201–27.
11. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Russo M, Vaz CAC, Burger E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p. 151–73.
12. Calich VLG, Vaz CAC, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol* 1998;149:407–16.
13. Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:615–23. Review.
14. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Russo M, Calich VLG. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. *Infect Immun* 1995;63:1777–83.
15. Chiarella AP. Caracterização da função das células TCD4⁺ e T CD8⁺ na paracoccidioidomycose pulmonar de camundongos isogênicos. Características imunopatológicas da paracoccidioidomycose experimental [M.Sc. Dissertation]. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2002. 103 pp.
16. Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:7659–63.
17. Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Bacchi MM, Mendes-Giannini MJ, Calich VL. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol* 1989;27:71–82.
18. Aristizabal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol* 2002;40:169–78.
19. Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 2001;39:233–41.
20. Calich VLG, Burger E, Kashino SS, Fazioli RA, Singer-Vermes LM. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. *Infect Immun* 1987;55:1919–23.
21. Forbes JR, Gross P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 2001;9:397–403.
22. Jimenez-Mdel P, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE, Garcia LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;47:56–66.
23. Calich VLG, Kipnis TL, Mariano M, Fava-Netto C, Dias da Silva W. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro. Its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1979;12:20–30.
24. Munk ME, Kajdacsy-Balla A, Del Negro G, Cuce LC, Dias da Silva W. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1992;30:317–21.
25. Calich VLG, Burger E, Vaz CAC. PMN chemotactic factor produced by glass adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Brit J Exp Pathol* 1985;66:57–65.
26. Luster AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Eng J Med* 1998;12:436–45.
27. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi M, Maffei CML, Ferreira BR, et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . *Am J Pathol* 2003;163:583–90.
28. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005;174:589–94.
29. Machado ER, Ueta MT, Lourenco EV, Anibal FF, Sorgi CA, Soares EG, et al. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *J Immunol* 2005;175:3892–9.
30. Ribeiro LRR. Caracterização do papel dos leucotrienos na paracoccidioidomycose (PCM) pulmonar e na atividade fungicida e secretora de macrófagos peritoneais infectados pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. [MSc.Dissertation]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005. 106 pp.
31. Michelin MA, Figueiredo F, Cunha FQ. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Parasitol* 2002;102:170–7.
32. Soares AMVC, Calvi SA, Peracoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001;102:480–5.
33. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Serrão Peraçoli MT, Soares AMVC. Prostaglandin E(2) inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect* 2007;9(6):744–7.
34. Almeida IC, Camargo MM, Procopio DO, Silva LS, Mehler A, Travassos LR, et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J* 2000;19:1476–85.

35. Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Glycoinositol-phospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 1995;25:745–50.
36. Loures FV. Caracterização da função dos lipídios do *Paracoccidioides brasiliensis* e do receptor TLR4 na interação fungo-hospedeiro (M.Sc. Dissertation). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007. 116 pp.
37. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie NH, Zhang M, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 1998;395:284–8.
38. Kirschning CJ, Wesche H, Ayres TM, Rothe M. Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998;188:2091–7.
39. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ W J, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274:10689–92.
40. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–76.
41. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-like receptors family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;168:2433–40.
42. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443–51.
43. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:5–11.
44. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782–7.
45. Calich VLG, Singer-Vermees LM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Brit J Exp Path* 1985;66:585–94.
46. Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol* 2002;218: 87–94.
47. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett* 2004;94:107–14.
48. Brummer E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p. 213–24.
49. McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:603–8.
50. Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DSP, Calich VLG, Burger E. Neutrophils from air-pouches of resistant mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection are more activated and efficient in killing the fungi than those of susceptible ones. *J Leuk Biol* 1996;59:526–33.
51. Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 2000;38:177–82.
52. Soares AM, Calvi SA, Peraçoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001;102:480–5.
53. Cano LER. Paracoccidioidomycose pulmonar experimental. Caracterização do modelo de infecção intratraqueal em camundongos resistentes e susceptíveis; participação do IFN- γ , das células TCD4⁺ e CD8⁺ na resistência ao fungo. (Ph.D. Thesis). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007. 191 pp.
54. Gonzalez A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol* 2003;41:391–9.
55. Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol* 2006;79:1202–13.
56. Peraçoli MT, Soares AM, Mendes RP, Marques SA, Pereira PC, Reskallah-Iwasso MT. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1991;29:373–80.
57. Jimenez BE, Murphy JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infec Immun* 1984;46:552–8.
58. Peraçoli MT, Fortes MR, Da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1995;37:129–36.
59. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermees LM, et al. Protective role of interferon-gamma in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infec Immun* 1998;66:800–6.
60. Deepe GS, Romani L, Calich VLG, Huffnagle G, Arruda C, Molinari-Madlum EEIW, et al. Knockout mice as experimental models of virulence. *Med Mycol* 2000;38:87–98.
61. Valente-Ferreira RC. Caracterização da importância do IFN- γ , da IL-12, dos leucócitos PMN e das células NK na imunidade natural ao *P. brasiliensis* utilizando hospedeiros normais e deficientes de células T. [Ph.D. Thesis]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005. 172 pp.
62. Kashino SS, Fazioli RA, Moscardi-Bacchi M, Franco M, Singer-Vermees LM, Burger E, et al. Effect of macrophage blockade on the resistance mechanisms of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 1995;130:131–40.
63. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis*: evidence for non-oxidative mechanisms. *Intern J Immunopharmac* 1998;10:945–52.
64. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of interferon-gamma activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 2000;68: 2546–52.
65. Cano LE, Gómez B, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA. Inhibitory effect of deferoxamine on macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia

- by ingested macrophages: reversal by holotransferin. *Infect Immun* 1994;62:1494–6.
66. Nascimento FR, Calich VLG, Rodriguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* 2002;168:4593–600.
 67. Bernardino S. Paracoccidioidomycose pulmonar em camundongos geneticamente deficientes da enzima óxido nítrico sintase-induzida (iNOS). [M.Sc.Dissertation]. São Paulo, São Paulo, Universidade de São Paulo; 2006. 82 pp.
 68. Gonzalez A, Aristizabal BH, Gomez EC, Restrepo A, Cano LE. Short report: inhibition by tumor necrosis factor- α -activated macrophages of the transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells through a mechanism independent of nitric oxide. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:828–30.
 69. Pina A. Atividade fungicida e secretora de macrófagos alveolares de camundongos susceptíveis e resistentes infectados pelo *P. brasiliensis*. [Ph.D. Thesis]. São Paulo, São Paulo, Universidade de São Paulo; 2005. 118 pp.
 70. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245–52.
 71. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 1999;29:1617–25.
 72. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
 73. Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun* 1986;53:199–207.
 74. Almeida SR, Moraes JZ, Camargo ZP, Gesztes J, Mariano M, Lopes JD. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 1998;190:68–76.
 75. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. *Scand J Immunol* 2003;58:290–7.
 76. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett* 2004;94:107–14.
 77. Ferreira KS, Almeida SR. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induces an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Immunol Lett* 2006;103:121–6.
 78. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli APM, Livonesi CML, Ferreira MBR, Travassos LR, et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . *Am J Pathol* 2003;163:583–90.
 79. Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FRF, Fazioli RA, Vaz CAC, et al. IL-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol* 2002;103:185–95.
 80. Pina A, Valente-Ferreira RC, Molinari-Madlum EE, Vaz CA, Keller AC, Calich VLG. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect Immun* 2004;72:2369–78.
 81. Arruda C, Valente-Ferreira RC, Pina A, Kashino SS, Fazioli RA, Vaz CAC, et al. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun* 2004;72:3932–40.
 82. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Reskallah-Musatto MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2004. p. 175–86.
 83. Mamoni RLR, Nouer AMS, Oliveira SA, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002;40:1–7.
 84. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001;13:248–52.
 85. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol* 2005;114:86–94.
 86. Cacere CR, Romano CC, Mendes Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of Paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol* 2002;105:215–22.
 87. Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MS, Livonesi MC, Martinez R, et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis* 2003;187:1496–505.
 88. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancin JO, Mamede RC, Martinez R, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol* 2006;177:5811–8.
 89. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86–9.
 90. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998;393:474–8.

Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis

Vera L. G. Calich, Adriana Pina, Maíra Felonato, Simone Bernardino, Tania A. Costa & Flávio V. Loures

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence: Vera L. G. Calich,
Departamento de Imunologia, Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1730,
CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.
Tel.: +55 11 30917397; fax: +55 11
30917224; e-mail: vlcalich@icb.usp.br

Received 8 November 2007; accepted 17
December 2007.

First published online 1 April 2008.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2008.00378.x

Editor: Willem van Leeuwen

Keywords

toll-like receptors; fungal pathogens;
paracoccidioidomycosis; TLR2; TLR4; MyD88.

Innate immunity and pattern recognition receptors

Cells of the innate immune system constantly sense the presence of invading microorganisms using several kind of conserved, transmembrane or intracytoplasmatic receptors called pattern recognition receptors (PRRs). These receptors recognize conserved molecular structures shared by groups of microorganisms and known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Because PAMPs are produced by pathogens but not by the host cells, their recognition by PRRs allows for self–nonself discrimination (Janeway & Medzhitov, 2002). The most important types of PRR are the Toll-like receptors (TLRs), the non-TLRs such as intracellular nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like proteins and the C-type lectin receptors (CLRs) (Gordon, 2002; Brown & Gordon, 2003; Inohara & Nunez, 2003; Akira *et al.*, 2006). The interaction between PAMPs and PRRs leads to the activation of cells of the innate immune system and subsequent production of mediators that are used to eliminate the invading pathogen and to control the adaptative immune responses. TLRs are crucial for many aspects of microbial elimination, including re-

Abstract

The aim of this minireview is to present a concise view of the most important pattern recognition receptors used by the innate immune system to sense and control pathogen growth into host tissues. A brief review of the role of Toll-like receptors (TLRs) in fungal infections followed by some recent results on the function of TLR4, TLR2 and the MyD88 adaptor molecule in the pathogenesis of paracoccidioidomycosis are presented.

cruitment of phagocytes to the site of infection, microbial killing and activation of dendritic cells (DCs), which become immunogenic and endowed with a unique ability to induce full activation of T cells (Reis e Sousa, 2004). Interestingly, recent findings indicate that direct recognition of PAMPs by DCs is critical for priming appropriate T-cell responses. TLR signaling resulted in activated DCs that primed an effective T helper 1 (Th1) or Th2 response, whereas indirect activation by inflammatory mediators alone (proinflammatory cytokines) induced DCs that, although supporting expansion of CD4⁺ T-cell clones, did not promote Th1 or Th2 effector differentiation (Spörri & Reis e Sousa, 2005).

Thus far, 13 TLRs have been described that recognize a wide variety of pathogen structures including triacyl lipopeptides (TLR1 in association with TLR2), lipoteichoic acid and lipoproteins of Gram-positive bacteria (TLR2), double-stranded RNA (TLR3), lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria (TLR4), bacterial flagellin (TLR5), diacyl lipopeptides (TLR6 in association with TLR2), single-stranded RNA (TLR7) and nonmethylated CpG of bacterial DNA (TLR9) (Takeda & Akira, 2005). Intracellular NOD proteins sense the presence of intracellular muropeptides (Inohara & Nunez, 2003). Upon ligand binding, innate

immune receptors engage intracellular signaling pathways that result in the activation of conserved transcription factors for cell activation. One key transcription factor used by TLR-mediated innate immunity is NF κ B. Almost all TLRs signal via MyD88, an adaptor protein, for NF κ B activation, subsequent inflammatory cytokine production and control of adaptive immunity (Takeda & Akira, 2005; Akira *et al.*, 2006). Besides their well-described role in the immunorecognition of conserved pathogen motifs, TLRs can be used to enhance microbial pathogenicity. Thus, *Yersinia pestis* was shown to evade the host's immune system by TLR2 activation and subsequent production of IL-10, one important macrophage deactivating cytokine (Sing *et al.*, 2002). Furthermore, studies with whole pathogens or purified components have shown distinct patterns of TLR usage: TLR2 and TLR4 control *in vivo* *Brucella abortus* infection whereas only TLR4 is activated by the purified bacterial lipopolysaccharide (Campos *et al.*, 2004).

TLR-activated DCs can induce the differentiation of distinct T-cell-mediated effector mechanisms. Lipopolysaccharide-stimulated DCs produce low levels of IL-10 but high levels of IL-12 and tumor necrosis factor- α (TNF- α), favoring Th1 immunity. In contrast, peptidoglycan-activated DCs secrete low levels of IL-12 associated with prevalent production of IL-10, resulting in prevalent Th2 immunity (Qi *et al.*, 2003). Interestingly, the recognition of microbial products by TLRs was found to block the suppressive effect of T regulatory (Treg) cells on pathogen-specific adaptive immune response and this effect was partially due to the synthesis of IL-6 by TLR-stimulated DCs (Pasare & Medzhitov, 2003).

Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), mannose receptor (MR) and dectin-1 are C-type lectins that recognize glycoproteins and carbohydrates in pathogen cells. This interaction controls phagocytosis, microbicidal activity and signaling processes that direct cell adhesion and migration. As fungal cell walls are carbohydrate-rich structures, these PRRs are directly involved in the host's innate immunity to these pathogens. DC-SIGN as well as MRs are primarily activated by IL-4 and associated with the Th2 pattern of the immune response (Brown & Gordon, 2003; Cambi *et al.*, 2005; Koppel *et al.*, 2005). Dectin-1 activation by *Candida albicans* or curdlan, a dectin-1-specific β -glucan, was recently shown to induce the preferential secretion of tumor growth factor (TGF)- β and IL-6 and the subsequent activation of Th17 lymphocytes. This T-cell subset secretes IL-17, induces chemokine secretion at sites of infection, causes recruitment of neutrophils and is important in defense against extracellular pathogens, including *Candida albicans* (Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007; Palm & Medzhitov, 2007).

Upon ligand binding, innate immunoreceptors engage intracellular signaling pathways that converge to the activation of conserved transcription factors and subsequent cell

activation. Almost all TLRs signal via MyD88 for NF κ B activation, resulting in Th1 immunity associated with the prevalent IL-12 secretion. TLR2 activation, however, induces high levels of IL-10, and expansion of regulatory T cells (Treg) which further control T effector lymphocytes (Gordon, 2002; Akira *et al.*, 2006; Suttmüller *et al.*, 2006). Interestingly, recent work has shown that the preferential activation of dectin-1 by the selective agonist curdlan, and possibly dectin-2 by *Candida albicans* hyphae, is mediated by the caspase recruitment domain (CARD9) adaptor protein, resulting in increased IL-23 secretion and preferential induction of Th17 cells (Gross *et al.*, 2006; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007; Palm & Medzhitov, 2007). The fungal morphotype is also recognized by different PRRs and this fact was suggested to be exploited as an escape mechanism by fungal cells. For instance, *Candida* hyphae are recognized only by TLR2, inducing prevalent secretion of anti-inflammatory cytokines, whereas *Candida* blastoconidia interact with TLR4, Dectin-1 and TLR2, resulting in a complex pattern of cell activation (Romani, 2004; Netea *et al.*, 2006).

In summary, PRR activation orchestrates the development of innate and adaptive immune responses, which are necessary for protection against infection, reinfection or containment of chronic infections. However, if activation of innate immune receptors is excessive, high levels of proinflammatory mediators [IFN- γ , TNF- α , nitric oxide (NO)] are secreted and can exert a deleterious effect to the host. Septic shock induced by lipopolysaccharide and TLR4 activation by Gram-negative bacteria is a good example of inadequate activation of immunity, which results in severe host pathology.

Recognition of fungi by TLR

Netea *et al.* (2002) were the first to describe the use of TLRs by a fungal pathogen, *Candida albicans*. C3H/HeJ mice, which express a defective TLR4 gene, present an increased susceptibility to disseminated candidiasis and impaired recruitment of neutrophils to the site of infection when compared with normal, C3H/HeN mice. In addition, the chemokines keratinocyte-derived chemokine (KC) and macrophage inflammatory protein (MIP-2) were shown to be released in lower amounts by TLR4-defective macrophages. Following this pioneer work, other groups reported their studies on the role of TLRs and the MyD88 adaptor protein in *Candida albicans* infections. The main biological effects observed in diverse experimental approaches are summarized in Table 1. As can be seen, some discrepant findings were obtained with TLR2- and TLR4-deficient hosts (Netea *et al.*, 2002, 2004; Villamón *et al.*, 2004b; Murciano *et al.*, 2006), although MyD88 deficiency appears consistently to lead to impaired protection or phagocyte-fungus interaction. This adaptor protein was shown to be

Table 1. The role of TLRs and MyD88 adaptor protein in some experimental models of *Candida albicans* infection

PRR deficiency	Biological effect	Reference
TLR4	High susceptibility; normal PMN and macrophage killing activity; normal TNF- α , low KC, MIP-2 and impaired PMN influx	Netea <i>et al.</i> (2002)
TLR4	No increased susceptibility to disseminated infection. TLR4-deficient mice mount Th1 immunity	Murciano <i>et al.</i> (2006)
TLR2	High resistance; TLR2 induces IL-10, Treg cells and suppressed immunity	Netea <i>et al.</i> (2004)
TLR2	High susceptibility; low TNF- α , MIP-2; decreased PMN influx; no effect phagocytosis and NO production	Villamón <i>et al.</i> (2004a)
MyD88	Hyphae: impaired phagocytosis, killing and cytokine secretion	Marr <i>et al.</i> (2003)
MyD88	High susceptibility, impaired production of cytokine, low type-1 CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells	Villamón <i>et al.</i> (2004b)
MyD88, TLR4, TLR2, TLR9	MyD88: high susceptibility. TLR signaling: depends on morphotypes, route of infection. Th1 response: DC-MyD-dependent	Bellocchio <i>et al.</i> (2004a)

Table 2. The role of TLRs and MyD88 adaptor protein in some experimental models of *Cryptococcus neoformans* infection

PRR deficiency	Biological effect	Reference
TLR2, TLR4, CD14	Glucuronoxylomannan stimulates cells via CD14 and TLR4; no TNF- α synthesis	Shoham <i>et al.</i> (2001)
TLR-2, TLR4, MyD88, CD14	MyD88 has a major role in protection; CD14 and TLR2, minor roles; TLR4, no effect	Yauch <i>et al.</i> (2004)
TLR-2, TLR4, MyD88	MyD88 and TLR2 have a major role in protection; TLR4 not important	Biondo <i>et al.</i> (2005)
TLR2 and TLR4	Not important to protection	Nakamura <i>et al.</i> (2006)

involved in the induction of protective immune responses by DCs (Bellocchio *et al.*, 2004a), as well as in the phagocytosis, killing and synthesis of cytokines by *Candida*-infected cells (Marr *et al.*, 2003; Villamón *et al.*, 2004a).

TLR2 usage was shown to have protective or detrimental effects in models of *Candida albicans* infection; the conflicting results, however, could be attributed to the use of different experimental protocols (Netea *et al.*, 2004; Villamón *et al.*, 2004a, b), but brought important contributions to the understanding of immunopathology of infectious processes. The deleterious effect of TLR2 signaling during infection was associated with increased synthesis of IL-10 and an enhanced survival of CD4⁺CD25⁺ Treg cells, resulting in deficient T-cell immunity and impaired fungal clearance (Netea *et al.*, 2004).

As observed with *Candida albicans*, the role of TLR in *Cryptococcus neoformans* infection needs to be further explored (Table 2). Glucuronoxylomannan, the major component of the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans*, is shed from the fungus and circulates in blood and cerebrospinal fluid of infected hosts. This polysaccharide was reported to activate cells transfected with CD14 and TLR4 but this interaction results in incomplete activation of cells, and no secretion of TNF- α (Shoham *et al.*, 2001). *In vivo*, MyD88 and TLR2 but not TLR4 were shown to be required to induce protection against *Cryptococcus neoformans* infection (Yauch *et al.*, 2004; Biondo *et al.*, 2005). A more recent report, however, suggests that TLR2 and TLR4 do not or only marginally contribute to the host response to this pathogen (Nakamura *et al.*, 2006).

TLR2-, TLR4- and MyD88-dependent activation of host cells were shown to play a role in cytokine secretion, polymorphonuclear neutrophil (PMN) activation and

susceptibility to infection by another opportunistic fungal pathogen, *Aspergillus fumigatus* (Wang *et al.*, 2001; Marr *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2003; Bellocchio *et al.*, 2004a, b; Braedel *et al.*, 2004; Dubordeau *et al.*, 2006). As described for *Candida albicans*, the germination from conidia to hyphae was proposed as an escape mechanism of *A. fumigatus* as conidia cells are recognized by TLR4 and TLR2, resulting in the production of proinflammatory cytokines, while hyphae stimulate production of IL-10 using a TLR2-dependent mechanism (Netea *et al.*, 2003). Although some experimental approaches have revealed the important role of MyD88 adaptor protein in cell signaling and protective responses (Mambula *et al.*, 2002; Bellocchio *et al.*, 2004a), other reports claimed that MyD88 signaling and activation of NF κ B are not important for fungal clearance (Marr *et al.*, 2003; Dubordeau *et al.*, 2006) (Table 3).

As a whole, several reports have illustrated the use of different TLRs by a single fungal species, resulting in diverse biological activities. Studies with purified components of fungal cell walls revealed the major PRR and signaling pathways used by host cells to recognize fungal PAMPs; however, this picture is less clear when whole pathogens are used to infect normal or PRR-deficient hosts. The final activation, although influenced by the missing receptor, is mediated by the remaining PRRs, which can compensate or not the deficient receptor.

PRR and *Paracoccidioides brasiliensis* infection

Paracoccidioides brasiliensis, the causative agent of human paracoccidioidomycosis, is primarily a respiratory pathogen, infecting the host through inhalation of airborne spores.

Table 3. The role of TLRs and MyD88 adaptor protein in some experimental models of *Aspergillus fumigatus* infection

PRR deficiency	Biological effect	Reference
TLR4, CD14, TLR2	TLR4 but not TLR2 recognizes hyphae	Wang <i>et al.</i> (2001)
TLR4, TLR2	TLR4 and TLR2 recognize conidia and hyphae, and induce TNF- α and MIP-2; impaired PMN influx	Meier <i>et al.</i> (2003)
TLR4, TLR2	Fungal antigens recognized by TLR4 and TLR2; enhanced phagocytosis and cytokine synthesis; activation and maturation of DCs	Braedel <i>et al.</i> (2004)
TLR4, TLR2, TLR3, etc	Individual TLRs activate human PMNs for specialized antifungal effector functions	Bellocchio <i>et al.</i> (2004b)
TLR4, TLR2	Conidia use TLR4 and TLR2 to induce proinflammatory cytokines; hyphae use only TLR2 to produce IL-10	Netea <i>et al.</i> (2003)
MyD88, TLR2, TLR4	MyD88 and TLR2 required for optimal signaling responses of cells	Mambula <i>et al.</i> (2002)
MyD88, TLR2, TLR4	TLR2, TLR4 and MyD88 signaling dispensable for fungal clearance	Dubordeau <i>et al.</i> (2006)
MyD88	Normal phagocytosis and killing of conidia; normal cytokine secretion	Marr <i>et al.</i> (2003)
MyD88 TLR4, TLR2, TLR9	MyD88: high susceptibility. TLR signaling: depends on morphotypes, route of infection. Th1 response: DC-MyD-dependent	Bellocchio <i>et al.</i> (2004a)

The great majority of infected subjects develop an asymptomatic pulmonary infection, although some individuals present clinical manifestations, which give rise to the localized (benign) or disseminated (severe) forms of the disease. Clinical and experimental evidence indicates that cell-mediated immunity plays a significant role in host defense against *P. brasiliensis* infection, whereas high levels of specific antibodies are associated with the most severe forms of the disease (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Calich *et al.*, 2008). Our laboratory developed a murine pulmonary model of infection in which A/Sn mice developed a chronic benign, pulmonary-restricted paracoccidioidomycosis whereas B10.A mice developed a progressive disseminated disease. The main immunological characteristics of this model are described elsewhere (Calich & Blotta, 2005).

Although the importance of innate immunity in resistance to fungal infection is well recognized (Roeder *et al.*, 2004; Romani, 2004), the molecular mechanisms underlying recognition of *P. brasiliensis* by innate immune cells are not well known (Calich & Blotta, 2005; Calich *et al.*, 2008). C3b receptors (CR3, CD11b/CD18) are membrane integrins that recognize iC3b of the complement system, several β -glucans and other cell-wall components expressing high mannose content (Brown & Gordon, 2003). We were the first to demonstrate that *P. brasiliensis* interaction with peritoneal macrophages was enhanced by iC3b opsonization of yeast cells (Calich *et al.*, 1979). Studying murine macrophages, Jimenez *et al.* (2006) verified that CR3 and MR were involved in the phagocytosis of *P. brasiliensis* spores (conidia). In addition, gp43, the immunodominant antigen of *P. brasiliensis*, was shown to bind to MR and to inhibit the phagocytic and fungicidal ability of peritoneal macrophages from resistant and susceptible mice (Popi *et al.*, 2002). This finding led the authors to postulate the expression or secretion of gp43 as an escape mechanism of fungal cells.

TLR4 and *P. brasiliensis* infection

Comparative studies of *in vivo* susceptibility of different mouse strains to *P. brasiliensis* intraperitoneal infection led us to verify that TLR4-deficient (C3H/HeJ) mice were more resistant than TLR4 normal (C3H/HePas) animals (Calich *et al.*, 1985). Recent findings from our laboratory (F.V. Loures, unpublished data) demonstrated that, compared with the normal strain, macrophages from TLR4-deficient mice had a lower phagocytic ability, which appears to influence the decreased number of viable *P. brasiliensis* yeasts recovered after cocultivation for a 72 h period. Deficient macrophages secrete lower levels of NO, IL-12 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) but produced equivalent amounts of TNF- α . In contrast, IL-10 was synthesized in higher amounts by TLR4-deficient macrophages. Consistent with *in vitro* results, 96 h after *in vivo* pulmonary infection, TLR4-deficient mice presented decreased fungal loads in the lungs associated with lower levels of NO and proinflammatory cytokines [IL-12, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)]. Similar results were observed at week 11 after infection of TLR4-mutant mice: decreased CFU counts associated with low IL-12 levels but high IFN- γ secretion. Paralleling its mild infection, the deficient strain secreted low levels of IgG1, IgG2b and IgM *P. brasiliensis*-specific isotypes (F.V. Loures, unpublished data).

Cytospin preparations of lung-infiltrating leukocytes at week 2 of infection showed an increased number of PMN neutrophils associated with decreased numbers of lymphocytes and monocytes. Diminished expression of CD25⁺, CD86⁺ and CD86⁺IA^{k+} cells were also observed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis of lung lymphocytes. In addition, by week 2 of infection no differences in the lymphoproliferative activity of TLR4-normal and TLR4-deficient spleen cells were detected. Although

differences in CFU counts and synthesis of some inflammatory mediators occur in TLR4-deficient mice, such differences were not sufficient to alter their mean survival times (Loures; F.V. Loures & V.L.G. Calich, unpublished data).

TLR2 and *P. brasiliensis* infection

We have also comparatively analyzed *P. brasiliensis* infection of TLR2-normal (WT) and TLR2-gene knockout (KO) mice in a C57BL/6 background (F.V. Loures & V.L.G. Calich, unpublished data). *In vitro* infection of KO macrophages resulted in lower phagocytic indexes, decreased recovery of viable yeasts after 72 h of cocultivation and low levels of NO and MCP-1 in culture supernatants. Compared with WT mice, 48 h after infection KO mice presented diminished pulmonary fungal loads and NO, but these findings were not associated with differences in the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines. Analysis of bronchoalveolar lavage fluids obtained 72 h after i.t. infection showed an increased influx of neutrophils to the airspaces of TLR2 KO mice in comparison with WT animals. Cytospin preparations of lung-infiltrating leukocytes at weeks 2 and 4 of infection showed a decreased proportion of macrophages but an increased number of PMN neutrophils and lymphocytes. In addition, a decreased number of IA^{k+} macrophages and CD4⁺ CD25⁺ T cells was detected in TLR2 KO mice. Further studies are needed, however, to characterize this T-cell subset more completely, which can exert effector or regulatory functions. Indeed, in a previous report Netea *et al.* (2004) showed that TLR2 KO mice are less susceptible to *Candida albicans* infection due to the decreased presence of regulatory T cells and a more efficient fungal-specific immunity. At week 11 of infection TLR2-deficient and normal mice presented similar humoral immunity but the former strain presented increased fungal burden in the lungs. Despite this difference, both mouse strains exhibited equivalent mortality rates.

MyD88 adaptor molecule and *P. brasiliensis* infection

When macrophages were *in vitro* infected with *P. brasiliensis* yeasts for 72 h, an increased number of viable fungi was recovered from MyD88 KO macrophages in comparison with normal cells. This diminished fungicidal ability paralleled a decreased synthesis of NO and IL-12. The early *in vivo* infection reproduced the *in vitro* findings: higher fungal loads were found in MyD88 KO mice associated with lower levels of pulmonary NO and IL-12. This appears to indicate that absence of MyD88 molecule causes profound effects in cell activation, resulting in more severe infection. Mortality studies confirmed the higher susceptibility of MyD88 KO mice to *P. brasiliensis* infection, as their mean survival time

was significantly lower than that of WT controls (F.V. Loures & V.L.G. Calich, unpublished data).

Concluding remarks

An increasing number of reports document the primary importance of innate immunity not only by providing the first line of defense against invading pathogens but also by controlling essential mechanisms that induce and regulate adaptive immunity. Our results on the role of TLRs in paracoccidioidomycosis suggest *P. brasiliensis* yeasts use TLR2 and TLR4 to gain entry into macrophages and infect mammalian hosts. Indeed, *P. brasiliensis* yeasts appear to be recognized by TLR2 and TLR4, resulting in increased phagocytic ability, NO secretion and fungal infection of macrophages. These data appear to be paradoxical, but the killing activity usually associated with NO secretion was not able to reduce the fungal growth provided by the presence of TLRs. Thus, interaction with TLRs could be considered a pathogenicity mechanism of *P. brasiliensis*, which would use host receptors of innate immunity (TLR2 and TLR4) to infect cells and to guarantee its own multiplication.

The *in vivo* infection of TLR-deficient mice resulted in decreased fungal burdens, again suggesting that TLRs are used by *P. brasiliensis* yeasts to infect hosts. The opposite result, however, was seen with MyD88-deficient macrophages and mice as more severe infections were observed probably due to the intact fungal recognition mediated by the expression of normal PRR but impaired ability of cell activation resulting in diminished fungicidal ability.

As a whole, TLR deficiency caused less severe infections associated with altered secretion of NO, cytokines and chemokines, resulting in altered cellular influx to the site of infection. In both PRR-deficient strains, the lung inflammatory infiltrate was composed of a diminished number of macrophages associated with an increased presence of PMN neutrophils. The phagocytic and killing abilities of the latter cells perhaps contribute to the decreased fungal inoculum at the site of infection. Furthermore, the low level of MCP-1 was parallel to the decreased number of lung-infiltrating monocytes.

An interesting observation was the decreased number of CD4⁺CD25⁺ T cells in the lungs of TLR2 KO mice, although an equivalent situation was not observed in TLR4-deficient animals.

Mortality studies have shown that TLR deficiency was not able to change the late course of infection as no differences were observed between TLR-deficient and TLR-normal mice. Compensatory mechanisms appear to abolish the immunological differences caused by PRR deficiencies. The same was not true for MyD88 deficiency, which causes higher mortality of infected mice.

In summary, our studies suggest that MyD88 deficiency is more important than TLR2 or TLR4 deficiency and *P. brasiliensis* yeasts appear to use TLRs as a virulence mechanism, which facilitates the access of fungal cells into murine macrophages. Despite their TLR-mediated activation, macrophages are not able to control fungal growth, both *in vitro* and *in vivo*. However, the final balance between fungal growth and activation of the immune system appears to control disease outcome as the low fungal loads and impaired immunity of TLR-deficient mice and the high fungal burdens and enhanced immunity of normal-TLR mice result in equivalent survival times. Furthermore, our studies have also suggested that, besides TLR, other PRRs play a role in the host immune response against *P. brasiliensis* infection.

In conclusion, studies aimed to characterize the role of TLRs in fungal infections are firmly demonstrating their important participation in the effector and regulatory mechanisms of innate and adaptive immunity against these pathogens. TLR2, TLR4 and the adaptor molecule MyD88 appear to control the phagocytic rates, cell migration and activation, cytokine and chemokine secretion as well as the expression of costimulatory molecules that affect dendritic cell activation and their competence as antigen-presenting cell (APC) to naïve T cells. The interaction between TLR and other PRRs, in a synergistic or antagonistic way with fungal agonists, can result in different effector (Th1, Th2 and Th17) and regulatory responses (Treg), which ultimately determine disease outcome. Despite the important information in the current literature, additional investigation is needed to characterize further the influence of TLRs in the immunopathology of fungal infections.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Shizuo Akira for providing TLR and MyD88 KO mice. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

References

- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783–801.
- Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, Vecchi A, Mantovani A, Levitz SM & Romani L (2004a) The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol* **172**: 3059–3069.
- Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L & Romani L (2004b) TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* **173**: 7406–7415.
- Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garufi G, Catania MR, Bombaci M, Beninati C, Teti G & Mancuso G (2005) MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol* **35**: 870–878.
- Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X & Walmsley AR (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* **10**: 80–87.
- Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latgé JP, Michan A, Loeffler J, Haddad Z, Grigoleit U, Schild H & Hebart H (2004) *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol* **125**: 392–399.
- Brown GD & Gordon S (2003) Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* **19**: 311–315.
- Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF & Dias da Silva WD (1979) The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. *Clin Immunol Immunopathol* **12**: 21–30.
- Calich VLG & Blotta MHSL (2005) Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Fungal Immunology, From an Organ Perspective* (Fidel PL & Huffnagle GB, eds), pp. 201–228. Springer, New York.
- Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM & Burger E (1985) Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Path* **66**: 585–594.
- Calich VLG, Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, Rineiro LRR, Valente-Ferreira RC & Pina A (2008) Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathology* DOI: 10.1007/s11046-007-9048-1.
- Cambi A, Koopman M & Figdor CG (2005) How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* **7**: 481–488.
- Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT & Oliveira SC (2004) Role of toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* **72**: 176–186.
- Dubordeau M, Athman R, Balloy V, Huerre M, Chignard M, Philpott DJ, Latgé JP & Ibrahim-Granet O (2006) *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J Immunol* **177**: 3994–4001.
- Gordon S (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**: 927–930.
- Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I & Ruland J (2006) Card9 controls a non-TLR signaling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**: 651–656.
- Inohara N & Nunez G (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**: 371–382.
- Janeway CA Jr & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197–216.
- Jimenez MP, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE & Garcia LF (2006) Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by

- Nramp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**: 56–66.
- Koppel EA, van Gisbergen KP, Geijtenbeek TB & van Kooyk Y (2005) Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DCSIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol* **7**: 157–165.
- Leibundgut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ *et al.* (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* **8**: 630–638.
- Loures FV (2007) The role of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and TLR4 in the fungus-host interaction. MSc thesis, São Paulo University, São Paulo.
- Mambula SS, Sau K, Henneke P, Golenbock DT & Levitz SM (2002) Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **277**: 39320–39326.
- Marr KA, Balajee SA, Hawn TR, Ozinsky A, Pham U, Akira S, Aderem A & Liles WC (2003) Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun* **71**: 5280–5286.
- Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J & Ebel F (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol* **5**: 561–570.
- Murciano C, Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE & Gil ML (2006) Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med Mycol* **44**: 149–157.
- Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y *et al.* (2006) Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**: 148–154.
- Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschuere I, Van Der Meer JW & Kullberg BJ (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **186**: 1377–1379.
- Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, Andresen T, Verweij PE & Kullberg BJ (2003) *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis* **188**: 320–326.
- 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**: 3712–3718.
- Netea MG, Van der Meer JW & Kullberg BJ (2006) Role of dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. *Clin Microbiol Infect* **12**: 404–409.
- Palm NW & Medzhitov R (2007) Antifungal defense turns 17. *Nat Immunol* **8**: 549–551.
- Pasare C & Medzhitov R (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**: 1030–1036.
- Popi AF, Lopes JD & Mariano M (2002) GP-43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophages functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol* **218**: 87–94.
- Qi H, Denning TL & Soong L (2003) Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun* **71**: 3337–3342.
- Reis e Sousa C (2004) Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* **16**: 21–25.
- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller Weindl G & Korting HC (2004) Toll like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* **42**: 485–498.
- Romani L (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**: 1–13.
- Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT & Levitz SM (2001) Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* **166**: 4620–4626.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M & Heesemann J (2002) *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* **196**: 1017–1024.
- Spörri R & Reis e Sousa C (2005) Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* **6**: 163–170.
- Suttmuller RP, Den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG & Adema GJ (2006) Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* **116**: 485–494.
- Takeda K & Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **1**: 1–14.
- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, Murciano C, O'Connor JE, Fradelizi D & Gil ML (2004a) Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines. *Eur Cytokine Netw* **15**: 263–271.
- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Ferrandiz ML, Fradelizi D & Gil ML (2004b) Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect* **6**: 1–7.
- Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jorgensen PF, Flo TH, Espevik T, Solberg R, Verweij PE & Aasen AO (2001) Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* **69**: 2402–2406.
- Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB & Levitz SM (2004) Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect Immun* **72**: 5373–5382.

TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection¹

Flávio V. Loures, Adriana Pina, Maíra Felonato, and Vera L. G. Calich²

To study the role of TLR2 in an experimental model of chronic pulmonary infection, TLR2-deficient and wild-type mice were intratracheally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*, a primary fungal pathogen. Compared with control, TLR2^{-/-} mice developed a less severe pulmonary infection and decreased NO synthesis. Equivalent results were detected with in vitro-infected macrophages. Unexpectedly, despite the differences in fungal loads both mouse strains showed equivalent survival times and severe pulmonary inflammatory reactions. Studies on lung-infiltrating leukocytes of TLR2^{-/-} mice demonstrated an increased presence of polymorphonuclear neutrophils that control fungal loads but were associated with diminished numbers of activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. TLR2 deficiency leads to minor differences in the levels of pulmonary type 1 and type 2 cytokines, but results in increased production of KC, a CXC chemokine involved in neutrophils chemotaxis, as well as TGF- β , IL-6, IL-23, and IL-17 skewing T cell immunity to a Th17 pattern. In addition, the preferential Th17 immunity of TLR2^{-/-} mice was associated with impaired expansion of regulatory CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells. This is the first study to show that TLR2 activation controls innate and adaptive immunity to *P. brasiliensis* infection. TLR2 deficiency results in increased Th17 immunity associated with diminished expansion of regulatory T cells and increased lung pathology due to unrestrained inflammatory reactions. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 1279–1290.

The initial interaction between immune cells and microorganisms is mediated by several types of receptors that recognize molecular patterns of pathogens and are collectively called pathogen recognition receptors. The TLRs constitute a molecular family that recognizes a wide range of microbes and their products known as pathogen-associated molecular patterns. TLRs are expressed in diverse innate immune cells such as polymorphonuclear neutrophils (PMN),³ macrophages, dendritic cells, and lymphocytes. Their activation triggers a signaling cascade that results in an inflammatory response through production of proinflammatory cytokines and up-regulation of costimulatory molecules expression leading to initiation of antigenic-specific adaptive immune response (1–3).

Importantly, the TLR expression was also shown to induce anti-inflammatory mediators and to discriminate the functional states of distinct T cell subsets (4, 5). Naive CD4⁺ T cells do not express significant levels of TLR2 and TLR4 mRNA and intracellular proteins, although activated and memory T cells express high levels of membrane-bound TLR2 and TLR4 (5). Besides its influence in the activation of innate immunity cells, recent evidences suggest that TLR2 signaling may regulate the expansion and function of

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) (5). Indeed, the administration of TLR2 ligands to wild-type (WT) mice results in increased number CD4⁺CD25⁺ Tregs and TLR2^{-/-} mice were shown to contain significantly fewer CD4⁺CD25⁺ Tregs than control mice (5–8).

As described for other microorganisms, TLRs were shown to be involved in host defense against different fungal pathogens. In vivo and in vitro studies demonstrated that *Cryptococcus neoformans* (9, 10), *Candida albicans* (11, 12), and *Aspergillus fumigatus* (13, 14) may signal through members of the TLR family, mainly TLR2 and TLR4. The contribution of individual TLRs to the immune response against pathogenic fungi depends on several factors such as the route of infection, the fungal morphotype, or the fungal species. Activation signals mediated by innate immunity receptors, however, are not always beneficial to the host and TLR activation can be used by pathogenic fungi to promote more severe infections (15–17).

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and constitutes the most prevalent deep mycosis in Latin America (18). Individuals from endemic areas who have inhaled mycelial fragments or fungal spores usually develop PCM infection which is characterized by positive delayed-type hypersensitive reactions but absence of specific Abs. The acute or severe form of the disease is associated with deficient cell immunity, high levels of Abs, and preferential secretion of type 2 cytokines, whereas the benign localized forms demonstrate preserved cell-mediated immunity, prevalent production of type 1 cytokines, and low levels of Abs (19, 20).

Our studies on the genetic susceptibility of hosts to *P. brasiliensis* infection characterized B10.A as a susceptible mouse strain due to its progressive and disseminated disease associated with impaired macrophage activation and the presence of high fungal loads in nonorganized lesions. On the other hand, A/J mice showed a regressive pattern of disease with well-organized lesions containing low numbers of yeast cells, positive cellular immunity, and

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Received for publication May 19, 2008. Accepted for publication May 5, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa and Conselho Nacional de Pesquisas.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Vera L. G. Calich, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. E-mail address: vlcalich@icb.usp.br

³ Abbreviations used in this paper: PMN, polymorphonuclear neutrophil; KO, knockout; Treg, regulatory T cell; PCM, paracoccidioidomycosis; PI, proliferation index; WT, wild type; i.t., intratracheal(ly); MFI, mean fluorescence intensity.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

macrophage activation. These features are similar to the severe and benign forms of human PCM (20, 21).

The alveolar macrophages are the first host cells that interact with *P. brasiliensis* cells and their activation is fundamental to control pathogen growth. The molecular mechanisms controlling the initial steps of *P. brasiliensis* and phagocytes interaction are not well understood. It is known, however, that normal macrophages are permissive to *P. brasiliensis* growth while cytokine-activated macrophages are able to restrain *P. brasiliensis* multiplication (22). It was previously demonstrated that C3b, mannose receptor, and gp43, the immunodominant Ag of *P. brasiliensis*, play an important role in the initial interaction between *P. brasiliensis* cells and mouse peritoneal macrophages (23–25). Interestingly, a recent work of our laboratory demonstrated that alveolar macrophages from susceptible mice are easily activated by IL-12 and IFN- γ and display an efficient fungal killing associated with increased secretion of NO and proinflammatory cytokines. In contrast, pulmonary macrophages from resistant mice are poorly activated by both cytokines, present inefficient killing activity and NO secretion, and this behavior was associated with the increased activity of endogenous TGF- β (26). Despite their inefficient innate immunity, A/Sn mice develop a balanced Th1/Th2 immunity which controls fungal growth without intense tissue pathology.

Since the contribution of TLR in *P. brasiliensis* infection was never studied before, we decided to investigate the role of TLR2 in murine PCM using *in vitro* and *in vivo* models of infection. Using TLR2-normal and TLR2-deficient C57BL/6 mice, we were able to demonstrate that, both *in vitro* and *in vivo*, the presence of TLR2 causes a more severe infection. Both approaches demonstrated that TLR2 are used by *P. brasiliensis* yeast to infect host cells inducing enhanced secretion of NO and cytokines. Unexpectedly, TLR2-deficient and WT mice presented similar survival times and equivalent severe lesions in the lungs. The lower fungal loads of TLR2-deficient mice were, however, associated with prevalent activation of Th17 immunity and exacerbated pulmonary inflammation containing high numbers of PMN leukocytes but diminished presence of Tregs. Altogether, our data indicate that expression of TLR2 has a beneficial effect on fungal pulmonary infection due to its negative control on Th17 immunity and tissue pathology. Furthermore, the present findings demonstrate that uncontrolled inflammatory response of hosts to *P. brasiliensis* infection is as deleterious as uncontrolled fungal growth by absence or inadequate activation of immunity.

Materials and Methods

Fungus

P. brasiliensis Pb18, a highly virulent isolate, was used throughout this investigation (27). Pb18 yeast cells were maintained by weekly subcultivation in semisolid culture medium. Washed yeast cells were adjusted to 20×10^6 cells/ml (in vivo infection) and 4×10^4 cells/ml (in vitro infection) based on hemocytometer counts. Viability was determined with Janus Green B vital dye (Merck) and was always higher than 85%.

Mice and intratracheal infection

TLR2^{-/-} mice on a C57BL/6 background were provided by S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan). C57BL/6 control (WT) mice were obtained from our Isogenic Breeding Unit (Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo) and used at 8–12 wk of age. Mice were anesthetized and submitted to intratracheal (i.t.) *P. brasiliensis* infection as previously described (28). Briefly, after i.p. anesthesia, the animals were i.t. infected with 10^6 *P. brasiliensis* yeast cells contained in 50 μ l of PBS. Mice were studied at 48 h, 2 wk, and 11 wk postinfection. The experiments were approved by the ethics committee on animal experiments of our institution.

Phagocytic and fungicidal assays

Thioglycolate-induced peritoneal macrophages were isolated by adherence (2 h at 37°C in 5% CO₂) to plastic-bottom tissue culture plates (1×10^6 cells/well in 24-well plates for fungicidal assays) or plated onto 13-mm round glass coverslips (1×10^6 cells/well in 24-well plates) for phagocytosis. Macrophages were washed to remove nonadherent cells and cultivated overnight with fresh complete medium (DMEM (Sigma-Aldrich) containing 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin) in the presence or absence of recombinant IFN- γ (20 ng/ml in culture medium; BD Pharmingen). Equivalent procedures were performed with alveolar macrophages obtained from *P. brasiliensis*-infected mice at week 2 of infection by bronchoalveolar lavage with 1.5 ml of warm PBS (26). For phagocytic assays, macrophage cultures were infected with *P. brasiliensis* yeast in a macrophage:yeast ratio of 50:1. The cells were cocultivated for 4 h at 37°C in 5% CO₂ to allow fungi adhesion and ingestion. Cells were washed twice with PBS to remove any noningested or nonadhered yeast cells and samples were processed for microscopy. Cells were fixed with methanol and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich). Experimental conditions were performed in triplicate, and the number of phagocytosed or adhered yeast cells per 1000 macrophages was evaluated on at least five separate slides. For fungicidal assays, IFN- γ -primed and unprimed macrophage cultures were infected with *P. brasiliensis* yeast as above described. After 48 h of culture at 37°C in a CO₂ incubator, plates were centrifuged (400 \times g, 10 min, 4°C), supernatants were stored at -70°C, and further analyzed for the presence of nitrite and cytokines. The wells were washed with distilled water to lyse macrophages and suspensions were collected in individual tubes. One hundred microliters of cell homogenates were assayed for the presence of viable yeast cells. All assays were done with five wells per condition in more than three independent experiments.

CFU assays, mortality rates, and histologic analysis to determine severity of infections

The numbers of viable microorganisms in cell cultures and infected organs (lungs, liver, and spleen) from experimental and control mice were determined by counting the number of CFU. Animals from each group were sacrificed and the enumeration of viable organisms was done as previously described (29). The numbers (log₁₀) of viable *P. brasiliensis* per g of tissue (in vivo) or per ml of cell homogenates (in vitro) are expressed as the means \pm SEs. Mortality studies were done with groups of 9–11 mice inoculated i.t. with 1×10^6 yeast cells or PBS. Deaths were registered daily for a 250-day period and experiments were repeated twice. For histology examinations, the left lung of infected mice was removed, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were stained by H&E for an analysis of the lesions and silver stained (Grocott stain) for fungal evaluation. Pathologic changes were analyzed based on the size, morphology, and cell composition of granulomatous lesions, presence of fungi, and intensity of the inflammatory infiltrates.

Measurement of cytokines and NO

Supernatants from lung homogenates or cell cultures were separated and stored at -70°C. Cytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-23, IL-17, IL-12, IL-10, IL-6, TNF- α , and IFN- γ) and chemokine (MCP-1 and KC) levels were measured by capture ELISA with Ab pairs purchased from BD Pharmingen. Active and acid-activatable latent TGF- β forms were also measured (kits from R&D Systems) in our biological fluids. The ELISA procedure was performed according to the manufacturer's protocol and absorbances were measured with a Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices). NO production was quantified by the accumulation of nitrite in the supernatants from *in vitro* and *in vivo* protocols by a standard Griess reaction. All determinations were performed in duplicate and expressed as μ M NO.

Assessment of leukocyte subpopulations in lung inflammatory exudates

After 2 and 11 wk of infection, lungs from each mouse were digested enzymatically for 30 min with collagenase (1 mg/ml) and DNase (30 μ g/ml) in culture medium (Sigma-Aldrich). Lung cell suspensions were centrifuged in the presence of 20% Percoll (Sigma-Aldrich) to separate leukocytes from cell debris. Total lung leukocyte numbers were assessed in the presence of trypan blue using a hemocytometer; viability was >85%. For differential leukocyte counts, samples of lung cell suspensions were cytopun (Shandon Cytospin) onto glass slides and stained by the Diff-Quik blood stain (Baxter Scientific). A total of 200–400 cells was counted from each sample. For flow cytometry, lung leukocytes were resuspended at 10^6 cells/ml in staining buffer (PBS plus 0.1% NaN₃ plus and 1%

FCS). FcRs were blocked by unlabeled anti-CD16/32 Abs (BD Biosciences) and cells were stained for 20 min at 4°C. PE- labeled anti-CD40, anti-CD86, anti-CD11b, anti-CD25, and anti-CD69 and FITC-labeled anti-IA^ε, anti-CD80, anti-CD4, and anti-CD8 mAbs (BD Biosciences) were used. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and stored in the dark at 4°C until analyzed in a flow cytometer. The acquisition and analysis gates were restricted to the lymphocytes or macrophages. Tregs were characterized by intracellular staining for Foxp3 using a Treg staining kit from BD Biosciences. Surface staining of CD25⁺ and intracellular FoxP3 expression were back-gated on the CD4⁺ T cell population. For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 6 h in complete medium in the presence of 50 ng/ml PMA, 500 ng/ml ionomycin (both from Sigma-Aldrich), and monensin (3 mM; eBioscience). After surface staining for CD4 and CD8, cells were fixed, permeabilized, and stained by PerCP-Cy5 anti-IL-17 Abs (eBioscience). The cell surface expression of leukocyte markers as well as intracellular expression of FoxP3 and IL-17 in lung-infiltrating leukocytes were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (BD Pharmingen) using the FlowJo software (Tree Star).

Fungicidal ability of neutrophils

To study the role of neutrophils in the control of fungal growth, PMN leukocytes from WT and TLR2 KO mice were *in vivo* depleted by i.p. administration of 0.5 ml of saline-diluted (1/5) rabbit anti-mouse PMN polyclonal Ab (Accurate Chemical & Scientific) at days -1, +3, and +5 of i.t. infection (0 time) with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells. Control mice received equivalent amounts of normal rat IgG. The number of blood PMN cells was evaluated before treatment (at day -2) and 24 h after the mAb inoculation. Groups of IgG-treated and PMN-depleted mice ($n = 4-6$) were sacrificed 2 and 6 days after *P. brasiliensis* infection and severity of disease evaluated by CFU counts. Mortality studies were done with IgG-treated and PMN-depleted groups of eight to nine mice inoculated i.t. with 1×10^6 yeast cells. Deaths were registered daily for a 10-day period and experiments were repeated twice. Alveolar neutrophils were obtained by bronchoalveolar lavage of mice infected 2 wk earlier with 1 million yeast cells. The number of PMN leukocytes in the nonadherent fraction of lung cells was adjusted to 2×10^5 cells, plated in 96-well plates, challenged with 1×10^5 yeast cells, and cocultivated for 1 h at 37°C. One hundred microliters of cell homogenates was assayed for the presence of viable yeast cells. All assays were done with three wells per condition in more than two independent experiments.

Lymphoproliferation assay

Cells were assayed for proliferation using an *in vitro* fluorescence-based assay. Briefly, 1×10^6 cells from spleens were stained with 1 μ l (5 mM) of CFSE (Molecular Probes) in PBS and 5% FCS for 15 min at room temperature. Stained cells were cultured for 3 days in the presence of anti-CD3 Abs (0.3 μ g/ml), anti-CD28 (2.5 μ g/ml) mAbs (BD Biosciences), *P. brasiliensis*-soluble Ag (100 μ g/ml), or Con A (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich). A minimum of 20,000 events was acquired on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Pharmingen). The proliferation index (PI) was calculated as the mean fluorescence intensity (MFI) of unstimulated cultures/MFI of stimulated cultures.

Statistical analysis

Data were analyzed by Student's *t* test or two-way ANOVA depending on the number of experimental groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

TLR2 deficiency leads to less severe fungal infection of macrophages associated with decreased synthesis of NO, IL-10, and MCP-1

Before performing fungicidal studies, we asked whether the initial interaction between *P. brasiliensis* yeast cells and peritoneal macrophages from TLR2^{-/-} and WT mice was equivalent. Macrophage cultures (1×10^6 /well), performed in round glass coverslips, were preactivated or not with IFN- γ (20 ng/ml) and infected with 2×10^4 viable yeast cells (1:50 fungus:macrophage ratio). After a 4-h incubation, supernatants were aspirated, the monolayers were gently washed with PBS, and the cells were stained with Giemsa. An average of 1000 macrophages was counted and the number of ingested and/or adherent yeast cells was determined. Compared with WT macrophages, a lower number of yeast cells

associated (ingested/adhered) with TLR2^{-/-} macrophages was observed (Fig. 1A). Peritoneal macrophages were cultivated with *P. brasiliensis* yeast cells for an additional 48-h period. Supernatants were removed and assayed for the presence of NO and cytokines and cell homogenates were plated for CFU determinations. As shown in Fig. 1B, the presence of functional TLR-2 led to increased recovery of viable yeast cells from untreated and IFN- γ -primed macrophages (20 ng/ml). In addition, higher levels of NO were produced by macrophages from WT mice than those of TLR2^{-/-} mice (Fig. 1B). Additional experiments were performed with alveolar macrophages obtained from bronchoalveolar lavage fluids of normal, uninfected, WT, and TLR2-deficient mice (Fig. 1C). Lower CFU counts were recovered from untreated TLR2-deficient cells, although no significant differences were seen with IFN- γ -activated macrophages. As observed with peritoneal cells, TLR2-deficient alveolar macrophages synthesized lower levels of NO.

To better characterize the role of TLR2 in *P. brasiliensis* infection, culture supernatants of peritoneal macrophages were evaluated for the presence of some macrophage-activating cytokines (IL-12 and TNF- α), a deactivating cytokine (IL-10), and for a chemokine involved in mononuclear cell chemotaxis, MCP-1. As depicted in Fig. 2, IFN- γ -treated and untreated macrophages from TLR2^{-/-} mice secreted decreased levels of IL-10 and MCP-1 than those from WT mice. IL-12 and TNF- α , however, appeared in similar levels.

In vivo, absence of TLR2 induces lower fungal loads but increased lung pathology

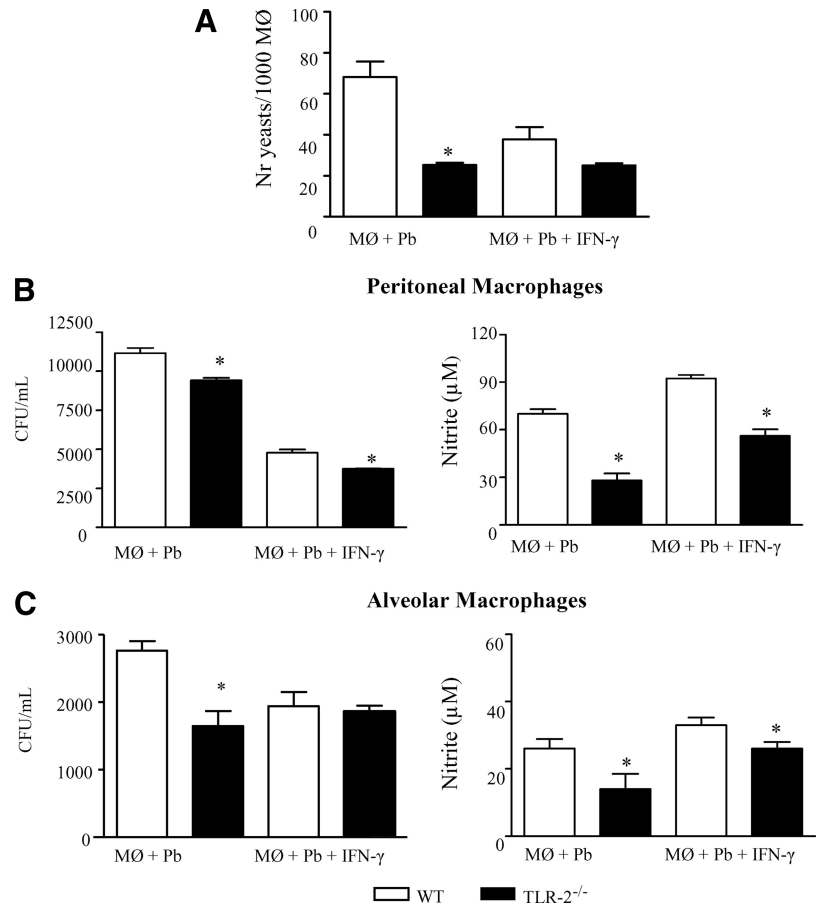
We infected groups ($n = 6-8$) of TLR2^{-/-} and WT mice i.t. with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells and evaluated parameters of infection and local inflammatory pathology over the course of infection. Diminished fungal burdens were detected in the lung tissue of TLR2^{-/-} mice at all postinfection periods (48 h and 2 and 11 wk) assayed (Fig. 3A). These lower fungal burdens were accompanied by lower NO levels in lung homogenates (Fig. 3B). Equivalent fungal counts were detected in the liver and spleen tissue (our unpublished data).

To assess the influence of TLR-2 deficiency in disease outcome, the mortality of *P. brasiliensis*-infected TLR2^{-/-} and WT mice was registered daily for a 250-day period and the median survival time was calculated for each strain. Unexpectedly, despite the significant differences in fungal burdens, no differences between mortality data ($p = 0.104$) were detected (Fig. 4A). The mean survival times of TLR2^{-/-} and WT mice were 221 and 190 days, respectively. To better understand this result, histopathological examination of lungs was done at weeks 2 and 11 of infection. As can be seen in Fig. 4, B-E, an equivalent and severe pattern of inflammatory reactions was detected in the lungs of both mouse strains. The pulmonary lesions replaced almost all of the normal parenchyma and were composed of confluent granulomas of various sizes containing many fungal cells surrounded by a small ring of mononuclear cells. Some lesions were also surrounded by an evident fibrotic layer. Multinucleated cells were scarcely seen. Lesions of TLR2-deficient mice showed a more prominent presence of inflammatory polymorphonuclear cells and decreased numbers of *P. brasiliensis* yeast cells (Fig. 4, D and E).

TLR2^{-/-} deficiency determines a sustained recruitment of PMN cells to the lungs

To better characterize the inflammatory reaction at the site of infection, leukocyte recruitment to the lung tissue of *P. brasiliensis*-infected TLR2^{-/-} and WT mice was studied at weeks 2 and 11 of infection. As can be seen in Fig. 5, A and B, at both postinfection

FIGURE 1. Macrophages (M ϕ) from TLR2-deficient mice have a decreased ability to interact with fungal yeast cells. **A**, For phagocytic assays, IFN- γ -primed (20 ng/ml, overnight) and unprimed peritoneal macrophage cultures were infected with *P. brasiliensis* yeast cells in a macrophage:yeast ratio of 50:1. The cells were cocultivated for 4 h at 37°C in 5% CO₂ to allow fungi adhesion and ingestion. Cells were washed, fixed, and stained with Giemsa; an average of 1000 macrophages was analyzed and the number of macrophages with adhered or ingested yeast cells was determined. **B**, For fungicidal assays, IFN- γ -primed and unprimed peritoneal macrophages were infected with yeast cells as above described. After 48 h at 37°C in 5% CO₂, plates were centrifuged and supernatants were used to determine the levels of nitrite and cytokines. The monolayers were washed with distilled water to lyse macrophages and 100 μ l of cell homogenates was assayed for the presence of viable yeast cells by a CFU assay. Supernatants from fungicidal assays were used to determine the levels of nitrites using the Griess reagent. **C**, Alveolar macrophages were collected from bronchoalveolar lavage fluids of normal mice and studied as in **B** for fungicidal activity and NO production. Data are the mean \pm SEM of quintuplicate samples from one experiment representative of three independent determinations. *, $p < 0.05$ between strains.



periods, increased numbers of polymorphonuclear cells (PMN) were observed in the lungs of TLR2^{-/-} mice than in their normal controls. Consistent with these findings, 72 h after infection, significantly increased influx of PMN cells were detected in the bronchoalveolar lavage fluids of TLR2^{-/-} mice (our unpublished data). At both postinfection periods, lower numbers of macro-

phages were recovered from lungs of TLR2-deficient mice, but only at week 2 was this difference significant. We further characterized the presence of neutrophil- and macrophage-mobilizing chemokines in the lung homogenates of WT and TLR2^{-/-} mice. In good agreement with cell phenotypes detected at weeks 2 and 11 of infection, increased levels of KC were detected in

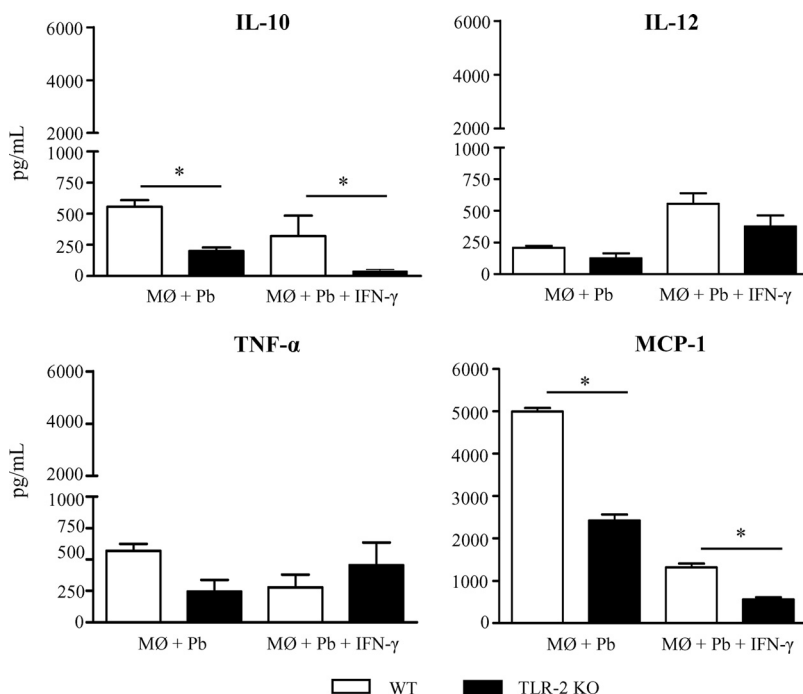


FIGURE 2. Macrophages (M ϕ) from TLR2^{-/-} mice secrete diminished levels of IL-10 and MCP-1. IFN- γ treated (20.00 ng/ml) or untreated macrophages of TLR2^{-/-} and TLR2^{+/+} C57BL/6 mice were challenged with viable *P. brasiliensis* yeast cells (1:50, fungus:macrophage ratio) during 4 h, washed, and further cultivated for 48 h at 37°C in 5% CO₂. Plates were then centrifuged and supernatants used for cytokine measurements using ELISA. Data are the means \pm SEM of triplicate samples from one experiment representative of three independent determinations. *, $p < 0.05$ between strains.

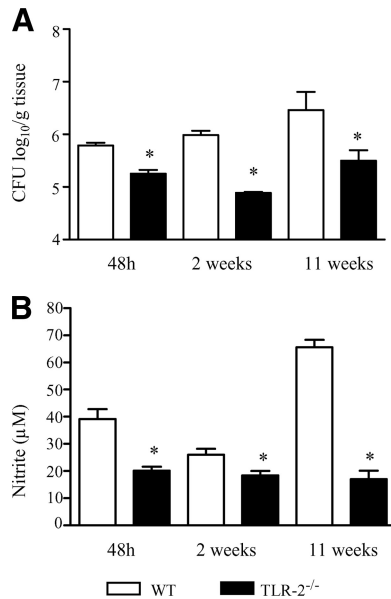


FIGURE 3. In vivo, absence of TLR2 induces lower fungal loads and NO synthesis. Depicted is the recovery of CFU (A) and NO (B) from the lungs of TLR2^{-/-} and WT control mice infected i.t. with 1×10^6 yeast cells. The bars represent means \pm SEM of log₁₀ CFU obtained from groups of six to eight mice at 48 h and 2 and 11 wk after infection. The results are representative of three experiments. *, $p < 0.05$ between strains.

the lungs of deficient mice, whereas augmented levels of MCP-1 were found in WT supernatants (Fig. 5, C and D). Thus, TLR2 deficiency resulted in increased KC production and PMN recruitment while in TLR2-normal mice a prevalent MCP-1 synthesis led to enhanced macrophage chemotaxis to the site of infection.

Depletion of PMN leukocytes increases fungal loads and mortality rates of TLR2-deficient but not normal mice

The finding that PMN cells were abundantly recruited to the lungs of TLR2^{-/-} mice in the presence of diminished fungal growth led us to verify whether these cells had a significant antifungal effector function in our model of pulmonary PCM. Thus, TLR2^{-/-} and TLR2^{+/+} mice were in vivo depleted of PMN cells by a polyclonal Ab and infected i.t. with the fungus. By days 2 and 6 after infection, PMN-depleted TLR2^{-/-} but not normal mice presented increased fungal burdens in the lungs (Fig. 6, A and B). The protective effect of PMN cells to deficient mice was confirmed by the precocious mortality developed by PMN-depleted mice. By day 5 of infection, 50% of PMN-depleted TLR2^{-/-} mice died, although no deaths were observed in the PMN-depleted WT group (Fig. 6C). We have also evaluated the killing ability of alveolar PMN cells obtained from *P. brasiliensis*-infected mice. At week 2 of infection, airway PMN cells were obtained from TLR2^{-/-} and normal mice and in vitro challenged with yeast cells (2:1, PMN:yeast ratio) for 1 h. As can be seen in Fig. 6C, equivalent numbers of viable yeast cells were recovered from both mouse strains, indicating that PMN cells from TLR2-deficient mice did not have an increased killing ability when compared with those from normal mice. Hence, the higher CFU counts detected in PMN-depleted TLR2^{-/-} mice could be attributed to the higher influx of PMN leukocytes to the lungs but not to an intrinsically enhanced killing ability of these cells.

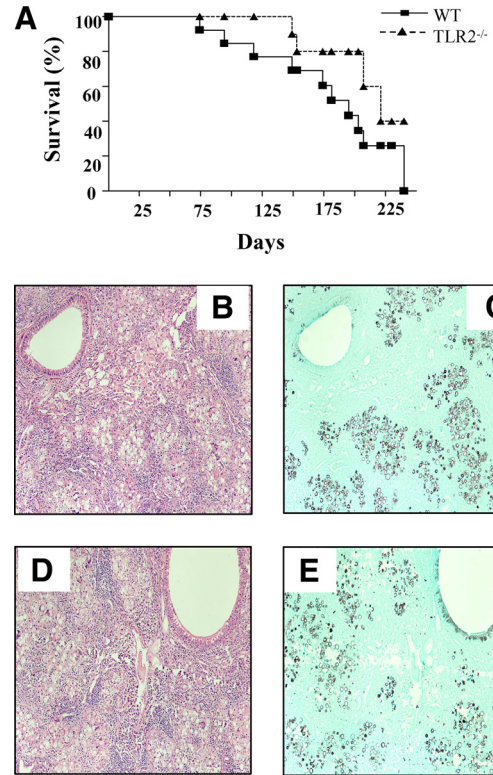


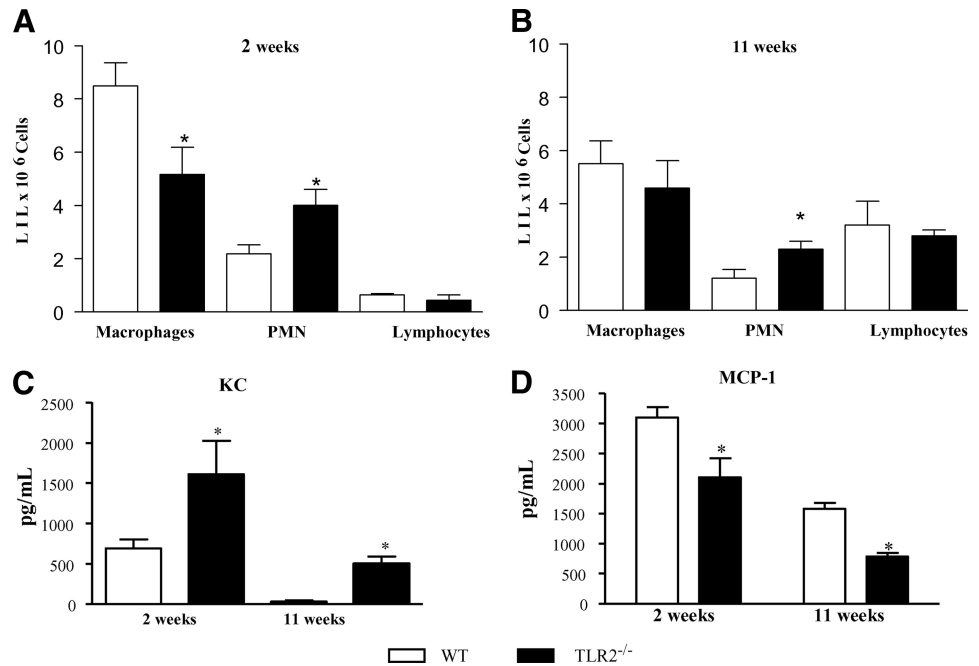
FIGURE 4. Despite the different fungal burdens, TLR2^{-/-} and TLR2^{+/+} mice present equivalent survival times and lung histopathology. A, Survival times of TLR2^{-/-} and WT control mice after i.t. infection with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells was determined in a period of 250 days. No significant differences were seen in the median survival times of both mouse strains; the results are representative of two independent experiments. Photomicrographs of pulmonary lesions of WT (B and C) and TLR2^{-/-} (D and E) mice at week 11 of infection with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells. At this period, despite the higher fungal loads detected in WT mice, no differences in the severity of lesions between TLR2-deficient and control mice were noted. Both mouse strains presented extensive and confluent lesions occupying almost all lung parenchyma which presented an elevated number of yeast cells. H&E (B and D; $\times 100$) and Grocott-stained lesions (C and E; $\times 100$).

TLR deficiency determines diminished T cell reactivity and influx to the lungs

We have further analyzed the phenotype and activity of lung inflammatory cells of TLR2^{-/-} and WT mice infected i.t. with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells. To determine the activation profile of pulmonary macrophages, the expression of CD11b, MHC class II (I-A^k), CD80, CD86, and CD40 Ags was assayed by flow cytometry. As can be seen in Fig. 7, no differences in lung macrophages were detected at weeks 2 and 11 of infection. The phenotypic analysis of lymphocyte subsets was also performed. Thus, the expression of CD4, CD25, CD8, and CD69 molecules was studied in lung-infiltrating lymphocytes. As depicted in Fig. 7A, at week 2 of infection, no differences in the number and activation of T cells were observed. However, a decreased frequency of activated CD4⁺ T lymphocytes expressing CD25 (CD4⁺CD25⁺) was detected in TLR2^{-/-} animals at this period of infection (data not shown). By week 11, however, significantly decreased numbers of CD4⁺, CD8⁺, and CD8⁺CD69⁺ T cells were detected in TLR2^{-/-} animals (Fig. 7B).

To characterize the lymphoproliferative activity of spleen cells obtained from WT and TLR2^{-/-} mice at week 4 of infection, CFSE-labeled lymphocytes were in vitro stimulated with *P. brasiliensis* Ag,

FIGURE 5. TLR2^{-/-} deficiency determines a sustained increased recruitment of PMN cells to the lungs. Number of leukocyte subsets (macrophages, PMN neutrophils, and lymphocytes) in the lung-infiltrating leukocytes (LIL) from TLR2^{-/-} and WT mice inoculated i.t. with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells. By 2 (A) and 11 (B) wk after infection, lungs of TLR2^{-/-} and WT mice ($n = 6-8$) were excised, washed in PBS, minced, and digested enzymatically. Lung cells suspensions were centrifuged in the presence of 20% Percoll (Sigma-Aldrich) to separate leukocytes from cell debris. Cell suspensions were cytospun onto glass slides and stained by the Diff-Quik blood stain. Lung cell homogenates were also obtained after 2 and 11 wk of infection and analyzed by ELISA for the content of KC (C) and MCP-1 (D) chemokines. Data are expressed as means \pm SEM. *, $p < 0.05$ between strains.



anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs, or Con A and cultivated for 72 h. As depicted in Table I, compared with TLR2-deficient mice, control mice developed higher lymphoproliferative activity with all stimuli used, including the polyclonal T cell activator Con A. A similar result was detected with unstimulated control lymphocytes, probably due to the

presence of yeast cells in the spleens of infected mice at this postinfection period. Together, these experiments demonstrated that TLR2-deficient mice mount a deficient T cell response as revealed by the diminished migration of T cells to the site of infection and the impaired lymphoproliferative activity.

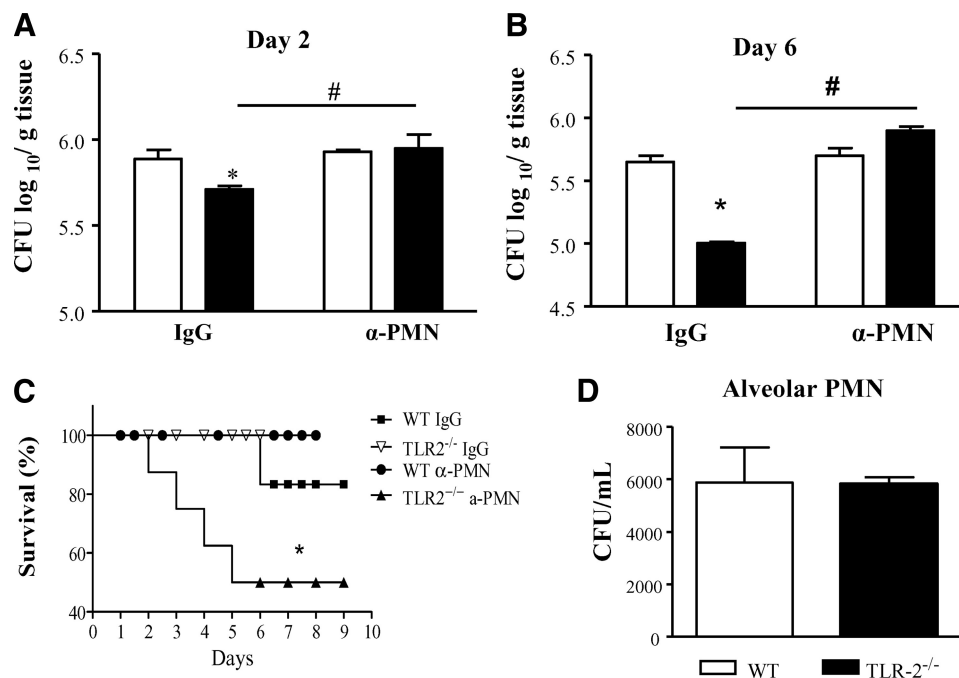
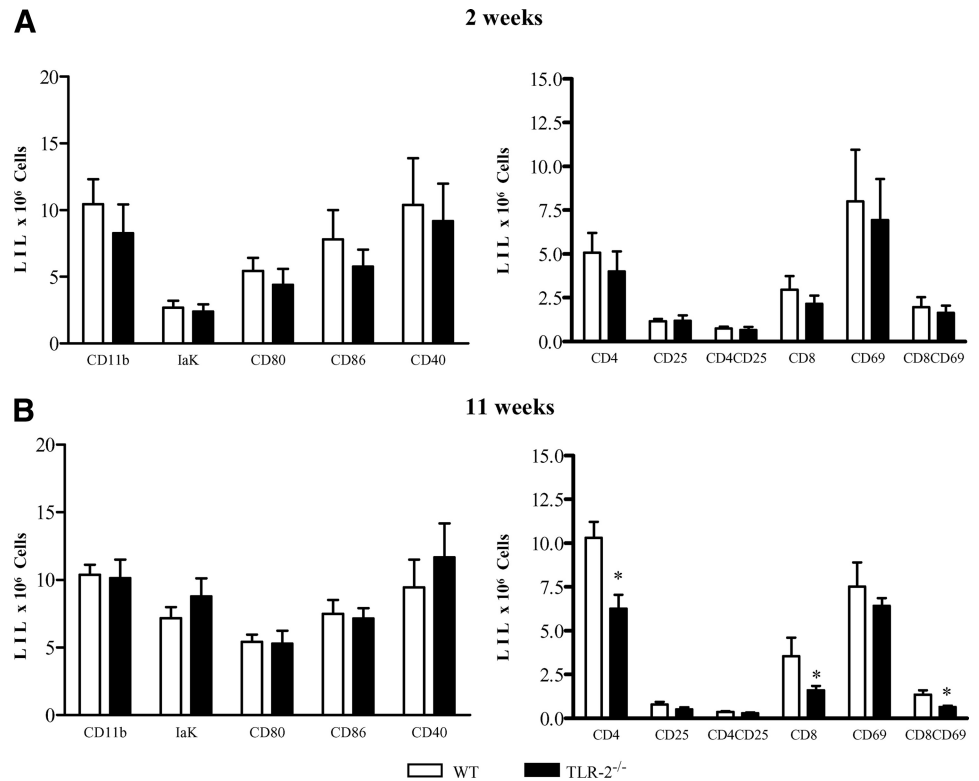


FIGURE 6. Fungicidal activity of PMN neutrophils. A and B, PMN leukocytes were in vivo depleted from WT and TLR2^{-/-} mice by i.p. administration of 0.5 ml of a 1/5 dilution of a rabbit anti-mouse PMN polyclonal Ab at days -1, +3, and +5 of i.t. infection (0 time) with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells. Control mice received equivalent amounts of normal rat IgG. This treatment resulted in 75 and 87% of PMN depletion at days 0 and 6 of infection, respectively. IgG-treated and PMN-depleted mice ($n = 4-6$) were sacrificed at days 2 and 6 days after fungal infection and severity of disease evaluated by CFU counts in lung homogenates. C, Mortality data of PMN-depleted mice. Groups of mice ($n = 8-9$) were treated as above described and increased mortality was observed only in the PMN-depleted TLR2^{-/-} group. Data were obtained from two independent experiments. D, Alveolar neutrophils were obtained by bronchoalveolar lavage of mice infected 2 wk earlier with 1 million yeast cells. The number of PMN leukocytes in the nonadherent fraction was adjusted to 2×10^5 cells, challenged with 1×10^5 yeast cells, and cocultivated for 1 h at 37°C. One hundred microliters of cell homogenates were assayed for the presence of viable yeast cells. All assays were done with three wells per condition in over two independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with WT mice; #, $p < 0.05$ compared with IgG controls.

FIGURE 7. Characterization of macrophages and T lymphocytes in the pulmonary lesions of TLR2^{-/-} mice. Equivalent numbers of macrophages were detected in the lungs of TLR2^{-/-} and WT mice but the latter presented increased numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Characterization of leukocyte subsets by flow cytometry in the lung-infiltrating leukocytes (LIL) from TLR2^{-/-} and WT mice inoculated i.t. with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells. Lungs of TLR2^{-/-} and WT mice ($n = 6-8$) were excised, washed in PBS, minced, and digested enzymatically. At weeks 2 (A) and 11 (B) after infection lung cell suspensions were obtained and stained as described in *Materials and Methods*. The acquisition and analysis gates were restricted to lymphocytes or macrophages. The data represent the mean \pm SEM of the results from six to eight mice per group and are representative of two independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with WT mice.



TLR2-deficient mice develop a Th17-skewed T cell response

Because the equilibrium between pro- and anti-inflammatory cytokines determines the efficiency and cellular composition of inflammatory reactions (30) and because recent investigations have demonstrated an increased presence of PMN cells associated with prevalent IL-17 secretion (31), cytokines associated with Th1 (IL-12, TNF- α , IL-2, and IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, and IL-10), and Th17 (TGF- β , IL-6, IL-17, and IL-23) immunity were assessed in lung homogenates obtained at different periods of infection (Figs. 8 and 9A). However, 48 h after infection, at the innate phase of immunity, higher levels of TGF- β and IL-17 were detected in the lungs of TLR2-deficient mice. At week 2, this strain produced higher amounts of IL-6, TGF- β , IL-17, and IL-23. By week 11, TLR2^{-/-} mice showed a sustained increase of IL-23 associated with lowered concentrations of IL-10 and IL-12. We have further defined the phenotype of IL-17-producing cells. As shown in Fig. 9B, after 72 h and 2 wk of *P. brasiliensis* infection, significantly increased numbers of IL-17⁺CD4⁺ T cells were detected in the lungs of TLR2^{-/-} mice. No differences were observed in the total numbers of CD8⁺ T cells, although the frequency of this T cell subset was significantly augmented in TLR2-deficient mice. These findings demonstrate that TLR2 deficiency induces, since the early phase of pulmonary infection, a Th17-skewed immune response, without severely impairing Th1 and Th2 immunity.

TLR2 deficiency results in lower expansion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs

In murine candidiasis, TLR2 deficiency was associated with decreased IL-10 production and deficient expansion of CD4⁺ Tregs (4, 32). In addition, differentiation of Tregs has an inhibitory effect on Th17 expansion (33, 34). Although Th17 cells and Tregs require TGF- β to their differentiation, the concomitant presence of some proinflammatory cytokines such as IL-1 or IL-6 results in preferential development of Th17 cells and impaired Treg expansion (34). These findings led us to ask whether the prevalent Th17

immunity developed by TLR2-deficient mice was associated with decreased expansion and recruitment of Tregs to the lungs. Thus, TLR2^{-/-} and WT mice were sacrificed at weeks 2 and 11 after infection and the presence of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells was characterized by flow cytometry in the CD4⁺ subpopulation of lung-infiltrating lymphocytes. Surface staining of CD25⁺ and intracellular FoxP3⁺ expression was back-gated on the CD4⁺ T cell population. As can be seen in Fig. 10, no differences were detected at week 2 but, at week 11 a lower number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells was observed in the lung inflammatory lymphocytes of TLR2-deficient than in WT mice.

Discussion

Recent studies have established the central role of TLRs in the innate immune recognition of a wide variety of microorganisms, including fungal pathogens (12, 15, 17). Since the contribution of TLR in *P. brasiliensis* infection was never investigated, the present report assessed the role of TLR2 in the innate and acquired phases of immunity to this pulmonary fungal pathogen. Data here presented demonstrate that TLR2 promotes fungal infection, but it has a concomitant beneficial effect to the host due to its inhibitory effect on the development of inflammatory reactions associated with prevalent Th17 immunity. Furthermore, it was also shown that TLR2 activation positively controls the expansion of Tregs, which modulate innate and adaptive immune cells and restrain lung inflammatory pathology.

Although TLR usually do not mediate fungal uptake (35), our in vitro studies suggested that *P. brasiliensis* yeast cells use TLR2 to interact with macrophages and to activate innate immunity cells. *P. brasiliensis* yeast cells appear to be recognized by TLR2 molecules, resulting in increased adherence/ingestion and augmented production of NO and cytokines (IL-10 and MCP-1). Despite this increased activation, 48 h after infection an increased number of viable fungi were recovered from TLR2-normal cells. This finding

Table I. PI of spleen lymphocytes obtained from *P. brasiliensis*-infected TLR2^{-/-} and WT mice at week 4 of infection^a

Treatment	TLR2 ^{-/-} (PI)	WT (PI ^b)
Control lymphocytes	0.78	2.82
Lymphocytes + AgPb	0.99	2.43
Lymphocytes + anti-CD28	0.66	2.66
Lymphocytes + Con A	1.3	6

^a Spleen cell suspensions were labeled with CFSE and cultured for 3 days in the presence of anti-CD3 (0.3) Ab, anti-CD28 (2.5 μg/ml) Ab, *P. brasiliensis*-soluble Ag (100 μg/ml), or Con A (1 μg/ml). The intensity of CFSE was assessed by flow cytometry.

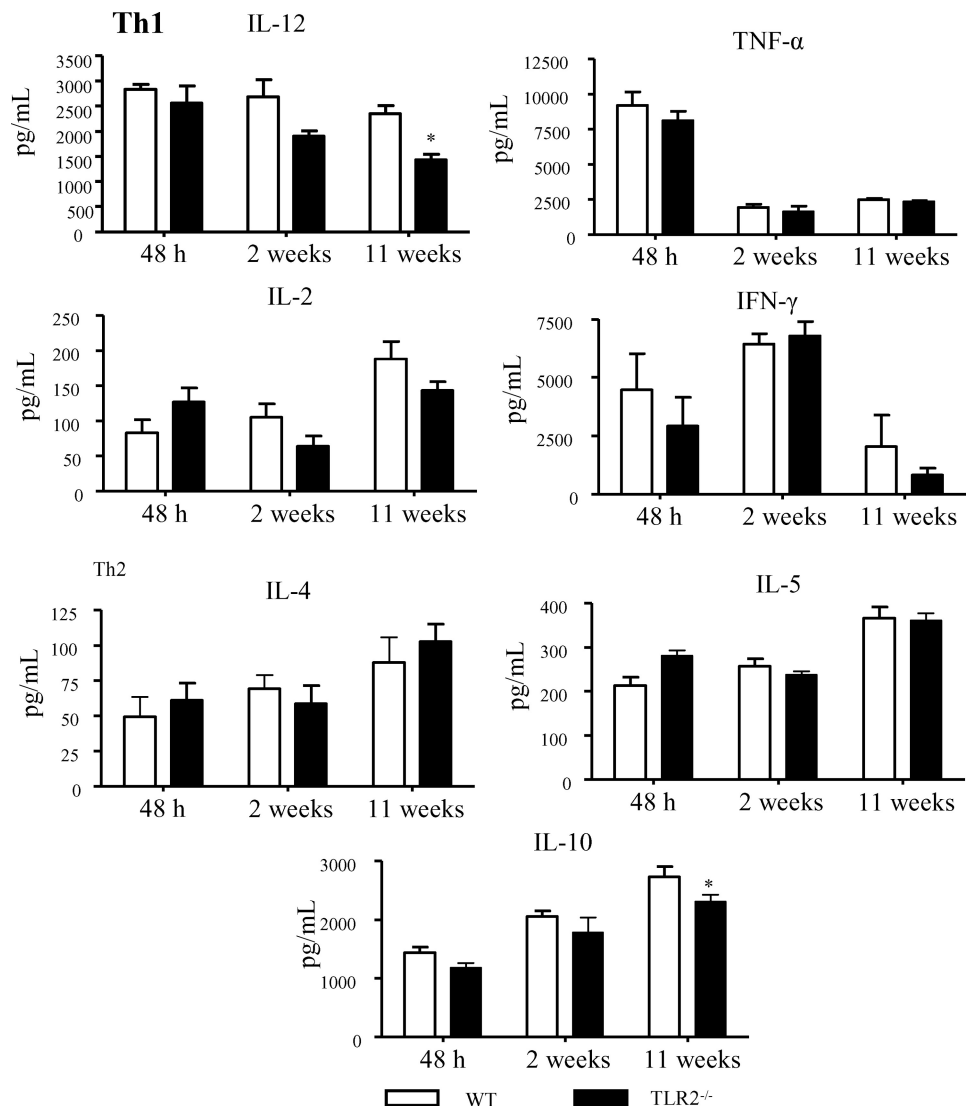
^b The PI was calculated as the MFI of unstimulated cultures/MFI of stimulated cultures. Data are representative of two independent experiments.

appears to be paradoxical, since the killing ability of murine macrophages was previously reported to be associated with NO production by cytokine-stimulated phagocytes (36). Although the killing mechanisms were not here addressed, it appears that the increased NO secretion by TLR2-normal macrophages was not sufficient to abolish the increased fungal interaction mediated by TLR2 expression. Furthermore, the concomitant increase in IL-10 production could have inhibited the fungicidal ability of TLR2-normal macrophages. Along the same line, we could hypothesize that the lower IL-10 synthesis by TLR2^{-/-} macrophages would

enhance IDO activity which would control *P. brasiliensis* growth and inhibit inducible NO synthase activity. This possibility is under investigation in our laboratory and would accommodate the lower fungal loads and NO production observed with TLR2^{-/-} macrophages (16, 30). Similarly to our results, TLR2-deficient macrophages exhibited an increased ability to contain another fungal pathogen, *C. albicans*, but this fact was not associated with different patterns of cytokine production (37).

The in vivo infection of TLR2-deficient mice resulted in decreased fungal burdens in all postinfection periods assayed. The less severe infection was always associated with low NO production. Again, the differences in fungal burdens could be explained by the different fungal interaction with alveolar macrophages at early phases of infection and not by differences in NO secretion. Forty-eight hours after infection, production of pulmonary cytokines was similar in both mouse strains, except for the augmented synthesis of TGF-β and IL-17 by TLR2-deficient mice. Interestingly, IL-17 is a cytokine involved with proinflammatory activity and increased PMN chemotaxis due to its ability to promote the synthesis of CXC chemokines (38–40). Consistent with the augmented IL-17 production, 72 h after infection increased PMN influx was detected in the alveolar spaces of TLR2^{-/-} mice (our unpublished data) and these cells could have efficiently controlled fungal growth but also sustained the synthesis of IL-23 and IL-17

FIGURE 8. Type 1 and type 2 cytokines in lung homogenates of TLR2^{-/-} and WT mice. At 48 h and 2 and 11 wk after i.t. infection with 10⁶ yeast cells of *P. brasiliensis*, lungs from TLR2^{-/-} and WT control mice were collected and disrupted in 5.0 ml of PBS and supernatants were analyzed for cytokines content by capture ELISA. The bars depict means ± SEM of cytokine levels (6–8 animals per group). *, *p* < 0.05 between strains.



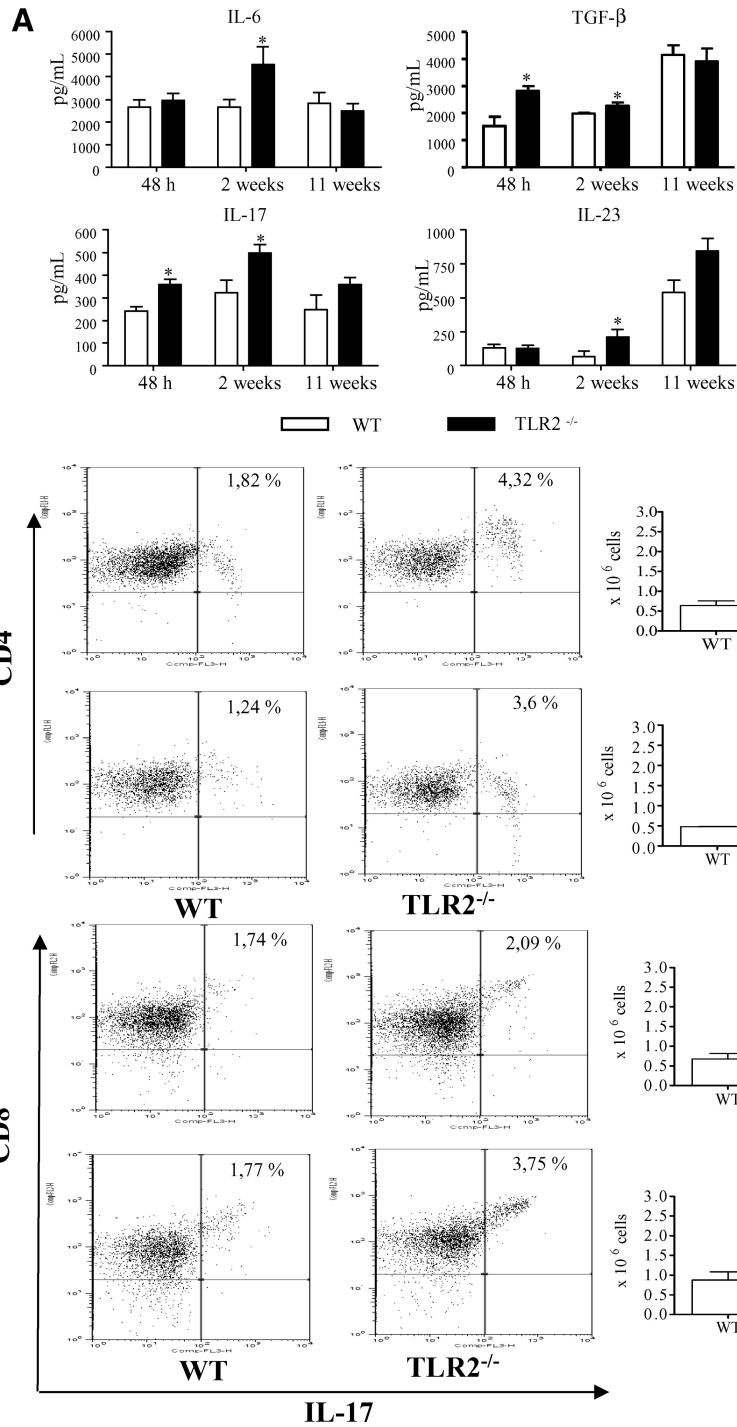


FIGURE 9. Lung homogenates of TLR2^{-/-} mice presented increased levels of Th17 cytokines and IL-17⁺ CD4⁺ T cells. **A**, At 48 h and 2 and 11 wk after i.t. infection with 10⁶ yeast cells of *P. brasiliensis*, lungs from TLR2^{-/-} and WT control mice were collected and disrupted in 5.0 ml of PBS and supernatants were analyzed for cytokines content by capture ELISA. Compared with WT controls, TLR2^{-/-} mice showed increased levels of pulmonary IL-6, TGF-β, IL-23, and IL-17. The bars depict means ± SEM of cytokine levels (6–8 animals/group). **B**, Flow cytometry analysis of IL-17-producing cells. Lung cells were restimulated in vitro with PMA/ionomycin for 6 h and subjected to intracellular staining for IL-17. The lymphocyte population was gated by forward/side scatters. Dot plots show a representative analysis from one of four to six mice. Results are from one experiment and are representative of two independent experiments. *, *p* < 0.05 between strains.

(41). Consistent with this possibility, lung homogenates of PMN-depleted TLR2^{-/-} mice showed diminished levels of IL-23 (data not shown), suggesting that neutrophils could have a positive influence in the differentiation and expansion of Th17 cells. Although IL-17 production is usually associated with the Th17 subset of CD4⁺ T cells, this cytokine was also described to be produced by innate immune cells such as γδ T cells, dendritic cells, PMN cells, or NKT lymphocytes (41–45). In our model, CD4⁺ T cells were shown to be the main source of IL-17 because increased numbers of IL-17⁺CD4⁺ T cells were present in the lung inflammatory infiltrates of TLR2^{-/-} mice since the early phase of infection. This fact led us to suppose that TLR2 signaling could impair interactions of macrophages with fungal

agonists that preferentially induce cytokines associated with the Th17 pathway of T cell differentiation, a fact not previously described in PCM.

At week 2 of infection, TLR2-deficient mice produced low levels of MCP-1 associated with augmented synthesis of pulmonary TGF-β, IL-6, IL-17, and IL-23. This pattern of cytokine secretion points to a preferential activation of Th17 cells without affecting other Th1/Th2 cytokines. Indeed, Th17 cell development occurs in the presence of TGF-β and IL-6 and is maintained in the presence of IL-23, an IL-12-related cytokine (46, 47). Interestingly, all of those mediators involved in the development and maintenance of Th17 immunity were found in lung homogenates of TLR2-deficient mice and increased numbers of

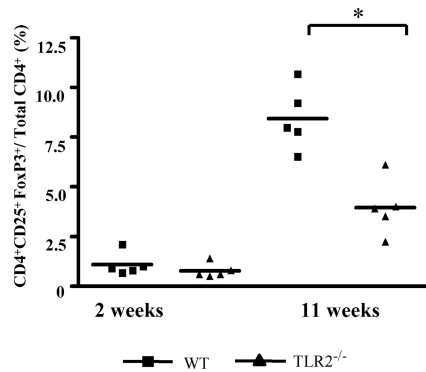


FIGURE 10. TLR2-deficient mice do not expand the number of Tregs. FoxP3 expression by lung lymphocytes from TLR2^{-/-} and WT mice inoculated i.t. with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells was determined by flow cytometric analysis. Lungs of TLR2^{-/-} and WT mice ($n = 6-8$) were excised, washed in PBS, minced, and digested enzymatically; 2 and 11 wk after infection cell suspensions were obtained and stained as described in *Materials and Methods*. The cell surface expression of leukocyte markers as well as intracellular FoxP3⁺ expression in lung-infiltrating leukocytes were analyzed by flow cytometry. Surface staining of CD25⁺ and intracellular FoxP3 expression were back-gated on the CD4⁺ T cell population. The data represent the mean \pm SEM of the results from six to eight mice per group and are representative of two independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with WT mice.

IL-17⁺CD4⁺ T cells were found in the lungs of these mice after 72 h and 2 wk of *P. brasiliensis* infection. This Th17-biased immunity resulted in altered cellular influx to the site of infection. At weeks 2 and 11 of infection, increased production of KC, a CXC chemokine involved in PMN chemotaxis, and augmented influx of neutrophils to the lungs of TLR2-KO mice were detected; these findings are in agreement with previous reports showing increased participation of PMN leukocytes in inflammatory exudates governed by Th17 immunity (38–40, 48, 49). Consistent with our results, association of IL-17 synthesis and increased PMN influx to the site of infection was seen in bacterial pneumonia (50), inflammatory lung disorders (51), and other fungal infections (31, 52). In addition, the diminished presence of MCP-1, a chemokine chemotactic for macrophages, was associated with decreased numbers of these cells in the lung cell infiltrates of TLR2-deficient animals.

The Th17-induced PMN accumulation in inflammatory reactions can play antagonistic effects to the hosts, being protective due to its microbicidal ability or deleterious due to the release of tissue-damaging components (41). In our model, the higher number of lung-infiltrating PMN associated with Th17 immunity was responsible, at least partially, by the better fungal clearance observed in TLR2^{-/-} mice. This was shown by in vivo depletion of PMN cells that led to increased fungal burdens only in TLR2^{-/-} mice. The immunoprotective effect of neutrophils was also verified by the early mortality of PMN-depleted TLR2^{-/-} mice. These data are consistent with previous findings in murine candidiasis describing a more severe systemic infection associated with deficient IL-17 production and impaired influx of neutrophils to infected organs (53). However, as described in other models of prevalent Th17 immunity, we believe that PMN cells exerted a dual effect in murine PCM. The protection granted by the increased influx and efficient fungicidal ability was probably accompanied by tissue damage caused by the release of protein-degrading enzymes such as neutrophil elastase, metalloproteinases, and other cytotoxic compounds as reactive oxygen species (31, 41, 50–54). Since equivalent fungicidal ability was detected in airway neutrophils from

TLR2^{-/-} and control mice, we believe that the increased number of PMN cells that migrate to the lungs and not the intrinsic activation of neutrophils was responsible for the control of fungal growth.

Despite the control of fungal growth, our data also suggest that Th17 immunity and PMN cells have also exerted a deleterious effect in TLR2^{-/-} mice. Indeed, the diminished fungal burdens of TLR2^{-/-} mice were concomitant with pulmonary lesions as severe as those displayed by WT mice. In both mouse strains nonorganized inflammatory reactions replaced almost all lung parenchyma, suggesting that high fungal loads (developed by WT animals) or prevalent Th17 immunity (mounted by TLR2^{-/-} mice) have similar deleterious effects to *P. brasiliensis*-infected mice.

The phenotypic analysis of lymphocyte subsets performed after 2 and 11 wk of infection showed a decreased frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in TLR2^{-/-} mice. This fact could be attributed to the lower fungal burden detected in this mouse strain or to the Th17-skewed immunity developed by the deficient animals. The early secretion of TGF- β and IL-6 by TLR2^{-/-} mice appeared to have induced a precocious and prevalent Th17 immunity which resulted in diminished macrophage and T cell migration to the lungs. These cells were, however, partially replaced by PMN neutrophils which characterize Th17-mediated inflammatory exudates.

By week 11 of infection, TLR2^{-/-} mice appear to maintain their prevalent Th17 immunity, whereas WT mice presented increased fungal burdens associated with augmented production of IL-10, IL-12, and significant expansion of Tregs. It can be supposed that those Tregs exerted an enhancing effect on fungal growth but an inhibitory activity on inflammatory reactions by down-modulating innate and adaptive immunity. Consistent with this interpretation, a recent work elegantly demonstrated the association of Tregs and increased fungal burdens in an experimental model of PCM using CXCR5 KO mice (55). The absence of TLR2 associated with decreased differentiation of Tregs here observed is also consistent with the increased secretion of TGF- β , which, associated with IL-6 (or other proinflammatory cytokine), could have inhibited FoxP3 production and expansion of Tregs (30).

In murine candidiasis, TLR2-deficient mice were shown to develop a more severe infection (56), a fact not subsequently confirmed (4, 16). The increased resistance of TLR2-deficient mice was associated with diminished IL-10 production and a decreased expansion of Tregs, which led to a more efficient Th1 immunity (4, 16). Similarly to the candidiasis model, PCM in TLR2^{-/-} mice results in lower fungal loads and decreased expansion of Tregs. However, expression of TLR2 appears to be protective to pulmonary PCM because of its inhibitory activity on the development of Th17 immunity and tissue pathology. In addition, the decreased expansion of Tregs could have contributed to the maintenance of pathogenic inflammatory reactions.

The prevalent Th17 immunity developed by TLR2-deficient mice could be explained by the use of different pattern recognition receptors at the initial phase of infection. Other experimental models have implicated the use of Dectin-1 or TLR4 in the induction of Th17 immunity (57–59). Despite the initial pattern recognition receptor used, our results add a new mechanistic pathway which can lead to deleterious Th17 immunity in fungal infections in the absence of TLR2 signaling.

In summary, we have demonstrated for the first time that TLR2 are important innate receptors for *P. brasiliensis* which appears to use TLR2 as a virulence mechanism, which facilitates the access of fungal cells into murine macrophages. Most important, this is the

first study to demonstrate that TLR2 has a protective effect in pulmonary fungal infections due to its ability to deviate T cell responses from pathogenic Th17 immunity to a balanced Th1/Th2 response modulated by Tregs.

Acknowledgments

We are grateful to Tania A. Costa and Paulo Albee for her invaluable technical assistance and Prof. S. Akira for generously providing the TLR2^{-/-} breeders used in this study. We also thank Dr. Julio Schaferstein for the donation of anti-PMN Abs.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Janeway, C. A. Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197–216.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335–376.
- Akira, S. 2006. TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311: 1–16.
- Netea, M. G., R. Sutmoller, C. Hermann, C. A. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, J. H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, and B. J. Kullberg. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 3712–3718.
- Sutmoller, R. P., M. H. den Brok, M. Kramer, E. J. Bennink, L. W. Toonen, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, S. Akira, M. G. Netea, and G. J. Adema. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 116: 485–494.
- Liu, G., and Y. Zhao. 2007. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunology* 122: 149–156.
- Liu, H., M. Komai-Koma, D. Xu, and F. Y. Liew. 2006. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 7048–7053.
- Sutmoller, R. P., A. Gaaristem, and G. J. Adema. 2007. Regulatory T cells and Toll-like receptors: regulating the regulators. *Ann. Rheum. Dis.* 66: 91–95.
- Yauch, L. E., M. K. Mansour, S. Shoham, J. B. Rottman, and S. M. Levitz. 2004. Involvement of CD14, Toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect. Immun.* 72: 5373–5382.
- Biondo, C., A. Midiri, L. Messina, F. Tomasello, G. Garufi, M. R. Catania, M. Bombaci, C. Beninati, G. Teti, and G. Mancuso. 2005. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Immunol.* 35: 870–878.
- Netea, M. G., C. A. Van Der Graaf, A. G. Vonk, I. Verschuere, J. W. Van Der Meer, and B. J. Kullberg. 2002. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* 185: 1483–1489.
- Netea, M. G., G. Ferwerda, C. A. van der Graaf, J. W. Van der Meer, and B. J. Kullberg. 2006. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Curr. Pharm. Des.* 12: 4195–4201.
- Meier, A., C. J. Kirschning, T. Nikolaus, H. Wagner, J. Heesemann, and F. Ebel. 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Clin. Microbiol.* 5: 561–570.
- Dubourdeau, M., R. Athman, V. Balloy, M. Huerre, M. Chignard, D. J. Philpott, J. P. Latgé, and O. Ibrahim-Granet. 2006. *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* 177: 3994–4001.
- Romani, L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 1–23.
- Bellocchio, S., C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S. S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S. M. Levitz, and L. Romani. 2004. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J. Immunol.* 172: 3059–3069.
- Calich, V. L., A. Pina, M. Felonato, S. Bernardino, T. A. Costa, and F. V. Loures. 2008. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2; TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53: 1–7.
- Franco, M. 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 5–18.
- Borges-Walmsley, M. I., D. Chen, X. Shu, and A. R. Walmsley. 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 10: 80–87.
- Calich, V. L. G., T. A. Costa, M. Felonato, C. Arruda, S. Bernardino, F. V. Loures, L. R. R. Ribeiro, R. C. Valente-Ferreira, and A. Pina. 2008. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 165: 223–236.
- Calich, V. L. G., and M. H. S. L. Blotta. 2005. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In *Fungal Immunology: From an Organ Perspective*. P. L. Fidel, and G. B. Huffnagle, eds. Springer, New York, pp. 201–228.
- Brummer, E. 1994. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells. In *Paracoccidioidomycosis*. M. Franco, C. Silva Lacaz, A. Restrepo, and G. Del Negro, editors. CRC, Boca Raton, FL, pp. 212–223.
- Calich, V. L., T. L. Kipnis, M. Mariano, C. F. Neto, and W. D. Dias da Silva. 1979. The activation of complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* “in vitro”: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 12: 20–30.
- Jiménez, M. del P., A. Restrepo, D. Radzioch, L. E. Cano, and L. F. Garcia. 2006. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by *Nramp1* congenic macrophages lines. *Immunol. Med. Microbiol.* 47: 56–66.
- Popi, A. F., J. D. Lopes, and M. Mariano. 2002. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions: An evasion mechanism of the fungus. *Cell. Immunol.* 218: 87–94.
- Pina, A., S. Bernardino, and V. L. Calich. 2008. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J. Leukocyte Biol.* 83: 1088–1099.
- Kashino, S. S., R. A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L. H. Meloni-Bruneri, C. A. Vaz, E. Burger, L. M. Singer, and V. L. Calich. 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. *J. Interferon. Cytokine Res.* 20: 89–97.
- Cano, L. E., L. M. Singer-Vermees, C. A. C. Vaz, M. Russo, and V. L. G. Calich. 1995. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect. Immun.* 63: 1777–1783.
- Singer-Vermees, L. M., M. C. Ciavaglia, S. S. Kashino, E. Burguer, and V. L. G. Calich. 1992. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 261–264.
- Romani, L., and P. Puccetti. 2006. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol.* 14: 183–189.
- Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, et al. 2007. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur. J. Immunol.* 37: 2695–2706.
- Netea, M. G., N. A. Gow, C. A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R. P. Hobson, G. Bertram, H. B. Hughes, T. Jansen, et al. 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* 116: 1642–1650.
- Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, I. I. Ivanov, R. Min, G. D. Victoria, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, et al. 2008. TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* 453: 236–240.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179–189.
- Netea, M. G., G. D. Brown, B. J. Kullberg, and N. A. Gow. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 67–78.
- Cano, L. E., R. Arango, M. E. Salazar, E. Brummer, D. A. Stevens, and A. Restrepo. 1992. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 161–168.
- Blasi, E., A. Mucci, R. Neglia, F. Pezzini, B. Colombari, D. Radzioch, A. Cossarizza, E. Lugli, G. Volpini, G. Del Giudice, and S. Peppoloni. 2005. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44: 69–79.
- Wu, Q., R. J. Martin, J. G. Rino, R. Breed, R. M. Torres, and H. W. Chu. 2007. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect.* 9: 78–86.
- Ley, K., E. Smith, and M. A. Stark. 2006. IL-17A-producing neutrophil-regulatory T lymphocytes. *Immunol. Res.* 34: 229–242.
- Liang, S. C., A. J. Long, F. Bennett, M. J. Whitters, R. Karim, M. Collins, S. J. Goldman, K. Dunussi-Joannopoulos, C. M. Williams, J. F. Wright, and L. A. Fouser. 2007. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J. Immunol.* 179: 7791–7799.
- Romani, L., T. Zelante, A. De Luca, F. Fallarino, and P. Puccetti. 2008. IL-17 and therapeutic kynurenes in pathogenic inflammation to fungi. *J. Immunol.* 180: 5157–5162.
- Michel, M. L., A. C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P. B. Savage, C. H. Wong, E. Schneider, M. Dy, and M. C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1^{int} iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* 204: 995–1001.
- De Luca, A., C. Montagnoli, T. Zelante, P. Bonifazi, S. Bozza, S. Moretti, C. D'Angelo, C. Vacca, L. Boon, F. Bistoni, P. Puccetti, F. Fallarino, and L. Romani. 2007. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. *J. Immunol.* 179: 5999–6008.
- Bozza, S., T. Zelante, S. Moretti, P. Bonifazi, A. Deluca, C. D'Angelo, G. Giovannini, C. Garlanda, L. Boon, F. Bistoni, et al. 2008. Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. *J. Immunol.* 180: 4022–4031.
- Romani, L., F. Fallarino, A. De Luca, C. Montagnoli, C. D'Angelo, T. Zelante, C. Vacca, F. Bistoni, M. C. Fioretti, U. Grohmann, B. H. Segal, and P. Puccetti. 2008. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *J. Immunol.* 180: 5157–5162.
- Bettelli, E., M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. T_H17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8: 345–350.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006.

- Transforming growth factor- β induces development of the T_H17 lineage. *Nature* 441: 231–234.
48. Carlson, T., M. Kroenke, P. Rao, T. E. Lane, and B. Segal. 2008. The Th17⁻ELR⁺ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 205: 811–823.
 49. Kobayashi, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. 2008. *Front. Biosci.* 13: 2400–2407.
 50. Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, H. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. E. Shellito, et al. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194: 519–527.
 51. Lindén, A., M. Laan, and G. P. Anderson. 2005. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur. Respir. J.* 25: 159–172.
 52. Cooper, A. M. 2007. IL-23 and IL-17 have a multi-faceted largely negative role in fungal infection. *Eur. J. Immunol.* 37: 2680–2682.
 53. Huang, W., L. Na, P. L. Fidel, and P. Schwarzenberger. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* 190: 624–631.
 54. Andersson, A., R. Kokkola, J. Wefer, H. Erlandsson-Harris, and R. A. Harris. 2004. Differential macrophage expression of IL-12 and IL-23 upon innate immune activation defines rat autoimmune susceptibility. *J. Leukocyte Biol.* 76: 1118–1124.
 55. Moreira, A. P., K. A. Cavassani, F. S. Massafera Tristão, A. P. Campanelli, R. Martinez, M. A. Rossi, and J. S. Silva. 2008. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J. Immunol.* 180: 3049–3056.
 56. Villamón, E., D. Gozalbo, P. Roig, J. E. O'Connor, D. Fradelizi, and M. L. Gil. 2004. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect.* 6: 1–7.
 57. LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8: 630–638.
 58. Hara, H., C. Ishihara, A. Takeuchi, T. Imanishi, L. Xue, S. W. Morris, M. Inui, T. Takai, A. Shibuya, S. Saijo, et al. 2007. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 8: 619–629.
 59. Abdollahi-Roodsaz, S., L. A. Joosten, M. I. Koenders, I. Devesa, M. F. Roelofs, T. R. Radstake, M. Heuvelmans-Jacobs, S. Akira, M. J. Nicklin, F. Ribeiro-Dias, et al. 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J. Clin. Invest.* 118: 205–216.



The Journal of Immunology

This information is current as of January 28, 2010

TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection

Flávio V. Loures, Adriana Pina, Maíra Felonato and Vera L. G. Calich

J. Immunol. 2009;183:1279-1290; originally published online Jun 24, 2009;
doi:10.4049/jimmunol.0801599
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/2/1279>

References

This article **cites 57 articles**, 18 of which can be accessed free at:
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/2/1279#BIBL>

1 online articles that cite this article can be accessed at:
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/2/1279#otherarticles>

Subscriptions

Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/>

Permissions

Submit copyright permission requests at
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/etoc.shtml>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright ©2009 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



1 **TLR4 signaling leads to a more severe fungal infection associated with**
2 **enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of**
3 **regulatory T cells**

4
5
6 Flávio V. Loures,¹ Adriana Pina,¹ Máira Felonato,¹ Eliseu F. Araújo, Katia R. M.
7 Leite,² and Vera L. G. Calich^{1*}

8
9
10 ¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São
11 Paulo, São Paulo, SP, Brazil, and ² Serviço de Patologia, Hospital Sírio Libanês, São
12 Paulo, SP, Brazil

13
14
15 **Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*; Pulmonary pathology; Innate immunity;
16 Adaptive immunity; Cytokines, T cells

17
18
19 **Corresponding Author:** Vera L. G. Calich, Departamento de Imunologia, Instituto de
20 Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, CEP
21 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. Phone: 55-11- 30917397. Fax: 55-11-30917224. E-
22 mail: vlcalich@icb.usp.br

23
24
25 **Running Title:** Role of TLR4 in pulmonary paracoccidioidomycosis

1 **Abstract:**

2 **Toll-like receptors (TLRs) present in innate immune cells recognize pathogen**

3 **molecular patterns and influence immunity that control host-parasite interaction.**

4 **The objective of this study was to characterize the involvement of TLR4 in the**

5 **innate and adaptive immunity to *Paraccocidioides brasiliensis*, the most important**

6 **primary fungal pathogen of Latin America. We compared the responses of**

7 **C3H/HeJ mice, which are naturally defective in TLR4 signaling, with C3H/HePas**

8 **mice, which express functional receptors, after in vitro and in vivo infection with**

9 ***P.brasiliensis*. Unexpectedly, we verified that TLR4-defective macrophages**

10 **infected *in vitro* with *P. brasiliensis* presented decreased fungal loads associated**

11 **with impaired synthesis of nitric oxide, IL-12 and MCP-1. After intratracheal**

12 **infection with one million yeasts, TLR4-defective mice developed reduced fungal**

13 **burdens and decreased levels of pulmonary nitric oxide, proinflammatory**

14 **cytokines and antibodies. TLR4-competent mice produced elevated levels of IL-12**

15 **and TNF- α , besides cytokines of the Th17 pattern indicating a proinflammatory**

16 **role for TLR4 signaling. The more severe infection of TLR4-normal mice resulted**

17 **in increased influx of activated macrophages and T cells to the lungs, progressive**

18 **control of fungal burdens but impaired expansion of regulatory T cells. In**

19 **contrast, TLR4-defective mice were not able of totally clearing their diminished**

20 **fungal burdens, associated with deficient activation of T cell immunity and**

21 **enhanced development of Treg cells. These divergent patterns of immunity,**

22 **however, resulted in equivalent mortality rates indicating that control of elevated**

23 **fungal growth mediated by vigorous inflammatory reactions is as deleterious to**

24 **the hosts as low fungal loads inefficiently controlled by limited inflammatory**

25 **reactions.**

1 INTRODUCTION

2

3 Pathogen recognition receptors (PRRs) are a group of receptors present in the membrane
4 and cytoplasm of innate immunity cells which recognize the presence of invading
5 microbes by interacting with conserved pathogen structures, the so called “pathogen
6 associated molecular patterns” or “PAMP”. This initial event of innate immunity is
7 crucial to control pathogen growth and to subsequently activate adaptative immunity.
8 Toll like receptors (TLRs) constitute a major family of pattern recognition molecules
9 and, like other PRRs, are able to respond to different structural homologies conserved in
10 many microorganisms (2, 62). The TLRs activation is crucial for many aspects of
11 microbe elimination, including microbial killing, recruitment of phagocytes to the site of
12 infection and activation of dendritic cells (DCs) (52). Early TLR activation results in the
13 production of several inflammatory mediators and the final balance among pro- and
14 anti-inflammatory components will regulate the type of adaptative immune response.
15 Recent findings have shown that direct recognition of PAMPs by DCs is critical for
16 priming appropriate T cell responses resulting in T helper 1 (Th1), Th2 or Th17
17 immunity (25, 31, 34, 60).

18 The TLR4 is the key receptor that recognizes bacterial lipopolysaccharides
19 whereas TLR2 is involved in the interaction with bacterial peptidoglycans and
20 lipoproteins (66). As described for other microorganisms, TLRs were shown to be
21 involved in host defense against different fungal pathogens. *In vivo* and *in vitro* studies
22 demonstrated that *Cryptococcus neoformans* (7, 67), *Candida albicans* (43, 45) and
23 *Aspergillus fumigatus* (24, 39) may signal through members of the TLR family, mainly
24 TLR2 and TLR4. Different components of a certain pathogen can be used to stimulate
25 the immune system. Thus, phospholipomannan of *C. albicans* is sensed by TLR2 (33)

1 while O-linked mannans are recognized by TLR4 (44). The contribution of individual
2 TLRs to the immune response against pathogenic fungi depends on several factors such
3 as the fungal morphotype, fungal species and route of infection. Activation signals
4 mediated by innate immunity receptors, however, are not always beneficial to the host
5 and TLR activation can be used by pathogenic fungi to promote more severe infections
6 (5, 53).

7 Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by
8 the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and constitutes the most prevalent
9 deep mycosis in Latin America (28). The alveolar macrophages are the first host cells
10 that interact with *P. brasiliensis* cells and their activation is fundamental to control
11 fungal growth. The molecular mechanisms controlling the initial steps of *P. brasiliensis*
12 and phagocytes interaction are not well understood. It is known, however, that normal
13 macrophages are permissive to *P. brasiliensis* growth while cytokine-activated
14 macrophages are able to restrain *P. brasiliensis* multiplication (12). Complement
15 receptor 3 (CR3) and mannose receptor were shown to play an important role in the
16 initial interaction between *P. brasiliensis* cells and mouse peritoneal macrophages (14,
17 32, 50). Interestingly, a recent work of our laboratory demonstrated that alveolar
18 macrophages from susceptible mice (B10.A) are easily activated by *P. brasiliensis*
19 infection, and show efficient fungal killing associated with nitric oxide production while
20 pulmonary macrophages from resistant mice (A/Sn) are poorly activated and present
21 inefficient killing activity associated with increased levels of TGF- β (49). Despite their
22 inefficient innate immunity, A/Sn mice develop a balanced Th1/Th2 immunity which
23 controls fungal growth without intense tissue pathology.

24 In a previous work, our group demonstrated the influence of TLR2 in pulmonary
25 PCM (15, 38). Using TLR2-normal and TLR2-deficient mice we were able to show

1 that the presence of TLR2 causes more severe *in vitro* and *in vivo* *P. brasiliensis*
2 infections. In addition, TLR2 deficiency results in increased Th17 immunity associated
3 with diminished expansion of Treg cells and increased lung pathology due to
4 unrestrained inflammatory reactions (38). Characterizing the behavior of dendritic cells
5 in murine PCM, Ferreira et al. observed an increased expression of TLR2 by dendritic
6 cells of susceptible, but not resistant mice (26). Moreover, TLR2, TLR-4 and dectin-1
7 were suggested to be involved in the recognition and internalization of *P. brasiliensis*
8 by human monocytes and neutrophils, indicating an important role of these pathogen
9 receptors in the immune response against the fungus (10).

10 We decided to investigate the role of TLR4 in murine PCM using *in vitro* and *in*
11 *vivo* models of infection. Using TLR-competent C3H/HePas and C3H/HeJ mice which
12 possess a missense mutation in the TLR4 gene, we were able to demonstrate that both,
13 *in vitro* and *in vivo*, TLR4 signaling causes a more severe infection associated with
14 increased activation of innate and adaptive immunity, but decreased expansion of Treg
15 cells. This pattern of immunity, however, was not beneficial to the hosts due to the
16 increased lung injury mediated by inefficient control of inflammatory reactions by Treg
17 cells.

18

19

MATERIALS AND METHODS

20 **Fungus.** *P. brasiliensis* Pb18, a highly virulent isolate was used throughout this
21 investigation (36). Pb18 yeast cells were maintained by weekly sub-cultivation in
22 semisolid culture medium. Washed yeast cells were adjusted to 20×10^6 cells/ml (*in*
23 *vivo* infection) and 4×10^4 cells/ml (*in vitro* infection) based on hemocytometer counts.
24 Viability was determined with Janus Green B vital dye (Merck) and was always higher
25 than 85%.

1 **Mice and intra-tracheal infection.** C3H/HeJ and C3H/HePas were obtained
2 from our Isogenic Breeding Unit (Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências
3 Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil) and used at 8 to 12 weeks of age.
4 C3H/HeJ has a point mutation in the TLR4 gene and C3H/HePas has a functional TLR4
5 gene. In selected experiments, C57Bl/6 mice genetically deficient of TLR4 (TLR4 KO)
6 and their normal C57Bl/6 counterparts were used. Mice were anesthetized and
7 submitted to intratracheal (i.t.) *P. brasiliensis* infection as previously described (18).
8 Briefly, after intraperitoneal anesthesia, the animals were i.t. infected with 10^6 *P.*
9 *brasiliensis* yeasts cells, contained in 50 μ l of PBS. Mice were studied at 96h, 2 and 11
10 weeks postinfection. The experiments were approved by the ethics committee on animal
11 experiments of our institution.

12 **Phagocytic and fungicidal assays.** Thioglycollate-induced peritoneal
13 macrophages were isolated by adherence (2h at 37° C in 5% CO₂) to plastic-bottom
14 tissue-culture plates (1x10⁶ cells/well in 24 well plates for fungicidal assays), or plated
15 onto 13-mm-round glass coverlips (1x10⁶ cells/well in 24 well plates) for phagocytosis.
16 Macrophages were washed to remove nonadherent cells and cultivated overnight with
17 fresh complete medium (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma,
18 containing 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin in the
19 presence or absence of recombinant IFN- γ (20 ng/ml in culture medium, BD-
20 Pharmingen). Non-adherent cells were counted to evaluate the number of remaining
21 adherent cells used in phagocytic and killing assays. For phagocytic assays, macrophage
22 cultures were infected with *P. brasiliensis* yeasts in a macrophage:yeast ratio of 25:1.
23 This ratio was previously determined and was shown to be no deleterious to
24 macrophage cultures and adequate for phagocytosis and killing assays (18, 49). The
25 cells were co-cultivated for 4h at 37° C in 5% CO₂ to allow fungi adhesion and

1 ingestion. Cells were washed twice with PBS to remove any non-ingested or non-
2 adhered yeast, and samples were processed for microscopy. Cells were fixed with
3 methanol and stained with Giemsa (Sigma). Experimental conditions were performed in
4 triplicate, and the number of phagocytosed or adhered yeasts per 1000 macrophages was
5 evaluated on at least three separate slides. For fungicidal assays, IFN- γ -primed and
6 unprimed macrophage cultures were infected with *P.brasiliensis* yeasts as above
7 described. After 48 h of culture at 37° C in a CO₂ incubator, plates were centrifuged
8 (400x g, 10 min, 4° C), supernatants stored at -70° C and further analyzed for the
9 presence of nitrite and cytokines. The wells were washed with distilled water to lyse
10 macrophages, and suspensions collected in individual tubes. One hundred μ l of cell
11 homogenates were assayed for the presence of viable yeasts. All assays were done with
12 five wells per condition in over three independent experiments.

13 **CFU assay, histological and morphometrical analyses.** The numbers of
14 viable microorganisms in cell cultures and infected organs (lungs, liver and spleen)
15 from experimental and control mice were determined by counting the number of colony
16 forming units (CFU). Animals from each group were sacrificed, and the enumeration of
17 viable organisms was done as previously described (59). The numbers (\log_{10}) of viable
18 *P. brasiliensis* per gram of tissue (*in vivo*) or per mL of cell homogenates (*in vitro*) are
19 expressed as the means \pm standard errors. For histological examinations, the left lung of
20 infected mouse was removed, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Five
21 μ m sections were stained by the hematoxilin-eosin (H&E) for an analysis of the lesions,
22 and silver stained for fungal evaluation. Pathologic changes were analyzed based on the
23 size, morphology and cell composition of granulomatous lesions, presence of fungi and
24 intensity of the inflammatory infiltrates. Morphometrical analysis was performed using
25 a Nikon DXM 1200c digital camera (magnification of 10x), and Nikon NIS Elements

1 AR 2.30 software. The area of lesions was measured (in μm^2) in 10 microscopic fields
2 per slide in 10 animals per group. Results were expressed as the mean \pm standard errors
3 of total area of lesions for each animal.

4 **Measurement of cytokines and NO.** Supernatants from lung homogenates or
5 cell cultures were separated and stored at -70°C . The levels of IL-2, IL-4, IL-5, IL-23,
6 IL-17, IL-12, IL-10, TNF- α , IFN- γ and levels of the MCP-1 chemokine, were measured
7 by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antibody pairs purchased
8 from BD Pharmingen. The ELISA procedure was performed according to the
9 manufacturer's protocol and absorbances were measured with Versa Max Microplate
10 Reader (Molecular Devices). NO production was quantified by the accumulation of
11 nitrite in the supernatants from *in vitro* and *in vivo* protocols by a standard Griess
12 reaction. All determinations were performed in duplicate and expressed as μM NO.

13 **Measurement of Serum *P. brasiliensis*-Specific Isotypes.** Specific isotypes
14 levels (total IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3) were measured by a
15 previously described ELISA (18) employing a cell-free antigen prepared by using a
16 pool of different *P. brasiliensis* isolates (Pb339, Pb265 and Pb18). The average of the
17 optical densities obtained with sera from control mice (PBS inoculated) diluted 1:20,
18 was considered the cutoff for each respective isotype. Optical densities for each dilution
19 of experimental sera were compared to the control values. The titer for each sample was
20 expressed as the reciprocal of the highest dilution that presented an absorbance higher
21 than the cutoff.

22

1 **Assessment of leukocyte subpopulations in lung inflammatory exudates.** After 2
2 and 11 weeks of infection, lungs from each mouse digested enzymatically for 30
3 minutes with collagenase (1 mg/ml) and DNase (30 µg/ml) in culture medium (Sigma).
4 Lung cells suspensions were centrifuged in presence of 20% percoll (Sigma) to separate
5 leukocytes from cell debris. Total lung leukocyte numbers were assessed in the presence
6 of trypan blue using a hemocytometer; viability was >85%. For differential leukocyte
7 counts, samples of lung cell suspensions were cytopun (Shandon Cytospin) onto glass
8 slides and stained by the Diff-Quik blood stain (Baxter Scientific). A total of 200 to 400
9 cells were counted from each sample. For flow cytofluorometry, lung leukocytes were
10 resuspended at 10^6 cells/ml in staining buffer (PBS + 0.1% NaN_3 + and 1% fetal calf
11 serum). Fc receptors were blocked by unlabeled anti-CD16/32 antibodies (BD
12 Biosciences) and cells stained for 20 minutes at 4°C. Phycoerytrin- labeled (PE) anti-
13 CD40, CD86, CD11b, CD25, CD69 and fluorescein isothiocyanate-labeled (FITC) anti-
14 IA^k, CD80, CD4, CD8 monoclonal antibodies (BD Biosciences) were used. Treg cells
15 were characterized by intracellular staining for Foxp3, using the Treg staining kit of BD
16 Bioscience. Surface staining of CD25⁺ and intracellular FoxP3 expression were back-
17 gated on the CD4⁺ T cell population. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde
18 (Sigma) and stored in the dark at 4°C until analyzed in a flow cytometer. The acquisition
19 and analysis gates were restricted to the lymphocytes or macrophages. The cell surface
20 expression of leukocyte markers as well as intracellular expression of FoxP3 in lung
21 infiltrating leucocytes, were analyzed in a FACScalibur flow cytometer (BD
22 Pharmingen) using the FlowJo software (Tristar).

23 ***Limulus amoebocyte lysate activity assay.*** Solutions used to prepare yeast cell
24 suspensions and macrophages cultivation were tested for the presence of LPS using the

1 *Limulus* amoebocyte lysate chromogenic assay (E-TOXATE[®], Sigma) and always
2 showed LPS levels lower than 0.015 EU/mL (endotoxin units).

3 **Statistical analyses.** Data were analyzed by Student's *t* test or two-way analysis
4 of variance depending on the number of experimental groups. *P* values under 0.05 were
5 considered significant.

6

7

RESULTS

8

9

10 **TLR4-deficiency leads to less severe fungal infection of macrophages**
11 **associated with decreased synthesis of NO, IL-12 and MCP-1.** Before performing
12 fungicidal studies, we asked whether the initial interaction between *P. brasiliensis*
13 yeasts and peritoneal macrophages from C3H/HeJ and C3H/HePas mice was equivalent.
14 Macrophages cultures (1×10^6 /well), performed in round glass coverlips, were pre-
15 activated or not with IFN- γ (20 ng/ml) and infected with 4×10^4 viable yeasts (1: 25
16 fungus: macrophage ratio). After 4h incubation supernatants were aspirated, the
17 monolayers gently washed with PBS and the cells stained with Giemsa. An average of
18 1,000 macrophages was counted and the number of ingested and/or adherent yeasts was
19 determined. As shown in Fig. 1A, when compared with normal macrophages, TLR4-
20 deficient macrophages presented a lower number of associated (ingested/adhered)
21 yeasts.

22 Macrophages were cultivated with *P. brasiliensis* yeasts for an additional 48h
23 period. Supernatants were removed and assayed for the presence of nitric oxide and
24 cytokines and cell homogenates plated for CFU determinations. As can be seen in Fig.
25 1B, TLR4-signaling resulted in increased recovery of viable yeasts from untreated and
IFN- γ -primed macrophages. In addition, higher levels of NO were produced by IFN- γ -

1 activated macrophages from TLR4-normal mice than those of TLR4-defective mice
2 (Fig. 1C). *P. brasiliensis* infection of unprimed macrophages do not induce NO
3 production that was only detected in IFN- γ -treated macrophages.

4 We further asked if TLR4 expression or signaling was involved in the decreased
5 fungal loads observed with TLR4-defective macrophages. As C3H/HeJ mice have a
6 defect in the intracellular signaling domain but a normal extracellular moiety, we
7 comparatively assessed the behavior of macrophages genetically deficient for TLR4
8 expression. Thus, TLR4^{-/-} from C57BL/6 mice were infected and compared with their
9 TLR4^{+/+} counterparts. TLR4-deleted macrophages showed decreased phagocytic ability
10 (Fig. 1D) and decreased numbers of viable yeasts were recovered from killing assays
11 (Fig. 1E). Similarly with C3H/HeJ macrophages, TLR4^{-/-} cells produced diminished
12 levels of NO. This result suggested that TLR4 signaling appeared to influence the
13 endocytic and killing ability of *P. brasiliensis* infected macrophages.

14 To further characterize the role of TLR4 in *P. brasiliensis* infection of C3H
15 macrophages, culture supernatants obtained from killing assays were tested for the
16 presence of some macrophage activating cytokines (IL-12 and TNF- α), a deactivating
17 cytokine (IL-10) and for a chemokine involved in mononuclear cell chemotaxis, the
18 macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1). As depicted in Fig. 2, IFN- γ -treated and
19 untreated macrophages from TLR4-defective mice secreted decreased levels of IL-12
20 and MCP-1 than those of TLR4-normal mice. IL-10 and TNF- α , however, appeared in
21 similar levels.

22 ***In vivo*, absence of TLR4 signaling induces lower fungal loads and**
23 **diminished NO production.** To study the *in vivo* role of TLR4, groups ($n = 6$ to 8) of
24 C3H/HeJ and C3H/HePas mice were *i.t.* infected with one million *P. brasiliensis* yeast
25 cells and evaluated in the course of infection. Diminished fungal burdens were detected

1 in the lung tissue of mice lacking functional TLR4 at all postinfection periods (96h, 2
2 and 11 weeks) assayed, as can be seen in Fig. 3A. In both strains, no fungal growth was
3 observed in liver and spleen tissue (data not shown). Decreased NO levels were detected
4 96 h and at week 11 after infection, although by week 2 similar levels were observed
5 (Fig. 3B).

6 **Defective TLR4 signaling determines decreased inflammatory reactions**
7 **composed of lower numbers of activated macrophages and T cells.** We have further
8 analyzed the phenotype and activation of lung inflammatory cells at weeks 2 and 11 of
9 *P.brasiliensis* infection (Fig. 4). To determine the activation profile of pulmonary
10 macrophages, the expression of CD11b, MHC class II (IA^K), CD80, CD86 and CD40
11 antigens was assessed by flow cytometry. As can be seen in Fig. 4A, all activation
12 markers were expressed in lower levels by deficient macrophages, although significant
13 differences were noticed with CD11b, MHC class II antigen and CD86. To determine
14 the lymphocyte influx and the activation profile of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the lungs
15 of *P. brasiliensis* infected mice, we determined the expression of the CD69 and CD25
16 by T cells freshly isolated from the lungs. The marker CD69 is a very early activation
17 antigen (70) as well as CD25, the α -chain of the interleukin-2 receptor (56), which is
18 rapidly up-regulated on activated T cells. Compared with the control group, at week 2 of
19 infection TLR4-deficient mice presented a significantly reduced recruitment of CD4⁺
20 and CD8⁺ T cells to the lungs, and the latter subpopulation also showed a decreased
21 expression of CD69 (Fig. 4B). Studies at week 11 postinfection confirmed those of
22 week 2. TLR4-normal mice presented increased numbers of CD11b⁺, CD11c⁺ and
23 CD40⁺ macrophages (Fig. 4C) besides augmented numbers of CD4⁺, CD8⁺ and
24 CD8⁺CD69⁺ T lymphocytes in the inflammatory exudates of lungs (Fig. 4D).

1 **The limited inflammatory reaction of TLR4-deficient mice was associated**
2 **with increased numbers of Treg cells.** Because Treg cells control the expansion of
3 effector T cells, and the number and function of these cells were shown to be influenced
4 by TLR4 activation (34), we characterized the presence of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells
5 in the lung cell infiltrates of TLR4-defective and normal mice (Fig. 5). **At both**
6 **postinfection periods studied, TLR4-defective mice showed increased numbers of**
7 **CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells in their lungs (Fig.5).**

8 **TLR4 dysfunction leads to diminished production of proinflammatory and**
9 **Th17 cytokines.** Cytokines associated with Th1, Th2 and Th17 cells were assessed in
10 lung homogenates obtained at different periods of infection. The production of type 1
11 (IL-12, TNF- α , and IFN- γ), and type 2 (IL-4, IL-5 and IL-10) cytokines, as well as the
12 Th17-associated (IL-17, IL-6, TGF- β and IL-23) cytokines were studied 96h, 2 and 11
13 weeks after infection. Mice lacking the ability to signal through TLR4 showed an early
14 (96h) deficient production of IL-12, TNF- α , IL-17 and IL-6 (Fig. 6A). By week 2, IL-17
15 and IL-23 appeared in lower levels in the lungs of TLR4-defective mice (Fig. 6B). This
16 decreased production of cytokines was confirmed at week 11 when these mice presented
17 decreased amounts of IL-12, IL-17 and TGF- β (Fig. 6C). Interestingly, IL-17 and MCP-
18 1 were constantly produced in higher levels by TLR4-normal mice (Fig. 6).

19 **TLR4-defective mice produced lower levels of *P.brasiliensis* specific**
20 **antibodies.** Although in some fungal infections specific antibodies may have a
21 protective role (19) in human and experimental PCM antibody production is a marker of
22 disease severity (13, 17). As expression of TLRs were shown to influence B cell
23 activation (30, 41) we decided to characterize humoral immunity of TLR4-deficient and
24 normal mice at week 11 postinfection. The less severe infection of TLR4-deficient mice
25 was associated with decreased production of IgG1, IgG2b and IgM specific isotypes.

1 **Absence of TLR4 signaling does not increase mortality rates but results in**
2 **less severe inflammatory reactions in the lungs.** To verify the influence of TLR4
3 deficiency in the disease outcome, mortality of *P.brasiliensis* infected C3H/HeJ and
4 C3H/HePas mice was registered daily for a 250-days period, and the median survival
5 time was calculated for each strain. Surprisingly, despite the significant differences in
6 fungal burdens, no differences between mortality data ($p= 0.9$) were detected (Fig. 8A).
7 The mean survival times of C3H/HeJ and C3H/HePas mice were 221 and 203 days,
8 respectively. At day 250 (35 weeks postinfection), the remaining survivors were
9 sacrificed and the number of CFUs determined in organs. Compared with other
10 postinfection periods assayed, lower fungal burdens were detected in both mouse
11 strains, but TLR4-normal mice remained with higher pulmonary fungal loads than toll-
12 defective mice (Fig. 8B). To further characterize the severity of *P.brasiliensis* infection,
13 histopathological examination of lungs was done at week 11 of infection. As can be
14 seen in Fig. 8C and 8E, a similar pattern of inflammatory reactions was detected in the
15 lungs of both mouse strains, but more preserved lung tissue was seen in TLR4-defective
16 mice. The pulmonary tissue presented several confluent or isolated granulomas of
17 varying sizes containing yeast cells with preserved morphology (Fig. 8D, 8F). Large
18 aggregates of macrophages, rare epithelioid cells and a poor mantle of lymphocytes
19 composed the granulomas, which were usually placed in the interlobular septa. Plasma
20 cells, eosinophils and multinucleated cells were scarcely seen. The total area of lesions
21 was quantified in histological sections and shown in Fig 8G. At week 11, the areas of
22 lesions of TLR4-normal mice were significantly larger than that presented by TLR4-
23 deficient mice. Thus, the higher influx of inflammatory cells observed in the lungs of
24 TLR4-normal mice was concomitant with increased pathology of lung tissue.

25

DISCUSSION

1 The innate immune mechanisms of hosts infected with *P.brasiliensis* are poorly
2 defined, but macrophages and their pathogen recognition receptors are thought to play a
3 crucial role in the initial interaction of this fungus with the immune system (16, 26, 29,
4 49, 50). Despite several studies with diverse fungal pathogens (16, 43) the role played
5 by TLRs in paracoccidioidomycosis is still unclear. In a previous report we were able to
6 show the dual role played by TLR2 in the immunity to *P.brasiliensis* infection. TLR2
7 activation prevented uncontrolled inflammatory reactions in pulmonary
8 paracoccidioidomycosis associated with increased expansion of Th17 cells and
9 diminished function of Treg cells (38).

10 Initially we characterized the influence of TLR4 in the phagocytic and fungicidal
11 ability of macrophages. Both, absence of TLR4 expression by TLR4^{-/-} C57BL/6 mice as
12 well as defective TLR4 signaling (C3H/HeJ) resulted in deficient *P.brasiliensis*
13 ingestion/adherence, and lower fungal loads recovered 48 hs after co-cultivation. In
14 both deficient mouse strains, lower levels of nitric oxide (and cytokines with C3H/HeJ
15 cells) were detected, indicating that the lower CFU counts recovered were not due to
16 increased activation of phagocytes and enhanced fungal killing, but probably by the
17 decreased endocytosis of *P.brasiliensis* yeasts. TLRs usually do not act as phagocytic
18 receptors but their engagement by pathogen components results in strong activation of
19 inflammatory responses (8, 9). There are, however, several examples demonstrating that
20 cell signaling can influence endocytosis and vice-versa (20, 23). Indeed, TLR4 was
21 shown to actively participate in bacterial phagocytosis (4) and to be rapidly internalized
22 by human monocytes after in vitro interaction with *P.brasiliensis* yeasts or *A. fumigatus*
23 conidia (10, 21). In addition, a recent paper has clearly demonstrated that TLR4 and
24 TLR2 synergize with class-A scavenger receptor to mediate phagocytosis of Gram-
25 negative and Gram-positive bacteria, respectively (3). Thus, we can suppose that TLR

1 signaling facilitated the endocytosis of *P.brasiliensis* and further induced the activation
2 of proinflammatory pathways which, however, were not sufficient to control the early
3 increased fungal loads. As equivalent results were obtained with macrophages lacking
4 TLR4 expression, we believe that TLR4 signaling could have influenced the
5 phagocytosis mediated by another pathogen receptor. Although our experiments have
6 not discriminated the main PRR involved in the initial *P.brasiliensis* recognition,
7 (particularly due to the number and complexity of components that comprise fungal cell
8 walls), we have clearly demonstrated that TLR4 participate in the activation of innate
9 immune cells required to the initial interaction with *P.brasiliensis* yeasts. Our in vitro
10 findings were validated by in vivo experiments, which demonstrated that early in
11 infection TLR4-normal mice presented higher fungal loads than their TLR4-defective
12 counterparts and this was accompanied by increased activation of the immune system.
13 Additional experiments with PRR agonists and antagonists using TLR4 normal and
14 deficient cells are needed, however, to further clarify the role of TLRs in pulmonary
15 PCM.

16 Our in vivo data showed that mice expressing a defective TLR4 developed a less
17 severe infection associated with lower production of nitric oxide, cytokines and
18 migration of inflammatory cells to the site of infection. A decreased presence of
19 activated macrophages expressing CD11b, CD86, CD40 and MHC class II molecules
20 was concomitant with a reduced synthesis of MCP-1. In addition, the diminished
21 presence of CD4⁺ T cells and recently activated CD69⁺ CD8⁺ T cells in the lungs of
22 TLR4-defective mice demonstrates that TLR4 signaling is necessary to the proper
23 activation of adaptive immunity to *P.brasiliensis* and enhanced migration of
24 inflammatory cells into the lungs. Consistent with these observations, several reports
25 demonstrated that TLR4 signaling is needed to the activation and maturation of

1 dendritic cells, which acquire the competent phenotype to preferentially differentiate
2 naïve T cells to the Th1 or Th17 patterns (57, 64, 65). No differences in Th1 and Th2
3 cytokines, however, were detected in lung homogenates. The increased production of
4 IL-12 and TNF- α concomitant with unaltered synthesis of Th2 cytokines (IL-4, IL-5
5 and IL-10) indicated, however, that TLR4 signaling promoted a cytokine milieu biased
6 to a proinflammatory balance. This cytokine response could have protected C3H/HePas
7 mice from high fungal burdens due to the enhanced fungicidal mechanisms of activated
8 phagocytes. Indeed, in experimental an human PCM, cytokine-activated phagocytes
9 (mainly by IFN- γ , IL-12 and TNF- α) were shown to be the most important effector
10 cells against *P.brasiliensis* infection (36, 40, 46, 55). Our data on cytokines production
11 showed an additional fact not previously reported in PCM. The expression of TLR4
12 facilitated the expansion of IL-17-producing cells since the levels of IL-17 and other
13 Th17 associated cytokines (IL-6 and IL-23) appeared in higher levels in the lungs of
14 TLR4-competent mice. In our previous report, we could verify that absence of TLR2
15 signaling induced enhanced expansion of Th17 cells and both CD4⁺ and CD8⁺ T cells
16 displayed intracellular IL-17 (38). Further studies in the TLR4-deficient model will help
17 us to characterize the phenotype of cells involved in IL-17 production.

18 TLR4 ligation is important to activate Th1 or Th17 responses (65) while TLR4-
19 deficiency can lead to increased expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (47, 48).

20 Assessing the presence of Treg cells in the lungs of toll-deficient and control mice at
21 weeks 2 and 11 of infection, an increased number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells was
22 found in the lungs of TLR4-defective mice. This finding was associated with decreased
23 fungal loads and diminished influx of inflammatory cells to the site of infection. As
24 Treg cells were shown to control the inductive and effector phases of immunity against
25 pathogens (6) we can suppose that Treg cells could have negatively controlled the

1 expansion and migration of *P.brasiliensis*-specific T cells to the lungs. Thus, the
2 advantage of low fungal loads conferred by TLR4 deficiency appeared to be negatively
3 compensated by the deficient T cell immunity and increased numbers of Treg cells
4 which appear to hamper the total clearance of fungi cells from the lungs.

5 At week 11 of infection, decreased levels of IL-12 were detected, probably due
6 to the decreased migration of macrophages to the lungs. Interestingly, in C3H/HeJ mice
7 decreased levels of IL-17 were concomitant diminished levels of TGF- β indicating that
8 another cytokine or costimulatory signal have participated in the increased expansion of
9 Treg cells (27).

10 As expression of TLRs were shown to influence B cell activation (41), we
11 decided to analyze the levels of anti-*P.brasiliensis* isotypes in our model and observed
12 an impaired humoral immune response in TLR4-defective mice. At week 11 of
13 infection (Fig. 7) TLR4-deficient mice produced lower levels of IgG1, IgG2b and IgM
14 specific antibodies. This could be due to the diminished fungal loads or the decreased
15 production of cytokines observed in this mouse strain. Alternatively, as almost all TLRs
16 ligands were recently shown to induce expansion and differentiation of B cells (30), we
17 can suppose that TLR4 agonists present in *P.brasiliensis* yeasts could have exerted an
18 stimulatory effect on B cells of TLR4-normal mice, resulting in increased humoral
19 immunity. Independently of the mechanisms used, this is the first demonstration on the
20 stimulatory role of TLR4 in the humoral immunity of *P.brasiliensis* infected hosts.

21 TLR4 recognizes lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria and favor
22 Th1 immunity due to the increased ability of LPS-stimulated DCs to produce IL-12 and
23 TNF- α (51). In some fungal infections, however, cell wall polysaccharides have been
24 reported to function as TLRs agonists (42, 63). To our knowledge, no studies in
25 paracoccidioidomycosis have addressed the characterization of TLR agonists. Although

1 LPS or LPS-like components in *P.brasiliensis* were not characterized, a few
2 investigations have described the presence of polysaccharides, lipids and glycolipids in
3 *P.brasiliensis* cell walls (35, 61). The alkali-soluble fraction of *P.brasiliensis* cell walls
4 was shown to contain a high proportion of galactomannan (35) and is tempting to
5 suppose that this component could play a role in TLR4 activation.

6 Dectin and TLR4 signaling by microbial agonists have been reported to induce
7 prevalent expansion of Th17 cells (1, 22, 33, 37). In our model, mice that possessed
8 functional TLR4 were shown to have increased levels of IL-17 and other Th17
9 associated cytokines in their lungs. Although not investigated in the present work, IL-
10 17-mediated immunity was shown to exert deleterious or protective effects in infectious
11 processes (54, 58). Actually, Th17 immunity can protect hosts due to its
12 proinflammatory and chemotactic effect to PMN cells. Conversely, the enhanced
13 oxidative metabolism and increased synthesis of metalloproteinases can result in tissue
14 pathology and detrimental effect to the hosts (11, 68, 69). In our previous work on the
15 role of TLR2 in pulmonary PCM we could demonstrate the dual role of Th17 immunity.
16 The increased presence of inflammatory neutrophils conferred immunoprotection by
17 reducing fungal loads but also resulted in tissue pathology equivalent to that induced by
18 higher fungal burdens (38).

19 Mortality studies, unexpectedly, demonstrated that TLR4 signaling does not
20 influence disease outcome since TLR4-competent and deficient mice presented
21 equivalent survival times. In the course of the disease, both mouse strains were able to
22 control fungal growth and to develop granulomatous reactions. However, the higher
23 fungal loads, the enhanced T cell immunity and the lower expansion of Treg cells
24 resulted in more extensive inflammatory lesions which exerted a deleterious effect to
25 the lungs of TLR4-normal mice. On the other hand, the inefficient T cell immunity of

1 TLR4-deficient mice, tightly controlled by Treg cells, was not sufficient to totally clear
2 the diminished fungal loads of TLR4-defective mice abolishing the initial advantage
3 conferred by their defective phagocytic ability. In sum, our findings indicate that high
4 fungal loads accompanied by enhanced inflammatory responses mediated by
5 uncontrolled T cell immunity are equivalent to low fungal loads poorly controlled by
6 deficient T cell response. Both mechanisms of immunity result in the chronic evolution
7 of infection and equivalent mortality rates.

8

9

ACKNOWLEDGEMENTS

10 This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
11 São Paulo (Fapesp) e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq). We are grateful to
12 Tania A. Costa and Paulo Albee for their invaluable technical assistance.

13

14

REFERENCES

- 15 1. **Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A., Koenders, M.I., Devesa, I., Roelofs,**
16 **M.F., Radstake, T.R., Heuvelmans-Jacobs, M., Akira, S., Nicklin, M.J.,**
17 **Ribeiro-Dias, F., and W.B. van den Berg.** 2008. Stimulation of TLR2 and
18 TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J.*
19 *Clin. Invest.* **118**:205-216.
- 20 2. **Akira, A.** 2006. TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* **311**:1-16.
- 21 3. **Amiel, E., Alonso, A., Uematsu, S., Akira, S., Poynter, M.E., and B. Berwin.**
22 2009. Toll-like receptor regulation of scavenger receptor-A-mediated
23 phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **85**:595-605.

- 1 4. **Anand, R.J., Kohler, J.W., Cavallo, J.A., Li, J., Dubowski, T., and D.J.**
2 **Hackam.** 2007. Toll-like receptor 4 plays a role in macrophage phagocytosis
3 during peritoneal sepsis. *J. Pediatr. Surg.* **42**:927-932.
- 4 5. **Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula,**
5 **S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M., and L. Romani.** 2004. The
6 contribution of the Toll-Like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive
7 immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J. Immunol.* **172**:3059-3069.
- 8 6. **Belkaid, Y., and B. T. Rouse.** Natural regulatory T cells in infectious disease.
9 2005. *Nat. Immunol.* **6**: 353-360.
- 10 7. **Biondo, C., Midiri, A., Messina, L., Tomasello, F., Garuffi, G., Catania,**
11 **M.R., Bombaci, M., Beninati, C., Teti, G., and G. Mancuso.** 2005. MyD88
12 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus*
13 *neoformans*. *Eur. J. Immunol.* **35**:870-878.
- 14 8. **Blander, J.M.** Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence.
15 2007. *Cell. Microbiol.* **92**:290-9.
- 16 9. **Blander, J.M., and R. Medzhitov.** 2004. Regulation of phagosome maturation
17 by signals from toll-like receptors. *Science* **304**:1014-1018.
- 18 10. **Bonfim, C.V., Mamoni, R.L., Souza, M.H., and L. Blotta.** 2009. TLR-2,
19 TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated
20 by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **17**:1-12.
- 21 11. **Bozza, S., Zelante, T., Moretti, S., Bonifazi, P., De Luca, A., D'Angelo, C.,**
22 **Giovannini, G., Garlanda, C., Boon, L., Bistoni, F., Puccetti, P., Mantovani,**
23 **A., and L. Romani.** 2008. Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses
24 in fungal infection. *J. Immunol.* **180**:4022-4031.

- 1 12. **Brummer, E.** 1994. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host
2 defense cells. In Paracoccidioidomycosis. Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A.,
3 Del Negro, G. editors. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 4 13. **Calich, V.L.G., and M.H.S.L. Blotta.** 2005. Pulmonary
5 Paracoccidioidomycosis, p. 201-208. In: Fungal Immunology: From an Organ
6 Perspective. P.L. Fidel, and G. B. Huffnagle (ed.), Springer Press, New York,
7 NY.
- 8 14. **Calich, V.L.G., Kipnis, T.L., Mariano, M., Neto, C.F., and W.D. Silva.** 1979.
9 The activation of complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* “in
10 vitro”: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of
11 infection. Clin. Immunol. Immunopathol. **12**:20-30.
- 12 15. **Calich, V.L., da Costa, T.A., Felonato, M., Arruda, C., Bernardino, S.,**
13 **Loures, F.V., Ribeiro, L.R, de Cássia Valente-Ferreira, R., Pina, A.** 2008.
14 Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathol.
15 **165**:223-36.
- 16 16. **Calich, V.L.G, Pina, A., Felonato, M., Bernardino, S., Costa, T.A., and F.V.**
17 **Loures.** 2008. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4
18 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **53**:1-
19 7.
- 20 17. **Camargo, Z.P., and L.E. Cano.** 1994. Humoral Immunity, p. 187-197. In: M.
21 Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, and G. Del Negro (ed.),
22 Paracoccidioidomycosis, 1th ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 23 18. **Cano, L.E., Singer-Vermes, L.M., Vaz, C.A.C., Russo, M., and V.L.G.**
24 **Calich.** 1995. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible
25 mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell

- 1 activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect.*
2 *Immun.* **63**:1777-1783.
- 3 **19. Casadevall, A., Feldmesser, M., and L.A. Pirofski.** 2002. Induced humoral
4 immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr. Opin.*
5 *Microbiol.* **5**:386-391.
- 6 20. **Cavalli, V., Corti, M., and J. Gruenberg.** 2001. Endocytosis and signaling
7 cascades: a close encounter. *FEBS Lett.* **498**:190-196.
- 8 21. **Chai, L.Y., Kullberg, B.J., Vonk, A.G., Warris, A., Cambi, A., Latgé, J.P.,**
9 **Joosten, L.A., van der Meer, J.W., and M.G. Netea.** 2009. Modulation of
10 Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*.
11 *Infect. Immun.* **77**:2184-2192.
- 12 22. **Dennehy, K.M., Willment, J.A., Williams, D.L., and G.D. Brown.** 2009.
13 Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1
14 and TLR signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* **39**:1379-1386.
- 15 23. **Di Fiore, P.P., and P. De Camilli.** 2001. Endocytosis and signaling. an
16 inseparable partnership. *Cell* **106**:1-4
- 17 24. **Dubourdeau, M., Athman, R., Balloy, V., Huerre, M., Chignard, M.,**
18 **Philpott, D.J., Latgé, J.P., and O. Ibrahim-Granet.** 2006. *Aspergillus*
19 *fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through
20 the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* **177**:3994-
21 4001.
- 22 25. **Fedele, G., Nasso, M., Spensieri, F., Palazzo, R., Frasca, L., Watanabe, M.,**
23 **and C.M. Ausiello.** 2008. Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and
24 *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions

- 1 resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses. *J. Immunol.*
2 **181**:208-216.
- 3 26. **Ferreira, K.S., Bastos, K.R., Russo, M., and S.R. Almeida.** 2007. Interaction
4 between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces
5 interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible
6 mechanisms of susceptibility. *J. Infect. Dis.* **196**:1108-1115.
- 7 27. **Feuerer, M., Hill, J.A., Mathis, D., and C. Benoist.** 2009. Foxp3+ regulatory
8 T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat. Immunol.* **10**:689-
9 695.
- 10 28. **Franco, M.** 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J.*
11 *Med. Vet. Mycol.* **25**:5-18.
- 12 29. **González, A., Yáñez, A., Gozalbo, D., and M.L. Gil.** 2008. MyD88 is
13 dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of
14 blood-borne disseminated infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **54**:365-
15 374.
- 16 30. **Garurajan, M., Jacob, J., and B. Pulendran.** 2007. Toll-like receptor
17 expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell
18 subsets. *PloS ONE*, **2(9)**: e863.
- 19 31. **Higgins, S.C., Jarnicki, A.G., Lavelle, E.C., and K.H. Mills.** 2006. TLR4
20 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*:
21 role of IL-17-producing T cells. *J. Immunol.* **177**:7980-7989.
- 22 32. **Jiménez, M.P., Restrepo, A., Radzioch, D., Cano, L.E., and L.F. Garcia.**
23 2006. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of
24 *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by *Nramp1* congenic macrophages lines.
25 *Immunol. Med. Microbiol.* **47**:56-66.

- 1 33. **Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.A., Sacchetti, P.,**
2 **Lefebvre, P., Akira, S., and D. Poulain.** 2003. *Candida albicans*
3 phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J. Infect. Dis.* **188**:165-
4 172.
- 5 34. **Jordan, J.M., Woods, M.E., Olano, J., and D.H. Walker.** 2008. Absence of
6 TLR4 signaling in C3H/HeJ mice predisposes to overwhelming rickettsial
7 infection and decreased protective Th1 responses. *Infect. Immun.* **76**:3717-24.
- 8 35. **Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Moreno, R.E., and J. Rodriguez.** 1969. Cell
9 wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides*
10 *brasiliensis*. *J. Bacteriol.* **97**:1036-1041.
- 11 36. **Kashino, S.S., Fazioli, R.A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L.H., Vaz,**
12 **C.A., Burger, E., Singer, L.M., and V.L.G. Calich.** 2000. Resistance to
13 *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune
14 response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma
15 production. *J. Interferon. Cytokine Res.* **20**:89-97.
- 16 37. **Leibundgut-Landmann, S., Osorio, F., Brown, G.D., and C. Reis e Sousa.**
17 2008. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming
18 of cytotoxic T-cell responses. *Blood* **112**:4971-4980.
- 19 38. **Loures, F.V., Pina, A., Felonato, M., and V.L.G. Calich.** 2009. TLR2 is a
20 negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of
21 fungal infection. *J. Immunol.* **183**:1279-1290.
- 22 39. **Meier, A., Kirschning, C.J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J., and**
23 **F. Ebel.** 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for
24 *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* **5**:561-
25 570.

- 1 40. **Mamoni, R.L., and M.H. Blotta.** 2006. Flow-cytometric analysis of cytokine
2 production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. **35**:207-16.
- 3 41. **Manicassamy, S. and B. Pulendran.** 2009. Modulation of adaptive immunity
4 with Toll-like receptors. *Semin. Immunol.*, **21**: 185-193.
- 5 42. **Monari, C., Pericolini, E., Bistoni, G., Casadevall, A., Kozel, T.R., and A.**
6 **Vecchiarelli.** 2005. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan
7 induces expression of fas ligand in macrophages. *J Immunol.* **174**:3461-3468.
- 8 43. **Netea, M. G., Ferwerda, G., van der Graaf, C.A., van der Meer, J. W.,**
9 **and B. J. Kullberg.** 2006. Recognition of fungal pathogens by toll-like
10 receptors. *Curr. Pharm. Des.* **12**:4195-4201.
- 11 44. **Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G.,**
12 **Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., Jacobs, L., Buurman,**
13 **E.T., Gijzen, K., Williams, D.L., Torensma, R., McKinnon, A., MacCallum,**
14 **D.M., Odds, F.C., Van der Meer, J.W., Brown, A.J., and B.J. Kullberg.**
15 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of
16 mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* **116**:1642-
17 1650.
- 18 45. **Netea, M. G., Van Der Graaf, C.A., Vonk, A.G., Verschueren, I., Van Der**
19 **Meer, J.W., and B.J. Kullberg.** 2002. The role of toll-like receptor (TLR) 2
20 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.*
21 **185**:1483-1489.
- 22 46. **Oliveira, S.J., Mamoni, R.L., Musatti, C.C., Papaiordanou, P.M., and M.H.**
23 **Blotta.** 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult
24 forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected
25 controls. *Microbes Infect.* **4**:139-144.

- 1 47. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2003. Toll pathway-dependent blockade of
2 CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**:1033-
3 1036.
- 4 48. **Pasare, C., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-dependent control mechanisms of
5 CD4 T cell activation. *Immunity*. **21**:733-741.
- 6 49. **Pina, A., Bernardino, S., and V.L.G. Calich.** 2008. Alveolar macrophages
7 from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control
8 initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J. Leukoc. Biol.* **83**:1088-1099.
- 9 50. **Popi, A.F., Lopes, J.D., and M. Mariano.** 2002. Gp43 from *Paracoccidioides*
10 *brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the
11 fungus. *Cell Immunol.* **218**:87-94.
- 12 51. **Qi, H., Denning, T.L., and L. Soong.** 2003. Differential induction of
13 interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like
14 receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect. Immun.*
15 **71**:3337-3342.
- 16 52. **Reis e Sousa, C.** 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into
17 adaptative immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **16**:21-25.
- 18 53. **Romani, L.** 2004. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:1-23.
- 19 54. **Romani, L., Zelante, T., De Luca, A., Fallarino, F., and P. Puccetti.** 2008.
20 IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi. *J.*
21 *Immunol.* **180**:5157-5162.
- 22 55. **Romano, C.C., Mendes-Giannini, M.J., Duarte, A.J., and G. Benard.** 2002.
23 IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific
24 cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine*
25 **18**:149-157.

- 1 56. **Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and M. Toda.** 1995.
2 Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2
3 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-
4 tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**:1151-1164.
- 5 57. **Shen, H., Tesar, B.M., Walker, W.E., and D.R. Goldstein.** 2008. Dual
6 signaling of MyD88 and TRIF is critical for maximal TLR4-induced dendritic
7 cell maturation. *J. Immunol.* **181**:1849-1858.
- 8 58. **Sieve, A.N., Meeks, K.D., Bodhankar, S., Lee, S., Kolls, J.K., Simecka, J.W.,**
9 **and R.E Berg.** 2009. A novel IL-17-dependent mechanism of cross protection:
10 respiratory infection with mycoplasma protects against a secondary listeria
11 infection. *Eur. J. Immunol.* **39**:426-438.
- 12 59. **Singer-Vermes, L.M., Ciavaglia, M.C., Kashino, S.S., Burguer, E., and**
13 **V.L.G. Calich.** 1992. The source of the growth-promoting factor (s) affects the
14 plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**:261-
15 264.
- 16 60. **Spörri, R., and C. Reis e Sousa.** 2005. Inflammatory mediators are insufficient
17 for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell
18 populations lacking helper function. *Nat. Immunol.* **6**:163–170.
- 19 61. **Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T.,**
20 **Matsumoto, T., Ohno, N., Tamura, H., Shibata, K., Akashi, S., Miyake, K.,**
21 **Sugawara, S., and H. Takada.** 2002. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida*
22 *albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by
23 human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner.
24 *Microbiol. Immunol.* **46**:503-512.

- 1 62. **Takeda, K., Kaisho, T., and S. Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev.*
2 *Immunol.* **21**:335-376.
- 3 63. **Toledo, M.S., Suzuki, E., Straus, A.H., and H.K. Takahashi.** 1995.
4 Glycolipids from *Paracoccidioides brasiliensis*. Isolation of a galactofuranose-
5 containing glycolipid reactive with sera of patients with
6 paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**:247-51.
- 7 64. **Weighardt, H., Jusek, G., Mages, J., Lang, R., Hoebe, K., Beutler, B., and**
8 **B. Holzmann.** 2004. Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation
9 program of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **34**:58-564.
- 10 65. **Wynn, T.A.** 2005. T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nat. Immunol.*
11 **6**:1069-1070.
- 12 66. **Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, N.H., and M. Zhang.**
13 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular
14 signaling. *Nature* **395**:284-288.
- 15 67. **Yauch, L.E., Mansour, M. K., Shoham, S., Rottman, J.B., and S.M. Levitz.**
16 2004. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host
17 response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans in vivo*. *Infect.*
18 *Immun.* **72**:5373-5382.
- 19 68. **Zelante, T., De Luca, A., Bonifazi, P., Montagnoli, C., Bozza, S., Moretti, S.,**
20 **Belladonna, M.L., Vacca, C., Conte, C., Mosci, P., Bistoni, F., Puccetti, P.,**
21 **Kastelein, R.A., Kopf, M., and L. Romani.** 2007. IL-23 and the Th17 pathway
22 promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur. J.*
23 *Immunol.* **37**: 2695-2706.
- 24 69. **Zelante, T., De Luca, A., D'Angelo, C., Moretti, S., and L. Romani.** 2009.
25 IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur. J. Immunol.* **39**:645-648.

- 1 70. **Ziegler, S.F., Levin, S.D., Johnson, L., Copeland, N.G., Gilbert, D.J.,**
2 **Jenkins, N.A., Baker, E., Sutherland, G.R., Feldhaus, A.L., and F.**
3 **Ramsdell.** 1994. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to
4 the NK gene complex. *J. Immunol.* **152**:1228-1236.

LEGENDS TO FIGURES

1

2 **Fig. 1. TLR4-deficiency leads to less severe fungal infection of macrophages**
3 **associated with decreased synthesis of NO.** The phagocytic and fungicidal ability of
4 macrophages with defective TLR4-signaling (C3H/HeJ) or TLR4 expression (C57BL/6
5 TLR4^{-/-}) were compared with their TLR4-normal controls (C3H/HePas and C57BL/6
6 TLR4^{+/+}, respectively) (A) For phagocytic assays, IFN- γ -primed (20ng/ml, overnight)
7 and unprimed macrophage cultures were infected with *P. brasiliensis* yeasts in a
8 macrophage:yeast ratio of 25:1. The cells were co-cultivated for 4h at 37° C in 5% CO₂
9 to allow fungi adhesion and ingestion. Cells were washed, fixed and stained with
10 Giemsa; an average of 1,000 macrophages was analyzed, and the number of
11 macrophages with adhered or ingested yeasts was determined. (B) For fungicidal
12 assays, IFN- γ -primed and unprimed macrophages were infected with yeast cells as
13 above described. After 48 h at 37° C in 5% CO₂, plates were centrifuged and
14 supernatants used to determine levels of nitrite and cytokines. The monolayers were
15 washed with distilled water to lyse macrophages, and 100 μ l of cell homogenates were
16 assayed for the presence of viable yeasts by a CFU assay. (C) Supernatants from
17 fungicidal assays were used to determine the levels of nitrites using the Griess reagent.
18 Data are the mean \pm SEM of quintuplicate samples from one experiment representative
19 of 3 independent determinations. **P* < 0.05.

20

21 **Fig. 2.** Macrophages from TLR4-defective mice secrete diminished levels of IL-12 and
22 MCP-1. IFN- γ treated (20.00 ng/ml) or untreated macrophages of TLR4-competent
23 (C3H/HePas) and defective (C3H/HeJ) mice were challenged with viable *P. brasiliensis*
24 yeasts (1:25, fungus:macrophage ratio) during 4h, washed, and further cultivated for

1 48h at 37°C in 5% CO₂. Plates were then centrifuged and supernatants used for
2 cytokine measurements using ELISA. Data are the means ± SEM of triplicate samples
3 from one experiment representative of 3 independent determinations. **P* < 0.05 .

4
5 **Fig. 3.** *In vivo*, TLR4 dysfunction leads to less severe fungal infection. Depicted is the
6 recovery of CFU from the lungs TLR4-defective and TLR4-normal control mice
7 infected i.t. with 1 x 10⁶ yeasts. Lung homogenates were used to determine the levels of
8 nitrites using the Griess reagent. The bars represent means ± SEM of log₁₀ CFU
9 obtained from groups of six to eight mice at 96h, 2 and 11 weeks after infection. The
10 results are representative of three independent experiments. **P* < 0.05.

11
12 **Fig. 4.** Increased numbers of activated macrophages, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes
13 were detected in the lungs of TLR4-competent mice at weeks 2 and 11 of infection.
14 Characterization of leukocyte subsets by flow cytometry in the lung infiltrating
15 leucocytes (LIL) from TLR4-defective and TLR4-normal mice inoculated i.t. with 1
16 million *P. brasiliensis* yeast cells. Lungs of C3H/HePas and C3H/HeJ mice (n=6–8)
17 were excised, washed in PBS, minced, and digested enzymatically. At weeks 2 and 11
18 after infection lung cell suspensions were obtained and stained as described in Materials
19 and Methods. The acquisition and analysis gates were restricted to lymphocytes or
20 macrophages. The data represent the mean ± SEM of the results from 6-8 mice per
21 group and are representative of two independent experiments. **P* < 0.05.

22
23 **Fig. 5.** TLR4-defective mice presented increased **numbers** of Treg cells in the
24 **lungs**. FoxP3 expression by lung lymphocytes from TLR4-defective (C3H/HeJ) and
25 normal (C3H/HePas) mice inoculated i.t. with 1 million *P. brasiliensis* yeast cells was

1 determined by flow cytometric analysis. Lungs of mice (n=6–8) were excised, washed
2 in PBS, minced, and digested enzymatically; 2 and 11 weeks after infection cell
3 suspensions were obtained and stained as described in Materials and Methods. The cell
4 surface expression of leukocyte markers as well as intracellular FoxP3⁺ expression in
5 lung infiltrating leucocytes were analyzed by flow cytometry . Surface staining of
6 CD25⁺ and intracellular FoxP3 expression were back-gated on the CD4⁺ T cell
7 population. The data represent the **number** of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells for individual
8 mice (n=5-6) and are representative of two independent experiments.

9
10 **Fig. 6.** Lung homogenates of TLR4-competent mice presented increased levels of
11 proinflammatory cytokines. At 96h, 2 and 11 weeks after i.t. infection with 10⁶ yeast
12 cells of *P. brasiliensis*, lungs from TLR4-defective and TLR4-competent mice were
13 collected and disrupted in 5.0 ml of PBS and supernatants were analyzed for cytokines
14 content by capture ELISA. The bars depict means ± SEM of cytokine levels (6–8
15 animals per group). The results are representative of three independent experiments.**P*
16 < 0.05.

17
18 **Fig. 7.** TLR4 deficiency determines impaired humoral immunity. Levels of
19 *P.brasiliensis*-specific antibodies in the sera of TLR4-defective (C3H/HeJ) and normal
20 mice (C3H/HePas) at week 11 after i.t. infection with 1 x 10⁶ yeast cells. Sera were
21 assayed for total IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 by using an isotype-
22 specific ELISA as detailed in methods. The bars depict means (log₂) ± SE of serum
23 titers (6 to 8 mice per group). * (*P*<0.05) compared with controls.

24
25

1 **Fig. 8.** Compared with TLR4-normal mice, TLR4-defective mice present increased
2 fungal loads and lung pathology but equivalent survival times. (A) Survival times of
3 TLR4-defective and control mice after i.t. infection with 1×10^6 *P. brasiliensis* yeast
4 cells was determined in a period of 250 days. No significant differences were seen in the
5 median survival times of both mouse strains; the results are representative of two
6 independent experiments. (B) By 250 days after infection survivor (n=3-6) mice were
7 sacrificed and tissue CFU determined. No viable yeasts were recovered from livers and
8 spleens. (C-F) Photomicrographs of pulmonary lesions of TLR4-competent C3H/HePas
9 mice (C, D) and TLR4-defective C3H/HeJ mice (E, F) mice at week 11 of infection
10 with 1 million *P. brasiliensis* yeasts. At this period, the morphology of lesions was
11 equivalent in both mouse strains; fungal cells were surrounded by confluent or isolated
12 granulomas scattered through the lung tissue. H&E (C, E) and Grocott (E, F,) stained
13 lesions (100X). (G) Total area of lesions in the lungs of mice (n=10) at week 11 after
14 infection. * $P < 0.05$.

Fig 1

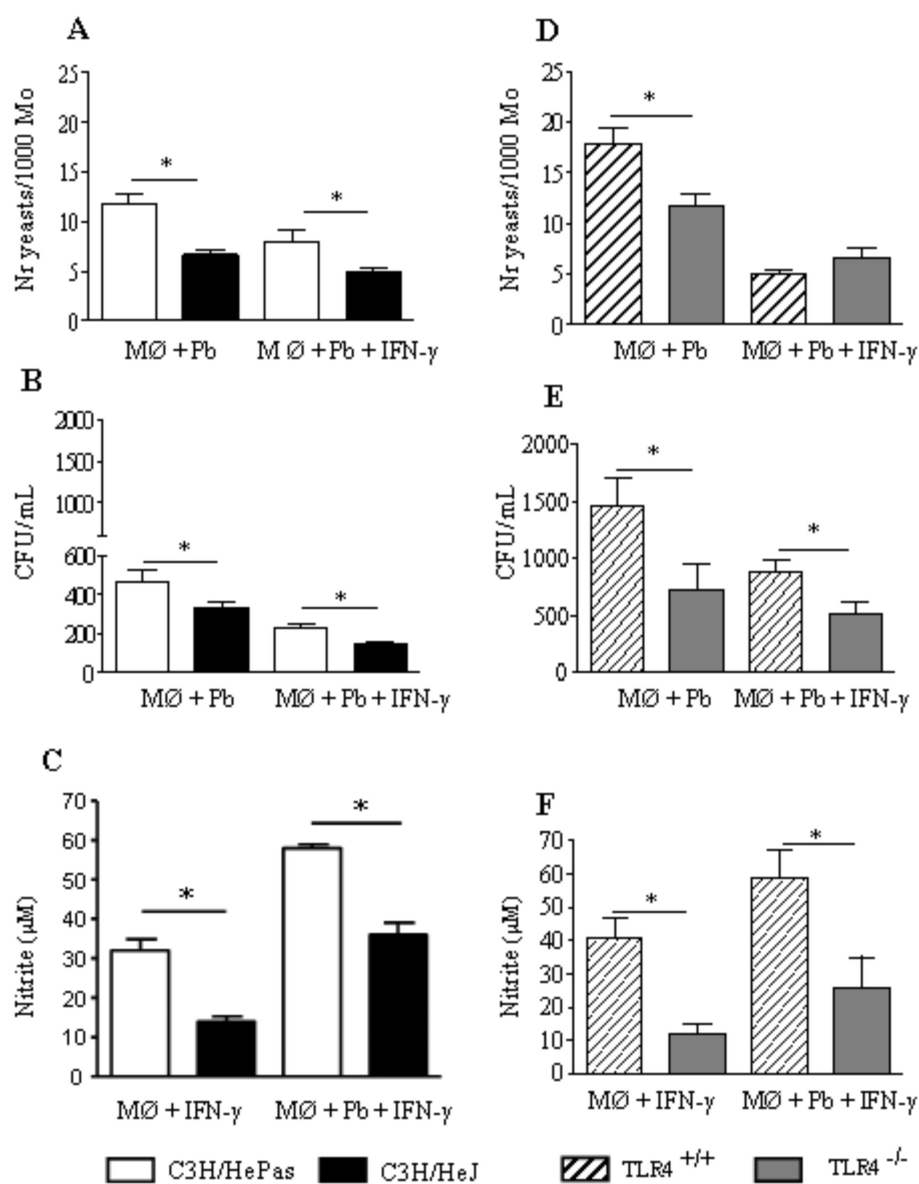


Fig 2

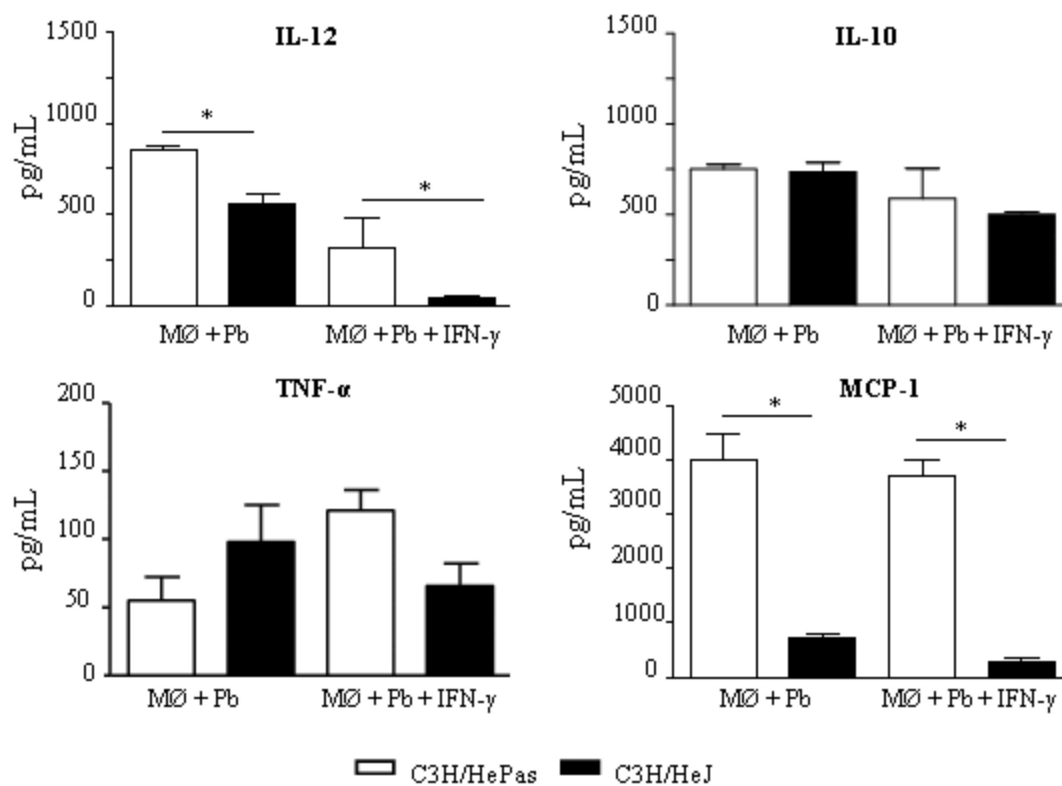
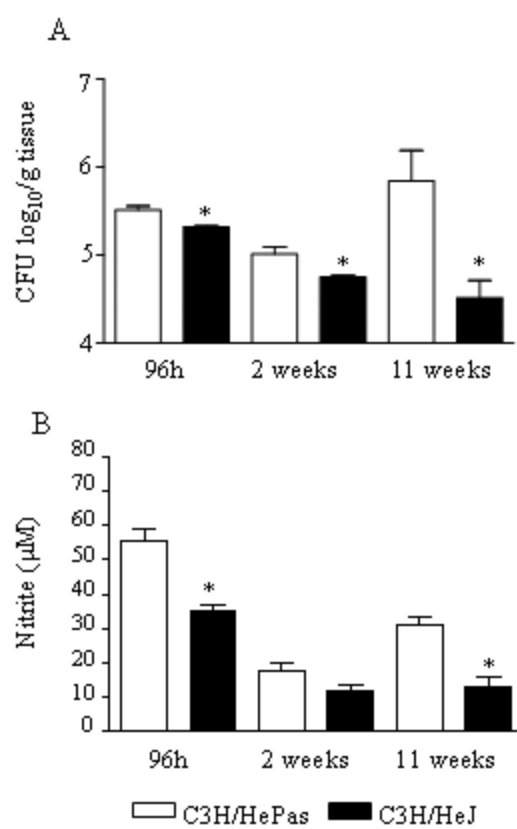


Fig 3



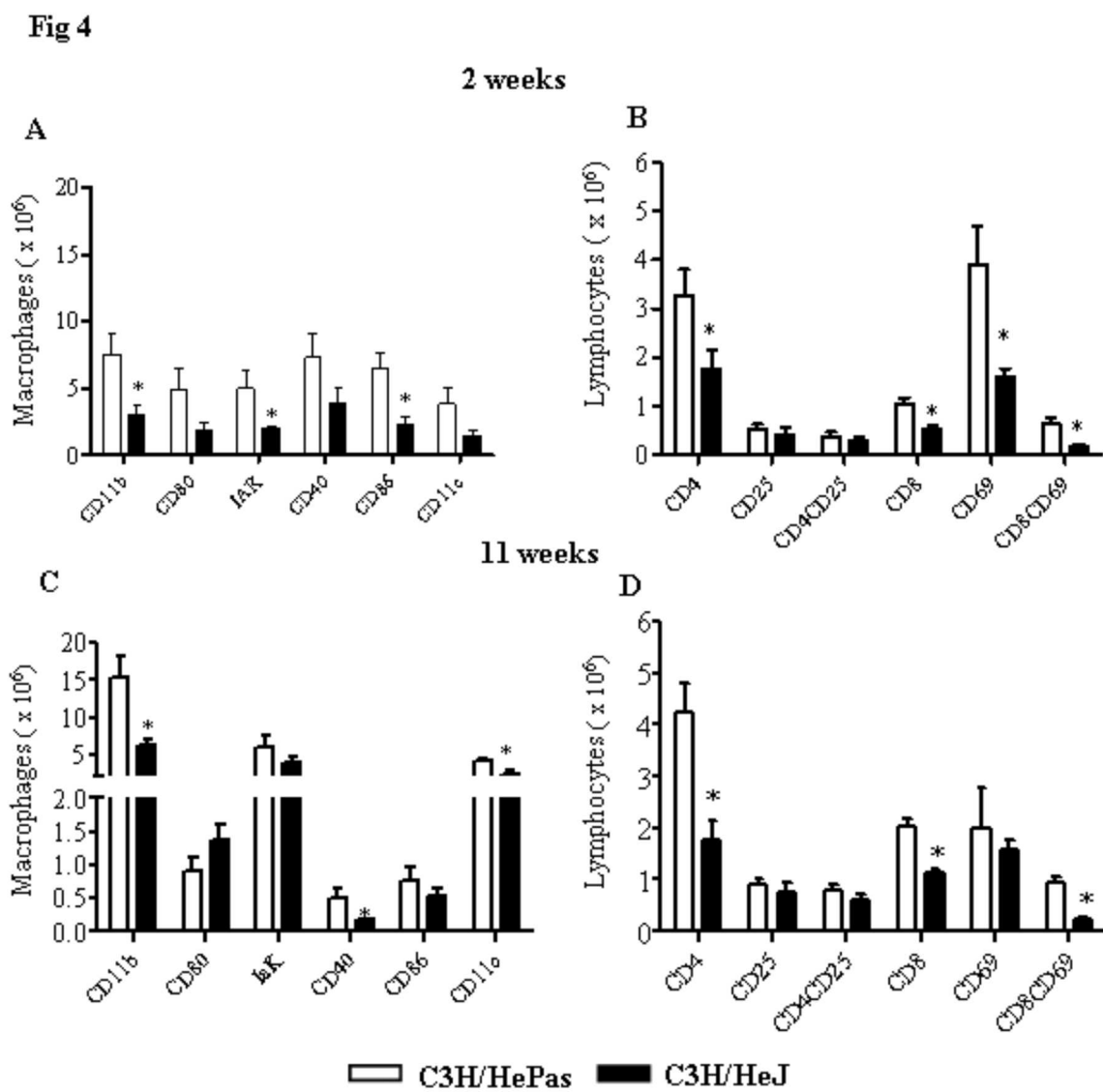


Fig 5

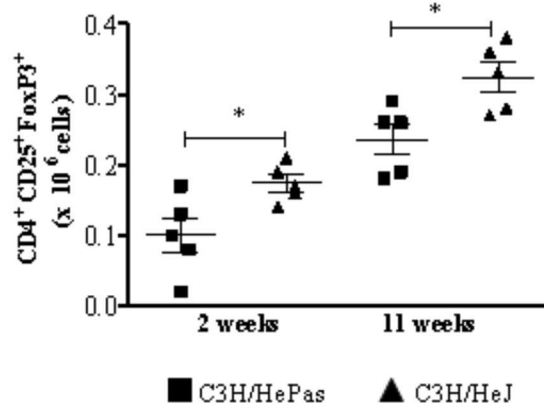


Fig 6

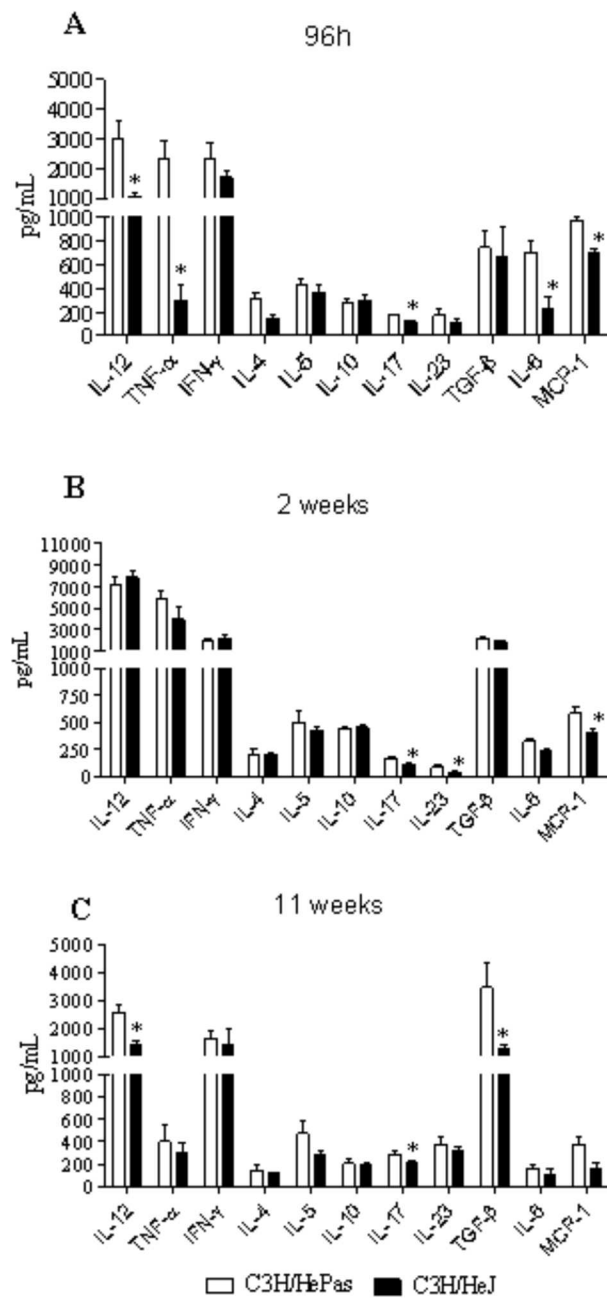


Fig 7

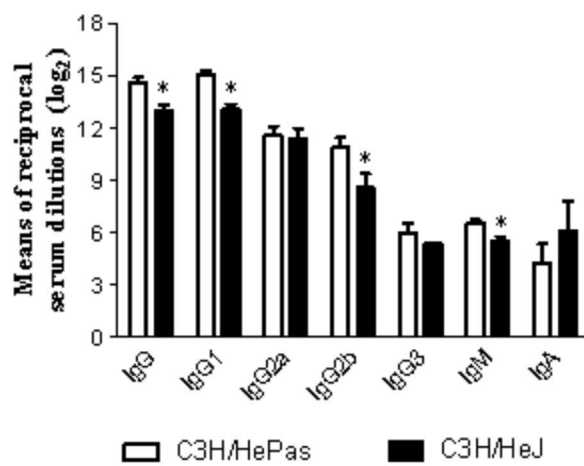


Fig 8

