



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

Facultad de Medicina

**LOS RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA
NOD1 Y NOD2 PARTICIPAN EN LA ACTIVACIÓN
DE LA RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA
Y LA AUTOFAGIA EN MACRÓFAGOS
ALVEOLARES HUMANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M. en C. Esmeralda Juárez Carvajal

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Eduardo Sada Díaz

COMITÉ TUTOR
Dr. Rogelio Hernández Pando
Dr. Eduardo García Zepeda



MÉXICO, D.F.

JUNIO 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) bajo la dirección del Dr. Eduardo Sada Díaz. La autora agradece la beca recibida del CONACYT (becario #84282) y el financiamiento del INER al proyecto.

*A Horacio, Emilio y Santiago,
Mi fuerza, mi razón y mi felicidad.*

Mi más profundo agradecimiento a quienes hicieron posible la realización de este trabajo:

Gracias a Dios.

Gracias Dr. Eduardo Sada por enseñarme tanto mientras dirigía esta tesis.

Gracias Dr. Rogelio Hernández y Dr. Eduardo García por contribuir a mi formación.

Gracias Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Rosana Pelayo Camacho, Dr. José Ángel Gutiérrez y Dr. Raúl Mancilla porque con su experiencia aportaron mucho a este trabajo.

Gracias Claudia Carranza, Fernando Hernández, Ricardo Poblano, Edmundo Olivares, Elva Loyola, Juan Carlos León y Dante Escobedo por obsequiarme del fruto de sus manos, el regalo de su tiempo y su valiosa experiencia.

Gracias Carmen Sarabia, Martha Torres, Rosita López, Tere Herrera, Karen Bobadilla, Yolanda González, Silvia Guzmán y Luz Balderas por suplir necesidades básicas: un café antes de las 7:00 am, una revisión enriquecedora, una palabra de aliento, una crítica constructiva, un trámite y tantas cosas más.

Gracias a todos los que me dieron algo más que sus células, mis voluntarios, sin ellos no habría trabajo.

Gracias Yanet, mi hermana, y Francisco, mi padre, porque siempre estuvieron allí para cualquier cosa que necesitara.

Gracias INER, Facultad de Medicina, UNAM y CONACYT por la oportunidad.

Contenido

	Pág.
Lista de tablas	i
Lista de figuras	i
Lista de abreviaturas	ii
Resumen	iv
Abstract	v
Antecedentes	1
1.- Introducción	1
2.- Inmunidad innata	2
3.- Inmunidad pulmonar	5
4.- Los receptores NOD1 y NOD2	8
5.- Respuesta inmune innata hacia <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Planteamiento del estudio	14
Hipótesis	18
Objetivos	18
Métodos	19
1.- Células	19
2.- Estímulos	20
3.- Expresión génica	22
4.- Detección de proteínas	25
5.-Determinación de inhibición del crecimiento intracelular de	27
<i>M. tuberculosis</i>	
6.- Análisis estadísticos	28
Resultados	29
Discusión	49
Conclusiones	54
Perspectivas	55
Referencias	59
Anexos	65
1.- Juárez y cols. Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. <i>Rev Inst Nal Enf Resp</i> , 2009; 22(4):366-378.	
2.- Juárez y cols. Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD) 2 receptor enhances the innate response of alveolar macrophages to <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in humans. <i>Eur J Immunol</i> . En prensa DOI:10.1002/eji201142105.	

ANTECEDENTES

1.-Introducción

El sistema respiratorio representa un portal de entrada para una gran variedad de partículas, microorganismos y otros componentes ambientales al organismo. Una exposición constante a diferentes microorganismos hace necesario que el sistema de defensa innata pulmonar sea eficiente para evitar que se produzcan diferentes enfermedades infecciosas. La respuesta inmune innata participa en el reconocimiento inicial de la infección por patógenos, en la inducción de mecanismos bactericidas y en el desarrollo posterior de la respuesta inmune adquirida para la completa erradicación de diversos microorganismos [1, 2]. La activación de la respuesta innata a un nivel que inicie la respuesta inmune contra patógenos pero que no resulte perjudicial para el individuo es deseable, tiene potencial terapéutico y actualmente es materia de gran interés [1, 3, 4]. Sin embargo, existe poca información sobre los procesos que ocurren en el sistema respiratorio, especialmente en el pulmón humano.

Los receptores tipo toll (TLR por sus siglas en inglés) se han identificado como importantes en la respuesta pulmonar contra patógenos [5-8]. Recientemente, los miembros de una familia de receptores citoplasmáticos, llamados receptores tipo NOD, han demostrado ser esenciales en la respuesta inmune capaz de eliminar eficientemente a patógenos respiratorios [9, 10]. La deficiencia de NOD1 y NOD2 se ha asociado a una falla en la eliminación de patógenos como *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium tuberculosis* pero los mecanismos aún no están descritos [11, 12]. La mayor parte de la información disponible sobre la descripción de los perfiles de reconocimiento de patógenos en macrófagos alveolares se ha generado en modelos animales, pero en células alveolares humanas están pobremente descritos.

El reconocimiento inicial del patógeno es la clave para el desarrollo de la respuesta innata y su amplificación. En la respuesta inmune pulmonar, los macrófagos alveolares son los responsables de realizar el reconocimiento inicial del patógeno pero también realizan otras funciones necesarias para la resolución de la infección. Los macrófagos expresan receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés); entre estos receptores se encuentran los TLR, NOD, receptores depuradores, lectinas tipo C y otros genéricamente conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en inglés) [13]. En este trabajo investigamos la presencia y función de NOD1 y NOD2 en la respuesta inmune del macrófago alveolar humano. A continuación describiré brevemente los elementos que nos motivaron a estudiar estos receptores.

2.-Inmunidad Innata

La respuesta inmune innata se caracteriza por ser inmediata. El reconocimiento de microorganismos se realiza a través de receptores especializados (PRR) que tienen alta afinidad por estructuras químicas como lípidos, carbohidratos, péptidos y ácidos nucleicos presentes en los microorganismos (PAMP); los PAMP son estructuras típicamente invariables que se encuentran en casi todos los microorganismos [14].

Los PRR se encuentran distribuidos con perfiles particulares en cada tipo de célula, pero su función es la misma independientemente de su localización celular, además, un solo receptor genera una respuesta celular mediante su interacción con varios ligandos que son estructuralmente distintos. El nivel de especificidad de los PRR es tan fino que dos PRR distintos pueden reconocer distintas porciones de una misma molécula y no entrecruzan sus respuestas [15]. Una vez activados estos PRR disparan eventos de señalización intracelular que llevan a la producción de mediadores de la inflamación [16]. Las dos familias

de PRR más estudiados son los TLR y los tipo NOD [17, 18]. Existen otros PRR cuya participación en la respuesta a la infección cada vez se conoce mejor, entre ellos las helicasas tipo RIG, lectinas tipo C, receptores purinérgicos, depuradores y otros [13, 19, 20]. El propósito general del reconocimiento de patógenos es el inicio de los mecanismos de la respuesta antimicrobiana e inflamatoria y el reclutamiento de más células del sistema inmune a las zonas de infección.

Se ha propuesto que cada órgano desencadena su respuesta innata de manera particular en función de tres factores [21]. Primero, la carga bacteriana presente determina el umbral de activación de los receptores de la inmunidad innata en cada órgano. Segundo, los perfiles de expresión de los receptores de la inmunidad innata son distintos en cada órgano. Tercero, los receptores de la inmunidad innata, originalmente descritos en las células fagocíticas, también se expresan en otras células permitiéndoles participar en la regulación del microambiente.

El presente estudio está centrado en la respuesta del macrófago alveolar humano, el cual es responsable de fagocitar y eliminar a los microorganismos que llegan al espacio alveolar [22]. El macrófago detecta la infección a través del reconocimiento de los PAMP. Este reconocimiento se realiza por medio de los diferentes PRR que pueden ser solubles, transmembranales o citoplásmicos para favorecer el reconocimiento de patógenos a todos los niveles. Después del reconocimiento inicial, el macrófago alveolar activa sus mecanismos de amplificación de la respuesta inmune y antimicrobianos [23, 24]. Algunos ejemplos de los PRR de importancia en la defensa contra patógenos respiratorios, así como los PAMP que pueden ser reconocidos se incluyen en la tabla 1.

Tabla 1. Receptores de reconocimiento de patrones de importancia contra patógenos respiratorios.

Receptor	Ligando	Patógeno reconocido
TLR1	Lipoproteínas aciladas	<i>A. fumigatus</i>
TLR2	LTA, Zimosán, glicoproteínas y glicolípidos	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
TLR3	RNA de doble cadena	Virus de influenza y virus sincicial respiratorio
TLR4	LPS y lipoproteínas	<i>P. aeruginosa</i>
TLR5	Flagelina	<i>L. pneumophila</i>
TLR6	Lipopéptidos diacilados	<i>M. tuberculosis</i>
TLR7/8	RNA de cadena sencilla	Virus de influenza
TLR9	DNA de doble cadena no metilado	<i>M. tuberculosis</i>
NOD1	Ácido diaminopimélico	<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>
NOD2	Muramildipéptido	<i>M. tuberculosis</i>
IPAF	Flagelina	<i>L. pneumophila</i>
RIG-I/ MDA-5	RNA de doble cadena	Virus de influenza, Virus sincicial respiratorio, Coronavirus
MR	Manosa, fucosa, N-acetil-glucosamina	<i>M. tuberculosis</i>
DC-SIGN	Glicoproteínas, ManLAM	<i>M. tuberculosis</i>
Dectin-1	Beta-glucanos, zimosán	<i>M. tuberculosis</i> <i>A. fumigatus</i> <i>P. jiroveci</i>

Extensamente revisados en la referencia del Anexo 1.

3.-Inmunidad pulmonar

El aparato respiratorio, con una superficie de 150 m² y un volumen de 350 litros de aire respirados por hora, representa un gran reto para la respuesta inmune porque mientras cumple su función primordial de intercambio de gases, interactúa simultáneamente con una variedad de microorganismos o sus componentes que entran con la inhalación; en estas circunstancias, la fisiología y anatomía del aparato respiratorio dan forma a la magnitud y umbral de activación de la respuesta innata responsable del reconocimiento de los microorganismos que logran acceso al espacio alveolar, así como de desencadenar los mecanismos efectores que eliminan a los agentes infecciosos [25].

La estructura del aparato respiratorio es en sí misma una barrera protectora porque bloquea la entrada de partículas grandes al espacio alveolar. Los pulmones se pueden dividir en dos compartimentos funcionalmente distintos, los conductos aéreos recubiertos de la mucosa (células epiteliales bronquiales ciliadas, células caliciformes, IgA, células dendríticas, macrófagos y linfocitos intraepiteliales) y el parénquima (alvéolos, donde se realiza el intercambio de gases, que cuenta con células epiteliales alveolares o neumocitos, macrófagos alveolares (>90% de las células que se localizan en el alvéolo), células dendríticas y linfocitos) [26]. En el pulmón, el resultado de la infección depende críticamente de la colonización e invasión de los macrófagos durante la infección primaria de microorganismos inhalados. Los macrófagos alveolares son los responsables de fagocitar y eliminar a los agentes infecciosos mientras producen mediadores solubles como quimiocinas y citocinas que activan a otros leucocitos y magnifican la respuesta inmune [27, 28].

El epitelio respiratorio además de ser una barrera física entre el interior del organismo y el ambiente externo, regula diversas funciones como el control y balance del flujo de aire hacia el pulmón, la activación de mecanismos

inflamatorios, el metabolismo y eliminación de agentes inhalados y la regulación de la función del músculo liso de las vías respiratorias. Lo anterior se logra porque las células epiteliales producen factores de crecimiento, péptidos de constricción, quimiocinas, citocinas, gases y mediadores lipídicos y a través de esta modulación del microambiente también contribuye a la reparación del daño del tejido [29]. La mucosa respiratoria está expuesta a una variedad de componentes ambientales no patógenos que son inhalados, y la respuesta inmune hacia los mismos consiste en una respuesta no inflamatoria o de tolerancia, generalmente llevada a cabo por las células epiteliales alveolares tipo II, quienes tienen la capacidad de incorporar antígeno pero no pueden activar células T debido a que carecen de moléculas coestimuladoras [30, 31].

El sistema inmune pulmonar también reconoce el material potencialmente patogénico. Una vez que un microorganismo ha logrado el acceso al alveolo, las células epiteliales y los macrófagos alveolares son los encargados de responder a los invasores. En el pulmón de sujetos sanos, las células predominantes son los macrófagos alveolares. Éstos son responsables de la primera respuesta a los microorganismos por medio de la fagocitosis, quimiotaxis y mecanismos bactericidas [32].

Dentro del macrófago alveolar, los patógenos enfrentan una serie de elementos antimicrobianos, como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y enzimas que pueden eliminar al microbio [24, 33]. El macrófago activado orchestra la respuesta inflamatoria subsecuente produciendo IL-8, $TNF\alpha$, e IL- 1β que estimulan a las células epiteliales a producir más citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, como las beta-defensinas, que amplifican la respuesta innata y contribuyen al reclutamiento de otras células, incluyendo eosinófilos, monocitos y neutrófilos que amplifican la respuesta inflamatoria local y aportan mecanismos antimicrobianos adicionales para terminar con la infección [34, 35]. Una vez cumplida la respuesta antimicrobiana, el macrófago alveolar realiza la

función reguladora del proceso inflamatorio [36] y la remoción de los restos celulares (Fig.1).

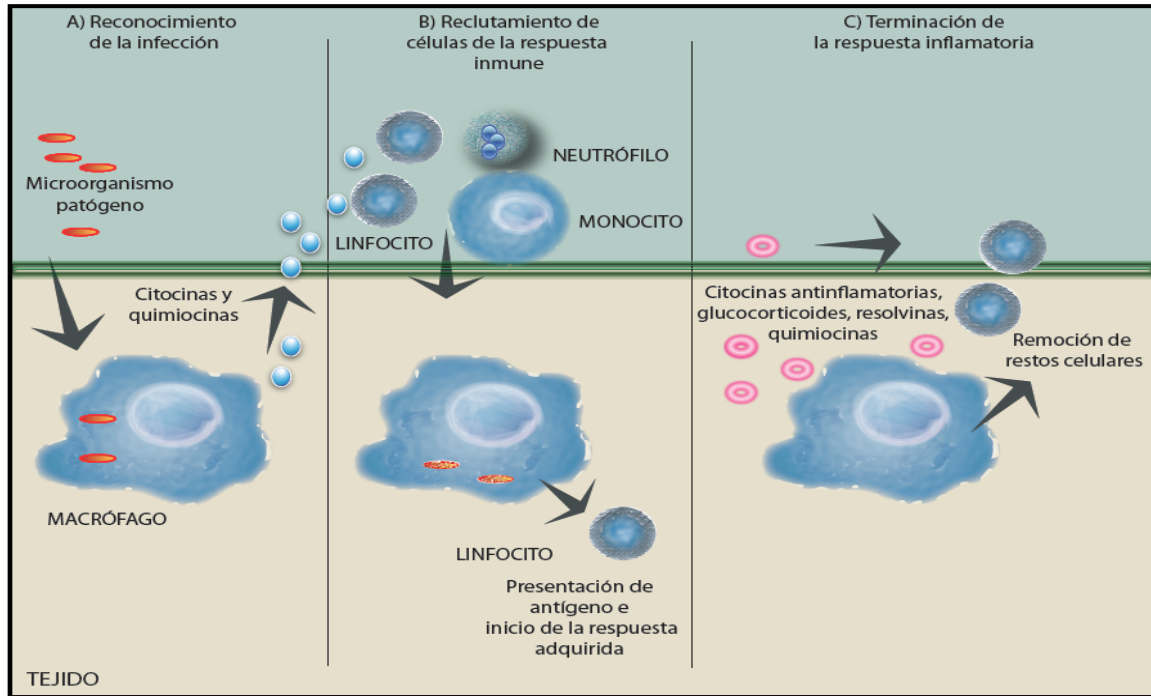


Figura 1. El papel del macrófago en los tejidos. A) Reconoce patógenos, los fagocita e inicia la respuesta inflamatoria temprana que atraerá más células al sitio de la infección. B) Elimina a los microorganismos fagocitados, procesa y presenta antígeno a los linfocitos para iniciar la respuesta adquirida. C) Resuelve el proceso inflamatorio y elimina los restos celulares generados durante el proceso inflamatorio.

4.-Los receptores NOD1 y NOD2

El papel que los TLR juegan en el reconocimiento de patrones en la respuesta inmune pulmonar han sido ampliamente estudiados. En los macrófagos residentes, los TLR ejercen diversas funciones que van del reconocimiento del microorganismo a la inducción de respuestas como inflamación, reclutamiento de otras células del sistema inmune, inicio de la respuesta adaptativa, comunicación entre otros componentes del tejido y activación de mecanismos bactericidas [37, 38]. Por otro lado, la función de los receptores tipo NOD (NLR por sus siglas en inglés) está pobremente caracterizada. En este estudio nos enfocaremos especialmente en NOD1 y NOD2 porque son los NLR que mayor participación parecen tener en la inmunidad contra patógenos respiratorios.

Los miembros de la familia de receptores NLR son de localización citoplasmática y se caracterizan por tener en su estructura un dominio de oligomerización (dominio NOD), un dominio de señalización CARD y un dominio de reconocimiento para PAMP. El receptor de reconocimiento de patrones NOD1 (nucleotide oligomerizing domain 1) reconoce la presencia citosólica del ácido meso-diaminopimélico (Tri-DAP) contenido principalmente en la peptidoglicana de las bacterias gram-negativas. Después del reconocimiento, NOD1 recluta la cinasa de serina-treonina Rip2 (Receptor-interacting protein 2) iniciando una cascada de señales que culminan con la traslocación al núcleo del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) [39]. La estimulación de NOD1 genera la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (IL-6, IL-8, CXCL1, MIP-2, CCL2 and CCL5) así como la producción de péptidos antimicrobianos (β -defensinas) en células epiteliales humanas [40, 41].

El receptor NOD2 reconoce el componente de la peptidoglicana muramildipéptido (MDP), comparte la vía de señalización de NOD1 y desencadena mecanismos bactericidas en situaciones de invasión por

patógenos en células epiteliales [42]. Su presencia se ha descrito en células epiteliales, monocitos humanos y macrófagos murinos [17, 43]. La administración de MDP a cobayos vía aerosol activa a los macrófagos alveolares para una respuesta más eficiente y rápida con producción de óxido nítrico a un segundo estímulo *in vitro* [44], lo que sugiere un papel para NOD2 en la respuesta pulmonar.

La observación de que los ratones deficientes en Rip2 manifiestan una reducción en su expresión de iNOS, un retraso en el reclutamiento de neutrófilos al pulmón y una marcada incapacidad de eliminar la infección por el patógeno intracelular gram-negativo *Chlamydia pneumoniae* con una alza en la mortalidad sugiere que NOD1 y NOD2 (Fig. 2) juegan un papel importante en la resolución de infecciones del tracto respiratorio [9]. Investigaciones sobre el papel de NOD1 en la respuesta contra varios patógenos respiratorios muestran que los ratones deficientes en NOD1 son incapaces de reclutar neutrófilos al pulmón y de eliminar la infección por *L. pneumophila* [11]. En otro estudio realizado con ratones se reveló que *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* son eliminados del tracto respiratorio superior en una forma dependiente de NOD1 y que esta respuesta es acompañada de reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección [45]. Aunque es evidente la relevancia de estos hallazgos, es necesario conocer más sobre el papel que NOD1 y NOD2 tienen en la respuesta del macrófago alveolar.

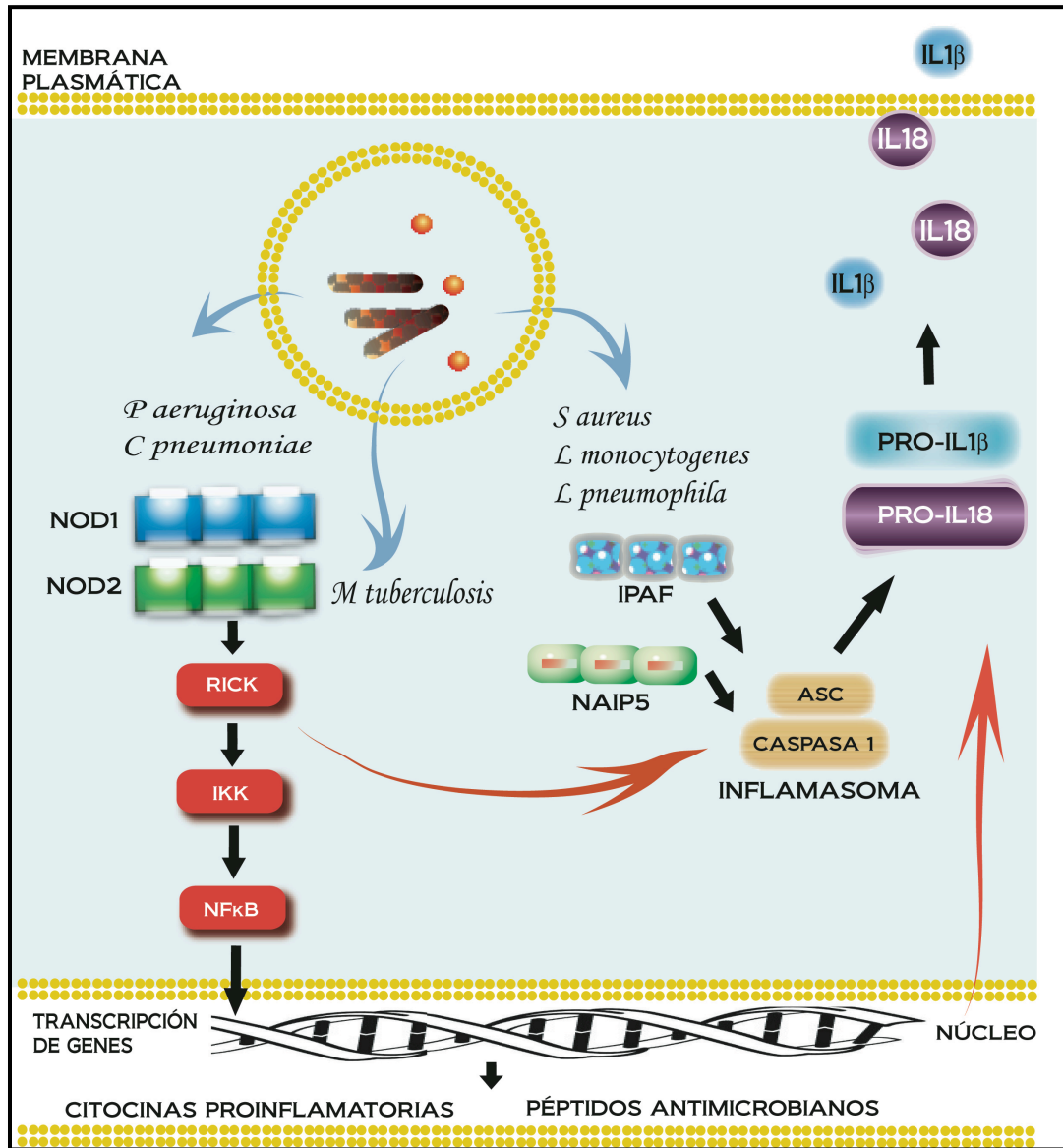


Figura 2. Los receptores tipo NOD participan en la respuesta contra patógenos respiratorios. Algunos miembros de la familia de receptores tipo NOD como NOD1, NOD2, IPAF y NAIP5 reconocen la presencia de patógenos que logran acceso al citosol. Parte de la respuesta que se genera incluye la producción de citocinas proinflamatorias, péptidos antimicrobianos y la activación del inflamasoma. Extensamente revisado en el artículo del anexo 1.

5.- Respuesta inmune innata hacia *Mycobacterium tuberculosis*

Uno de los patógenos más exitosos es *M. tuberculosis*, quien aún en esta era de antibióticos y vacunas sigue siendo un problema de salud pública mundial [46]. La infección por *M. tuberculosis* depende de la invasión y colonización de macrófagos alveolares durante la infección primaria de bacterias inhaladas. De todos los individuos infectados con *M. tuberculosis* sólo el 10% desarrollará tuberculosis pulmonar activa. Investigaciones recientes muestran que la respuesta inmune innata es indispensable para evitar el establecimiento y progreso de la enfermedad [47], esto sugiere que los mecanismos inmunitarios iniciados temprano en el macrófago son fundamentales como mecanismos de eliminación de este patógeno.

La internalización de la micobacteria y el reconocimiento de sus componentes por receptores PRR son necesarios para el inicio de la respuesta inmune. *Mycobacterium tuberculosis* es internalizada por macrófagos alveolares y células dendríticas intraepiteliales por medio de interacciones con los receptores de fagocitosis, como el receptor de Fc de la IgG o el receptor de manosa (MR) [48, 49]. También las células epiteliales pueden ser infectadas [50]. Diversos componentes de *M. tuberculosis* son reconocidos por receptores de la inmunidad innata induciendo la respuesta inflamatoria inicial (Tabla 1) entre los que se encuentran TLR2, TLR4 y TLR9, los cuales juegan un papel primordial en la inducción de la respuesta innata hacia *M. tuberculosis* y contribuyen a la resistencia a la infección por este patógeno [5, 51, 52].

Como resultado del reconocimiento inicial de la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos alveolares y las células epiteliales pulmonares, producen mediadores solubles de la inflamación y péptidos antimicrobianos [35, 61, 62]. Los mediadores solubles activan a las células epiteliales adyacentes y contribuyen al reclutamiento de neutrófilos al pulmón. Las células epiteliales alveolares tipo II producen colectinas, como las proteínas surfactantes A y D, las

cuales regulan la expresión y señalización de TLR2 y TLR4 en macrófagos, median la adherencia de la micobacteria e incrementan la fagocitosis de *M. tuberculosis* por macrófagos alveolares adyacentes debido a que inducen un aumento en la expresión del receptor de manosa y participan en la fusión fagosoma-lisosoma [64-67]. Los neutrófilos también reaccionan ante la infección utilizando moléculas efectoras antimicrobianas que ayudan a restringir el crecimiento de *M. tuberculosis* y activan al macrófago alveolar [58-60]. Las células respondedoras a la infección y los mediadores solubles que se liberan al el espacio alveolar forman una compleja red de interacciones que dan forma a la respuesta innata temprana y participan en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Las investigaciones en el campo de la inmunidad innata y sus efectores se han intensificado en modelos con células humanas debido a las implicaciones de estos receptores en la inducción de mecanismos bactericidas que podrían ser relevantes en el control de la tuberculosis [53-57].

La cepa virulenta de *M. tuberculosis* puede sobrevivir dentro de los macrófagos y se adapta al ambiente intracelular donde puede establecer su nicho gracias a que posee mecanismos de evasión de la respuesta inmune que interfieren con los mecanismos bactericidas del macrófago. Estos mecanismos incluyen la inhibición de diversos aspectos de la respuesta del macrófago como la fusión del fagosoma con el lisosoma [68], la producción de óxido nítrico, citocinas y quimiocinas dependientes de TLR4 [69], la activación del NF- κ B, la expresión de la proteína de clase II del MHC y la presentación antigénica por mecanismos dependientes de TLR2 [70, 71]. Además la micobacteria puede impedir la apoptosis y favorecer la necrosis para asegurar su diseminación [72]. En este contexto, el proceso de muerte del macrófago infectado también forma parte de la respuesta innata, pues una muerte por apoptosis limita la diseminación de la infección [73]. Sobreponerse a los distintos mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata es necesario para prevenir o limitar el desarrollo de la

tuberculosis, por lo que la modulación de esta respuesta es un blanco terapéutico potencial.

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Los macrófagos alveolares humanos inician la respuesta innata después de reconocer a los patógenos a través de los receptores TLR2, TLR4, TLR9 y NOD2; a pesar de la información generada en investigaciones recientes son necesarios más estudios para determinar si NOD1 es parte del repertorio de receptores de reconocimiento de patrones en estas células. Existe una homología de funciones entre NOD1 y NOD2; ambos reconocen fragmentos de peptidoglicana [74-76], señalizan a través del adaptador Rip2 [77], inducen la producción de RANTES y otras quimiocinas [78], inducen la expresión de beta-defensinas humanas [79, 80] así como la producción de citocinas proinflamatorias [81].

Aunque algunos reportes indican que NOD1 y NOD2 tienen funciones homólogas, existe evidencia de respuestas diferenciales en el sistema respiratorio. Ratones deficientes en NOD1 son incapaces de producir citocinas proinflamatorias, reclutar neutrófilos al pulmón y eliminar la infección por *L. pneumophila*, mientras que en los ratones deficientes en NOD2 la misma infección induce un incremento en el infiltrado de neutrófilos y producción de citocinas proinflamatorias; por lo tanto, los componentes de la pared celular de este patógeno son preferentemente reconocidos por NOD1, lo que sugiere que ambos receptores pueden tener funciones diferentes en la inmunidad innata pulmonar [11]. En otro estudio la administración intranasal del ligando de NOD2 en ratones induce la liberación de citocinas que revierten la tolerancia respiratoria, mientras que el ligando de NOD1 no lo hace [82]. Por lo que planteamos estudiar si ambos participan en la respuesta innata del macrófago alveolar humano de manera similar.

En este proyecto investigamos la presencia de NOD1 y NOD2 en macrófagos alveolares humanos primarios, su participación en el inicio de la respuesta inflamatoria y en la inducción de mecanismos bactericidas. Este estudio del

funcionamiento de estos receptores en células de sujetos sanos es indispensable ya que sin este conocimiento no es posible hacer propuestas acerca de situaciones patológicas.

Los mecanismos bactericidas inducidos por receptores de la inmunidad innata en macrófagos alveolares humanos se han estudiado poco. TLR4 induce en distintos tipos celulares, incluido el macrófago alveolar, la producción de LL-37, cuyo efecto bactericida se ha descrito por adición directa de la catelicidina a cultivos de *M. tuberculosis*. Recientemente se reportó el papel fundamental en monocitos humanos de la GTPasa IRGM en el control del crecimiento intracelular de *M. bovis*, otro miembro del complejo tuberculosis [83], esta enzima participa en el proceso de autofagia y ya había sido descrita como inducible por TLR4 en macrófagos murinos. Hasta ahora no se han descrito mecanismos bactericidas del macrófago humano inducidos por otros receptores de la inmunidad innata tales como NOD1 y NOD2.

Debido a que la activación de NOD2 por su ligando tiene potencial terapéutico como inmunomodulador, en este estudio se investigó la participación de la administración de MDP en la inducción de mecanismos bactericidas del macrófago alveolar humano en la infección por *M. tuberculosis*. Recientemente se ha sugerido que los receptores NOD intervienen en la infección por *M. tuberculosis* [84-86], se ha reportado que señalizan para activación nuclear dependiente del NF- κ B en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* y que son esenciales en la protección contra *M. avium* subsp *paratuberculosis*. Aunque NOD2 participa en la respuesta innata a la infección por *M. tuberculosis* [12, 87], en este trabajo no evaluamos su intervención en el reconocimiento de *M. tuberculosis*, sino en la modulación de la respuesta innata del macrófago alveolar infectado.

No existe información que relacione a NOD1 con la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares humanos. La información más reciente indica que los macrófagos alveolares humanos poseen a NOD2 funcional y que participa en la respuesta a la infección por *M. tuberculosis* [88], aunque los mecanismos responsables de esta respuesta se desconocen (Fig.3). La activación de mecanismos bactericidas en el macrófago humano dependientes de los receptores NOD1 y NOD2 permitiría la eliminación temprana de cualquier patógeno que se haya instalado en el espacio alveolar con profundas implicaciones en el diseño de terapias que permitan la resolución de procesos infecciosos en general y específicamente para el control y la erradicación de *M. tuberculosis*. En este estudio investigamos algunos mecanismos de la respuesta innata que pudieran ser responsables de la actividad antimicrobiana inducida por NOD2 en macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis*, y LL-37 e IRGM fueron nuestro primer blanco.

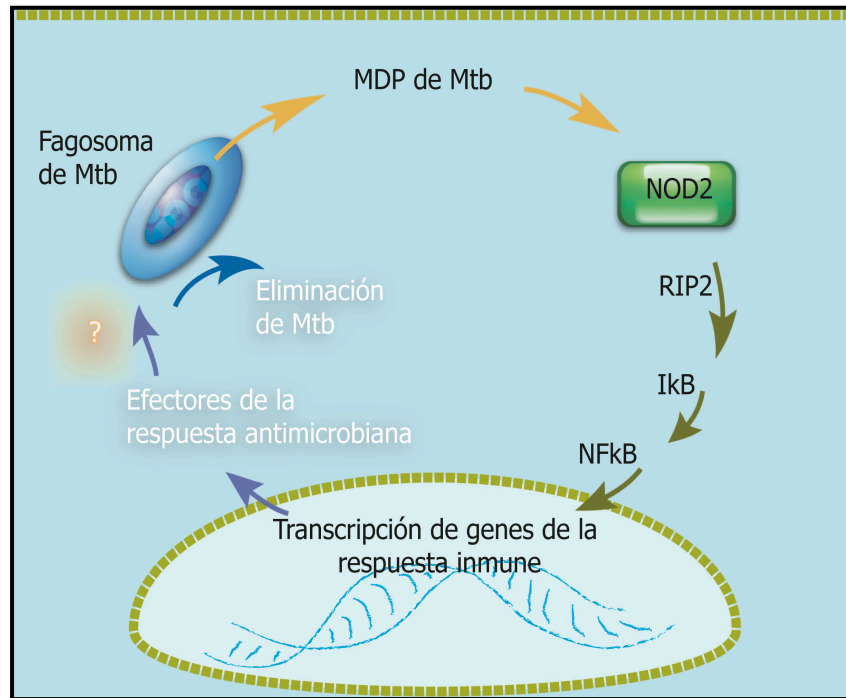


Figura 3. NOD2 participa en la eliminación de la infección por *M. tuberculosis*. Después de que el MDP de *M. tuberculosis* (Mtb) es reconocido por NOD2 se activa la transcripción de genes de la respuesta inmune que ayudan a la eliminación del patógeno. Los mecanismos precisos que participan en el control de la infección por *M. tuberculosis* se desconocen.

HIPÓTESIS

Los receptores de la inmunidad innata NOD1 y NOD2 inducen mecanismos bactericidas en macrófagos alveolares humanos.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar la inducción de efectores de la respuesta bactericida del macrófago alveolar humano vía activación de los receptores NOD1 y NOD2 y su participación en la modulación de la respuesta a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos Particulares:

- 1.- Determinar la expresión de NOD1 y NOD2.
- 2.- Evaluar la participación de NOD1 y NOD2 en la producción de citocinas proinflamatorias.
- 3.- Evaluar el efecto de la estimulación de NOD1 y NOD2 sobre la expresión de LL37, IRGM y la inducción de autofagia.
- 4.- Determinar el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares en relación con los mecanismos bactericidas inducidos por NOD1 y NOD2.

MÉTODOS

1.- Células

Grupo de estudio.

Se reclutaron 25 sujetos sanos mayores de 18 años y menores de 65 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Todos los voluntarios fueron seronegativos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), negativos para cualquier patología pulmonar o sistémica y para cualquier proceso inflamatorio agudo o crónico. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER y todos los voluntarios otorgaron su consentimiento por escrito.

Lavado Bronquioloalveolar.

A los voluntarios se les realizó un Lavado Bronquioloalveolar (LBA) en el Servicio de Broncoscopia del INER. Para obtener células bronquioloalveolares (BAC) se siguió el procedimiento descrito por nuestro grupo [38]. El LBA se realizó con un broncoscopio de fibra óptica marca P30 (Olympus BF), el cual fue introducido en el lóbulo medio y la llingula del pulmón. El lavado se realizó con un volumen total de 300 mL de solución salina estéril al 0.9%.

Preparación de Macrófagos Alveolares.

Se centrifugó el LBA a 400 x g, por 15 min a 4°C para obtener células bronquioloalveolares. Las células resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Lonza) suplementado con 50 µg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma), 200 mM L-glutamina (Lonza) y 10% de suero humano descomplementado (en adelante este medio será llamado solamente medio). Las células fueron adheridas en placas de poliestireno (descritas delante de acuerdo a las necesidades de cada experimento) durante 1h antes de ser procesadas. El porcentaje de linfocitos presente en las células bronquioloalveolares fue menor

al 6% en todos los casos y las células no adherentes fueron removidas, por lo tanto consideramos que la investigación se realizó con macrófagos alveolares. La viabilidad fue de 98% medida por exclusión de azul de tripano (Gibco).

Preparación de monocitos y macrófagos derivados de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica.

En experimentos piloto con perspectivas a futuro descritos en la sección “Perspectivas” se utilizaron monocitos y macrófagos derivados de monocitos. A 3 voluntarios se les extrajo una muestra de sangre (120 – 180 mL) usando heparina como anticoagulante; la sangre se diluyó a una relación 1:1 con RPMI (Lonza). Las células mononucleares de sangre periférica fueron separadas por medio de un gradiente de densidad en Solución separadora de linfocitos (Lonza) a una relación 1:3 (solución separadora: dilución de sangre). Las células mononucleares se recuperaron de la interfase, se resuspendieron en medio, se colocaron en placas de petri de poliestireno de 100mm y se incubaron durante 1h a 37°C. Se descartaron las células no adherentes y las adherentes (MN) fueron recuperadas mecánicamente con un levantador de células (Costar). La viabilidad fue de mayor al 98% en todos los casos. En paralelo se colocaron monocitos en placas de poliestireno de 25 pozos (Costar) y se dejaron diferenciar a macrófagos durante siete días.

2.- Estímulos

Estimulación por ligando

Las células se estimularon con ligandos específicos para los receptores en estudio por tiempos determinados en ensayos piloto de cinéticas de concentración y tiempo. Los sobrenadantes se reservaron para determinación de citocinas y las células se lisaron para la posterior extracción de RNA y análisis de la expresión de genes de la respuesta innata. En experimentos seleccionados se añadieron inhibidores de componentes de las principales vías

de señalización de los receptores en estudio 30 minutos antes de la estimulación con ligandos específicos. Los ligandos e inhibidores aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Estímulos e inhibidor.

Agente	Función	Origen	Dosis utilizada
Tri-DAP	Ligando de NOD1	Invivogen	5µg/mL
MDP	Ligando de NOD2	Invivogen	10µg/mL
LPS	Ligando de TLR4	Sigma	100 ng/mL
SB203580	Inhibidor de las cinasas RIP2 y p38	Promega	10µM

Preparación de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para la infección *in vitro*.

La cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC #25618) fue crecida en medio líquido 7H9 (Difco), suplementado con 10% de ADC (albumina, dextrosa y catalasa, Becton Dickinson, BD) y 2% de glicerol (Merck). Después de 21 días de incubación en agitación orbital a 37°C se cosechó por centrifugación a 3000 rpm, 30 min a 18°C. Las bacterias fueron resuspendidas en medio 7H9, se separaron en alícuotas y fueron congeladas a – 80°C hasta su uso.

En cada experimento se disgregaron las bacterias con perlas de cristal de 3 mm de diámetro durante 5 min, se centrifugaron a 900 x g durante 5 min, se recolectó el sobrenadante y se hicieron diluciones seriadas (1:10) con medio 7H9. Las bacterias se sembraron por triplicado en placas de agar de 7H10 (Difco), se incubaron por 21 a 37°C en 5% de CO₂ y 85% de humedad relativa. Las UFC se cuantificaron con ayuda de una lupa estereoscópica. Para infectar a

los macrófagos alveolares, las bacterias disgregadas con perlas se resuspendieron en medio RPMI con 30% de suero humano.

Infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

Los macrófagos alveolares se colocaron en placas de 24 pozos de baja adherencia (Costar) a razón de 5×10^5 células por pozo. Las células se infectaron con *M. tuberculosis* a una razón de 1-2 bacterias por 20 macrófagos durante 1 h, al término de este tiempo los pozos se lavaron tres veces con medio para eliminar las bacterias que no fueron fagocitadas y enseguida se estimularon con $10 \mu\text{g/ml}$ de MDP o se dejaron con medio, posteriormente se incubaron durante 1, 24 y 72 horas (D0, D1 y D4) y se determinó el control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* por el método de unidades formadoras de colonias (UFC). En paralelo se infectó otro juego de muestras en las mismas condiciones de infección y se incubaron por 24h; se centrifugaron y los sobrenadantes se guardaron a -70°C para la determinación posterior de citocinas y las células se lisaron para obtención de RNA y análisis por técnicas de biología molecular. En estas condiciones de infección el 8.4% de los macrófagos estaban infectados y contenían hasta 4 bacterias por macrófago. Para el estudio de microscopía electrónica se utilizó otro experimento con una infección de 5 bacterias por macrófago; las células se incubaron por 24h antes de fijarlas.

3.- Expresión génica

La expresión génica de los componentes de la inmunidad innata en estudio se determinó por RT-PCR y la evaluación cuantitativa se realizó por PCR en tiempo real utilizando juegos de primers y sondas Taqman específicos comerciales prediseñados (Applied Biosystems) descritos en la Tabla 4. La cinética de amplificación de los genes en estudio se midió en tiempo real, el ciclo en el cual la expresión del gen sobrepasó el umbral de detección se denomina Ct y es un

indicador de la concentración inicial de mRNA del gen en estudio. La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó por el método de $\Delta\Delta Ct$ previa validación del método utilizando como gen control endógeno el de 18S RNA.

Validación de ensayos (estandarización).

La validación del ensayo de qPCR se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Pelkin Elmer Users Bulletin No. 2). Se realizó una curva estándar para determinar la eficiencia de amplificación de todos los genes a partir de una muestra de cDNA diluida serialmente cinco veces en órdenes de 5, la cual se amplificó y se determinó por triplicado. A partir de los resultados se graficó el Ct vs el log₁₀ de la concentración. Para calcular la eficiencia de amplificación (E) a partir de la pendiente (m) se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/m)}] - 1$$

Validación del método $\Delta\Delta Ct$.

Para poder aplicar el método $\Delta\Delta Ct$ fue necesario construir una curva de rango dinámico para el gen blanco (NOD1, por ejemplo) y el control endógeno (18S RNA); ésta se construyó siguiendo las recomendaciones de AB. Una muestra de cDNA se diluyó serialmente cinco veces en órdenes de cinco, se obtuvo el ΔCt (Ct NOD1-Ct 18S RNA) para cada concentración. Se graficó el Ct vs el logaritmo base 10 de la concentración de cada uno de los puntos; el valor de la correlación (R^2) cercano a 1 valida la utilización del método ΔCt . Una vez validado el método se aplicó directamente la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a cada cDNA problema.

Cuantificación de la expresión génica.

Para la cuantificación de la expresión de cada gen blanco se realizó la determinación en un equipo “Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM 7500” de acuerdo al protocolo recomendado por AB y se analizó con el software “ABI PRISM SDS 7500 Fast System” del equipo. Se preparó una mezcla de

cDNA diluido 1:5 en agua con DEPC, 1X de Universal Master Mix (AB), 900 nM de los cebadores y 250 nM de las sondas TaqMan correspondientes al gen de interés. Las muestras se colocaron por triplicado en una placa para reacción óptica de 96 pozos libre de RNAsas. La amplificación se realizó con una estrategia prediseñada por el fabricante para este fin, la cual consiste en: 5 minutos a 50° C para desintegrar el encapsulado protector que presentan las sondas, 10 minutos a 95° C para activar la Taq polimerasa, 40 repeticiones de 15 segundos a 95° C para alinear el DNA y 1 minuto a 60° C para elongar el DNA. La expresión de cada gen se normalizó con la expresión del gen de RNA 18S y la cuantificación relativa de la expresión génica NOD2 se realizó utilizando el método $\Delta\Delta Ct$.

Fórmulas utilizadas en el método $\Delta\Delta Ct$:

La Expresión del gen X en la muestra A (tratamiento) relativa a la muestra B (células sin estimular), RQ, se calcula como sigue:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En donde,

RQ, cuantificación relativa.

$\Delta\Delta Ct$, diferencia en la expresión normalizada del gen blanco entre las dos muestras comparadas:

$$\Delta\Delta Ct_{\text{genX}} = \Delta Ct_{\text{genX muestra A}} - \Delta Ct_{\text{genX muestra B}}$$

$$\Delta Ct_{\text{genX muestra A}} = Ct_{\text{genX muestra A}} - Ct_{18S \text{ muestra A}}$$

$$\Delta Ct_{\text{genX muestra B}} = Ct_{\text{genX muestra B}} - Ct_{18S \text{ muestra B}}$$

Tabla 3. Ensayos prediseñados por Applied Biosystems utilizados en este estudio.

Ensayo para el gen	Número de catálogo (AB)
NOD1	Hs01036717_m1
NOD2	Hs00223394_m1
LL37	Hs00189038_m1
IRGM	Hs01013699_s1
18S RNA	4319413E

4.- Detección de proteínas

Detección de NOD2 por citometría de flujo.

Un millón de macrófagos alveolares se incubaron en PBS (Lonza) con 50% de suero hiperinmune de conejo preparado en nuestro laboratorio durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación (30 rpm en un agitador orbital) para bloquear los receptores de Fc de la membrana de los macrófagos. Las células se permeabilizaron con la solución permeabilizadora para FACS (BD) y se añadió el anticuerpo de cabra anti-NOD2 humano o su isotipo (Imgenex) en presencia de 50% de suero de conejo. Después de 20 min a 4°C, se lavaron las células y se añadió un anticuerpo secundario de burro anti-IgG de cabra acoplado al fluorocromo FITC (Santa Cruz Biotechnology). Las células se incubaron otros 20 min a 4°C en la oscuridad y después de un lavado con PBS se fijaron con paraformaldehído al 1%. Se adquirieron 20,000 eventos en un citómetro FACScalibur (BD) y se analizaron con el software CellQuest (BD). El análisis se realizó en las células más grandes y granulosas ajustando el voltaje al nivel que permita discriminar la autofluorescencia de la fluorescencia específica.

Determinación de citocinas.

La producción de las citocinas proinflamatorias IL1 β , IL6, IL10, IL8, IL12p70, IL17, IFN α y TNF α se determinó utilizando el sistema Milliplex (Millipore) siguiendo las especificaciones del fabricante. En los experimentos que aparecen en la sección “Perspectivas” la producción de TNF α se determinó por ELISA como fue previamente reportado [38].

Determinación de proteínas por inmunoblot

Las células se lavaron después del tratamiento especificado y se centrifugaron. El botón celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso. Para extracción de proteínas citoplásmicas, las células se lisaron con un buffer de lisis (10mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM ditiotreitól, 5 μ g/ml of leupeptin, 5 μ g/ml de aprotinin y 0.5mM PMSF, todos de Sigma). Los lisados se centrifugaron y los sobrenadantes que contenían a las proteínas citoplásmicas se recuperaron y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

Para el análisis por western blot, los extractos proteicos se hirvieron en buffer de Laemmli. Las proteínas se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de disulfuro de polivinilideno (Millipore). Las membranas se bloquearon con buffer de bloqueo (TBS, 50mM Tris.Cl, pH 7.5; 150mM NaCl; 0.1% Tween 20; 1% BSA) seguido de una incubación por 2h con el primer anticuerpo: anti-NOD1 (AdB serotec), anti-NOD2 (Millipore), anti-LL37 (Santa Cruz) anti-IRGM (Abcam), anti-Atg9, anti-LC3 and anti-ATG16L1 (Novus Biologicals) or anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich). El segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Sigma) se añadió después de tres lavados y se incubó durante 1h. Las bandas específicas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema SuperSignal (Thermo) y se revelaron en placas radiográficas. El análisis

densitométrico se realizó con el programa ImageJ 1.44° (Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de América).

Inmunomicroscopía electrónica

Preparación de la muestra. Las células en suspensión fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en buffer de Sörensen 0.2M pH7.3. Posteriormente, el botón celular fue deshidratado por inmersión durante 30 min en alcoholes de concentración creciente, 50, 70, 80, 96 y 100%. Después, el botón celular fue infiltrado en resina LR White (London Resin, Co): alcohol 100% 1:1 durante 24h seguido de otras 24h en resina pura. Para la polimerización de la resina se incubó la muestra 4h a 60°C. Una vez obtenido el bloque de células, se realizaron cortes de 60-80 nm que se fijaron en rejillas de níquel.

Inmunomarcaje. Después de un proceso de permeabilización de 1h en solución de lavado, las rejillas de níquel se incubaron en anticuerpo primario durante 24h en la dilución estandarizada para cada anticuerpo (Tabla 5). Las muestras se lavaron dos veces en agua destilada durante 15 min antes de añadir el anticuerpo secundario correspondiente e incubarlas por 2h (Tabla 5). Posteriormente se realizaron 2 lavados más en agua destilada y las muestras se contrastaron con acetato de uranilo acuoso por 30 seg seguido de un último lavado en agua destilada. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss M-10 (Carl Zeiss) para determinar la localización subcelular de los elementos de respuesta innata en estudio.

5.- Determinación de la inhibición del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*.

Los macrófagos alveolares se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv, se estimularon con MDP post-infección de la manera descrita en la sección anterior y se determinó la actividad bactericida de los macrófagos midiendo el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* por el método de las UFC a las 1, 24

y 72 horas (D0, D1 y D4) post infección. El cálculo del índice de crecimiento intracelular se hizo contabilizando el número de UFC al día 1 o 4 y dividiéndolo entre el número de UFC que había al día 0.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la inmunomicroscopía electrónica.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-NOD2 (Millipore)	1:20	Anti-IgG de conejo oro de 5nm (Sigma)	1:20
Anti-LC3 (Novus Biologicals)	1:20	Anti-IgG de conejo oro de 5nm	1:20
Anti-IRGM (Abcam)	1:20	Anti-IgG de conejo oro de 5nm	1:20
Anti-ATG16L1 (Novus Biologicals)	1:40	Anti-IgG de conejo oro de 5nm	1:20

6.- Análisis estadísticos.

Los datos se analizaron utilizando la suma de rangos de Wilcoxon para muestras pareadas. Los diagramas de caja muestran los cuartiles y la mediana. Las gráficas de barra muestran las medias \pm error estándar de la media. Los datos de microscopía electrónica fueron analizados con una prueba t de dos colas para datos pareados. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando la $p < 0.05$. Los análisis se realizaron con el SPSS 15.0 para Windows (SPSS) y GraphPad Prisma 5.0 para Mac (GraphPad Inc.).

RESULTADOS

NOD1 y NOD2 forman parte del repertorio de receptores de la inmunidad innata de los macrófagos alveolares humanos

Examinamos la presencia citosólica de NOD1 y NOD2 en macrófagos alveolares humanos. Observamos que el receptor NOD1 se expresa en cantidades basales tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína. En la figura 4 se muestra la expresión basal del mensajero en relación al gen endógeno de referencia 18S RNA (A) y los niveles basales de proteína medidos por inmunoblot en células sin estimular (C). Tanto la expresión génica (B) como la proteica de NOD1 (C y D) aumentaron después de 24h de incubar las células en presencia de Tri-DAP, ligando de NOD1.

La expresión de NOD2 fue detectada (Fig. 5) a nivel de proteína en el citoplasma de células sin estimular por medio de dos técnicas: por citometría de flujo intracelular (A) y por inmunoblot en lisados citoplásmicos (B). La estimulación durante 24h con MDP, ligando de NOD2, indujo la sobre-expresión de NOD2 a nivel de proteína dos veces respecto a la de las células sin estimular (B). Además, la expresión génica también aumentó en respuesta a la estimulación por su ligando (C). Posteriormente exploramos la localización intracelular de NOD2 por inmunomicroscopía electrónica (D) y observamos que en ausencia de estimulación por ligando el receptor se distribuye homogéneamente en el citoplasma del macrófago; después de la estimulación con MDP ocurrió una redistribución de NOD2 hacia la membrana plasmática.

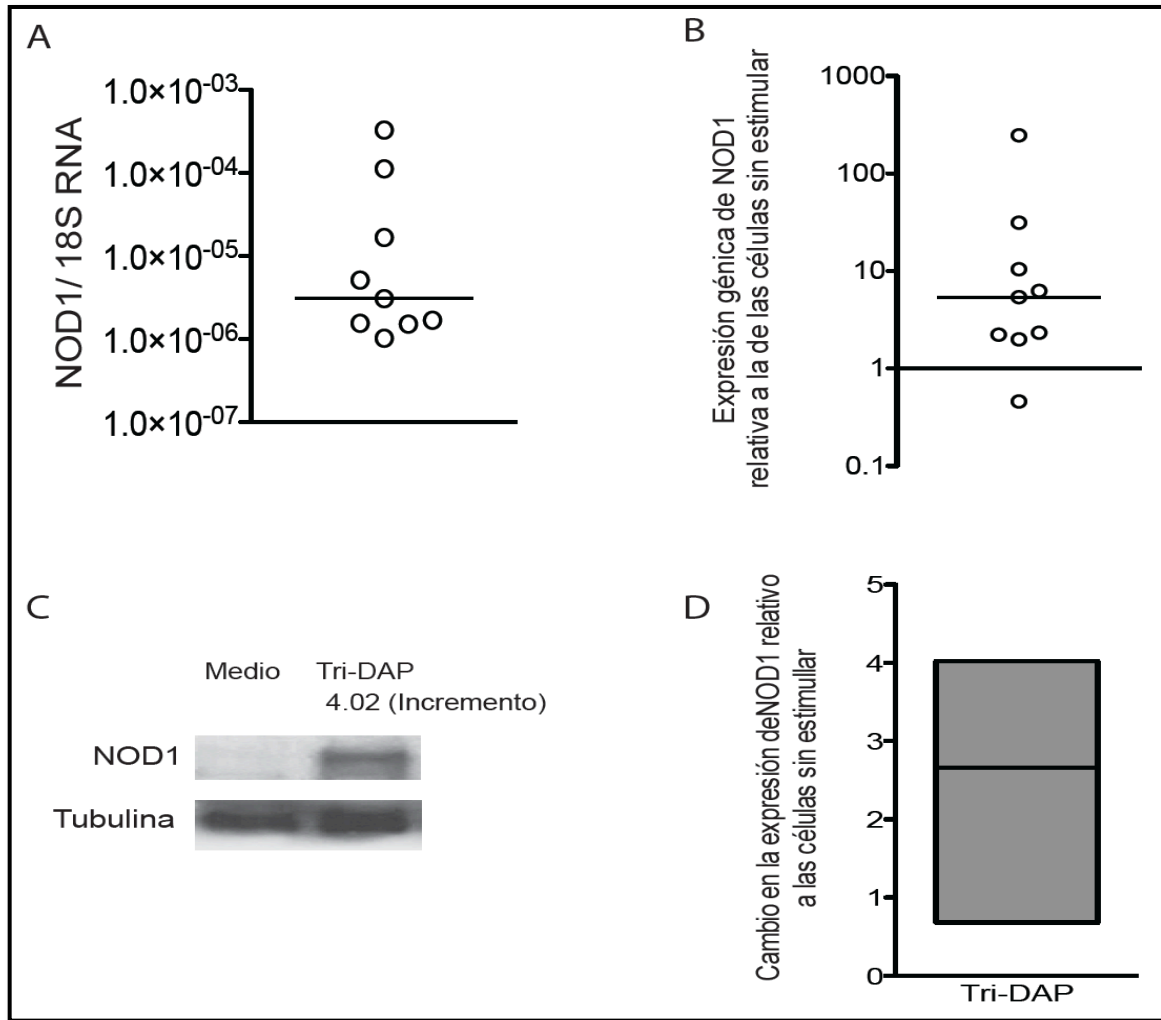


Figura 4. NOD1 se expresa en macrófagos alveolares y su expresión aumenta en respuesta a la estimulación por ligando. A, La expresión basal se determinó por PCR cuantitativa en células sin estimular y se reporta en relación a la expresión del gen endógeno de referencia 18S RNA, la línea delgada indica la mediana, n=9. B, Las células se estimularon con $5\mu\text{g/ml}$ de Tri-DAP durante 24h y se determinó la expresión génica por PCR cuantitativa, método $\Delta\Delta\text{Ct}$; se reporta la expresión relativa a la de las células sin estimular, la línea delgada indica la mediana, n=9. C, La detección de la proteína se hizo por inmunoblot. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. El incremento en la cantidad de proteína se calculó por densitometría y se reporta como relativo a la de las células sin estimular y normalizado con la expresión de tubulina; en D el diagrama de caja muestra los valores mínimo, máximo y la mediana, n=3.

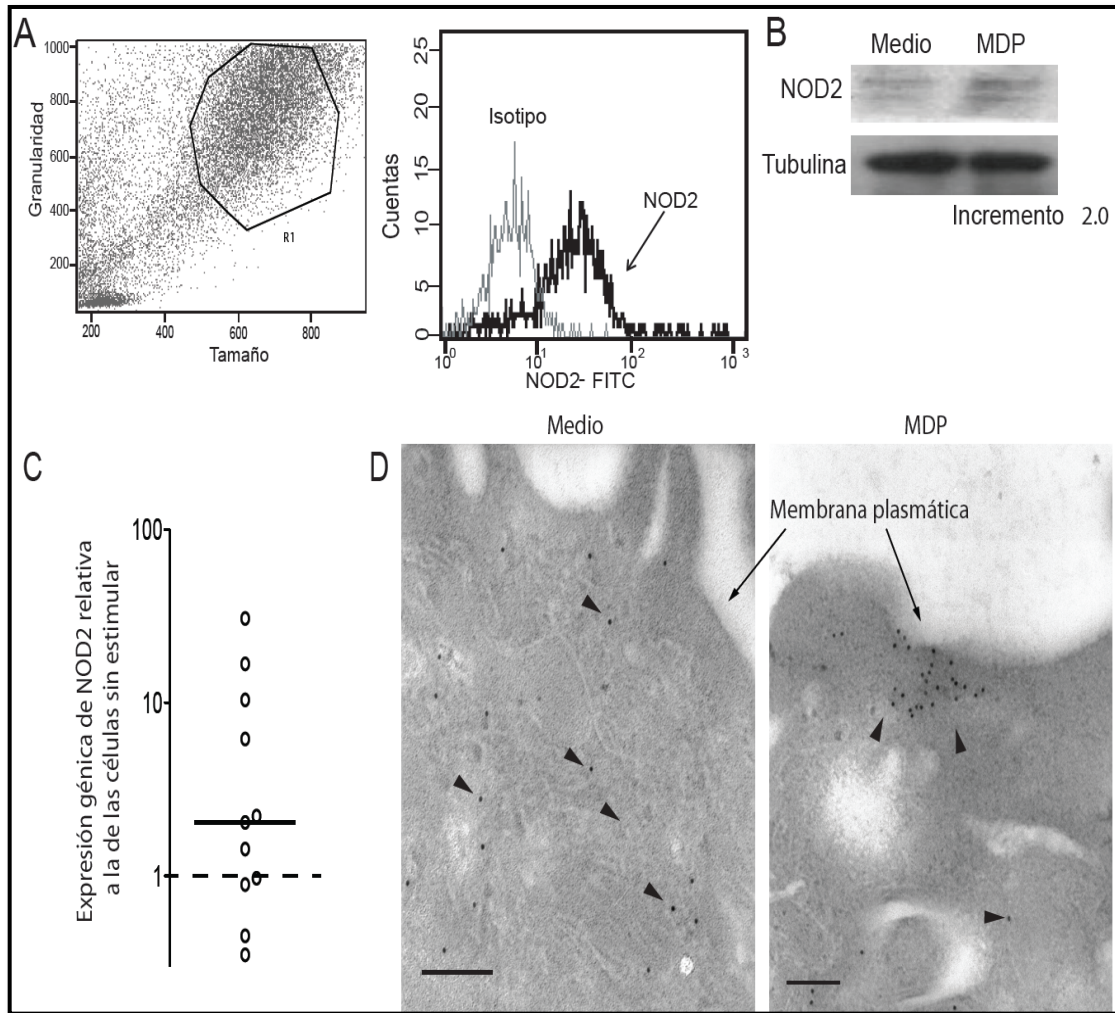


Figura 5. NOD2 se expresa en macrófagos alveolares y su expresión aumenta en respuesta a la estimulación por ligando. A, NOD2 se detectó en el citoplasma de los macrófagos por citometría de flujo en células sin estimular. Se muestra un experimento representativo. Las células se seleccionaron en la región correspondiente a las células grandes y granulosas (R1 en el gráfico de puntos). Los macrófagos se estimularon con 10 μ g/ml de MDP durante 24h. B, la proteína se cuantificó por inmunoblot; se muestra un experimento representativo. El incremento en la expresión de NOD2 relativa a la de las células sin estimular y normalizada con la expresión de tubulina se calculó por densitometría. C, la expresión génica se determinó por PCR cuantitativa, método $\Delta\Delta$ Ct; se reporta la expresión relativa a la de las células sin estimular, la línea gruesa indica la mediana, n=11. D, la localización subcelular del receptor se estableció por inmunomicroscopía electrónica en células sin estimular (TEM X 80,000) y estimuladas con MDP (TEM X 63,000). El anticuerpo específico anti-NOD2 se detectó con un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 5nm, señaladas con cabezas de flecha. La barra representa 150nm.

NOD1 y NOD2 inducen la producción de citocinas proinflamatorias en respuesta al reconocimiento de su ligando

Para investigar si la activación de NOD1 y NOD2 por su ligando participa en la generación de la respuesta proinflamatoria, se determinó la presencia de algunas citocinas en sobrenadantes de cultivo de 24h. Encontramos que la activación de ambos receptores induce la liberación significativa de las citocinas proinflamatorias IL1 β , IL6 y TNF α . Ninguno de los ligandos de NOD1 y NOD2 indujo la producción de la citocina anti-inflamatoria IL10. Ambos receptores tipo NOD indujeron la producción de la quimiocina IL8. La producción de citocinas proinflamatorias dependiente de la activación de TLR4 también fue significativa y en proporciones significativamente mayores que las observadas en la activación de NOD1 y NOD2. (Fig. 6, $p < 0.05$ y $p < 0.01$ señalado en las gráficas). Ninguno de los estímulos indujo la liberación al medio de las citocinas IL12p70, IL17 e IFN α 2 (datos no mostrados).

NOD1 y NOD2 inducen la sobre-expresión de la catelicidina LL37 y de la enzima de autofagia IRGM en respuesta a su ligando

Investigamos el potencial que tiene la activación de los NOD en la inducción de los mecanismos bactericidas LL37 e IRGM. En la figura 7A se observa que ambos receptores indujeron la sobre-expresión del gen de LL37 pero la magnitud de la respuesta fue significativamente mayor cuando se activó el receptor NOD1 (mediana 7.68 veces respecto a las células sin estimular) que cuando se activó NOD2 (mediana 1.43 veces respecto a las células sin estimular), $p < 0.05$. Estos hallazgos también se presentaron a nivel de proteína (Fig. 7B,C).

La expresión génica de IRGM aumentó en respuesta a la activación de ambos NOD. En respuesta a la activación de NOD1 la mediana del cambio en la expresión génica de IRGM fue 9.9 veces respecto a la de las células sin estimular. En respuesta a la activación de NOD2 el cambio fue de 2.93 veces respecto a las células sin estimular (Fig. 8A). Este resultado también se vio reflejado a nivel de proteína (Fig. (B,C)). No hubo diferencias significativas entre la respuesta de ambos receptores.

Como control positivo de inducción se incluyó la estimulación con LPS. Este ligando de TLR4 indujo la sobre-expresión de LL37 (mediana 4.86 veces respecto a las células sin estimular) y de IRGM (mediana 5.38 veces respecto a las células sin estimular). Ambos resultados fueron significativamente mayores que la mediana teórica de 1, equivalente a la respuesta de células sin estimular (Fig. 8).

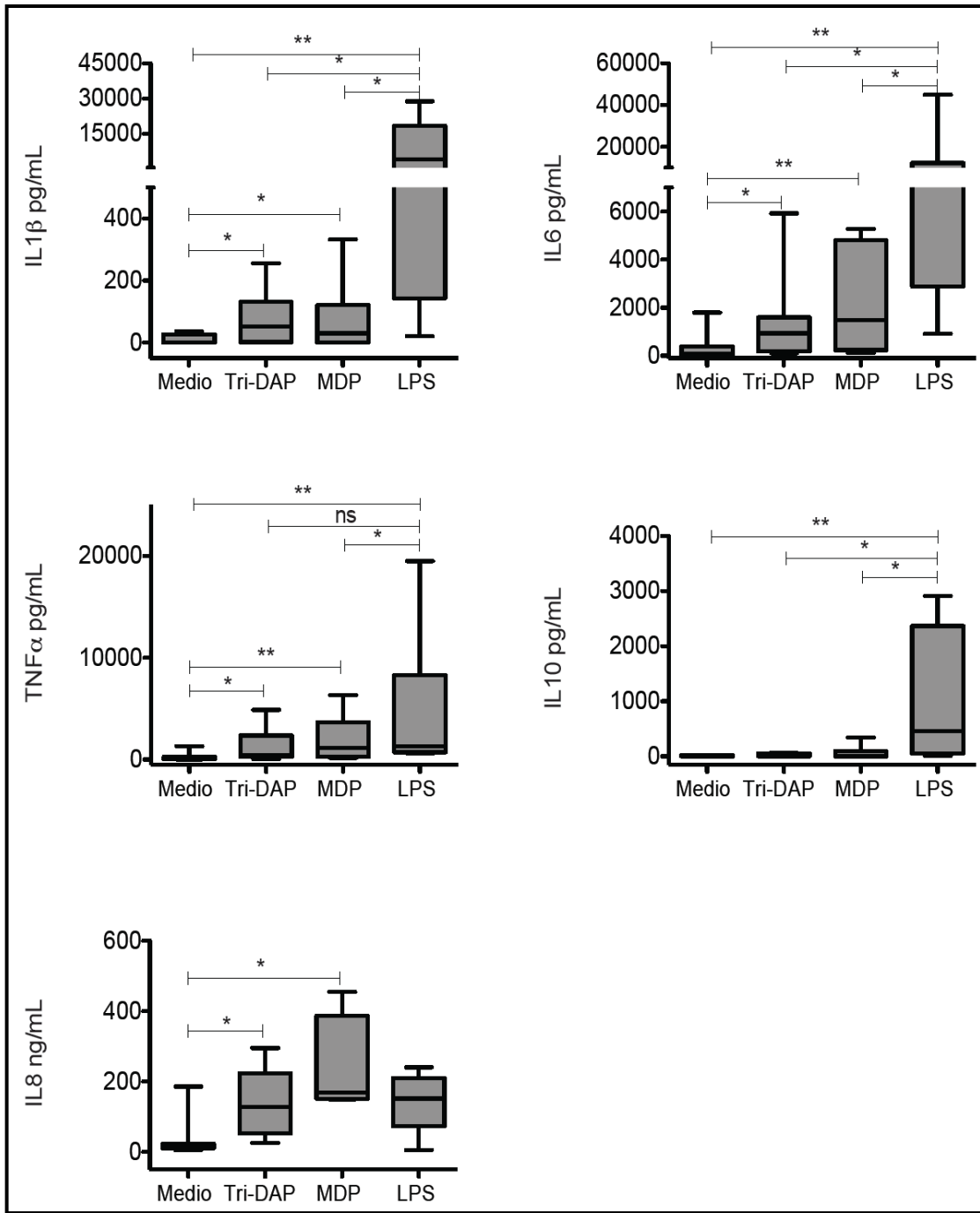


Figura 6. Producción de citocinas proinflamatorias. Las células se incubaron en presencia de 5µg/ml de Tri-DAP, 10µg/ml de MDP, 100ng/ml de LPS o medio solo durante 24h. Se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y las citocinas se determinaron por el método de Milliplex, n=8 . Se muestran diagramas de caja que representan cuartiles y se indica la mediana. *p<0.05 y **p<0.01.

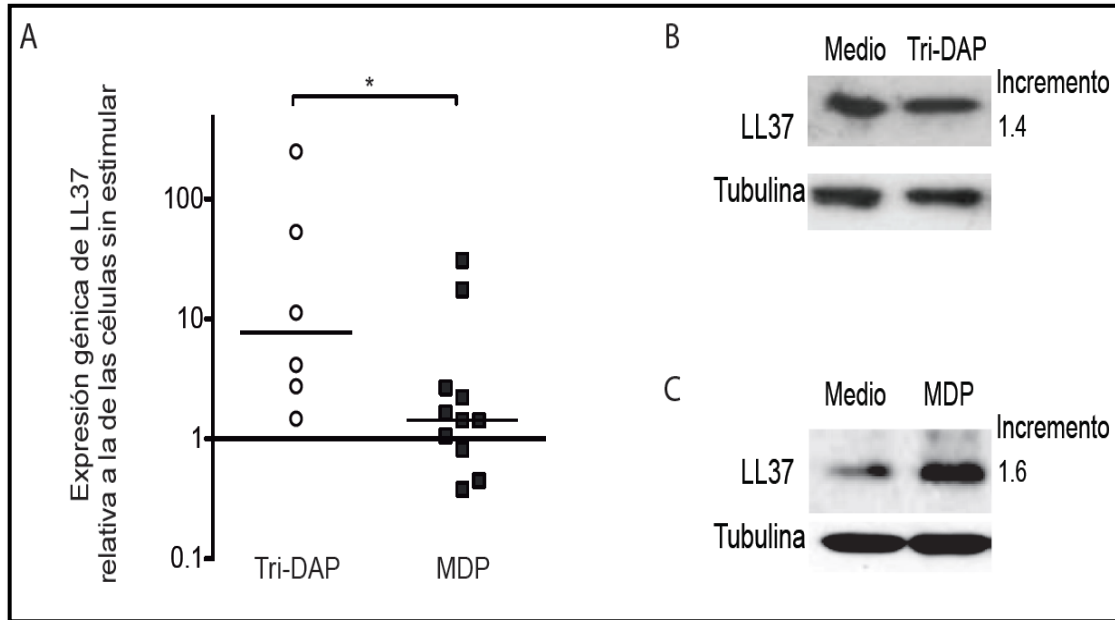


Figura 7. Expresión de LL37. Los macrófagos alveolares se incubaron en presencia de 5µg/ml de Tri-DAP, 10µg/ml de MDP o medio solo durante 24h; los sobrenadantes se reservaron y se obtuvieron lisados celulares. A, la expresión génica de LL37 se determinó por PCR cuantitativa, método $\Delta\Delta CT$. Se reporta el cambio en la expresión génica respecto a la de las células sin estimular y se indica la mediana; n=6 y 11, *p<0.05. La presencia de LL37 se detectó por inmunoblot en extractos citoplásmicos de células estimuladas con Tri-DAP (B) y MDP (C); se muestra un experimento representativo de tres independientes. El incremento en la cantidad de proteína se calculó por densitometría y se reporta como relativo a la de las células sin estimular y normalizado con la expresión de tubulina.

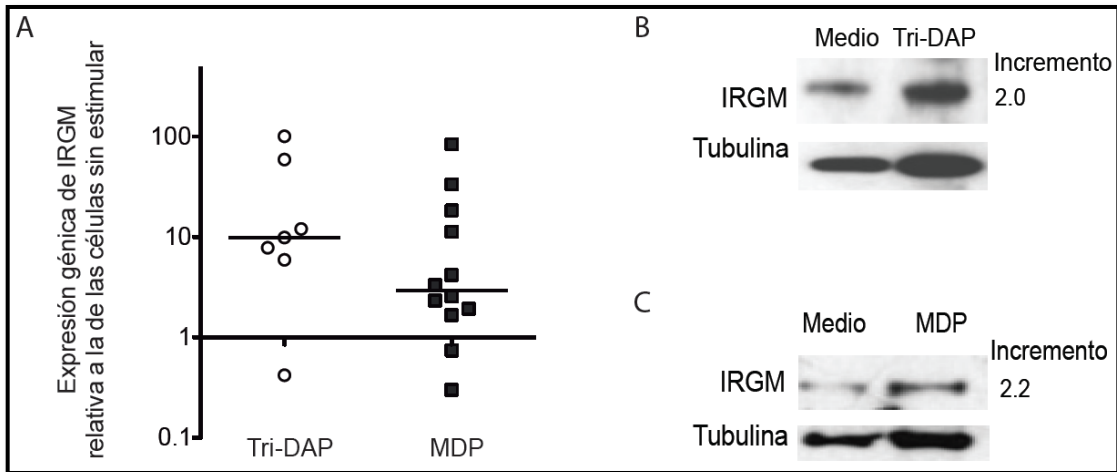


Figura 8. Expresión de IRGM. Los macrófagos alveolares se incubaron en presencia de 5µg/ml de Tri-DAP, 10µg/ml de MDP o medio solo durante 24h; los sobrenadantes se reservaron y se obtuvieron lisados celulares. A, la expresión génica de IRGM se determinó por PCR cuantitativa, método $\Delta\Delta CT$. Se reporta el cambio en la expresión génica respecto a la de las células sin estimular y se indica la mediana; n=7 y 12. La presencia de IRGM se detectó por inmunoblot en extractos citoplásmicos de células estimuladas con Tri-DAP (B) y MDP (C); se muestra un experimento representativo de tres independientes. El incremento en la cantidad de proteína se calculó por densitometría y se reporta como relativo a la de las células sin estimular y normalizado con la expresión de tubulina.

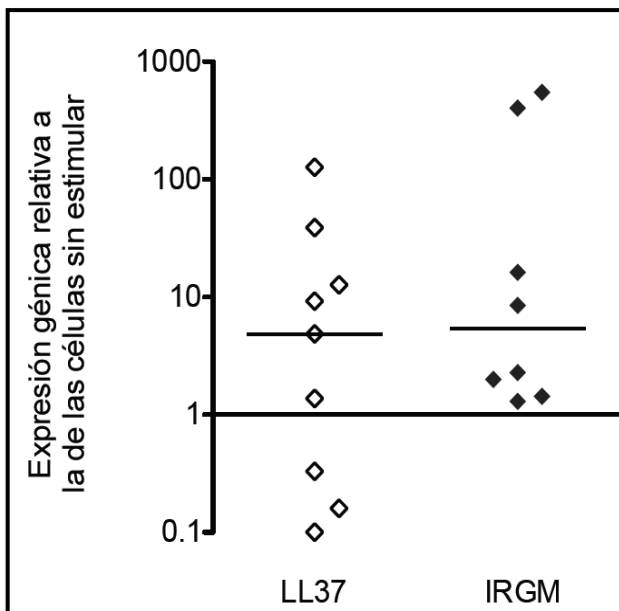


Figura 9. Expresión génica de LL37 e IRGM dependiente de la estimulación con LPS. Los macrófagos alveolares se incubaron en presencia de 100ng/ml de LPS o medio solo durante 24h; los sobrenadantes se reservaron y se obtuvieron lisados celulares. La expresión génica de IRGM se determinó por PCR cuantitativa, método $\Delta\Delta CT$. Se reporta el cambio en la expresión génica respecto a la de las células sin estimular y se indica la mediana; n=8 y 9.

La activación de NOD1 y NOD2 después de la infección por *M. tuberculosis* participa en el control de la replicación intracelular de la micobacteria

Mycobacterium tuberculosis es capaz de sobrevivir y replicarse dentro del macrófago infectado. Después de observar que la adición de ligandos de NOD1 y NOD2 induce en los macrófagos alveolares la expresión de moléculas que participan en mecanismos bactericidas, investigamos si administrar los ligandos de NOD1 y NOD2 a macrófagos infectados puede favorecer el control de la infección. Utilizamos una MOI baja (1-2 bacterias por 20 macrófagos) para representar la infección natural. En la figura 10A observamos que la micobacteria fue capaz de replicarse dentro del macrófago aún en esta dosis infectante. El crecimiento intracelular aumentó 12.5 veces entre el día 1 y el día 4 post-infección (mediana 5.5 veces, $p < 0.05$). Sin embargo, cuando se adicionó Tri-DAP o MDP a los macrófagos infectados, éstos pudieron controlar el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. Este control relativo del crecimiento intracelular de la micobacteria se acompañó de un aumento significativo en la producción de $TNF\alpha$, $p < 0.05$ (Fig. 10B).

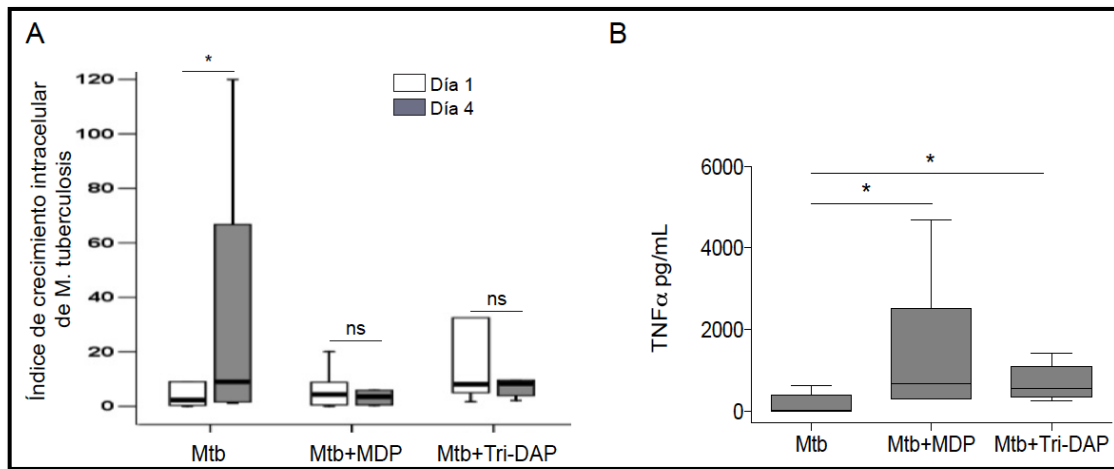


Figura 10. NOD1 y NOD2 inducen una activación antibacteriana en los macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Las células fueron infectadas a una razón de 1-2 bacterias por 20 macrófagos durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron una hora antes de añadir al cultivo 5µg/ml de Tri-DAP, 10µg/ml de MDP o medio solo. El crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* se determinó por el método de unidades formadoras de colonia a los 0, 1 y 4 días post-infección. A, se reporta el índice de crecimiento relativo a las bacterias fagocitadas el día 0; n=6. B, a los sobrenadantes del cultivo se les determinó la producción de TNFα por ELISA. Se muestran diagramas de caja que representan cuartiles y se indica la mediana. *p<0.05, ns= no significativo.

La activación de NOD2 posterior a la infección con *M. tuberculosis* activa una gama de mecanismos de la respuesta innata

Debido a la gran cantidad de células necesarias para cada experimento, los siguientes resultados se obtuvieron exclusivamente para dilucidar los mecanismos involucrados en el control de la infección por *M. tuberculosis* activados por adición de MDP a las células infectadas. Los experimentos que analicen la contribución de NOD1 en la resolución de la infección por *M. tuberculosis* serán estudiados en el futuro. En la figura 11 se muestra que la infección por si misma, a esta dosis de infección, no indujo la producción de citocinas proinflamatorias; sin embargo, la activación de NOD2 post-infección indujo la producción significativa de IL6 y TNF α ($p < 0.05$ comparado con las células no infectadas y $p < 0.01$ comparado con las células infectadas no tratadas con MDP) pero no la de IL1 β . En ninguno de los casos observamos producción de IL10, IL12p70, IL17 o IFN α 2 (datos no mostrados).

Adicionalmente se determinó la sobre-expresión de los efectores bactericidas que describimos como inducibles por NOD2 (Figs. 7 y 8) en los macrófagos infectados y tratados con MDP post-infección. En la figura 12 se observa que la infección por si misma, a esta dosis de infección, no indujo un aumento en la expresión génica de LL37 (A) ni de IRGM (B); por el contrario, el tratamiento con MDP post-infección indujo significativamente la sobre-expresión de LL37 e IRGM ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente). Este resultado también se reflejó en un incremento en la expresión de ambos efectores a nivel de proteína (C y D).

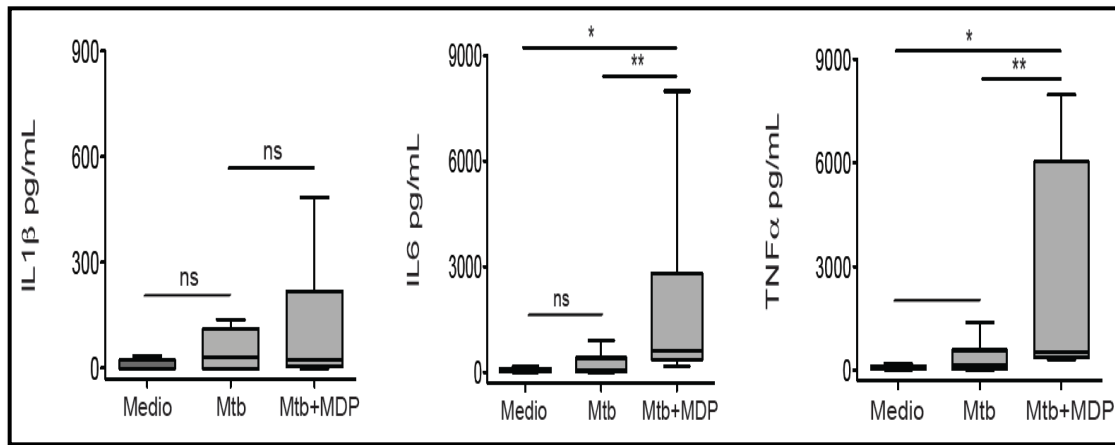


Figura 11. NOD2 induce la producción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Las células fueron infectadas a una razón de 1-2 bacterias por 20 macrófagos durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron una hora antes de añadir al cultivo 10µg/ml de MDP o medio solo. Las células se incubaron durante 24 h adicionales. A los sobrenadantes del cultivo se les determinó la producción de citocinas por el método de Milliplex, n=9. Se muestran diagramas de caja que representan cuartiles y se indica la mediana. *p<0.05, **p<0.01, ns= no significativo.

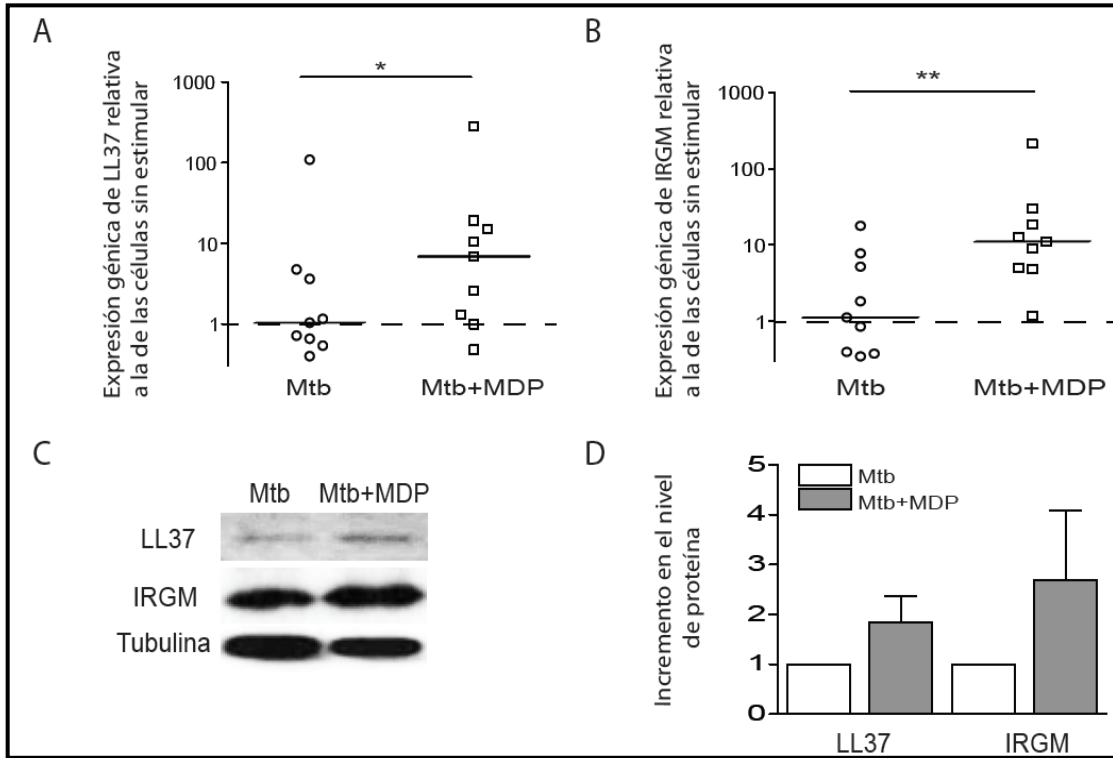


Figura 12. NOD2 induce un aumento en la expresión de LL37 e IRGM en los macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Las células fueron infectadas a una razón de 1-2 bacterias por 20 macrófagos durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron una hora antes de añadir al cultivo 10 μ g/ml de MDP o medio solo. Las células se incubaron durante 24 h adicionales. La expresión génica de LL37 (A) e IRGM (B) se determinó por PCR cuantitativa, método $\Delta\Delta$ CT. Se reporta el cambio en la expresión génica respecto a la de las células sin estimular y se indica la mediana; n=9. La determinación de proteína se hizo por inmunoblot en extractos citoplásmicos. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes (C). El incremento en la cantidad de proteína se calculó por densitometría y se reporta como relativo a la de las células sin estimular y normalizado con la expresión de tubulina, n=3; se muestra la media \pm SEM (D).

La activación de NOD2 post-infección induce el proceso autofágico

Debido a que la molécula efectora de la actividad bactericida que mayormente se indujo por efecto de la activación de los macrófagos infectados con MDP fue la enzima autofágica IRGM, comprobamos si el incremento en la expresión de IRGM representa, en efecto, la inducción de autofagia. Primero verificamos si IRGM se reclutó a las vesículas que contenían a la micobacteria por inmunomicroscopía electrónica. En la figura 13 se aprecia que en los macrófagos infectados ocurrió un reclutamiento mínimo de IRGM a la vesícula que contenía a la micobacteria (A); por otro lado, el tratamiento con MDP post-infección indujo un reclutamiento mayor de IRGM a la vesícula que contenía a la micobacteria (marcas de oro señaladas con cabezas de flecha, B).

El mismo fenómeno se observó en relación al reclutamiento de dos marcadores de autofagia LC3 (Fig. 13C, D) y ATG16L1 (Fig. 13E y F), los cuales fueron masivamente reclutados a la vesícula que contenía a la micobacteria cuando los macrófagos fueron tratados con MDP post-infección. Para establecer el nivel de reclutamiento, se cuantificó la marca de oro por bacteria en 10 células independientes que contenían de 1-7 bacterias de cada condición experimental. El reclutamiento de proteínas de autofagia fue significativamente mayor en las células tratadas con MDP post-infección ($p < 0.05$, Fig. 14).

El reclutamiento de proteínas de autofagia a la vesícula que contenía a la micobacteria fue dependiente de la señal de NOD2. La adición de un inhibidor de Rip2/p38, importantes adaptadores de la señalización de NOD2, antes de la adición de MDP causó una reducción en el reclutamiento de IRGM, LC3 y ATG16L1 (Fig.15).

La inmunodetección por microscopía electrónica no permite visualizar membranas, por lo que nos preguntamos si nuestros resultados anteriores fueron indicativos de formación de autofagosomas o de reclutamiento de

proteínas de autofagia a fagosomas. Para esclarecer la interrogante utilizamos microscopía convencional que permitió analizar la ultraestructura de las células infectadas y tratadas con MDP post-infección. Encontramos que el tratamiento indujo la formación de grandes vesículas que contenían organelos y material citoplásmico características de autofagosomas, así como organelos multivesiculares llamados de “piel de cebolla” que también son característicos de autofagia (señalados con cabezas de flecha, Fig. 16A y B). Las micobacterias estaban encerradas en verdaderas vesículas autofágicas (señaladas con flechas, Fig. 16C y D).

Para confirmar que el proceso autofágico estaba completo se determinó el corte proteolítico de LC3 por inmunoblot [89]. En las células tratadas con MDP post-infección se observó la conversión de LC3 I en LC3 II (Fig. 17A). La razón LC3 II/ LC3 I fue muy baja en células infectadas, pero aumentó en las células tratadas con MDP post-infección a consecuencia del corte proteolítico de LC3 I (Fig. 17B). También los niveles totales de LC3 II aumentaron (Fig. 17C).

Figura 13. NOD2 induce un reclutamiento de IRGM, LC3 y ATG16L1 a las vesículas que contienen a la micobacteria en los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (Mtb) y tratados con MDP post-infección. Las células fueron infectadas a una razón de 5 bacterias por macrófago durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron por una hora antes de añadir al cultivo 10µg/ml de MDP o medio solo. Las células se incubaron durante 24 h adicionales. La localización subcelular de las proteínas de autofagia se determinó en células infectadas no tratadas y tratadas con MDP utilizando anticuerpos específicos para IRGM (A, B), LC3 (C, D) y ATG16L1 (E, F) detectados con un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 5nm (señaladas con cabezas de flecha). Las barras representan 150 nm. TEM X 80, 000, excepto en B (TEM X 50,000). Datos generados en un experimento.

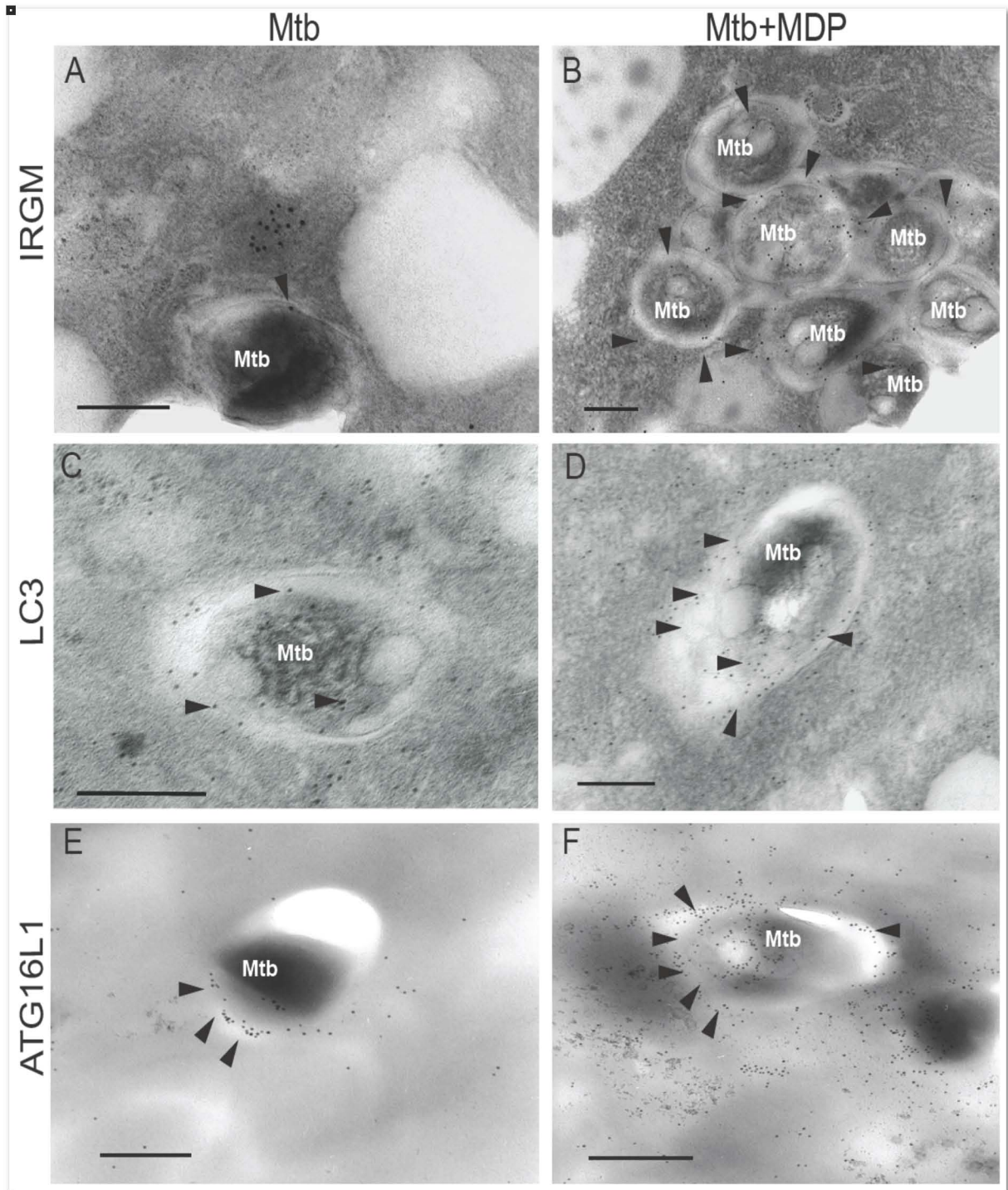


Figura 13. NOD2 induce un reclutamiento de IRGM, LC3 y ATG16L1 a las vesículas que contienen a la micobacteria en los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (Mtb) y tratados con MDP post-infección.

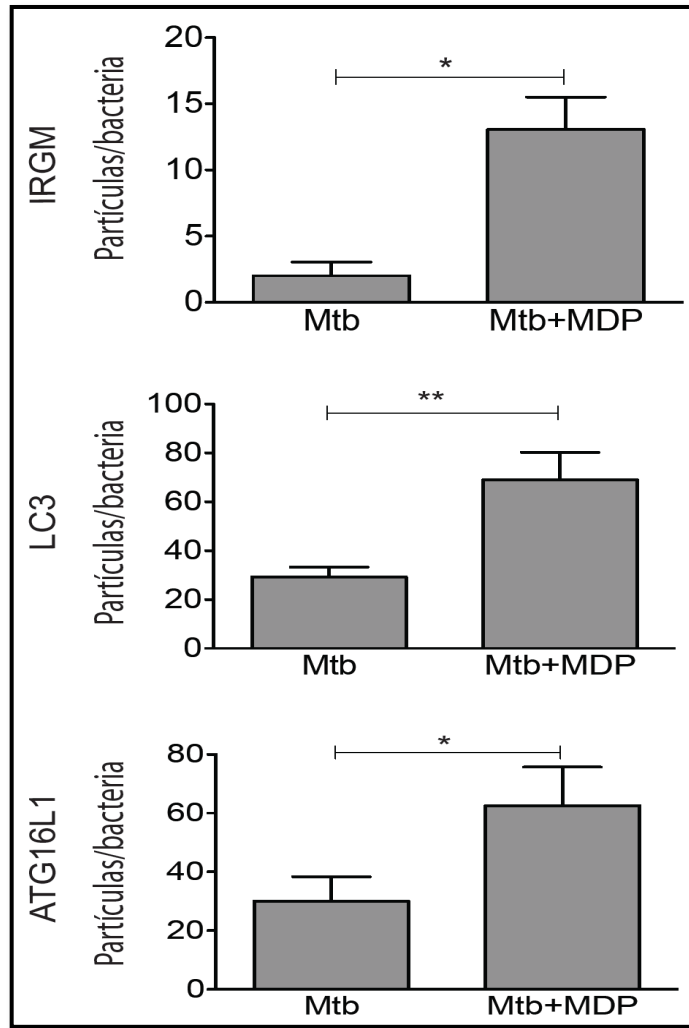


Figura 14. NOD2 induce un aumento significativo en el reclutamiento de proteínas de autofagia a la vesícula que contiene a la micobacteria. Las células fueron infectadas a una razón de 5 bacterias por macrófago durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron una hora antes de añadir al cultivo 10 μ g/ml de MDP o medio solo. Las células se incubaron durante 24 h adicionales. La localización subcelular de las proteínas de autofagia se determinó en células infectadas no tratadas y tratadas con MDP utilizando anticuerpos específicos anti IRGM, LC3 y ATG16L1 detectados con un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 5nm. Se cuantificaron manualmente las partículas que colocalizaban con las bacterias de 10 células independientes que contenían 1-7 bacterias/célula de cada condición experimental. se muestra la media \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.01). Datos generados en un experimento.

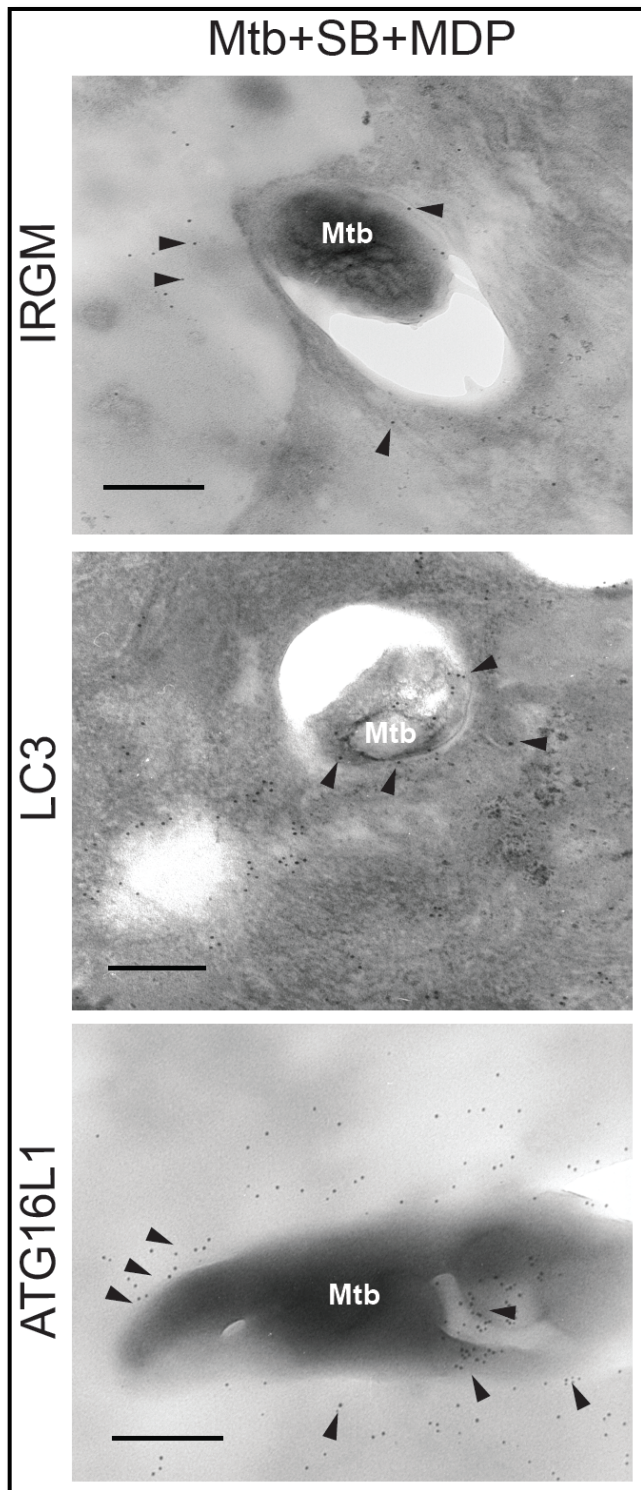


Figura 15. El efecto de la activación de NOD2 en el reclutamiento de proteínas de autofagia a la vesícula que contiene a la micobacteria depende de las cinasas Rip2 y p38.

Las células fueron infectadas a una razón de 5 bacterias por macrófago durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron una hora más. El inhibidor de Rip2/p38 SB203580 (SB, 10 μ M) se incorporó al cultivo 30 min antes de añadir 10 μ g/ml de MDP o medio solo. Las células se incubaron durante 24 h adicionales. La localización subcelular de las proteínas de autofagia se determinó en células infectadas no tratadas y tratadas con MDP utilizando anticuerpos específicos anti IRGM, LC3 y ATG16L1 detectados con un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 5nm (señaladas con cabezas de flecha). Las barras representan 150 nm. TEM X 80, 000. Datos generados en un experimento.

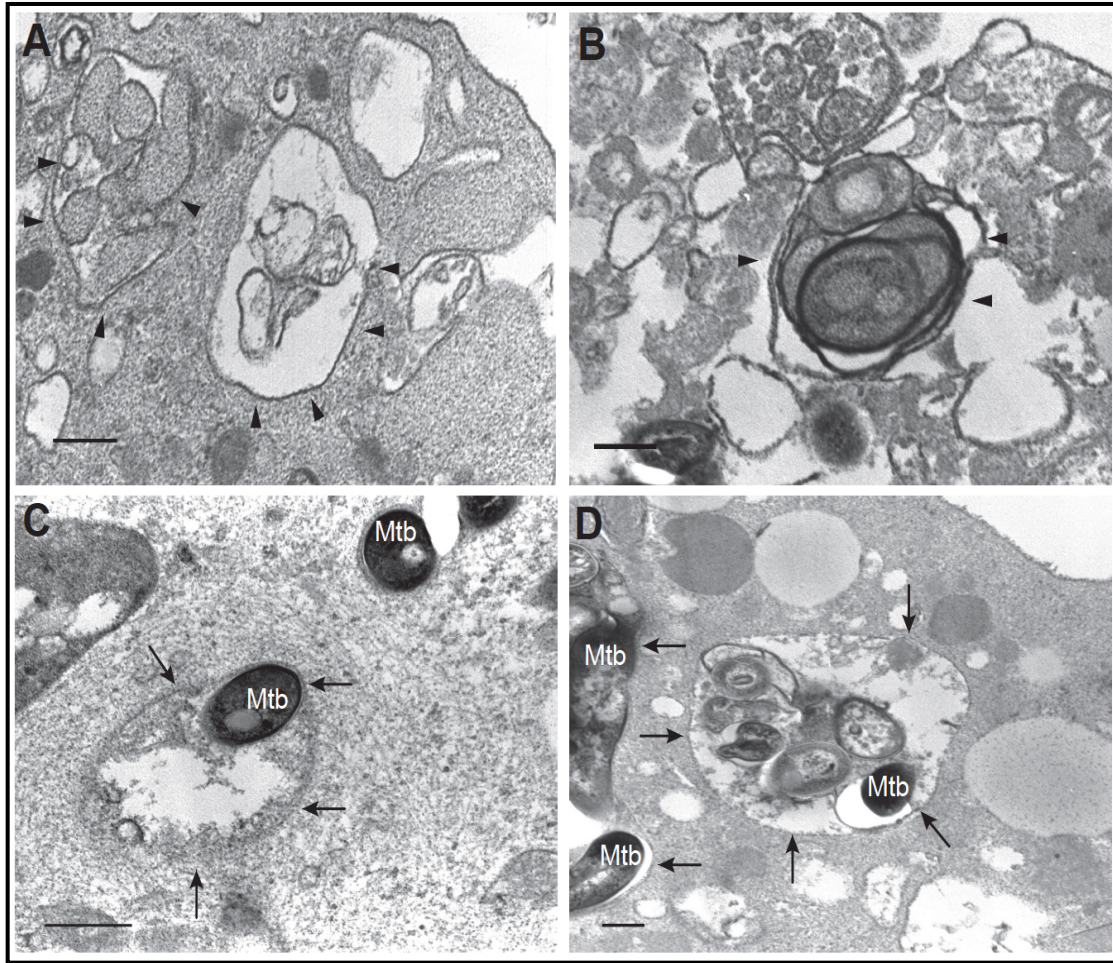


Figura 16. Los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (Mtb) y tratados con MDP post-infección desarrollan vacuolas autofágicas. Las células fueron infectadas a una razón de 5 bacterias por macrófago durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron una hora antes de añadir al cultivo 10 μ g/ml de MDP o medio solo. Las células se incubaron durante 24 h adicionales. La identificación de estructuras características de autofagia como vesículas que contienen organelos (A), y estructuras multivesiculares en “piel de cebolla” (B) se hizo por microscopía electrónica de transmisión convencional (señaladas con cabezas de flecha). Las micobacterias se señalan con flechas (C, D). TEM X 16,000.

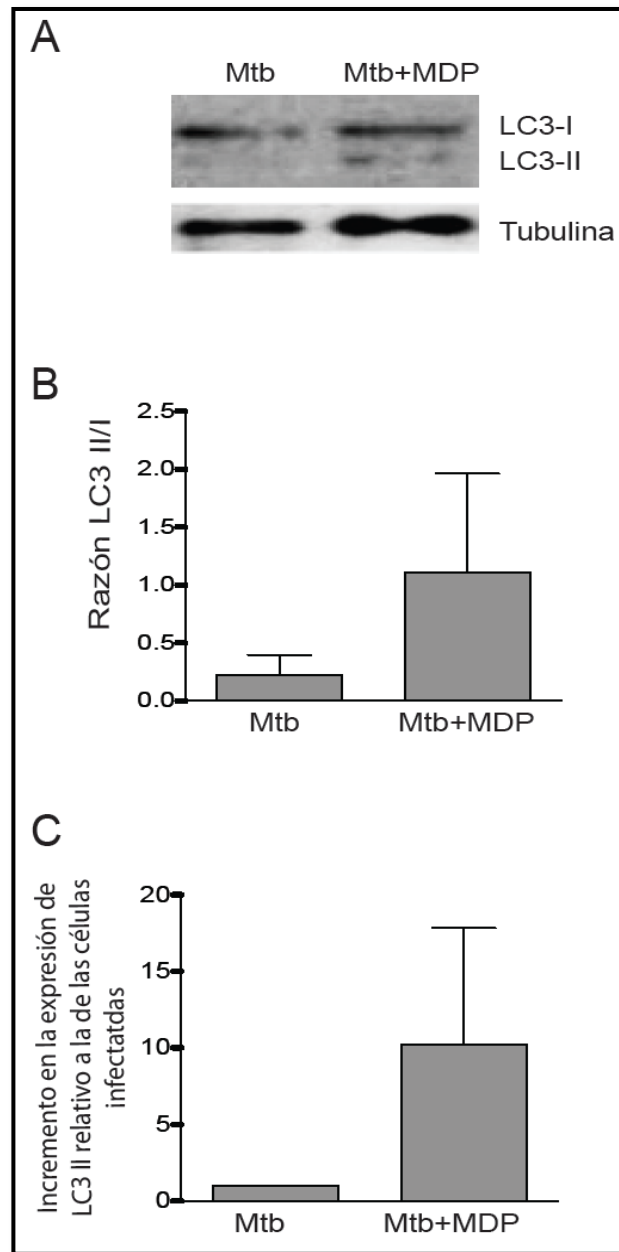


Figura 17. El tratamiento con MDP post-infección induce el corte proteolítico de LC3. Las células fueron infectadas a una razón de 1 bacteria por 20 macrófagos durante 1 h. Las bacterias no fagocitadas se lavaron exhaustivamente y las células se incubaron una hora antes de añadir al cultivo 10µg/ml de MDP o medio solo. Las células se incubaron durante 24 h adicionales. La determinación de la proteína se hizo por inmunoblot en extractos citoplásmicos. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes (A). El incremento en la cantidad de proteína se calculó por densitometría y se reporta como relativo a la de las células sin estimular y normalizado con la expresión de tubulina, n=3; las barras representan la media \pm SEM (D).

DISCUSIÓN

El estudio sobre la respuesta iniciada por el reconocimiento de patógenos a través de receptores de la familia NLR ha cobrado interés, especialmente en el contexto de patógenos respiratorios intracelulares. En modelos murinos la deficiencia de NOD1 y NOD2 se refleja en la pérdida de la capacidad antimicrobiana e incremento en la severidad de enfermedades respiratorias infecciosas [9, 90, 91]. Investigaciones recientes señalan la relevancia que NOD1 podría tener en la respuesta del macrófago alveolar humano aunque se conoce poco de él y el papel de NOD2 está pobremente caracterizado. En este trabajo se investigó la presencia de NOD1 y NOD2 en macrófagos alveolares primarios humanos y su papel en la inducción de una respuesta de perfil antimicrobiano que incluye la producción de citocinas proinflamatorias y los efectores de la respuesta antimicrobiana LL37 e IRGM.

Primero se demostró que ambos receptores NOD están presentes en el macrófago alveolar humano. NOD1 y NOD2 están expresados en macrófagos no estimulados tanto a nivel de mRNA como de proteína, y en respuesta a la estimulación con su ligando correspondiente, aumentan su expresión. En el caso particular de NOD2, se demostró que en respuesta a la estimulación con MDP, el receptor se dirige hacia la membrana plasmática, fenómeno se requiere para que exista la señalización del receptor [42].

Posteriormente se observó que ambos receptores inducen la producción y liberación al medio de citocinas proinflamatorias como IL1 β , IL6, IL8 y TNF α pero no la citocina anti-inflamatoria IL10. La producción de TNF α activada por MDP contrasta con la inexistente producción de esta citocina por los macrófagos de ratón en respuesta al ligando de NOD2 [12]. En general, la respuesta de citocinas inducida por ambos NOD fue significativamente menor que la inducida

por LPS, que es un potente inductor de inflamación; esto es de relevancia biológica porque la generación de respuesta innata mediada por los NOD puede ser útil sin el detrimento tisular que acompaña al exceso de inflamación. La producción canónica de IL1 β reportada para monocitos y macrófagos murinos y su participación en la activación de las células de la vecindad es muy importante en el control de la infección por *M. tuberculosis* [85, 92-94]. La alta producción de IL8 que también observamos como respuesta a la activación de los NOD sugiere su participación en el reclutamiento de neutrófilos al pulmón que podría redundar en un incremento en la capacidad de eliminar patógenos [95, 96].

La inducción de una respuesta proinflamatoria sugiere que los macrófagos podrían exhibir un estado bactericida. Al investigar este aspecto de la respuesta innata, en este trabajo se demostró por primera vez que los receptores NOD1 y NOD2 inducen la expresión de los efectores de la respuesta antimicrobiana LL37 e IRGM en el macrófago alveolar humano. Nosotros ya habíamos reportado la inducción de la catelicidina en macrófagos alveolares humanos por mecanismos dependientes de TLR2, TLR4 y TLR9 [62]. Ahora incluimos a NOD1 y NOD2 en el espectro de receptores de la inmunidad innata capaces de desencadenar esta respuesta de péptidos antimicrobianos en el macrófago alveolar. Llama la atención que NOD1 sea un mejor inductor de LL37 que NOD2 y es un fenómeno que merece estudios posteriores.

La enzima IRGM no había sido asociada a los receptores NOD hasta ahora. El hecho de que en este trabajo se haya encontrado como inducible por NOD2 sugiere activación de la vía de autofagia. La enzima IRGM es uno de los componentes de la autofagia y su presencia se ha visto asociada con la eliminación de patógenos intracelulares, incluyendo *M. bovis*, tanto en células humanas como murinas [83, 97, 98]. Por lo tanto, además de la actividad proinflamatoria, los NOD participan en la inducción de componentes que intervienen en mecanismos bactericidas. En consecuencia, investigamos si el

perfil antibacteriano que induce la activación de los receptores NOD en el macrófago alveolar participa en el control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*.

Recientemente se reportó que NOD2 se expresa en macrófagos alveolares humanos y que participa en el control de la infección por la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv y por *M. bovis* cuando es activado por MDP antes de la infección [88], pero los mecanismos responsables de esta respuesta se desconocen. En el presente trabajo se tomó en cuenta que *M. tuberculosis* es capaz de replicarse exitosamente en los macrófagos infectados y decidimos activar a los receptores NOD después de la infección con el objeto de determinar si su ligando posee actividad inmunomoduladora en condiciones de infección. Encontramos que los macrófagos alveolares permiten el crecimiento intracelular de la micobacteria, pero cuando se trataron las células con ligandos de NOD1 y NOD2 por 24h post-infección, el macrófago alveolar controló la replicación intracelular de *M. tuberculosis*.

Para dilucidar los mecanismos involucrados en el control de la infección por *M. tuberculosis* dependiente de los receptores NOD hicimos experimentos adicionales. Debido al gran número de células requerido para estos experimentos nos limitamos a estudiar solamente el papel de NOD2. La dosis infectante utilizada fue baja, sin embargo el macrófago fue permisivo para su crecimiento intracelular, pues a los 4 días post-infección el incremento en la carga bacteriana intracelular fue substancial. La infección por sí misma no activó ninguno de los mecanismos de la respuesta innata que hemos descrito. En cambio, cuando se trataron los macrófagos infectados con MDP por 24h post-infección se observó una producción significativa de IL6 y TNF α y la sobreexpresión de LL37 e IRGM. Es posible que la micobacteria virulenta inhiba algunos mecanismos de la respuesta innata y esta inhibición puede ser revertida por adición de MDP sugiriendo que el ligando de NOD2 tiene potencial para ser

utilizado como inmunomodulador. El aumento en la expresión de LL37 e IRGM podría estar asociado al control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* porque LL37 tiene actividad bactericida directa contra la micobacteria [99] y el proceso de autofagia inducido por IRGM participa en la eliminación intracelular de la micobacteria [83, 100, 101], aunque se requieren experimentos adicionales para comprobarlo.

La autofagia es un mecanismo de degradación enzimática que participa en numerosos procesos como presentación de antígeno, maduración fagosomal y degradación alterna de patógenos intracelulares [102]. La autofagia se activa por mecanismos dependientes de los TLR y de la señalización del receptor de IFN γ [103]. La señalización de NOD1 y NOD2 también participa en la activación de autofagia; ambos inducen el reclutamiento de la proteína de autofagia ATG16L1 al sitio de entrada del patógeno en macrófagos murinos y células epiteliales humanas [104]. La inducción de autofagia por NOD2 de manera dependiente de Rip2 y ATG16L1 ya se había descrito en células dendríticas derivadas de monocitos humanos [105], pero su participación en el macrófago alveolar humano no había sido descrita hasta ahora. En el presente trabajo demostramos que el tratamiento con MDP en los macrófagos infectados activa el proceso de autofagia. Esto se demostró mediante la observación de (1) la conversión de LC3 I en LC3 II, indicativo de que formaron autofagosomas, (2) el reclutamiento dependiente de Rip2 de las proteínas IRGM, LC3 y ATG16L1 a la vesícula que contiene a la micobacteria y (3) la formación de elementos subcelulares característicos de la autofagia como vesículas grandes con contenido de organelos y cuerpos multivesiculares lamelares en “piel de cebolla” [89, 106].

En conjunto, nuestros resultados nos permiten proponer un modelo de activación de NOD2 cuando se usa MDP como tratamiento post-infección *in vitro* (Fig. 18). La infección por *M. tuberculosis* es exitosa, se establece intracelularmente, pero el tratamiento con MDP post-infección activa tanto a la célula infectada como a

las células adyacentes para producción de citocinas proinflamatorias que amplifican la respuesta inmune y permiten el reclutamiento de otras células al sitio de infección. La activación de NOD2 también induce autofagia, proceso mediante el cual se generan vesículas grandes que engloban a la micobacteria y la exponen a degradación enzimática para su posterior eliminación.

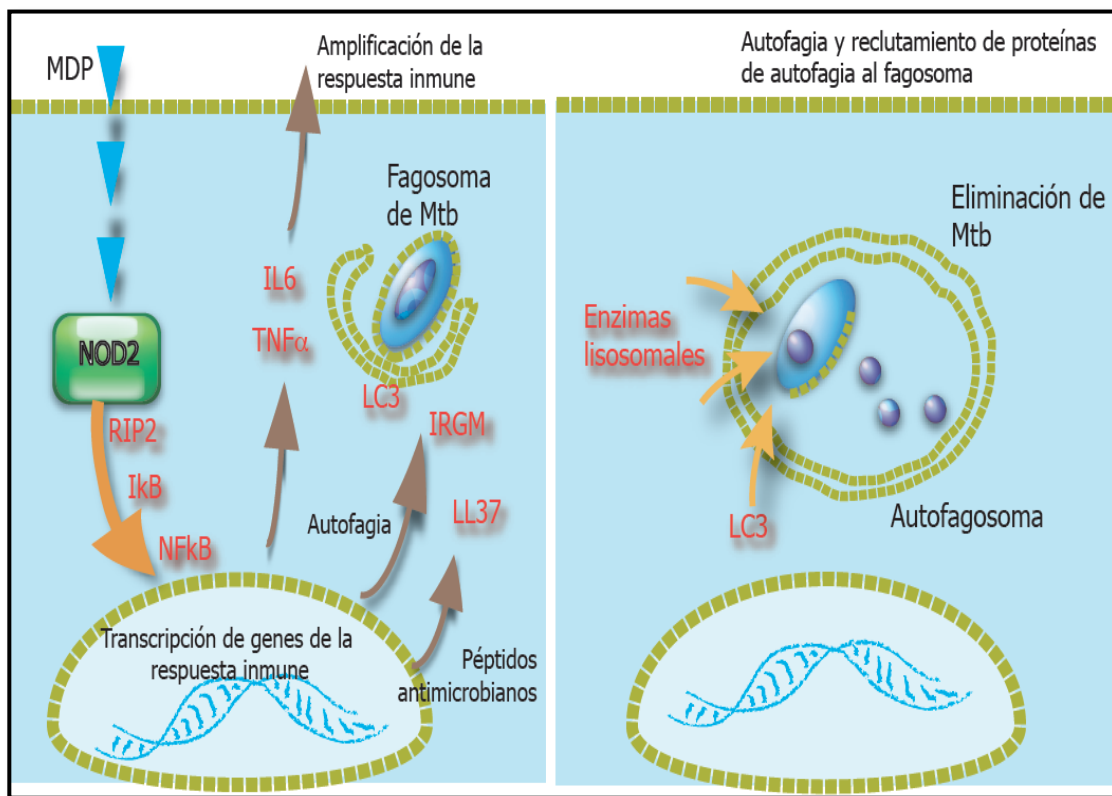


Figura 18. Modelo propuesto para activación de NOD2 en macrófagos infectados. La infección por *M. tuberculosis* es exitosa, se establece intracelularmente, pero el tratamiento con MDP post-infección activa tanto a la célula infectada como a las células adyacentes para producción de citocinas proinflamatorias que amplifican la respuesta inmune y permiten el reclutamiento de otras células al sitio de infección. La activación de NOD2 también induce la autofagia, proceso mediante el cual se generan vesículas grandes que engloban a la micobacteria y la exponen a degradación enzimática para su posterior eliminación.

CONCLUSIONES

- 1.- NOD1 y NOD2, como parte del repertorio de receptores del macrófago alveolar humano, inducen la producción de citocinas proinflamatorias en respuesta al reconocimiento de su ligando.
- 2.- NOD1 y NOD2 inducen la sobre-expresión de la catelicidina LL37 y de la enzima de autofagia IRGM en respuesta a su ligando.
- 3.- La activación de NOD1 y NOD2 por su ligando después de la infección por *M. tuberculosis* induce la producción de $TNF\alpha$ y se asocia con el control de la replicación intracelular de la micobacteria.
- 4.- La activación de NOD2 por su ligando sintético después de la infección con *M. tuberculosis* activa una gama de mecanismos de la respuesta innata que incluyen la producción de las citocinas proinflamatorias $TNF\alpha$ e IL6, el péptido antimicrobiano LL37, y el proceso de autofagia.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten proponer proyectos que profundicen en el conocimiento de la respuesta innata desencadenada por los receptores NOD1 y NOD2. Tenemos algunos experimentos preliminares que nos motivan a continuar esta línea de investigación en un futuro cercano y que se describen a continuación.

Perspectivas para NOD1

Nuestros resultados revelaron que la activación de NOD1 por su ligando induce un incremento en la expresión de los efectores de la respuesta antimicrobiana (Figs. 7 y 8) y participa en el control de la infección con *M. tuberculosis* (Fig. 10). Por lo tanto, los mecanismos involucrados en esta respuesta contra un patógeno que carece de ligandos para NOD1 en su pared celular adquiere gran importancia. En un futuro estudiaremos si la activación de NOD1 también induce el proceso autofágico en respuesta al reconocimiento de su ligando. En la figura 19 muestro uno de los ensayos preliminares en el que, además de la respuesta del macrófago alveolar (MA) se incluyó la determinación del incremento en la expresión de marcadores de autofagia en macrófagos derivados de monocitos de sujetos sanos (MDM). La ventaja de observar el mismo patrón de respuesta entre ambos tipos celulares radica en la posibilidad de utilizar células sanguíneas para la descripción de los mecanismos inducibles por NOD1.

Otra ventaja de observar una respuesta similar entre MA y MDM es que el número de células y voluntarios no es limitante por lo que se pueden explorar otros aspectos de la respuesta de los receptores tipo NOD. Por ejemplo, se ha reportado que la totalidad de la respuesta inflamatoria inducible por NOD2 en MDM humanos depende de la liberación de IL1 β [107]. Si esto también fuera

cierto para NOD1, significaría que el nivel de respuesta y manipulación de la misma se centra en una sola ruta de señalización, la vía de la caspasa 1, la cual permite la liberación de la forma biológicamente activa de la IL1 β . Esta información es relevante si se pretende bloquear o potenciar alguno de los efectos de NOD1 con fines terapéuticos o profilácticos. Continuaremos con esta línea de investigación porque tiene potencial en el desarrollo de inmunomoduladores.

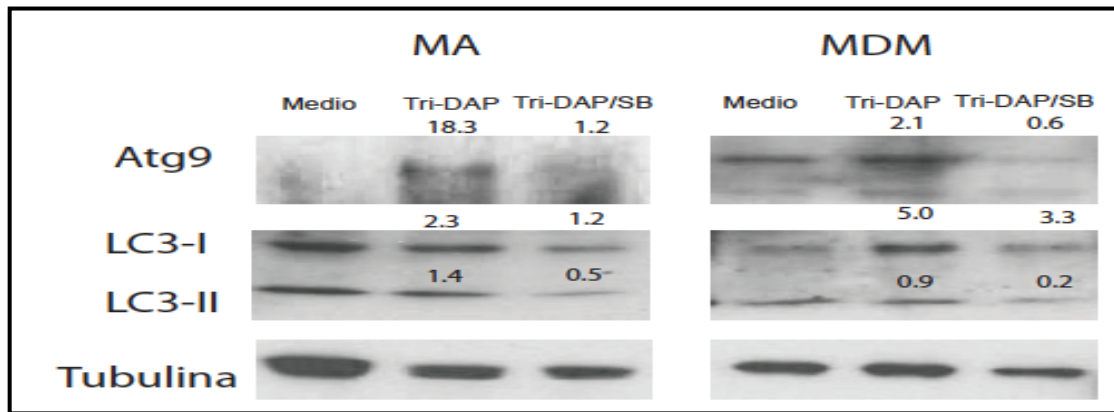


Figura 19. La activación de NOD1 induce un incremento en la expresión de proteínas de autofagia en macrófagos alveolares (MA) y macrófagos derivados de monocitos (MDM). Las células fueron estimuladas con 5 μ g/ml de Tri-DAP en presencia o ausencia del inhibidor de Rip2/p38 SB 203580 (SB) durante 24h. Las proteínas de autofagia Atg9 y LC3 I y II se detectaron por inmunoblot en extractos citoplásmicos. Se muestra el resultado de un experimento. El incremento en la cantidad de proteínas indicado en cada banda se calculó por densitometría y se reporta como relativo a las células sin estimular normalizadas con tubulina.

Perspectivas para NOD2

La respuesta que encontramos en macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis* inducida por el tratamiento con MDP post-infección sugiere que uno de los mecanismos bactericidas importantes del macrófago humano es la autofagia y que NOD2 es susceptible de ser utilizado como blanco de inmunomoduladores. Estudiar el espectro completo de la respuesta inducida por NOD2 puede arrojar información definitiva sobre el uso del MDP como inmunomodulador. Ya se ha intentado obtener derivados del MDP como adyuvantes [108]. En el corto plazo estudiaremos este fenómeno *in vivo* en modelos animales y en modelos de infección *in vitro* con metodologías de mayores alcances para el esclarecimiento de mecanismos moleculares.

Dos antecedentes sobre el papel inmunomodulador de NOD2 indican que (1) este receptor sinergiza con TLR2 y TLR4 para la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos humanos cuando los ligandos se administran simultáneamente y (2) los macrófagos derivados de monocitos humanos entran en estado de tolerancia después de una exposición crónica a ligandos de TLR4 o de NOD2 y este efecto deja a los macrófagos incapaces de responder con producción de citocinas a una re-estimulación cruzada con los mismos ligandos de TLR4 o de NOD2 [92, 109]. Para investigar si NOD2 tiene un efecto sinérgico con TLR4 para la producción de TNF α en macrófagos alveolares, se hizo un ensayo preliminar y nuestros resultados sugieren que NOD2 tiene un efecto modulador de la respuesta inflamatoria inducida por LPS en macrófagos alveolares humanos pero no sinérgico, sino controlador (Figura 20). Tomando en cuenta que la regulación del proceso inflamatorio a nivel alveolar es deseable, estos resultados justifican que en un futuro cercano se investigue a fondo el potencial inmunomodulador del MDP.

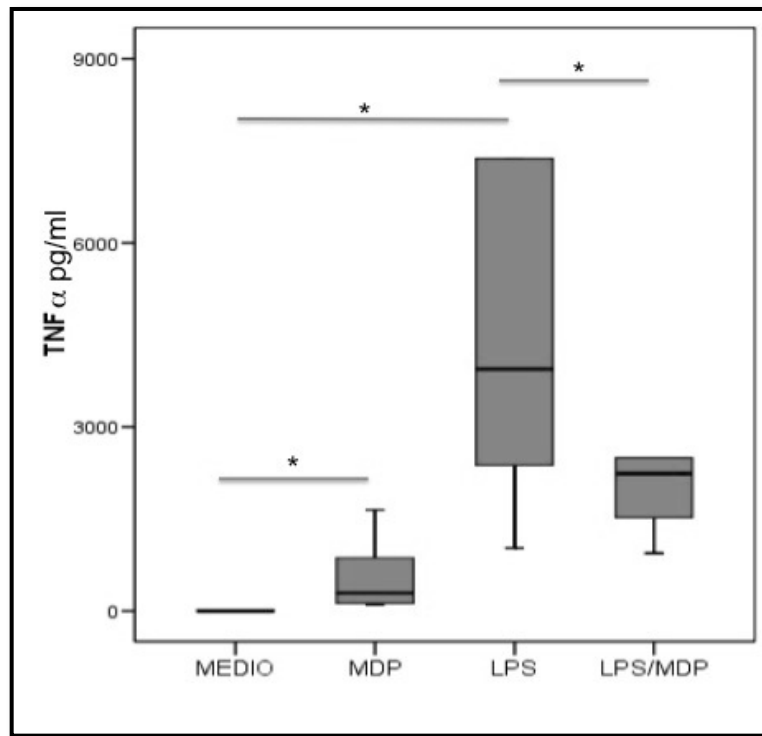


Figura 20. La activación de NOD2 reduce la producción de TNF α inducida por LPS en macrófagos alveolares humanos. Las células se estimularon con 100ng/ml de LPS durante 1 h. Las células se lavaron para eliminar el LPS del medio y se añadieron 10 μ g/ml de MDP al cultivo por otras 24h. La producción de TNF α se cuantificó en el sobrenadante del cultivo por ELISA, n=6.*p<0.05.

REFERENCIAS

1. S Thoma-Uszynski, S Stenger, O Takeuchi, MT Ochoa, M Engele, PA Sieling, PF Barnes, M Rollinghoff, PL Bolcskei, M Wagner, et al: **Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors.** *Science* 2001, **291**:1544-7.
2. R Haase, CJ Kirschning, A Sing, P Schrottner, K Fukase, S Kusumoto, H Wagner, J Heesemann, K Ruckdeschel: **A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages.** *J Immunol* 2003, **171**:4294-303.
3. EL Wissinger, J Saldana, A Didierlaurent, T Hussell: **Manipulation of acute inflammatory lung disease.** *Mucosal Immunol* 2008, **1**:265-78.
4. PS Lenert: **Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9.** *Mediators Inflamm* 2010, **2010**:986596.
5. A Bafica, CA Scanga, CG Feng, C Leifer, A Cheever, A Sher: **TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis.** *J Exp Med* 2005, **202**:1715-24.
6. W Love, N Dobbs, L Tabor, JW Simecka: **Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a major role in innate resistance in the lung against murine Mycoplasma.** *PLoS One* 2010, **5**:e10739.
7. P Mendez-Samperio, L Belmont, E Miranda: **Mycobacterium bovis BCG Toll-like receptors 2 and 4 cooperation increases the innate epithelial immune response.** *Arch Med Res* 2008, **39**:33-9.
8. B Rivas-Santiago, E Juarez: **[Toll-like receptor in lung response to pathogens].** *Rev Invest Clin* 2007, **59**:481-8.
9. K Shimada, S Chen, PW Dempsey, R Sorrentino, R Alsabeh, AV Slepkin, E Peterson, TM Doherty, D Underhill, TR Crother, et al: **The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against Chlamydomphila pneumoniae lung infection.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000379.
10. J Coers, RE Vance, MF Fontana, WF Dietrich: **Restriction of Legionella pneumophila growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:2344-57.
11. WR Berrington, R Iyer, RD Wells, KD Smith, SJ Skerrett, TR Hawn: **NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to Legionella pneumophila.** *Eur J Immunol* 2010, **40**:3519-27.
12. M Divangahi, S Mostowy, F Coulombe, R Kozak, L Guillot, F Veyrier, KS Kobayashi, RA Flavell, P Gros, MA Behr: **NOD2-deficient mice have impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection through defective innate and adaptive immunity.** *J Immunol* 2008, **181**:7157-65.
13. PR Taylor, L Martinez-Pomares, M Stacey, HH Lin, GD Brown, S Gordon: **Macrophage receptors and immune recognition.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:901-44.
14. S Akira, S Uematsu, O Takeuchi: **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* 2006, **124**:783-801.
15. E Vivier, B Malissen: **Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited.** *Nat Immunol* 2005, **6**:17-21.
16. J Berube, C Bourdon, Y Yao, S Rousseau: **Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells.** *Cell Signal* 2009, **21**:448-56.
17. JH Fritz, RL Ferrero, DJ Philpott, SE Girardin: **Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease.** *Nat Immunol* 2006, **7**:1250-7.

18. LA O'Neill: **How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know.** *Curr Opin Immunol* 2006, **18**:3-9.
19. A Pluddemann, S Mukhopadhyay, S Gordon: **The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands.** *Expert Rev Mol Med* 2006, **8**:1-25.
20. S Mukhopadhyay, J Herre, GD Brown, S Gordon: **The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors.** *Immunology* 2004, **112**:521-30.
21. E Raz: **Organ-specific regulation of innate immunity.** *Nat Immunol* 2007, **8**:3-4.
22. AO Amer, BG Byrne, MS Swanson: **Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes.** *Autophagy* 2005, **1**:53-8.
23. K Rohmann, T Tschernig, R Pabst, T Goldmann, D Dromann: **Innate immunity in the human lung: pathogen recognition and lung disease.** *Cell Tissue Res* 2011, **343**:167-74.
24. N Chaudhuri, I Sabroe: **Basic science of the innate immune system and the lung.** *Paediatr Respir Rev* 2008, **9**:236-42.
25. C von Garnier, LP Nicod: **Immunology taught by lung dendritic cells.** *Swiss Med Wkly* 2009, **139**:186-92.
26. PG Holt, DH Strickland, ME Wikstrom, FL Jahnsen: **Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:142-52.
27. SB Gordon, RC Read: **Macrophage defences against respiratory tract infections.** *Br Med Bull* 2002, **61**:45-61.
28. Y Sibille, HY Reynolds: **Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury.** *Am Rev Respir Dis* 1990, **141**:471-501.
29. BG Zani, K Kojima, CA Vacanti, ER Edelman: **Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:7046-51.
30. PG Holt, D Britten, JD Sedgwick: **Suppression of IgE responses by antigen inhalation: studies on the role of genetic and environmental factors.** *Immunology* 1987, **60**:97-102.
31. B Lo, S Hansen, K Evans, JK Heath, JR Wright: **Alveolar epithelial type II cells induce T cell tolerance to specific antigen.** *J Immunol* 2008, **180**:881-8.
32. AE Leitch, R Duffin, C Haslett, AG Rossi: **Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa.** *Mucosal Immunol* 2008, **1**:350-63.
33. C Delclaux, E Azoulay: **Inflammatory response to infectious pulmonary injury.** *Eur Respir J Suppl* 2003, **42**:10s-14s.
34. JA Bartlett, AJ Fischer, PB McCray, Jr.: **Innate immune functions of the airway epithelium.** *Contrib Microbiol* 2008, **15**:147-63.
35. B Rivas-Santiago, SK Schwander, C Sarabia, G Diamond, ME Klein-Patel, R Hernandez-Pando, JJ Ellner, E Sada: **Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells.** *Infect Immun* 2005, **73**:4505-11.
36. X Zhang, DM Mosser: **Macrophage activation by endogenous danger signals.** *J Pathol* 2008, **214**:161-78.
37. P Griebel, G Mutwiri, B Singh: **Innate immunity: complex specificity.** *Cell Tissue Res* 2011, **343**:1-4.
38. E Juarez, C Nunez, E Sada, JJ Ellner, SK Schwander, M Torres: **Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes.** *Respir Res* 2010, **11**:2.
39. S Benko, DJ Philpott, SE Girardin: **The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors.** *Cytokine* 2008, **43**:368-73.
40. L Franchi, N Warner, K Viani, G Nunez: **Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense.** *Immunol Rev* 2009, **227**:106-28.
41. A Grubman, M Kaparakis, J Viala, C Allison, L Badea, A Karrar, IG Boneca, L Le Bourhis, S Reeve, IA Smith, et al: **The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of Helicobacter pylori by antimicrobial peptides.** *Cell Microbiol* 2010, **12**:626-39.

42. N Barnich, JE Aguirre, HC Reinecker, R Xavier, DK Podolsky: **Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition.** *J Cell Biol* 2005, **170**:21-6.
43. S Lala, K Dheda, JS Chang, JF Huggett, LU Kim, MA Johnson, GA Rook, S Keshav, A Zumla: **The pathogen recognition sensor, NOD2, is variably expressed in patients with pulmonary tuberculosis.** *BMC Infect Dis* 2007, **7**:96.
44. RJ Pettis, I Hall, D Costa, AJ Hickey: **Aerosol delivery of muramyl dipeptide to rodent lungs.** *AAPS PharmSci* 2000, **2**:E25.
45. ES Lysenko, TB Clarke, M Shchepetov, AJ Ratner, DI Roper, CG Dowson, JN Weiser: **Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing.** *PLoS Pathog* 2007, **3**:e118.
46. VM Vashishtha: **WHO Global Tuberculosis Control Report 2009: Tuberculosis elimination is a distant dream.** *Indian Pediatr* 2009, **46**:401-2.
47. AS Almeida, PM Lago, N Boechat, RC Huard, LC Lazzarini, AR Santos, M Nociari, H Zhu, BM Perez-Sweeney, H Bang, et al: **Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity.** *J Immunol* 2009, **183**:718-31.
48. BK Kang, LS Schlesinger: **Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan.** *Infect Immun* 1998, **66**:2769-77.
49. LS Schlesinger, TM Kaufman, S Iyer, SR Hull, LK Marchiando: **Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis by human macrophages.** *J Immunol* 1996, **157**:4568-75.
50. LE Bermudez, J Goodman: **Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells.** *Infect Immun* 1996, **64**:1400-6.
51. B Abel, N Thieblemont, VJ Quesniaux, N Brown, J Mpagi, K Miyake, F Bihl, B Ryffel: **Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice.** *J Immunol* 2002, **169**:3155-62.
52. J Branger, JC Leemans, S Florquin, S Weijer, P Speelman, T Van Der Poll: **Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice.** *Int Immunol* 2004, **16**:509-16.
53. A Dalpke, J Frank, M Peter, K Heeg: **Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species.** *Infect Immun* 2006, **74**:940-6.
54. D Droemann, T Goldmann, T Tiedje, P Zabel, K Dalhoff, B Schaaf: **Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients.** *Respir Res* 2005, **6**:68.
55. G Fenhalls, GR Squires, L Stevens-Muller, J Bezuidenhout, G Amphlett, K Duncan, PT Lukey: **Associations between toll-like receptors and interleukin-4 in the lungs of patients with tuberculosis.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **29**:28-38.
56. CJ Hertz, Q Wu, EM Porter, YJ Zhang, KH Weismuller, PJ Godowski, T Ganz, SH Randell, RL Modlin: **Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2.** *J Immunol* 2003, **171**:6820-6.
57. R MacRedmond, C Greene, CC Taggart, N McElvaney, S O'Neill: **Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide.** *Respir Res* 2005, **6**:116.
58. SK Schwander, E Sada, M Torres, D Escobedo, JG Sierra, S Alt, EA Rich: **T lymphocytic and immature macrophage alveolitis in active pulmonary tuberculosis.** *J Infect Dis* 1996, **173**:1267-72.
59. AR Martineau, SM Newton, KA Wilkinson, B Kampmann, BM Hall, N Nawroly, GE Packe, RN Davidson, CJ Griffiths, RJ Wilkinson: **Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria.** *J Clin Invest* 2007, **117**:1988-94.
60. BH Tan, C Meinken, M Bastian, H Bruns, A Legaspi, MT Ochoa, SR Krutzik, BR Bloom, T Ganz, RL Modlin, et al: **Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens.** *J Immunol* 2006, **177**:1864-71.

61. B Rivas-Santiago, E Sada, V Tsutsumi, D Aguilar-Leon, JL Contreras, R Hernandez-Pando: **beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection.** *J Infect Dis* 2006, **194**:697-701.
62. B Rivas-Santiago, R Hernandez-Pando, C Carranza, E Juarez, JL Contreras, D Aguilar-Leon, M Torres, E Sada: **Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells.** *Infect Immun* 2008, **76**:935-41.
63. J Uehori, M Matsumoto, S Tsuji, T Akazawa, O Takeuchi, S Akira, T Kawata, I Azuma, K Toyoshima, T Seya: **Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan.** *Infect Immun* 2003, **71**:4238-49.
64. LN Henning, AK Azad, KV Parsa, JE Crowther, S Tridandapani, LS Schlesinger: **Pulmonary surfactant protein A regulates TLR expression and activity in human macrophages.** *J Immunol* 2008, **180**:7847-58.
65. JS Ferguson, JL Martin, AK Azad, TR McCarthy, PB Kang, DR Voelker, EC Crouch, LS Schlesinger: **Surfactant protein D increases fusion of Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes with lysosomes in human macrophages.** *Infect Immun* 2006, **74**:7005-9.
66. CD Gaynor, FX McCormack, DR Voelker, SE McGowan, LS Schlesinger: **Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages.** *J Immunol* 1995, **155**:5343-51.
67. JS Ferguson, DR Voelker, FX McCormack, LS Schlesinger: **Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages.** *J Immunol* 1999, **163**:312-21.
68. S Sturgill-Koszycki, PH Schlesinger, P Chakraborty, PL Haddix, HL Collins, AK Fok, RD Allen, SL Gluck, J Heuser, DG Russell: **Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase.** *Science* 1994, **263**:678-81.
69. E Doz, S Rose, N Court, S Front, V Vasseur, S Charron, M Gilleron, G Puzo, I Fremaux, Y Delneste, et al: **Mycobacterial phosphatidylinositol mannosides negatively regulate host Toll-like receptor 4, MyD88-dependent proinflammatory cytokines, and TRIF-dependent co-stimulatory molecule expression.** *J Biol Chem* 2009, **284**:23187-96.
70. SK Pathak, S Basu, KK Basu, A Banerjee, S Pathak, A Bhattacharyya, T Kaisho, M Kundu, J Basu: **Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages.** *Nat Immunol* 2007, **8**:610-8.
71. EH Noss, RK Pai, TJ Sellati, JD Radolf, J Belisle, DT Golenbock, WH Boom, CV Harding: **Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis.** *J Immunol* 2001, **167**:910-8.
72. M Chen, H Gan, HG Remold: **A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis.** *J Immunol* 2006, **176**:3707-16.
73. SM Behar, M Divangahi, HG Remold: **Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy?** *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**:668-74.
74. SE Girardin, IG Boneca, LA Carneiro, A Antignac, M Jehanno, J Viala, K Tedin, MK Taha, A Labigne, U Zahringer, et al: **Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan.** *Science* 2003, **300**:1584-7.
75. M Chamaillard, M Hashimoto, Y Horie, J Masumoto, S Qiu, L Saab, Y Ogura, A Kawasaki, K Fukase, S Kusumoto, et al: **An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid.** *Nat Immunol* 2003, **4**:702-7.

76. SE Girardin, LH Travassos, M Herve, D Blanot, IG Boneca, DJ Philpott, PJ Sansonetti, D Mengin-Lecreulx: **Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2.** *J Biol Chem* 2003, **278**:41702-8.
77. C Werts, SE Girardin, DJ Philpott: **TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad.** *Cell Death Differ* 2006, **13**:798-815.
78. C Werts, L le Bourhis, J Liu, JG Magalhaes, LA Carneiro, JH Fritz, S Stockinger, V Balloy, M Chignard, T Decker, et al: **Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway.** *Eur J Immunol* 2007, **37**:2499-508.
79. PK Boughan, RH Argent, M Body-Malapel, JH Park, KE Ewings, AG Bowie, SJ Ong, SJ Cook, OE Sorensen, BA Manzo, et al: **Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during Helicobacter pylori infection.** *J Biol Chem* 2006, **281**:11637-48.
80. E Voss, J Wehkamp, K Wehkamp, EF Stange, JM Schroder, J Harder: **NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2.** *J Biol Chem* 2006, **281**:2005-11.
81. M Chamaillard, SE Girardin, J Viala, DJ Philpott: **Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation.** *Cell Microbiol* 2003, **5**:581-92.
82. W Duan, AK Mehta, JG Magalhaes, SF Ziegler, C Dong, DJ Philpott, M Croft: **Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **126**:1284-93 e10.
83. SB Singh, AS Davis, GA Taylor, V Deretic: **Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria.** *Science* 2006, **313**:1438-41.
84. LA Sechi, M Gazouli, J Ikonopoulou, JC Lukas, AM Scanu, N Ahmed, G Fadda, S Zanetti: **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, genetic susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the way ahead.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:5275-7.
85. G Ferwerda, SE Girardin, BJ Kullberg, L Le Bourhis, DJ de Jong, DM Langenberg, R van Crevel, GJ Adema, TH Ottenhoff, JW Van der Meer, et al: **NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis.** *PLoS Pathog* 2005, **1**:279-85.
86. Y Yang, C Yin, A Pandey, D Abbott, C Sasseti, MA Kelliher: **NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2.** *J Biol Chem* 2007, **282**:36223-9.
87. EK Jo: **Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs.** *Curr Opin Infect Dis* 2008, **21**:279-86.
88. MN Brooks, MV Rajaram, AK Azad, AO Amer, MA Valdivia-Arenas, JH Park, G Nunez, LS Schlesinger: **NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG in human macrophages.** *Cell Microbiol* 2011, **13**:402-18.
89. Y Kabeya, N Mizushima, T Ueno, A Yamamoto, T Kirisako, T Noda, E Kominami, Y Ohsumi, T Yoshimori: **LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing.** *Embo J* 2000, **19**:5720-8.
90. WR Berrington, R Iyer, RD Wells, KD Smith, SJ Skerrett, TR Hawn: **NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to Legionella pneumophila.** *Eur J Immunol* 2010.
91. MS Frutuoso, JI Hori, MS Pereira, DS Junior, F Sonego, KS Kobayashi, RA Flavell, FQ Cunha, DS Zamboni: **The pattern recognition receptors Nod1 and Nod2 account for neutrophil recruitment to the lungs of mice infected with Legionella pneumophila.** *Microbes Infect* 2010, **12**:819-27.
92. MG Netea, G Ferwerda, DJ de Jong, T Jansen, L Jacobs, M Kramer, TH Naber, JP Drenth, SE Girardin, BJ Kullberg, et al: **Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release.** *J Immunol* 2005, **174**:6518-23.

93. CW Wieland, S Florquin, JM Pater, S Weijer, T van der Poll: **Interleukin-1 contributes to an effective clearance of Mycobacterium kansasii from the respiratory tract.** *Microbes Infect* 2006, **8**:2409-13.
94. A Novikov, M Cardone, R Thompson, K Shenderov, KD Kirschman, KD Mayer-Barber, TG Myers, RL Rabin, G Trinchieri, A Sher, et al: **Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1beta production in human macrophages.** *J Immunol* 2011, **187**:2540-7.
95. TA Zola, ES Lysenko, JN Weiser: **Mucosal clearance of capsule-expressing bacteria requires both TLR and nucleotide-binding oligomerization domain 1 signaling.** *J Immunol* 2008, **181**:7909-16.
96. TB Clarke, KM Davis, ES Lysenko, AY Zhou, Y Yu, JN Weiser: **Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity.** *Nat Med* 2010, **16**:228-31.
97. AO Amer, MS Swanson: **Autophagy is an immediate macrophage response to Legionella pneumophila.** *Cell Microbiol* 2005, **7**:765-78.
98. SB Singh, W Ornatowski, I Vergne, J Naylor, M Delgado, E Roberts, M Ponpuak, S Master, M Pilli, E White, et al: **Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:1154-65.
99. AR Martineau, KA Wilkinson, SM Newton, RA Floto, AW Norman, K Skolimowska, RN Davidson, OE Sorensen, B Kampmann, CJ Griffiths, et al: **IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37.** *J Immunol* 2007, **178**:7190-8.
100. MG Gutierrez, SS Master, SB Singh, GA Taylor, MI Colombo, V Deretic: **Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages.** *Cell* 2004, **119**:753-66.
101. V Deretic, M Delgado, I Vergne, S Master, S De Haro, M Ponpuak, S Singh: **Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2009, **335**:169-88.
102. A Orvedahl, B Levine: **Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases.** *Cell Death Differ* 2009, **16**:57-69.
103. V Deretic: **Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity.** *Curr Opin Immunol* 2009, **21**:53-62.
104. LH Travassos, LA Carneiro, M Ramjeet, S Hussey, YG Kim, JG Magalhaes, L Yuan, F Soares, E Chea, L Le Bourhis, et al: **Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry.** *Nat Immunol* 2009, **11**:55-62.
105. R Cooney, J Baker, O Brain, B Danis, T Pichulik, P Allan, DJ Ferguson, BJ Campbell, D Jewell, A Simmons: **NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation.** *Nat Med* 2010, **16**:90-7.
106. S Kageyama, H Omori, T Saitoh, T Sone, JL Guan, S Akira, F Imamoto, T Noda, T Yoshimori: **The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella.** *Mol Biol Cell* 2011, **22**:2290-300.
107. M Hedl, C Abraham: **Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1beta in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages.** *J Biol Chem* 2011, **286**:26440-9.
108. F Coulombe, M Divangahi, F Veyrier, L de Leseleuc, JL Gleason, Y Yang, MA Kelliher, AK Pandey, CM Sasseti, MB Reed, et al: **Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide.** *J Exp Med* 2009, **206**:1709-16.
109. M Hedl, C Abraham: **Secretory mediators regulate Nod2-induced tolerance in human macrophages.** *Gastroenterology* 2011, **140**:231-41.

ANEXOS

Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares

ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL*
 JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ†
 MARTHA TORRES ROJAS*
 EDUARDO SADA DÍAZ* ✉

* Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER).

† Departamento de Investigación en Cáncer Pulmonar, INER.
 Trabajo recibido: 10-XI-2009; aceptado: 21-IV-2010
 Conflicto de intereses: ninguno

RESUMEN

La mucosa del aparato respiratorio es una de las superficies tisulares más expuestas al ambiente externo, por lo que el sistema inmune pulmonar debe proteger al organismo de la presencia de material potencialmente patogénico. Las células responsables de la inmunidad local incluyen a los macrófagos alveolares, que realizan funciones de fagocitosis y quimiotaxis y generan múltiples mecanismos bactericidas, y a las células epiteliales, que también contribuyen a la respuesta innata con producción de quimiocinas, citocinas y péptidos antimicrobianos. Las células de la defensa pulmonar cuentan con un repertorio de receptores para llevar a cabo el reconocimiento de patógenos, entre ellos los TLR, NLR, RLH y algunos otros, los cuales señalizan en respuesta al reconocimiento de patógenos para generar la respuesta inflamatoria y los mecanismos antimicrobianos necesarios para erradicar la infección. El conocimiento obtenido con relación a las interacciones entre los receptores de la inmunidad innata y sus ligandos naturales y sintéticos, así como acerca de la inducción específica de genes por los distintos mecanismos de señalización innatos y la participación de las células locales, permite hacer propuestas sobre su manipulación a fin de regular el proceso inflamatorio que, en ocasiones, contribuye al daño pulmonar.

Palabras clave: TLR, NLR, RLH, inmunidad innata.
Key words: TLR, NLR, RLH, innate immunity.

ABSTRACT

The respiratory system's mucous membrane is one of the largest tissue surfaces exposed to the external milieu, and thus the pulmonary immune system must be able to protect the organism from potentially pathogenic agents. Cells responsible for local immunity include alveolar macrophages, which perform phagocytosis and chemotaxis and generate multiple bactericidal mechanisms, and epithelial cells, which also contribute to the innate response by producing chemokines, cytokines and antimicrobial peptides. Cells committed to lung defense have a repertoire of receptors to recognize pathogens, including TLR, NLR, and RLH, among others. After recognizing pathogens these receptors produce intracellular signaling to generate the inflammatory response and the antimicrobial mechanisms necessary for eradication of the infection. The knowledge that has been obtained on interactions of innate immunity receptors with their natural and synthetic ligands, as well as on the specific induction of genes by mechanisms of innate signaling and the participation of local cells, allows the proposal of their manipulation in order to regulate the inflammatory process that may occasionally contribute to lung damage.

366

INTRODUCCIÓN

El aparato respiratorio, con superficie de 150 m² y un volumen de 350 litros de aire respirados por hora, enfrenta un gran reto para la respuesta inmune porque mientras cumple su función primordial de intercambio de gases, interactúa simultáneamente con una variedad de microorganismos o sus componentes que entran con la respiración. En estas circunstancias, la fisiología y anatomía del aparato dan forma a la magnitud y umbral de activación de la respuesta innata responsable del reconocimiento de los microorganismos que logran acceso al espacio alveolar, así como de desencadenar los mecanismos efectoros que eliminen al agente infeccioso.¹

El parénquima pulmonar incluye a las células epiteliales, células dendríticas y en el espacio alveolar se localizan los macrófagos alveolares. En el pulmón, el resultado de la infección depende críticamente de la invasión y colonización de los macrófagos durante la infección primaria de microorganismos inhalados debido a que son los macrófagos alveolares los responsables de fagocitar y eliminar a los agentes infecciosos utilizando mecanismos bactericidas, como péptidos antimicrobianos, mientras producen mediadores solubles como quimiocinas y citocinas que activan a leucocitos y magnifican la respuesta inmune.^{2,3} Esta es la razón por la que los mecanismos de la inmunidad innata iniciados de manera inmediata en el macrófago han recibido tanto interés.

Se ha propuesto que cada órgano desencadena su respuesta innata de manera particular en función de tres factores.⁴ Primero, la carga bacteriana presente determina el umbral de activación de los receptores de la inmunidad innata en cada órgano. Tanto el hígado como el intestino son órganos con mayor exposición natural a microorganismos y sus productos y, en ambos órganos, la respuesta innata tiende a manifestarse con una inflamación controlada; por lo tanto, las células dendríticas plasmacitoides del hígado y los macrófagos del intestino responden a componentes bacterianos con una limitada respuesta inflamatoria en comparación con las mismas células localizadas en el bazo.^{5,6} Segundo, los perfiles de expresión de los receptores de la inmunidad innata son distintos en cada órgano; p. ej., la

expresión de los receptores innatos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 y TLR5 se manifiestan en tejido pulmonar, mientras que en células epiteliales intestinales sólo se expresan TLR3 y TLR5; y en neumocitos tipo II, lo hacen TLR1, TLR2 y TLR4.^{7,8} Tercero, los receptores de la inmunidad innata originalmente descritos en las células fagocíticas, también se expresan en otras células permitiéndoles participar en la regulación del microambiente.⁹ Lo anterior refleja la importancia de definir con precisión los mecanismos innatos que participan en el reconocimiento y eliminación de patógenos en el pulmón.

La respuesta inmune innata se caracteriza por ser inmediata, esta propiedad se la confieren sus receptores. El reconocimiento de microorganismos se realiza a través de receptores que tienen alta afinidad por estructuras químicas, como lípidos, carbohidratos, péptidos y ácidos nucleicos presentes en los microorganismos a los que se les ha denominado patrones moleculares asociados a patógenos; son llamados así porque son estructuras típicamente invariables que se encuentran en casi todos los microorganismos.

A estos receptores especializados se les ha denominado receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR, por sus siglas en inglés). Los PRR se encuentran distribuidos con perfiles particulares en cada tipo de célula, pero su función es la misma independientemente de su localización celular; además, un solo receptor genera una respuesta celular mediante su interacción con varios ligandos que son estructuralmente distintos. No obstante, el nivel de especificidad de los PRR es tan fino que dos PRR distintos distinguen porciones de una misma molécula y no entrecruzan sus respuestas.¹⁰ Una vez activados, los PRR disparan eventos de señalización intracelular que llevan a la producción de mediadores de la inflamación.¹¹ Las dos familias de PRR más estudiadas son los TLR (del inglés *toll like receptors*) y los NLR (del inglés *NOD like receptors*);^{12,13} pero existen otros PRR cuya participación en la respuesta a la infección cada vez se conocen mejor, entre ellos, las helicasas tipo RIG, lectinas tipo C, receptores purinérgicos, *scavenger* y otros.¹⁴

En este trabajo realizaremos una breve descripción de las células que participan en la

defensa innata del pulmón; posteriormente, revisaremos los receptores de la respuesta inmune innata, particularmente las familias de receptores TLR y NLR y, brevemente, algunos otros PRR que participan en los procesos pulmonares infecciosos. Asimismo, comentaremos las aplicaciones y perspectivas que el conocimiento de los mecanismos de reconocimiento y de respuesta de estos receptores permite proponer.

RESPUESTA INNATA PULMONAR

La arquitectura del aparato respiratorio es en sí misma una barrera protectora porque bloquea la entrada a las vías respiratorias bajas de partículas mayores de 5 μm . Los pulmones se pueden dividir en dos compartimentos funcionalmente distintos, los conductos aéreos recubiertos de la mucosa (células epiteliales ciliadas, células caliciformes, células dendríticas, macrófagos y linfocitos intraepiteliales) y el parénquima (alvéolos, donde se realiza el intercambio de gases, que cuenta con células epiteliales alveolares o neumocitos, macrófagos alveolares [$> 90\%$], células dendríticas y linfocitos).¹⁵

El epitelio respiratorio no sólo constituye una barrera física entre el interior del organismo y el ambiente externo, sino que regula diversas funciones como el control y balance del flujo de aire hacia el pulmón, activación de mecanismos inflamatorios, metabolismo y eliminación de agentes inhalados y regulación de la función del músculo liso de las vías respiratorias. Lo anterior se logra porque las células epiteliales pueden producir factores de crecimiento, péptidos antimicrobianos, quimiocinas y citocinas, gases y mediadores lipídicos; a través de esta modulación del microambiente también contribuyen a la reparación del daño del tejido.¹⁶ La mucosa respiratoria está expuesta a una variedad de componentes ambientales no patógenos que son inhalados, por lo que la respuesta inmune hacia los mismos consiste en una respuesta no inflamatoria tipo Th2 o de tolerancia, generalmente llevada a cabo por las células epiteliales alveolares tipo II, quienes tienen la capacidad de incorporar antígeno pero no pueden activar células T debido a que carecen de moléculas coestimuladoras.^{17,18}

El sistema inmune pulmonar también reconoce el material potencialmente patógeno. Una vez que un microorganismo ha logrado el acceso al alvéolo, las células epiteliales y los macrófagos alveolares son los encargados de responder a los invasores. En el pulmón de sujetos sanos, las células predominantes son los macrófagos alveolares, éstos son responsables de la primera respuesta a los microorganismos por medio de la fagocitosis, quimiotaxis y mecanismos bactericidas. Adicionalmente, las células epiteliales también contribuyen a la respuesta innata con producción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, particularmente beta-defensinas.¹⁹ Generalmente esta respuesta involucra el reclutamiento de otras células de la respuesta inmune como los neutrófilos, eosinófilos y monocitos que amplifican la respuesta inflamatoria local y aportan mecanismos antimicrobianos para terminar con la infección.

Tanto los macrófagos alveolares como las células epiteliales alveolares realizan el reconocimiento inicial de los microorganismos invasores a través de los PRR como los TLR y NLR que, aunque participan activamente en la homeostasis pulmonar,²⁰ serán analizados a continuación en un contexto exclusivamente relativo a procesos pulmonares infecciosos.

RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS RESPIRATORIOS POR RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA

En un proceso infeccioso todos los componentes del microorganismo invasor son susceptibles de ser reconocidos por los PRR que se localizan en la membrana plasmática (Figura 1) y por los PRR de localización intracelular (Figura 2). Por otro lado, existe redundancia en el reconocimiento de los patrones moleculares de microorganismos por los diferentes PRR; p. ej., tanto TLR2, TLR1, NOD1 como NOD2 reconocen diferentes porciones de la peptidoglicana.¹¹⁻¹³ Esto confiere ventaja selectiva al organismo, pues con un número finito de receptores se puede defender de un número infinito de patógenos. La redundancia de PRR también implica una mayor modulación de la respuesta inmune por estos receptores. A continuación, analizaremos el papel de los PRR en los

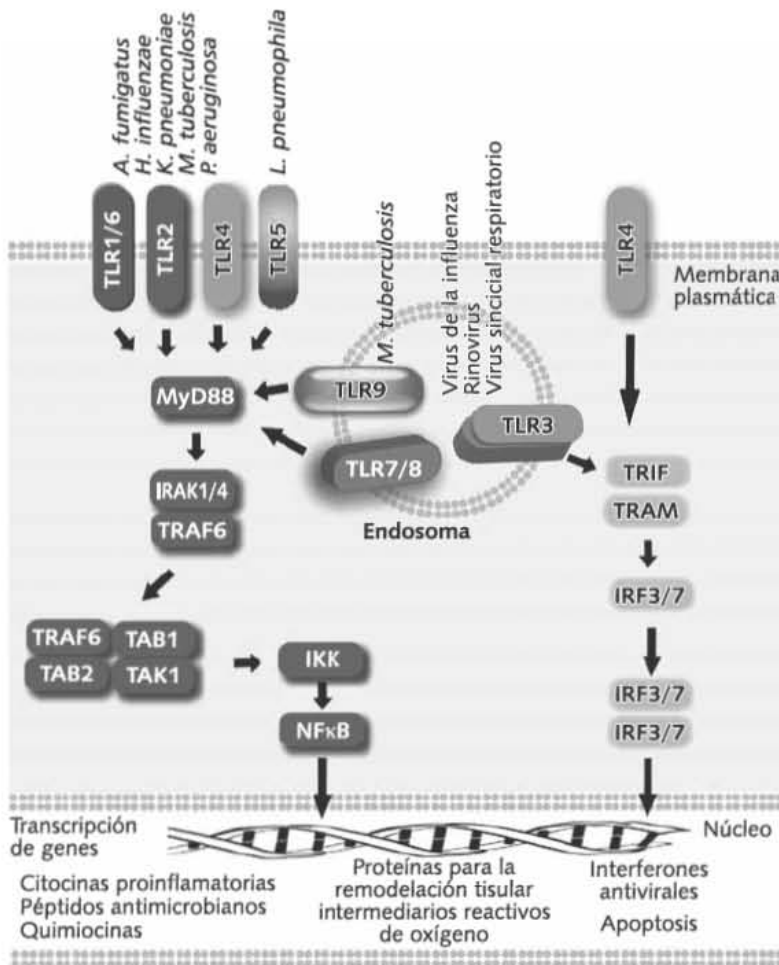


Figura 1. Receptores tipo Toll en el reconocimiento de patógenos pulmonares. Los TLR reconocen una variedad de patrones moleculares conservados en los microorganismos. Enseguida, los receptores inician cascadas de señalización que culminan con la traslocación del $\text{NF}\kappa\text{B}$ al núcleo para la activación de la transcripción de genes correspondientes a los programas inmunológicos disponibles para cada tipo celular.

procesos infecciosos pulmonares analizados por la familia de receptores.

Receptores tipo Toll (TLR)

El pulmón exhibe un patrón de expresión de TLR muy amplio en concordancia con su alto grado de exposición a microorganismos.²¹ Los TLR son moléculas transmembranales que reconocen estructuras microbianas particulares y se expresan en células de las vías respiratorias de diversas estirpes, incluyendo células epiteliales bronquiales, neumocitos tipo II y macrófagos alveolares en donde desencadenan señales intracelulares como consecuencia de dicho reconocimiento. Se han descrito 13 TLR en mamíferos y reconocen una gran variedad de moléculas; TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10 reconocen zimósán, lipopéptidos y peptidoglicanos; TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos

nucleicos y compuestos cíclicos; TLR3 reconoce RNA de doble cadena; TLR4 es el receptor de LPS, mientras TLR5 reconoce flagelina, sin embargo, para algunos TLR se desconoce su ligando.²² Debido a que estas moléculas están ampliamente distribuidas en todos los microorganismos, la diversidad de reconocimiento aumenta aun con un número finito de receptores. En la Tabla I aparecen éstos y otros receptores de localización membranal, así como los patógenos susceptibles de ser reconocidos por ellos.

Los TLR, mediante una cascada de señalización, inducen la expresión de una respuesta inflamatoria posterior al reconocimiento de sus ligandos y participan en el inicio de la respuesta adquirida.^{23,24} La unión de los TLR con su ligando causa dimerización de los receptores. Después de la dimerización, la porción citoplásmica de los TLR se une a diferentes moléculas adaptadoras a

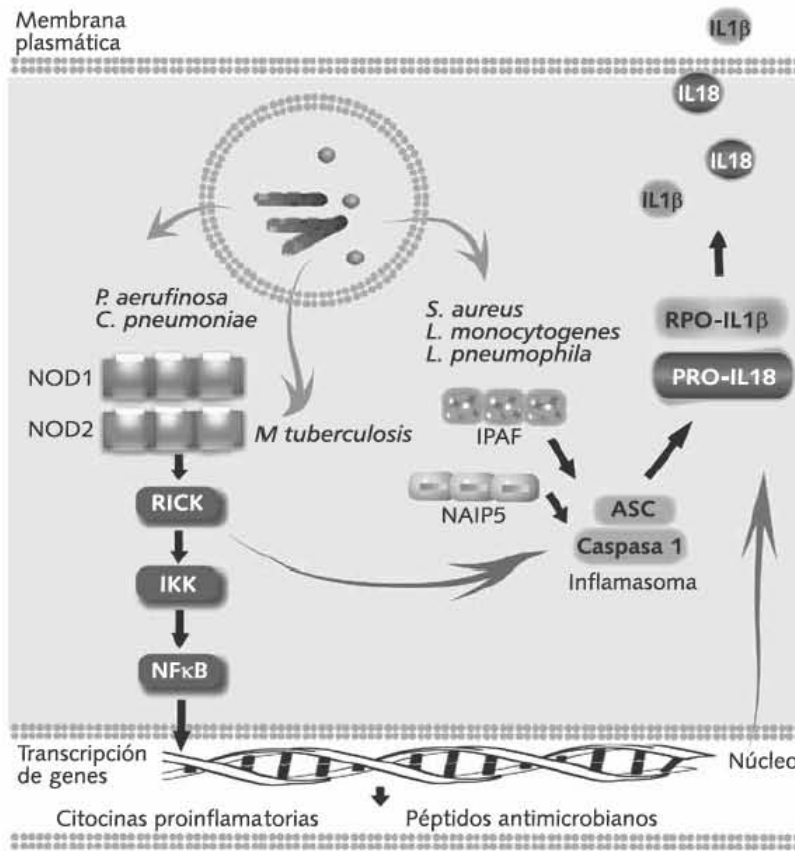


Figura 2. Los receptores tipo NOD participan en el reconocimiento de patógenos respiratorios. Los microorganismos que logran acceso directo o aquellos que pueden traslocar sus productos al citosol son reconocidos por los miembros de la familia NLR. Los receptores NOD1 y NOD2 pueden inducir la producción de citocinas proinflamatorias y de péptidos antimicrobianos, mientras que IPAF y NAIP forman un complejo con la proteína adaptadora ASC y con caspasa 1 (inflammasoma) para generar la forma biológicamente activa de IL1β e IL18.

370

través de su dominio de receptor TLR/IL1 (TIR). El adaptador mejor caracterizado por su participación en la señalización de la mayoría de los TLR es MyD88 (Figura 1), el cual recluta protein-quinasas del receptor de IL1 (IRAK), factor 6 del receptor de TNF (TRAF6) y la cinasa 1 activada por el TGFβ (TAK1). A partir de aquí se activan las cuatro principales vías de señalización: la vía del factor nuclear de transcripción κB (NFκB) y tres vías de protein-quinasa activadas por mitógeno (MAP-quinasas) como ERK1/ERK2, p38 y JNK. TLR3 y TLR4 poseen una vía de señalización independiente de MyD88 y dependiente del activador de interferón asociado al receptor Toll (TRIF) y la molécula asociada al receptor Toll (TRAM).²⁵

Debido a que TLR2 y TLR4 reconocen estructuras lipídicas ampliamente distribuidas, tanto en bacterias gramnegativas como en grampositivas, son de gran importancia en el reconocimiento y resolución de la mayoría de las infecciones bacterianas de las vías respiratorias; p. ej., las células epiteliales bronquiales humanas producen

hBD-4 en respuesta a la infección *in vivo* e *in vitro* con *P. aeruginosa* por un mecanismo dependiente de TLR4, también responden a la infección por neumococo y por microorganismos gramnegativos como *H. influenzae* y *K. pneumoniae* a través de TLR2, TLR4 y NOD1.²⁶

El modelo murino ha permitido conocer la importancia de estos receptores. Los ratones que carecen de MyD88 son incapaces de controlar el crecimiento de patógenos respiratorios intracelulares como *L. pneumophila*, *K. pneumoniae* y *M. tuberculosis* a pesar de tener intacta su capacidad de montar una respuesta inmune adquirida, debido a que MyD88 es la proteína adaptadora de la mayoría de los TLR, este hallazgo remarca la importancia de los distintos TLR en el reconocimiento y control de infecciones pulmonares.^{27,28} Por otro lado, la deficiencia de TLR2 correlaciona con un incremento en la severidad de la enfermedad causada por neumococo y la tasa de mortalidad de meningitis por neumococo.²⁹ Además, TLR4 reconoce a la neumolisina del pneumo-

Tabla I. Receptores de la inmunidad innata de localización membranal y sus ligandos.

Receptor	Ligando	Localización subcelular	Patógenos reconocidos
Receptores tipo Toll			
TLR1	Lipoproteínas triaciladas	Membrana plasmática	<i>A. fumigatus</i>
TLR2	Ácido lipoteicoico, zimosán glicolípidos, glicoinositol-fosfolípidos y glicoproteínas	Membrana plasmática	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>K. pneumoniae</i>
TLR3	RNA de doble cadena, poli I:C	Endosomal	Virus de influenza Virus sincicial respiratorio
TLR4	LPS y lipoproteínas	Membrana plasmática	<i>P. aeruginosa</i>
TLR5	Flagelina	Membrana plasmática	<i>L. pneumophila</i>
TLR6	Lipopéptidos diacilados	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i>
TLR7	RNA de cadena sencilla, compuestos aromáticos sintéticos	Endosomal	Rinovirus
TLR8	RNA de cadena sencilla, imidazol	Endosomal	Virus de influenza Virus sincicial respiratorio
TLR9	DNA de doble cadena no metilado	Membrana plasmática y endosomal	<i>M. tuberculosis</i>
TLR10	Desconocido, sólo en células humanas	Membrana plasmática	
TLR11	Profilina	Membrana plasmática	
TLR12 y TLR13	Desconocido, sólo en células murinas	Desconocida	
Receptores lectina tipo C			
MR	Manosa, fucosa, N -acetil -glucosamina	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i>
DC SIGN	Glicoproteínas, ManLAM	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i>
Dectin -1	Beta-glucanos, zimosán	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i> <i>A. fumigatus</i> <i>P. jiroveci</i>
Receptores scavenger			
MARCO	Lípidos oxidados, ozono	Membrana plasmática	
SRA	Lípidos oxidados, LTA, epóxidos	Membrana plasmática	

TLR: Receptores tipo Toll; LTA: Ácido lipoteicoico.

coco e induce mecanismos que limitan su capacidad de colonización.³⁰ En modelos murinos de infección por *M. tuberculosis*, los TLR estimulan la actividad antimicrobiana de macrófagos infectados induciendo la maduración fagosomal, la producción de LRG47 y los intermediarios reactivos de nitrógeno, todos estos mecanismos permiten la eliminación de la bacteria.³¹

También se ha reportado la participación de los TLR en la respuesta inmune hacia virus; el TLR3 reconoce virus de la influenza, rinovirus y el virus sincicial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés);³² además, en estudios epidemiológicos, se han identificado polimorfismos

en el TLR4 asociados a bronquiolitis severa por RSV.^{33,34} La respuesta pulmonar antiviral, también será analizada más adelante en el contexto de otros receptores de la inmunidad innata.

Receptores tipo NOD (NLR)

Los microorganismos que pueden lograr acceso al citosol por ser invasivos o escapar del fagosoma, o aquellos contenidos en vacuolas que puedan trasladar sus productos al citosol por medio de sistemas de secreción, pueden activar a miembros de la familia NLR. Los NLR reconocen una variedad de patrones moleculares asociados a patóge-

Tabla II. Receptores de la inmunidad innata de localización citoplásmica y sus ligandos.

Receptor	Ligando	Distribución celular	Patógenos reconocidos
Receptores tipo NOD (NLR)			
NOD1	Ácido diaminopimélico (DAP)	Monocitos, macrófagos, neutrófilos células dendríticas, células epiteliales y fibroblastos	<i>P. aeruginosa</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>
NOD2	Muramildipéptido (MDP)	Monocitos, células cebadas, células dendríticas	<i>M. tuberculosis</i> <i>L. monocytogenes</i>
IPAF	Flagelina	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B	<i>L. pneumophila</i>
NALPs	MDP, ATP extracelular, cristales de ácido úrico, RNA bacteriano	Monocitos, células dendríticas y células T y B	
NAIP	Flagelina	Macrófagos	<i>L. pneumophila</i>
Helicasas tipo RIG (RLH)			
RIG-I MDA5	RNA de doble cadena	Células dendríticas convencionales	Virus sincicial respiratorio Virus parainfluenza Virus de influenza Coronavirus

nos similar o complementaria al reconocimiento por TLR (Tabla II). La peptidoglicana (PGN) es reconocida por NOD1/NOD2;³⁵ el receptor IPAF y la proteína neuronal inhibidora de apoptosis (NAIP) reconocen a la flagelina; los miembros de la subfamilia NALP reconocen al muramildipéptido (MDP) y a los adenovirus (no envueltos de DNA de doble cadena) que causan enfermedades respiratorias.³⁶

Los NLR están formados por un dominio de reconocimiento rico en repeticiones de leucina, un dominio central de oligomerización (NOD) y un dominio de señalización que puede contener dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD), dominios de pirina o dominios de apoptosis del inhibidor de baculovirus que participan en la activación de diferentes vías de señalización (Figura 2). NOD1 y NOD2 se unen a través de su dominio CARD a la protein-cinasa RIP2 (RICK), quien recluta a IRAK2, TRAF6, TAB2 y TAK1 para activación del complejo IKK y la inducción de expresión de genes a través del NF κ B; mientras que otros como IPAF y NALP1-3 parecen tener control postraduccional del procesamiento y secreción de IL1 β e IL18

por un mecanismo dependiente de caspasa 1 y la proteína *speck-like* asociada a la apoptosis portadora de dominio CARD (ASC) denominada inflammasoma.^{37,38}

La familia NLR comprende alrededor de 20 miembros, sin embargo, sólo se ha estudiado la participación de algunos de ellos en el reconocimiento y resolución de la infección por patógenos que causan enfermedades respiratorias. Los macrófagos murinos, así como las células epiteliales alveolares y macrófagos alveolares humanos controlan la replicación intracelular de *L. pneumophila* por un mecanismo dependiente de NAIP5 e IPAF de manera independiente de TLR5, el cual también reconoce a la flagelina.³⁹ *S. pneumoniae* generalmente resistente a la eliminación por parte de los neutrófilos, puede ser eliminado cuando ocurre una coinfección con *H. influenzae*; la eliminación del neumococo ocurre por un mecanismo dependiente de NOD1 e independiente de estallido respiratorio, se ha propuesto que la neumolisina del neumococo crea poros que permiten la entrada de *H. influenzae* y NOD1 puede reconocer *H. influenzae*-PGN y desencadenar mecanismos bactericidas efectivos

para la eliminación del neumococo.⁴⁰ NOD2 parece ser necesario para la eliminación de la infección por *M. tuberculosis* en modelos murinos, aunque su papel es todavía incierto y cuestionable, con implicaciones en etapas crónicas de la enfermedad pulmonar; además, no se ha logrado establecer una asociación entre variantes de NOD2 con susceptibilidad a tuberculosis pulmonar.^{41,42} No obstante, la IL1 β , que es uno de los principales efectores de la respuesta por NLR, es imprescindible para eliminar la infección pulmonar por *M. kansasii* y *M. tuberculosis* también en modelos murinos, así como para la remodelación pulmonar, por lo que es probable que estos receptores tengan un papel relevante en las enfermedades causadas por estos patógenos.^{43,44}

La administración en aerosol de MDP (ligando de NOD2) a cobayos activa a los macrófagos alveolares y les permite responder más rápido a estímulos posteriores con la producción de óxido nítrico, respuesta que confirma la importancia de NOD2 en la actividad del macrófago alveolar.⁴⁵ Las células epiteliales alveolares en condiciones particulares pueden secretar citocinas proinflamatorias en respuesta a agonistas de TLR2, TLR4, NOD1 y NOD2.⁴⁶ Asimismo, NOD2 induce la expresión de los péptidos antimicrobianos beta-defensinas en células epiteliales humanas,⁴⁷ lo cual indica la importancia de estos receptores en la regulación de la respuesta inmune.

Receptores helicasas tipo RIG (RLH)

La proteína citoplásmica inducible por el ácido retinoico I (RIG-I) es una helicasa de RNA. Posee un dominio de reconocimiento de RNA de doble cadena y tiene dos dominios CARD de señalización que activan al factor regulador del interferón 3 (IRF3) y la vía que culmina con la traslocación del NF κ B al núcleo (Tabla II, Figura 3). Su función consiste en bloquear la replicación viral a través de producción de IFN β . Otro receptor relacionado es la proteína del gen asociado a la diferenciación del melanoma 5 (MDA5) también llamada helicard, a su vez, posee un dominio de helicasa y dos dominios CARD. Otra helicasa de RNA es LPG2, que por no contener dominios CARD se considera que es un regulador negativo de RIG-I y MDA5. RIG-I y MDA5

tienen en común el adaptador mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) en su cascada de señalización que activa al NF κ B y a distintos IRF para la producción de interferones antivirales, además, de inducir la apoptosis de las células infectadas mediante la activación de la caspasa 9.^{48,49}

RIG-I y MDA5 reconocen al RSV, y los ratones deficientes en su adaptador MAVS no pueden recuperarse de la infección por este virus a pesar de tener niveles de células T CD8⁺ y producción de IFN normal.⁵⁰ Poco se conoce del papel de estos receptores en infecciones respiratorias, uno de los trabajos más extensos es el de Kobasa *et al*, quienes estudiaron estos receptores en un modelo de infección en primates no humanos (*Macaca fascicularis*) con una cepa reconstruida del virus de la influenza de 1918 (i1918). Sus resultados mostraron que la cepa i1918 causa lesiones pulmonares severas acompañadas de bronquiolitis y bronquitis, edema y exudados hemorrágicos en los macacos. Mediante el análisis por microarreglos en tejido pulmonar se encontró que los genes de la respuesta inmune, proliferación y remodelación tisular, estaban disminuidos en los macacos infectados con i1918 en comparación con aquellos infectados con una cepa convencional de la influenza humana. También se observó que los genes de la respuesta inflamatoria mediada por quimiocinas y citocinas se transcriben tardíamente en los macacos infectados con i1918 y los genes de los interferones antivirales están regulados a la baja. En estos macacos no se transcribieron los genes de RIG-I ni MDA-5 y, posiblemente, esta es la causa de la deficiencia en la respuesta innata observada.⁵¹

Lo anterior remarca la importancia de la inmunidad innata en la evolución de la enfermedad, no sólo porque se requiere el desarrollo de la respuesta inflamatoria inicial, sino porque tanto TLR7 como RIG son necesarios para la respuesta celular y humoral específica contra el virus de la influenza.⁵² Es posible que los RLH sean un blanco de componentes del virus de influenza cuya función es la evasión de la respuesta inmune, como se ha demostrado para la proteína M del coronavirus que causa el síndrome agudo respiratorio severo, esta proteína bloquea la respuesta de RIG-I y MDA5 como mecanismo de evasión de la respuesta inmune.⁵³

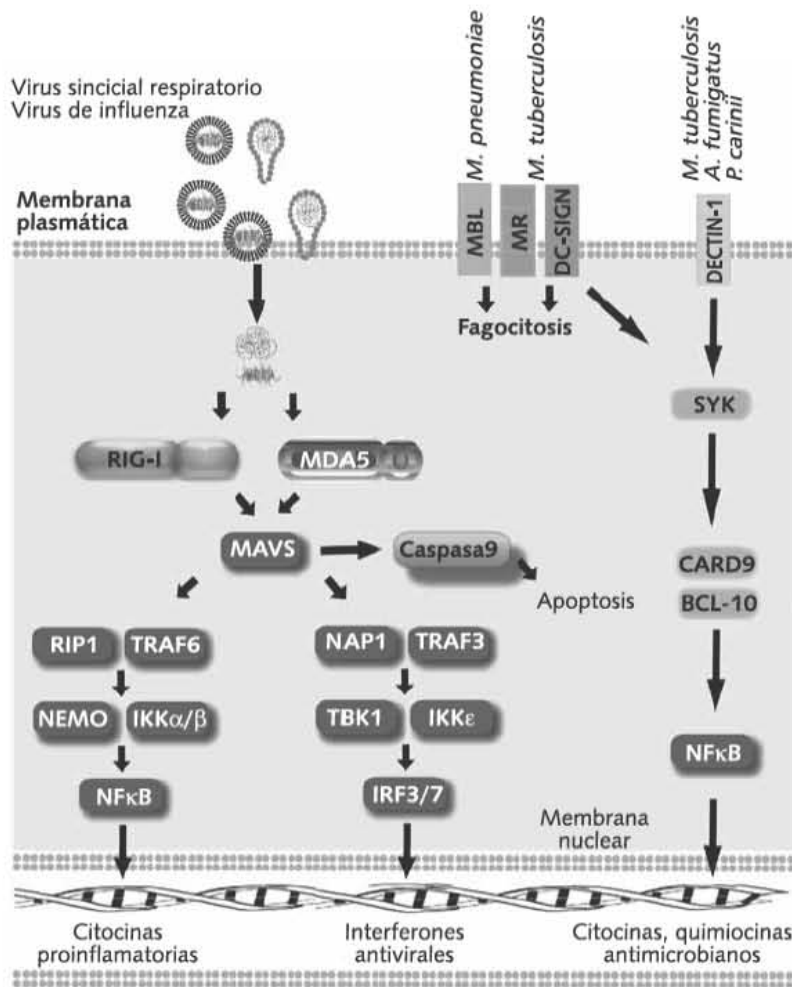


Figura 3. Receptores de la respuesta pulmonar antiviral, antibacteriana y antifúngica. Las helicasas de RNA (RLH) RIG-I y MDA5 son responsables de la inmunidad antiviral complementaria a la respuesta por TLR 7/8, mientras que los miembros de la familia de las lectinas tipo C (CLR), reconocen carbohidratos presentes en bacterias y hongos. Ambas familias de receptores contribuyen a la producción de efectores antimicrobianos.

374

Receptores lectina tipo C (CLR)

Los CLR son una familia de receptores que reconocen carbohidratos como N-acetilglucosamina, manosa, N-acetilmanosamina, mucosa y glucosa (Tabla I, Figura 1). Algunos tienen actividad bactericida como Reg III que se une a la PGN de bacterias grampositivas y regula la colonización del intestino murino. Muchos están expresados en células de origen mieloide como monocitos y células dendríticas. Algunos CLR como dectina-1 y la No-integrina unida a ICAM3 específica de células dendríticas (DC-SIGN) participan en la fagocitosis, maduración fagosomal y producción de intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno, producción de IL10 y derivados del ácido araquidónico.^{54,55}

Dectin-1 es un CLR que reconoce beta-glucanos que se encuentran en la pared celular de hongos; además de regular la expresión de citocinas proinflamatorias, es un receptor de fagocitosis.⁵⁶ Aunque TLR2 y TLR4 reconocen conidias e hifas de *A. fumigatus*, los ratones deficientes en ellos y en MyD88 aún se pueden defender de este hongo mediante dectin-1, el cual se recluta al fagosoma y señala para producción de TNF α y MIP-2.⁵⁷ Dectin-1 reconoce *A. fumigatus* en su etapa de crecimiento. Los tubos germinales y las hifas tienen β -glucano expuesto y esto favorece el reconocimiento por dectin-1, con la subsecuente producción de citocinas proinflamatorias y la producción de intermediarios reactivos del oxígeno para eliminar la infección. Este tipo de inmunidad antifúngica también se ha observado para *P. jirovecii*.⁵⁸

Existen otras lectinas tipo C cuya función principal descrita es la fagocitosis, aunque algunas de ellas parecen generar señales que llegan al núcleo para transcripción de genes. La lectina de unión a manosa (MBL) participa en la defensa contra *M. pneumoniae*, quien al no tener una pared celular de peptidoglicana no puede ser reconocido por TLR, pero sí posee material capsular reconocido por MBL.⁵⁹ MBL también participa en el reconocimiento de *M. tuberculosis*, reconoce carbohidratos de superficie y favorece la opsonización, fagocitosis y activación de la cascada del complemento.⁶⁰ Otros CLR también participan en la fagocitosis de *M. tuberculosis* tales como DC-SIGN y el receptor de manosa.^{61,62}

LOS PRR COMO BLANCO DE TERAPIA INMUNOMODULADORA

La información obtenida de la activación de los PRR por distintos ligandos en distintos compartimentos del organismo ha sido de gran utilidad en el conocimiento de los procesos inflamatorios, ha permitido orientar la investigación aplicada hacia sectores particulares de la inmunidad contra agentes infecciosos.

Ligandos de PRR con actividad de adyuvante

Los ligandos de PRR se proponen como adyuvantes de vacunas por sus características inmunogénicas y por la selectividad de la respuesta local. Se ha demostrado que la unión de los TLR y NLR con sus ligandos dirige la diferenciación de la respuesta de células T hacia Th1.²⁷ Los ligandos de TLR también promueven la inducción de respuesta inmune de mucosas y la sistémica cuando son administrados como adyuvantes en inmunizaciones intranasales.⁶³ La estimulación de la respuesta innata en el momento de la vacunación induce la generación de IFN $\alpha\beta$ indispensable para el control de infecciones virales, así como para la generación de células citotóxicas CD8+.⁶⁴ Se ha demostrado que un análogo del MDP (ligando de NOD2) al ser administrado como adyuvante de vacunas participa en la inducción de inmunidad sistémica.⁶⁵

Ligandos de PRR como moderadores de la inflamación

La característica fundamental del reconocimiento de ligandos por los PRR específicos es la inflamación; por lo tanto, la modulación de la inflamación pulmonar es un blanco terapéutico potencial, p. ej., se ha reportado que los macrófagos murinos quedan insensibles al reconocimiento y eliminación de bacterias después de la estimulación con LPS (agonista de TLR4), pero si son estimulados con agonistas de NOD1 y NOD2 su capacidad bactericida, medido por la eliminación de *L. monocytogenes* se restaura sin que haya incremento en la inflamación.⁶⁶ Recientemente en un estudio de terapia génica en el modelo murino se reportó que la inhibición de NF κ B (principal activador de genes de la respuesta inflamatoria), impide la neumonía causada por *P. aeruginosa* sugiriendo que el bloqueo de la señalización por PRR juega un papel importante en la modulación de la inflamación.⁶⁷ Por otro lado, se ha demostrado que el bloqueo de la señalización del receptor dectin-1 mantiene activada la vía de las MAP-cinasas aumentando la producción de citocinas proinflamatorias, demostrando la importancia de este receptor en la modulación de la respuesta inflamatoria.⁶⁸

CONCLUSIÓN

Se sabe que los PRR reconocen microorganismos patogénicos y no patogénicos, así como componentes generados por estrés celular y daño no microbiano. Por ello, es importante continuar las investigaciones que permitan comprender su participación en el contexto específico de los microorganismos que causan enfermedades pulmonares, sobre todo porque algunos procesos infecciosos por virus como el de la influenza o el RSV deja a los macrófagos alveolares temporalmente incapaces de responder a ligandos de TLR, incrementando la susceptibilidad del individuo a infecciones bacterianas subsecuentes.⁶⁹

Con base a esto, el concepto de respuesta inmune órgano-específica propuesto por Raz⁴ donde sugiere que cada órgano tiene una respuesta innata, así como un umbral de activación de la respuesta innata, específicos y que ambos de-

penden del grado de esterilidad del órgano, cobra un interés especial; de manera tal, que la investigación acerca de cómo ocurre la inducción específica de genes por los distintos mecanismos de señalización innato y la participación de células locales, especialmente el macrófago alveolar, podríamos hoy empezar a aprender cómo modificarlos para lograr mejoras en la resolución de los procesos infecciosos pulmonares.

REFERENCIAS

1. Von Garnier C, Nicod LP. *Immunology taught by lung dendritic cells*. Swiss Med Wkly 2009;139:186-192.
2. Gordon SB, Read RC. *Macrophage defences against respiratory tract infections*. Br Med Bull 2002;61:45-61.
3. Sibille Y, Reynolds HY. *Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury*. Am Rev Respir Dis 1990;141:471-501.
4. Raz E. *Organ-specific regulation of innate immunity*. Nat Immunol 2007;8:3-4.
5. Castellaneta A, Sumpter TL, Chen L, Tokita D, Thomson AW. *NOD2 ligation subverts IFN-alpha production by liver plasmacytoid dendritic cells and inhibits their T cell allostimulatory activity via B7-H1 up-regulation*. J Immunol 2009;183:6922-6932.
6. Shen R, Richter HE, Clements RH, et al. *Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 Infection*. J Virol 2009;83:3258-3267.
7. Zarembek KA, Godowski PJ. *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. J Immunol 2002;168:554-561.
8. Cario E, Podolsky DK. *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. Infect Immun 2000;68:7010-7017.
9. Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. *Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries*. Circulation 2008;118:1276-1284.
10. Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. *Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different Aspergillus fumigatus cellular states*. J Immunol 2006;176:3717-3724.
11. Berubé J, Bourdon C, Yao Y, Rousseau S. *Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells*. Cell Signal 2009;21:448-456.
12. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. *Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease*. Nat Immunol 2006;7:1250-1257.
13. O'Neill LA. *How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know*. Curr Opin Immunol;2006;18:3-9.
14. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol 2005;23:901-944.
15. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. *Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract*. Nat Rev Immunol 2008;8:142-152.
16. Zani BG, Kojima K, Vacanti CA, Edelman ER. *Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair*. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:7046-7051.
17. Lo B, Hansen S, Evans K, Heath JK, Wright JR. *Alveolar epithelial type II cells induce T cell tolerance to specific antigen*. J Immunol 2008;180:881-888.
18. Holt PG, Sedgwick JD. *Suppression of IgE responses following inhalation of antigen: a natural homeostatic mechanism which limits sensitization to aeroallergens*. Immunol Today 1987;8:14-15.
19. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, et al. *Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells*. Infect Immun 2005;73:4505-4511.
20. Bohnenkamp HR, Papazisis KT, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. *Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses*. Cell Immunol 2007;247:72-84.
21. Nishimura M, Naito S. *Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes*. Biol Pharm Bull 2005;28:886-892.
22. Roach JC, Glusman G, Rowen L, et al. *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:9577-9582.
23. Akira S, Takeda K, Kaisho T. *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol 2001;2:675-680.
24. Iwasaki A, Medzhitov R. *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol 2004;5:987-995.
25. Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MK. *The role of TLR activation in inflammation*. J Pathol 2008;214:126-135.
26. Yanagi S, Ashitani J, Ishimoto H, et al. *Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection*. Respir Res 2005;6:130.
27. Archer KA, Roy CR. *MyD88-dependent responses involving toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of Legionella pneumophila in a mouse model of Legionnaires' disease*. Infect Immun 2006;74:3325-3333.
28. Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B. *Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88*. J Clin Invest 2004;114:1790-1799.
29. Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. *Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae men-*

- ingitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 2002;186:798-806.
30. Malley R, Henneke P, Morse SC, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1966-1971.
 31. Shi S, Blumenthal A, Hickey CM, Gandotra S, Levy D, Ehrh S. Expression of many immunologically important genes in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages is independent of both TLR2 and TLR4 but dependent on IFN- α receptor and STAT1. *J Immunol* 2005;175:3318-3328.
 32. Kang MJ, Lee CG, Lee JY, et al. Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2771-2784.
 33. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, et al. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004;189:2057-2063.
 34. Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, et al. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol* 2007;179:3177-3177.
 35. Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, et al. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 2004;5:1000-1006.
 36. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* 2008;214:161-178.
 37. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006;6:9-19.
 38. Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Núñez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005;74:355-383.
 39. Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, et al. NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol* 2008;180:6808-6815.
 40. Ratner AJ, Aguilar JL, Shchepetov M, Lysenko ES, Weiser JN. Nod1 mediates cytoplasmic sensing of combinations of extracellular bacteria. *Cell Microbiol* 2007;9:1343-1351.
 41. Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, et al. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2008;181:7157-7165.
 42. Gandotra S, Jang S, Murray PJ, Salgame P, Ehrh S. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2007;75:5127-5134.
 43. Wieland CW, Florquin S, Pater JM, Weijer S, van der Poll T. Interleukin-1 contributes to an effective clearance of *Mycobacterium kansasii* from the respiratory tract. *Microbes Infect* 2006;8:2409-2413.
 44. Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, et al. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2000;182:902-908.
 45. Pettis RJ, Hall I, Costa D, Hickey AJ. Aerosol delivery of muramyl dipeptide to rodent lungs. *AAPS PharmSci* 2000;2:E25.
 46. Uehara A, Hirabayashi Y, Takada H. Antibodies to proteinase 3 prime human oral, lung, and kidney epithelial cells to secrete proinflammatory cytokines upon stimulation with agonists to various Toll-like receptors, NOD1, and NOD2. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1060-1066.
 47. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schröder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* 2006;281:2005-2011.
 48. Pippig DA, Hellmuth JC, Cui S, et al. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res* 2009;37:2014-2025.
 49. Lei Y, Moore CB, Liesman RM, et al. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One* 2009;4:e5466.
 50. Bhoj VG, Sun Q, Bhoj EJ, et al. MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14046-14051.
 51. Kobasa D, Jones SM, Shinya K, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 2007;445:319-323.
 52. Koyama S, Ishii KJ, Kumar H, et al. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol* 2007;179:4711-4720.
 53. Siu KL, Kok KH, Ng MH, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKK epsilon complex. *J Biol Chem* 2009;284:16202-16209.
 54. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. Self and nonself recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:33-54.
 55. Valera I, Fernández N, Trinidad AG, et al. Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2008;180:5727-5736.
 56. Hernanz-Falcón P, Joffre O, Williams DL, Reis e Sousa C. Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses. *Eur J Immunol* 2009;39:507-513.
 57. Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, et al. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog* 2005;1:e30.
 58. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 2007;8:39-46.
 59. Hamvas RM, Johnson M, Vlieger AM, et al. Role for mannose binding lectin in the prevention of *Mycoplasma* infection. *Infect Immun* 2005;73:5238-5240.
 60. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003;37:1496-1505.

61. Tailleux L, Pham-Thi N, Bergeron-Lafaurie A, et al. *DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis*. PLoS Med 2005;2:e381.
62. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, et al. *The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis*. J Exp Med 2005;202:987-999.
63. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. *TLR ligands that stimulate the metabolism of vitamin D3 in activated murine dendritic cells can function as effective mucosal adjuvants to subcutaneously administered vaccines*. Vaccine 2008;26:601-613.
64. Martinez-Sobrido L, Gitiban N, Fernandez-Sesma A, et al. *Protection against respiratory syncytial virus by a recombinant Newcastle disease virus vector*. J Virol 2006;80:1130-1139.
65. Chedid LA, Parant MA, Audibert FM, et al. *Biological activity of a new synthetic muramyl peptide adjuvant devoid of pyrogenicity*. Infect Immun 1982;35:417-424.
66. Kim YG, Park JH, Shaw MH, Franchi L, Inohara N, Núñez G. *The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands*. Immunity 2008;28:246-257.
67. Sadikot RT, Zeng H, Joo M, et al. *Targeted immunomodulation of the NF-kappaB pathway in airway epithelium impacts host defense against Pseudomonas aeruginosa*. J Immunol 2006;176:4923-4930.
68. Hernanz-Falcón P, Joffre O, Williams DL, Reis e Sousa C. *Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses*. Eur J Immunol 2009;39:507-513.
69. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, et al. *Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection*. J Exp Med 2008;205:323-329.

✉ **Correspondencia:**

Dr. Eduardo Sada Díaz,
Departamento de Investigación en
Microbiología. Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias Ismael
Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan
4502, colonia Sección XVI. México,
D.F., 14080
Correo electrónico:
eduardosadadiaz@yahoo.com

NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans

Esmeralda Juárez¹, Claudia Carranza¹, Fernando Hernández-Sánchez¹, Juan C. León-Contreras², Rogelio Hernández-Pando², Dante Escobedo³, Martha Torres¹ and Eduardo Sada¹

¹Department of Microbiology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México City, México

²Department of Experimental Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México

³Bronchoscopy Service, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México City, México

A role for the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) receptor in pulmonary innate immune responses has recently been explored. In the present study, we investigated the role that NOD2 plays in human alveolar macrophage innate responses and determined its involvement in the response to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Our results showed that NOD2 was expressed in human alveolar macrophages, and significant amounts of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were produced upon ligand recognition with muramyl dipeptide (MDP). NOD2 ligation induced the transcription and protein expression of the antimicrobial peptide LL37 and the autophagy enzyme IRGM in alveolar macrophages, demonstrating a novel function for this receptor in these cells. MDP treatment of alveolar macrophages improved the intracellular growth control of virulent *M. tuberculosis*; this was associated with a significant release of TNF- α and IL-6 and overexpression of bactericidal LL37. In addition, the autophagy proteins IRGM, LC3 and ATG16L1 were recruited to the bacteria-containing autophagosome after treatment with MDP. In conclusion, our results suggest that NOD2 can modulate the innate immune response of alveolar macrophages and play a role in the initial control of respiratory *M. tuberculosis* infections.

Keywords: Alveolar macrophage • Autophagy • Innate immunity • NOD2 • Tuberculosis



Supporting Information available online

Introduction

The recognition of pathogen-associated molecular patterns by innate immune receptors is essential for the initiation and coordination of the immune mechanisms responsible for host pro-

tection against lung-invading pathogens [1]. The innate immune recognition is based on a limited repertoire of pattern recognition receptors, which sense conserved microbial components known as pathogen associated molecular patterns. The pattern recognition receptors include the members of the Toll-like receptor (TLR) family and the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) proteins (NOD-like receptors, NLRs), among others [2, 3].

The NLR proteins have been demonstrated to play an important role in the defense against respiratory agents, including

Correspondence: Dr. Eduardo Sada
e-mail: eduardosadadiaz@yahoo.com

Pseudomonas aeruginosa, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Mycobacterium tuberculosis* [1,4,5]. The NOD proteins, members of the NLR family, are cytoplasmic receptors implicated in the recognition of bacterial molecules produced during the synthesis and/or degradation of peptidoglycan. Specifically, NOD2 senses the cytosolic presence of muramyl dipeptide (MDP) [6,7]. Activation of NOD2 by bacterial products can stimulate two major signaling pathways to activate caspase-1 and pro-inflammatory responses, including the NF- κ B pathway and the inflammasome pathway [5]. Upon ligand recognition, NOD2 activates the receptor-interacting protein-2 kinase (Rip2), which forms a multiprotein complex via its caspase activation recruitment domains (CARDs). These CARD-CARD interactions lead to NF- κ B nuclear translocation with the consequent initiation of both innate and acquired immune responses and the enzymatic cleavage of pro-IL-1 β , which releases the biologically active form of IL-1 β [8,9]. Murine macrophages and dendritic cells release IL-6, IL-1 β , IL-8, and RANTES following MDP-induced NOD2 activation [10,11]. Human blood mononuclear cells produce the NOD2-dependent inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 [12,13], and chemokines that recruit neutrophils [14,15]. Moreover, the induction of antimicrobial effectors, such as cryptidins and beta-defensins, in human epithelial cells has been associated with NOD2 signaling [16–18].

The contribution of NOD2 to the host response against *M. tuberculosis* and the pathogenesis of mycobacterial infections have both been established at different levels. Polymorphisms in the NOD2 gene confer susceptibility to leprosy and tuberculosis in human populations [19,20]. Monocytes from patients with Crohn's disease that are homozygous for the 3020insC NOD2 mutation lack functional NOD2 and have a severe reduction in their pro-inflammatory cytokine response to *M. tuberculosis* infection, despite an intact TLR response [12,21]. NOD2 recognizes *M. tuberculosis* and not only initiates a cascade of pro-inflammatory cytokines after recognition of the infection but also contributes to *M. tuberculosis* clearance. Data from the NOD2-deficient mouse model suggest that macrophages might control the replication of virulent *M. tuberculosis* during the late stages of the infection in a NOD2-dependent manner [22]. Moreover, recent evidence indicates that pretreatment with the ligand of NOD2 augments pro-inflammatory cytokine production from *M. tuberculosis*-infected human alveolar macrophages, which supports the control of *M. tuberculosis* growth [23]. However, the mechanisms responsible for how NOD2 contributes to antimicrobial responses during a *M. tuberculosis* infection remain unknown.

In this study, we investigated the role of two antimicrobial components in NOD2-driven innate defense in human alveolar macrophages: the autophagy enzyme immunity-related GTPase M protein (IRGM), which has been involved in the clearance of intracellular bacteria including *Mycobacterium bovis* [24,25], and the human cathelicidin peptide LL37, which has been shown to contribute to bactericidal activity against *M. tuberculosis* in macrophages [26,27]. To determine the function of NOD2 in the response of human alveolar macrophages against virulent *M. tuberculosis*, we evaluated whether NOD2 is involved in the induc-

tion of these antimicrobial effectors, namely, IRGM and LL37, and their relative contribution to the control of intracellular growth of *M. tuberculosis*. Here, we provide evidence that NOD2 plays a role in human pulmonary defense.

Results

Human alveolar macrophages express functional NOD2

We examined the presence of NOD2 in the cytosol of alveolar macrophages and evaluated its function after stimulation with MDP. Flow cytometric analysis demonstrated that the NOD2 protein was expressed in freshly isolated alveolar macrophages (Fig. 1A). MDP induced an increase in NOD2 protein levels and a slight increase in I κ B α in the cytosolic fractions of alveolar macrophages (Fig. 1B). MDP stimulation also led to increased NOD2 gene expression (Fig. 1C). We examined the localization of NOD2 by immunoelectron microscopy and observed that the NOD2 protein was homogeneously distributed in the cytosol of unstimulated alveolar macrophages, but migrated to plasma membrane after MDP stimulation of NOD2 (Fig. 1D).

NOD2 induces a release of pro-inflammatory cytokines

To investigate the contribution of NOD2 ligation in the early release of pro-inflammatory mediators, we measured the production of the following cytokines in the supernatant of MDP-stimulated alveolar cell cultures: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN- α 2, and TNF- α . MDP induced a significant release of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in comparison to unstimulated alveolar macrophages ($p < 0.01$, Fig. 2). IL-1 β , IL-6, and IL-10 production was also significantly induced by LPS compared with unstimulated cells and cells stimulated with MDP. The LPS-dependent production of TNF- α was similar to that of MDP stimulation. IL-12p70, IL-17, and IFN- α 2 were not detected in either MDP- or LPS-stimulated cells (data not shown).

LL37 and IRGM are induced after NOD2 activation with MDP

We investigated the potential of the NOD2 receptor to induce the antimicrobial peptide LL37 and the autophagy enzyme IRGM (an ortholog of mouse LRG47) in human alveolar macrophages. Our results showed that MDP treatment resulted in the upregulation of LL37 and IRGM gene expression, which ranged from a 1.43-fold to 30.71-fold increase and a 1.67-fold to 83.71-fold increase, respectively, relative to unstimulated cells (Fig. 3A and D). In addition, immunoblot analysis revealed a slight increase in the protein expression of the LL37 peptide and an increment in IRGM protein expression in the cytosolic fraction of the cells after MDP treatment (Fig. 3B, C, E, and F).

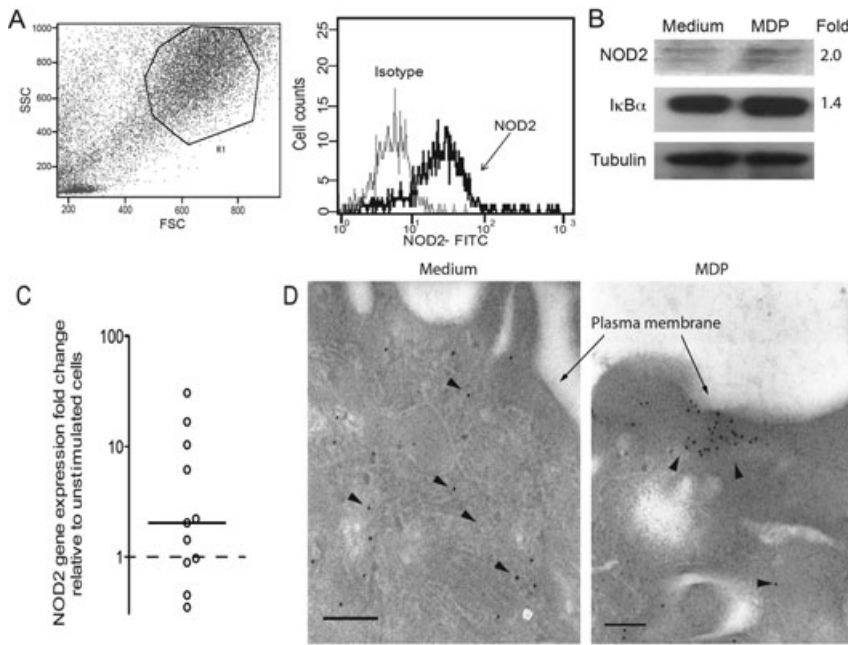


Figure 1. NOD2 accounts for intracellular pathogen sensing receptors in human alveolar macrophages. (A) Intracellular detection of NOD2 (bold line in the histogram plot) was performed by flow cytometry using freshly isolated alveolar macrophages selected from a gate set on large granular bronchoalveolar cells (R1, dot plot). One representative experiment out of three experiments is presented. (B) Cells were stimulated with 10 μ g/mL of MDP for 24 h, and NOD2 and I κ B α proteins were measured in the cytosolic fractions by western blot analysis. The fold increase relative to unstimulated cells and normalized to tubulin of one representative experiment out of three is reported. (C) The upregulation of NOD2 gene expression was assessed by quantitative PCR. The results are depicted as the mean fold change in NOD2 gene expression relative to unstimulated cells ($n = 11$). (D) Subcellular localization of NOD2 was ascertained in unstimulated (left, $\times 80,000$) and MDP-stimulated cells (right, $\times 63,000$) using an anti-NOD2 antibody and detected with a secondary antibody coupled to 5-nm gold particles, indicated with arrowheads. Bar represents 150 nm. Micrographs were obtained from one experiment.

NOD2 activation in *M. tuberculosis*-infected alveolar macrophages improved control of intracellular growth

Mycobacterium tuberculosis survives and replicates inside macrophages, therefore we aimed to determine the contribution of NOD2 activation in the control of *M. tuberculosis* growth after treating infected human alveolar macrophages with MDP. Figure 4A shows that *M. tuberculosis* intracellular growth significantly increased between day 1 and day 4 (intracellular growth increased by 12.2-fold, median 5.5, between day 1 and day 4, $p < 0.05$). However, when the alveolar macrophages were treated with MDP, the macrophages were able to limit the intracellular

growth of *M. tuberculosis* (intracellular growth increased by only 0.5-fold, median 2.8, between day 1 and day 4).

MDP treatment of *M. tuberculosis*-infected alveolar macrophages increased the production of TNF- α and IL-6 and upregulated LL37 and IRGM gene expression

Because alveolar macrophages could limit *M. tuberculosis* growth following NOD2 activation, we examined NOD2-induced cytokine expression to understand the mechanism behind controlled *M. tuberculosis* growth. We measured the release of various cytokines into the supernatant of infected cell cultures following

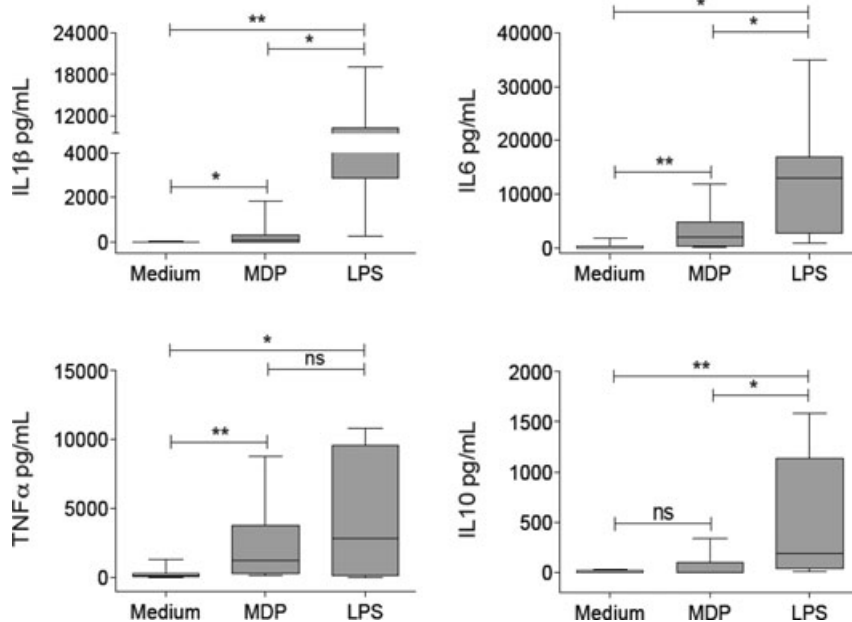


Figure 2. NOD2 ligation in alveolar macrophages induces pro-inflammatory cytokine release. Cells were incubated for 24 h in the presence of 10 μ g/mL of MDP or 100 ng/mL of LPS. Production of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-10 was measured in culture supernatants using Milliplex technology. Depicted are box plots with median values and quartiles for each cytokine. The data are representative of two independent experiments ($n = 11$); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ using the two-tailed Wilcoxon signed-rank test.

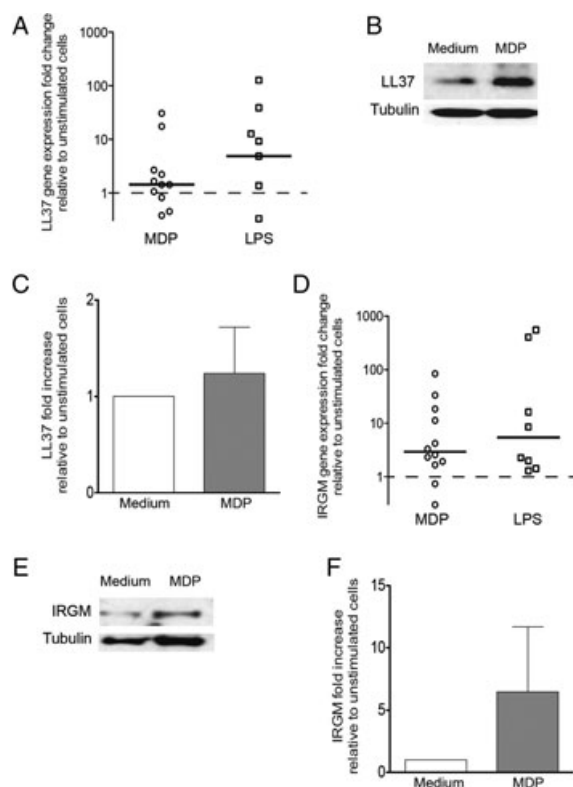


Figure 3. LL37 and IRGM gene expression is upregulated following NOD2 activation (A–D). Alveolar macrophages were incubated in the presence of 10 μ g/mL of MDP or 100 ng/mL of LPS for 24 h. Upregulation of (A) LL37 and (D) IRGM gene expression was assessed after specific ligand recognition by quantitative PCR using the Taqman system and the $\Delta\Delta$ CT method for relative quantification. The fold change in gene expression relative to unstimulated cells is depicted. Data are representative of two independent experiments ($n = 7$ –12). Bold lines indicate median values. (B, E) LL37 and IRGM protein levels were measured in cytosolic fractions by western blot analysis. (C, F) Data are expressed as the protein fold increases relative to unstimulated cells and normalized to tubulin calculated by densitometry and are shown as means \pm SEM. One representative experiment out of three experiments is presented.

treatment with MDP, including IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN- α 2, and TNF- α . The addition of MDP to infected cells induced a significant increase in the production of TNF- α and IL-6, although the production of IL-1 β was not significantly altered (Fig. 4B–D). Stimulation with MDP did not induce the production of IL-10, IL-12p70, IL-17, or IFN- α 2 (data not shown).

In previous experiments, we had shown that LL37 and IRGM were upregulated in alveolar macrophages in response to NOD2 stimulation by MDP (Fig. 3). Infection of alveolar macrophages alone with *M. tuberculosis* induced a slight change in LL37 and IRGM gene expression. However, infected alveolar macrophages significantly increased the gene expression of these antimicrobial molecules after stimulation with MDP ($p < 0.05$, Fig. 4E and F). MDP treatment also induced an increase in LL37 and IRGM amounts (Fig. 4G and H). Our results suggest that MDP stimulation of infected macrophages via NOD2 can activate the pathways that lead to both antimicrobial peptide production and autophagy.

Activation of NOD2 recruits autophagy proteins to *M. tuberculosis*-containing vesicles

To investigate the presence of IRGM in *M. tuberculosis*-containing vesicles, we used immunoelectron microscopy. Our results showed that the alveolar macrophages in the infected-only cells did not recruit IRGM into *M. tuberculosis*-containing vesicles (Fig. 5A). Rather, IRGM was confined in separate vacuoles that were not in contact with the bacilli. In contrast, when alveolar macrophages were treated with MDP, IRGM was co-localized with the *M. tuberculosis*-containing vesicles (arrowheads, Fig. 5B). The quantitative morphometric analysis of IRGM recruitment, measured as gold particles/bacterium, proved to be significant (Fig. 5C, $p < 0.05$). These results suggest a role for NOD2 in the induction of autophagy in human alveolar macrophages.

In addition, the autophagy molecule LC3 was minimally recruited to *M. tuberculosis*-containing vesicles in infected alveolar macrophages, although treatment of these cells with MDP post-infection induced a massive recruitment of LC3 to these vesicles (Fig. 5D–F, $p < 0.05$). The same pattern was observed for the autophagy protein ATG16L1 (Fig. 5G–I, $p < 0.05$). Further, supplementing infected cultures with the Rip2/p38 inhibitor SB203580 prior to treatment with MDP limited the recruitment of IRGM, LC3, and ATG16L1 to mycobacteria-containing vesicles, thereby demonstrating that their co-localization was NOD2-dependent (Supporting Information Fig. 1). The localization of IRGM, LC3, and ATG16L1 to *M. tuberculosis*-containing vesicles indicated that *M. tuberculosis* was either contained in an autophagosome or in a phagosome that had acquired autophagy enzymes.

To characterize the *M. tuberculosis*-containing vesicles, we used conventional electron microscopy. We found large vesicles containing organelles and degraded cell structures in the alveolar macrophage cytosol (Fig. 6A) and in lamellar multivesicular bodies, which are characteristic of autophagy (Fig. 6B). *M. tuberculosis* was identified in large vesicles that also contained these structures. (Fig. 6C and D). We confirmed the autophagy completion by determining the cleavage of soluble LC3-I to form LC3-II (Supporting Information Fig. 2) [28]. Thus, we concluded that *M. tuberculosis* was contained in autophagosomes.

Discussion

There has been an increasing interest in the role of NLRs in the innate defense against intracellular pathogens. The NOD2 receptor has been found to be important for the detection of intracellular pathogens and the initiation of bactericidal responses against them, including *M. tuberculosis* [22, 29]. It was recently reported that NOD2 is expressed by human alveolar macrophages [23], although the role that NOD2 plays in the control of intracellular pathogens in human alveolar macrophages is poorly characterized. In this study, we investigated whether NOD2 is involved in the production of pro-inflammatory cytokines, the induction of antimicrobial responses or cellular autophagy of infected human alveolar macrophages.

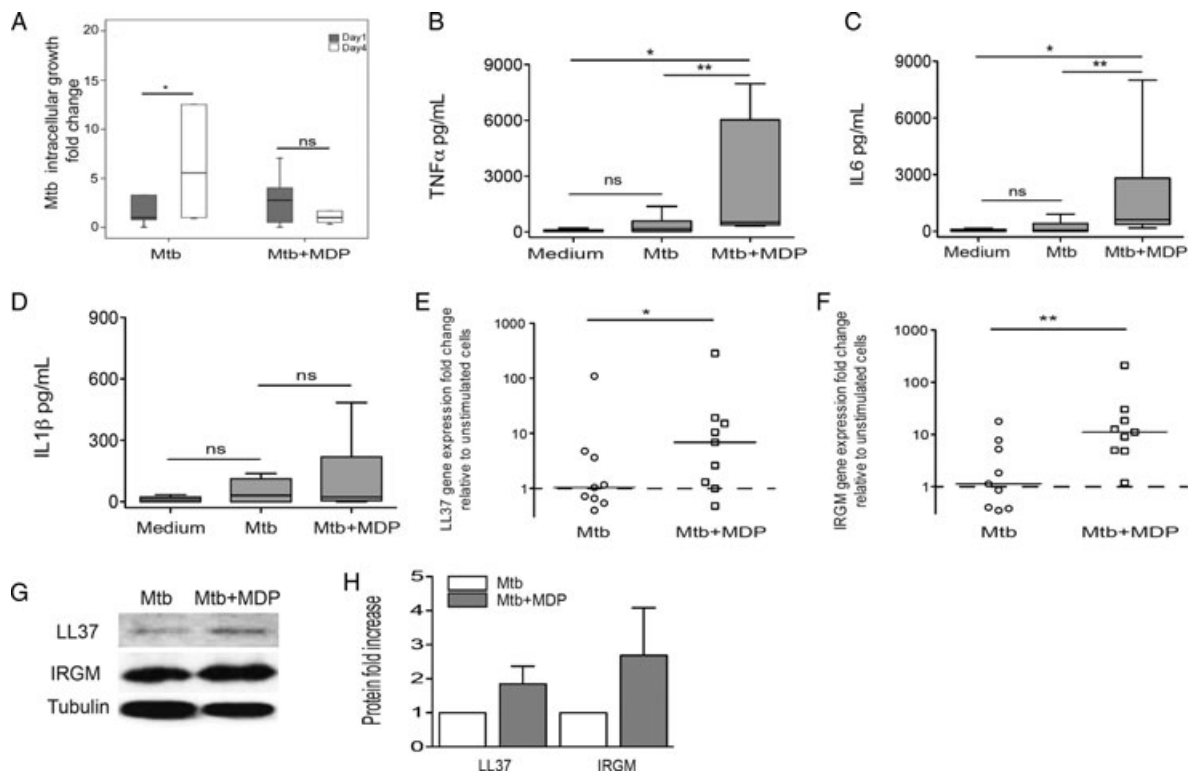


Figure 4. NOD2 activation after *M. tuberculosis* infection induces an antibacterial innate activation profile. Alveolar macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Rv at an infection ratio of 1–2 bacteria/20 macrophages for 1 h. Nonphagocytosed bacteria were washed away, and the macrophages were then treated with 10 μ g/mL of MDP or left with medium alone. (A) Intracellular bacterial burden was measured by quantifying CFU, and the intracellular growth index was calculated after 1 and 4 days post infection relative to phagocytosed bacteria at day 0. Data are shown as medians and quartiles and are representative of $n = 7$ experiments. The production of (B) TNF- α , (C) IL-6 and (D) IL-1 β was measured in culture supernatants using Milliplex technology. Box plots depicting median values and quartiles are representative of $n = 9$ experiments. (E) LL37 and (F) IRGM gene expression was assessed by quantitative PCR using the Taqman system and the $\Delta\Delta$ CT method for relative quantification. Fold changes in gene expression relative to unstimulated cells are reported. Bold lines indicate median values of $n = 9$. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ using the two-tailed Wilcoxon signed-rank test. (G) LL37 and IRGM protein was assessed by western blot. One representative experiment out of three experiments is presented. (H) The amount of protein normalized to tubulin relative to infected-only cells was calculated by densitometry. Data are depicted as the means \pm SEM and are representative of $n = 3$ experiments.

First, we demonstrated that NOD2 was functional in primary alveolar macrophages. NOD2 was present in unstimulated alveolar macrophages, both at the protein and mRNA level, and NOD2 gene expression was upregulated following MDP stimulation. In addition, MDP can induce NOD2 protein redistribution toward the plasma membrane. It has been described that NOD2 recruitment to the plasma membrane initiates downstream signaling [30].

Our results indicate that NOD2 is included among the repertoire of lung macrophage receptors used in innate immune responses, and these data also show that significant levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , but not anti-inflammatory cytokines such as IL-10, are produced following MDP binding to NOD2. The TNF- α response was similar to that observed for LPS stimulation, indicating that MDP elicits a strong inflammatory response from human alveolar macrophages and contrasts with the almost nonexistent TNF- α response previously reported for MDP-treated murine macrophages [22]. The canonical IL-1 β released after stimulation of alveolar macrophages with MDP was consistent with the release of IL-1 β from human monocytes in a NOD2-dependent manner [12, 13].

We demonstrate for the first time that the bactericidal effector molecule LL37 is upregulated in human alveolar macrophages af-

ter NOD2 ligand recognition. We have previously reported that cathelicidin LL37 is induced in human alveolar macrophages by TLR2, TLR4, and TLR9 signaling [31]; however, the NOD2-dependent induction is smaller than that observed after stimulation of TLR4. Thus, we now include NOD2 to broaden the spectrum of innate signals capable of cathelicidin induction by the human alveolar immune response. We also report for the first time that IRGM is overexpressed in alveolar macrophages after NOD2 activation. IRGM has been thought to play an important role in autophagy, suggesting that in addition to its antibacterial effects, NOD2 may play a complex role in linking the innate response to autophagy.

NOD2 stimulation induced a pro-inflammatory and antimicrobial profile in alveolar macrophages. Therefore, we sought to investigate whether this NOD2-dependent antibacterial response could be induced in human alveolar macrophages following infection with virulent *M. tuberculosis*. A previous study performed in human macrophages had reported that knocking down NOD2 leads to an increase in intracellular *M. tuberculosis* [23]. Here, we observed that alveolar macrophages infected with a virulent strain of *M. tuberculosis* permit the intracellular growth of the pathogen, but that these infected macrophages could be activated

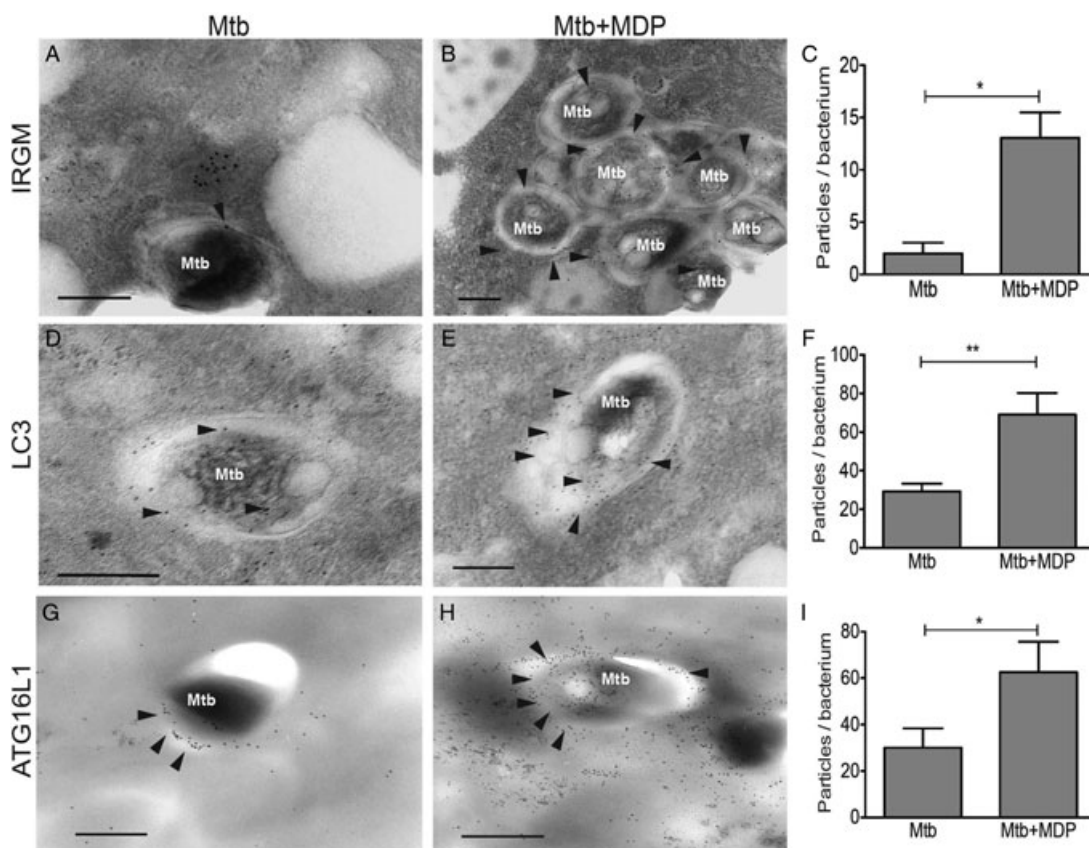


Figure 5. NOD2 activation of *M. tuberculosis*-infected macrophages induces the recruitment of autophagy proteins IRGM, LC3, and ATG16L1 to the bacteria-containing vesicles. Alveolar macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Rv at an MOI of 5 for 1 h. Nonphagocytosed bacteria were washed away, and the macrophages were incubated for an additional hour. The cells were then treated with 10 μ g/mL of MDP for 24 h or left with medium alone. (A, B, D, E, G, H) The subcellular localization of autophagy proteins was ascertained in untreated and MDP-treated cells using (A, B) anti-IRGM, (D, E) anti-LC3, and (G, H) anti-ATG16L1 antibodies and detected with a secondary antibody coupled to 5-nm gold particles indicated with arrowheads; bar represents 150 nm. (C, F, I) Gold particles co-localizing with bacteria were manually counted in ten macrophages of each condition. Means \pm SEM are depicted and differences between treatments are indicated, * p < 0.05 using a two-tailed paired t-test. (B) Transmission electron microscopy (TEM) magnification \times 50,000; the rest of the micrographs are TEM magnification \times 80,000. Data were generated from one experiment.

to prevent intracellular mycobacteria replication by the addition of MDP. The infection alone was insufficient to elicit a protective innate response. However, the treatment with MDP for 24 h post infection induced the release of significant amounts of IL-6 and TNF- α as well as the overexpression of LL37 and IRGM. This antimicrobial response was expected to result in effective control of intracellular growth during a *M. tuberculosis* infection because LL37 had previously exhibited direct bactericidal effects against *M. tuberculosis* [26]. Moreover, the role of IRGM in the autophagy process might contribute to the elimination of intracellular *M. tuberculosis* as demonstrated by others [32, 33]. Although the MDP of *M. tuberculosis* cell wall activates NOD2, the availability of this ligand in the cytosol is not immediate. Thereby, we consider that infection alone, especially at a low multiplicity of infection (MOI), was insufficient to induce antimicrobial effector expression, and the addition of MDP after infection enhanced the macrophages antimicrobial response. We cannot exclude that this effect is a result of activation of bystander macrophages.

Autophagy is emerging as an important mechanism in the defense of mammals against several bacterial infections, especially

those that are dependent on the activation of innate immune responses. Autophagy can be triggered by the activation of pattern recognition receptors, mainly TLRs, and by immunity-related GTPases downstream of IFN- γ activation, such as IRGM [34]. The NOD2 receptor may be critical for the autophagy response to invading pathogens by promoting the recruitment of enzymes such as ATG16L1 to the site of pathogen entry in murine macrophages and human epithelial cells [35]. Here, we also demonstrate that NOD2 induces autophagy in human alveolar macrophages. We show that NOD2 activation of *M. tuberculosis*-infected human alveolar macrophages leads to the conversion of LC3-I into LC3-II as indicative of autophagosome formation and also to the recruitment of the autophagy markers IRGM, LC3, and ATG16L1 to *M. tuberculosis*-containing vesicles in a Rip2/p38-dependent manner. Finally, we found that bacilli were actually enclosed in autophagosomes.

Taken together, our findings suggest that autophagy is a key NOD2-dependent mechanism by which human alveolar macrophages eliminate *M. tuberculosis*. In human alveolar macrophages, the activation of NOD2 may be involved in the early

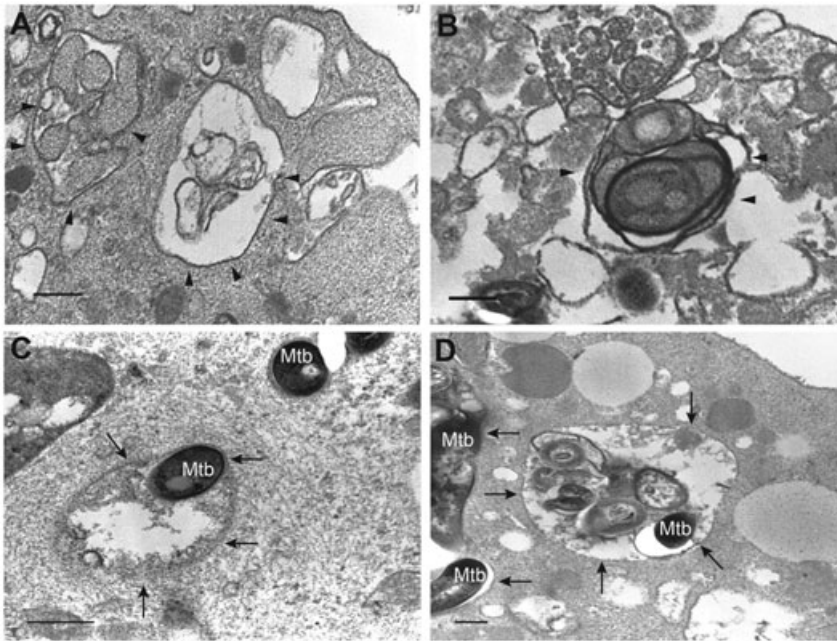


Figure 6. Macrophages treated with MDP after *M. tuberculosis* infection develop autophagy vacuoles. Alveolar macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Rv at an MOI of 5 for 1 h. Nonphagocytosed bacteria were washed away, and the macrophages were incubated for an additional hour. The cells were then treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MDP for 24 h. Autophagy indicators (arrowheads) such as (A) vesicles containing organelles (TEM magnification $\times 20,000$) and (B) onion skin-like lamellar multivesicular bodies (TEM magnification $\times 16,000$) were identified by ultrastructural analysis. (C, D) Autophagosomes containing mycobacteria (Mtb) are indicated with arrows (C, TEM magnification $\times 40,000$; D, TEM magnification $\times 12,000$). Micrographs were obtained from one experiment. Bar represents 300 nm.

innate control of *M. tuberculosis* primary infections, thereby preventing the development of active disease. In comparison, the study of the role of NOD2 during *M. tuberculosis* infection investigated in NOD2-deficient mice revealed that NOD2-dependent immune responses only partially limited *M. tuberculosis* growth in the acute phase of infection. In contrast, the major contribution of NOD2 was perceived during the chronic phase of the disease [22].

In conclusion, NOD2 is a receptor that participates in the early control of intracellular pathogens in human alveolar macrophages and is associated with the activation of an antibacterial response. We hypothesize that the influence of NOD2 in early immune responses to *M. tuberculosis* prevents the onset of active disease, which may be important for the development of vaccine adjuvants and immunological therapies.

Materials and methods

Study group

We recruited 20 healthy, HIV-1 seronegative residents of Mexico City, who had normal chest radiographs and no history of prior exposure to TB patients, at the National Institute for Respiratory Diseases (INER) in Mexico City. Fiberoptic bronchoscopy was performed on all study subjects with bronchoalveolar lavage. Approval to perform these studies was granted by the Institutional Review Board of INER. Written informed consent was obtained from all study subjects prior to any procedure, according to the guidelines of the U.S. Department of Health and Human Services and the declaration of Helsinki.

Human cell preparations

Bronchoalveolar cells were obtained by bronchoalveolar lavage, as described previously [36]. Briefly, bronchoalveolar lavage fluid was centrifuged and bronchoalveolar cells were resuspended in culture medium. More than 93% of the bronchoalveolar cells were alveolar macrophages in every case according to flow cytometric analysis using a gate on size and granularity. Therefore, the cells are hereafter referred to as alveolar macrophages. All cell cultures were carried out in RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate, 200 mM L-glutamine, and 10% heat-inactivated pooled human AB serum (Gemini Bioproducts, Sacramento, CA, USA) at 37°C in 5% CO₂.

Stimulation of alveolar macrophages with NOD2 ligand

To assess ligand-induced responses in alveolar macrophages, 10⁶ cells were cultured in duplicate wells in ultralow attachment polystyrene 24-well plates (Corning Inc., NY, USA). Cells were stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of synthetic MDP (InvivoGen, San Diego, CA, USA) for 24 h. Following stimulation, one set of alveolar macrophage cultures was harvested and prepared for flow cytometry, and one set was harvested and prepared for mRNA extraction. Supernatants were collected and kept frozen until NOD2 ligand-induced cytokine release was assessed. Culture medium alone was used as a negative control. In selected experiments, 10 μM SB203580 Rip2/p38 inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) was added to the cells 30 min prior to MDP stimulation to block NOD2 signaling.

Intracellular NOD2 expression by flow cytometry

To assess NOD2 expression, 10^6 alveolar macrophages were incubated in phosphate-buffered saline (Lonza) with 50% rabbit serum for 10 min at room temperature with agitation (30 rpm) to block nonspecific Fc receptor binding. Cells were then treated with permeabilizing buffer (Becton Dickinson, San José, CA, USA), and saturating amounts of either goat antihuman NOD2 or corresponding goat isotype control (Imgenex, San Diego, CA, USA) were added in the presence of 50% rabbit serum. The cells were then incubated for 20 min at 4°C. After one washing step, secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was added, and the cells were incubated for 20 min at 4°C in the dark. Following another wash step, the cells were fixed with 1% paraformaldehyde. Acquisition of 20,000 cells was achieved using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Flow cytometric analysis was performed using a gate set on large granular cells (high FSC and SSC). The FITC voltage detector was set to the minimum level that discriminates between autofluorescence and specific antibody staining. Isotype controls were used to define settings in the histogram plot analyses.

Real-time PCR for NOD2, LL37, and IRGM gene expression

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR, TaqMan) was performed to determine the NOD2, LL37, and IRGM mRNA expression levels using the comparative threshold cycle ($\Delta\Delta C_t$) method of relative quantitation, as described previously [36]. Briefly, real-time PCR reactions were performed in duplicate wells according to the manufacturer's protocol for the following Taqman predesigned gene assays: NOD2 (Hs00223394.m1), LL37 (Hs00189038.m1), and IRGM (Hs01013699.s1) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). PCR reactions were performed on an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The C_t values for each gene were normalized to 18S rRNA (4319413E) as an endogenous control. To analyze ligand-induced expression changes of NOD2, LL37, and IRGM mRNA, the expression of unstimulated alveolar macrophages was set as 1, and the mRNA expression of the ligand-stimulated cells was reported relative to that of unstimulated cells.

Immunoblot

Cells were washed once in PBS and then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use. For extraction of cytoplasmic proteins, the frozen cell pellet was lysed by vigorous pipeting with lysis buffer containing 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of aprotinin, and 0.5 mM PMSF (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The lysates were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C, and the supernatants containing cytosolic pro-

teins were recovered. The total amount of protein was determined using the Bradford method, with BSA used as a standard.

For western blot analyses, cytosolic and nuclear extracts were resuspended in Laemmli buffer and boiled for 5 min. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. After blocking with 1% BSA in blocking buffer (TBS, 50 mM Tris.Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20), the membranes were incubated with anti-NOD2 (Millipore, Billerica, MA, USA), anti-IRGM (Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-I κ B (Santa Cruz Biotechnology), anti-LC3 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) or anti-alpha tubulin (Sigma-Aldrich) antibodies for 2 h followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody for 1 h at room temperature. Specific bands were detected by chemiluminescence using the SuperSignal system (Thermo, Rockford, IL, USA) and revealed on autoradiographic films. Densitometry was performed with ImageJ 1.44o (National Institutes of Health, USA).

Cytokine detection

The cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN- α 2, and TNF- α were measured in the culture supernatants using a custom-designed Milliplex human cytokine kit (Millipore), according to the manufacturer's instructions.

Infection with *M. tuberculosis*

The *M. tuberculosis* strain H37Rv (ATCC 25618) was grown for 28 days in Middlebrook 7H9 broth, counted, and stored at -70°C until use. For the in vitro infection, 10^5 bronchoalveolar cells were allowed to adhere for 1 h in round bottom 96-well polystyrene plates. After removal of nonadherent cells, alveolar macrophages were infected with *M. tuberculosis* in RPMI with 30% nonheat-inactivated, pooled human AB serum at an infection ratio of 1–2 bacteria/20 macrophages, which yielded an average of 8.4% cells infected with four bacilli. Cells were then incubated for 1 h followed by three washes to remove nonphagocytosed bacteria. The cells were then cultured for another hour in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated pooled human serum with or without 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MDP. To evaluate macrophage control of mycobacterial intracellular growth, infected macrophages were incubated for 1 h (Day 0), 24 h (Day 1), and 96 h (Day 4). The cells were lysed with 1% SDS followed by 20% BSA, serially diluted in Middlebrook 7H9 medium and plated in triplicate over 7H10 medium to quantify colony forming units (CFUs). To take into account the phagocytosis of individual cells, the fold change of intracellular growth was calculated as the CFU at Day 1 or 4/CFU at Day 0.

For the modulation of gene expression and cytokine production following *M. tuberculosis* infection, alveolar macrophages were infected at the same infection ratio using 5×10^5 cells plated in 24-well plates under the same conditions described above. The cells were treated with MDP for 24 h post infection, and supernatants were collected to assess cytokine production. Cells were lysed,

and mRNA was extracted. For transmission electron microscopy (TEM) examination, alveolar macrophages were infected at MOI 5 using 4×10^6 cells in polypropylene tubes under the same conditions described above, which yielded an average of 42.6% of cells infected with four bacilli. The cells were treated with MDP for 24 h post infection and fixed in preparation for electron microscopy detection of subcellular localization of proteins and ultrastructure.

Electron microscopy

Cells were prepared for TEM by centrifugation for 1 min/6000 rpm followed by fixation of the various cell preparations for either immunodetection of protein subcellular localization or conventional ultrastructure observation. An analysis of the subcellular localization of NOD2, IRGM, LC3, and ATG16L1 proteins was performed as previously described [37]. Briefly, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.2 M Sørensen buffer; the samples were dehydrated with different concentrations of ethylic alcohol and infiltrated with LR-White hydrosoluble resin (London Resin Co., Hampshire, UK). Sections 60 to 80 nm thick were placed on nickel grids. The grids were incubated overnight at 4°C with specific polyclonal rabbit anti-NOD2 (Millipore), anti-IRGM (Abcam), anti-LC3, or anti-ATG16L1 (Novus Biologicals) antibodies. After rinsing with PBS, the grids were incubated for 2 h at room temperature with goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich) conjugated to 5-nm gold particles (Sigma-Aldrich) and diluted 1:20 in PBS. The grids were contrasted with uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) and examined with an M-10 Zeiss electron microscope (Karl Zeiss, Jena, Germany). To quantitatively assess the recruitment of autophagy proteins to the mycobacteria-containing vesicle, we performed the morphometric analysis by counting the gold particles co-localizing with the bacteria contained in 10 randomly selected cells from each condition (10–17 bacteria/condition) using ImageJ software.

For conventional ultrastructure observations, the cells were fixed in 1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7), postfixed in 2% osmium tetroxide in 100 mM cacodylate buffer, dehydrated with increasing concentrations of ethanol and gradually infiltrated with Epon resin (Pelco International, Redding, CA, USA). Thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate before TEM examination.

Statistical analysis

Data were analyzed by the non-parametric two-tailed Wilcoxon signed-rank test. Boxplots displaying median and quartiles (min to max) or means \pm standard error of the mean (SEM) are presented were indicated. TEM data were analyzed using a two-tailed paired *t*-test. Values were statistically different when $p < 0.05$. Analysis was performed using SPSS 15.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) and GraphPad prism 5.0 for Mac (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Acknowledgments: This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT) grants SEP2004-CO1-47745 and CB-2008-01-101948. We acknowledge the Facultad de Ciencias, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and the CONACYT for the scholarship awarded to Esmeralda Juárez. We are thankful for the excellent technical assistance of Ricardo Poblano and Edmundo Olivares.

Conflict of interests: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B. and Suttrop, N., Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia—molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir. Res.* 2006. 7: 97.
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J. and Girardin, S. E., Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 2006. 7: 1250–1257.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O., Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. 124: 783–801.
- Jo, E. K., Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008. 21: 279–286.
- Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M. and Nunez, G., Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 2007. 27: 549–559.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamailard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. et al., Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003. 278: 8869–8872.
- Inohara, N., Chamailard, M., McDonald, C. and Nunez, G., NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2005. 74: 355–383.
- Hasegawa, M., Fujimoto, Y., Lucas, P. C., Nakano, H., Fukase, K., Nunez, G. and Inohara, N., A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J.* 2008. 27: 373–383.
- Magalhaes, J. G., Lee, J., Geddes, K., Rubino, S., Philpott, D. J. and Girardin, S. E., Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur. J. Immunol.* 2011. 41: 1445–1455.
- Park, J. H., Kim, Y. G. and Nunez, G., RICK promotes inflammation and lethality after gram-negative bacterial infection in mice stimulated with lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 2009. 77: 1569–1578.
- Werts, C., le Bourhis, L., Liu, J., Magalhaes, J. G., Carneiro, L. A., Fritz, J. H., Stockinger, S. et al., Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 2499–2508.
- Ferwerda, G., Girardin, S. E., Kullberg, B. J., Le Bourhis, L., de Jong, D. J., Langenberg, D. M., van Crevel, R. et al., NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2005. 1: 279–285.

- 13 Netea, M. G., Ferwerda, G., de Jong, D. J., Girardin, S. E., Kullberg, B. J. and van der Meer, J. W., NOD2 3020insC mutation and the pathogenesis of Crohn's disease: impaired IL-1beta production points to a loss-of-function phenotype. *Neth. J. Med.* 2005. **63**: 305–308.
- 14 Ekman, A. K. and Cardell, L. O., The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* 2009.
- 15 Uehara, A., Yang, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Shibata, K., Sugawara, S. et al., Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol.* 2005. **7**: 53–61.
- 16 Kobayashi, K. S., Chamailard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. and Flavell, R. A., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005. **307**: 731–734.
- 17 Uehara, A., Fujimoto, Y., Fukase, K. and Takada, H., Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* 2007. **44**: 3100–3111.
- 18 Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., Stange, E. F., Schroder, J. M. and Harder, J., NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J. Biol. Chem.* 2006. **281**: 2005–2011.
- 19 Zhang, F. R., Huang, W., Chen, S. M., Sun, L. D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y. et al., Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 2009. **361**: 2609–2618.
- 20 Austin, C. M., Ma, X. and Graviss, E. A., Common nonsynonymous polymorphisms in the NOD2 gene are associated with resistance or susceptibility to tuberculosis disease in African Americans. *J. Infect. Dis.* 2008. **197**: 1713–1716.
- 21 Yang, Y., Yin, C., Pandey, A., Abbott, D., Sasseti, C. and Kelliher, M. A., NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *J. Biol. Chem.* 2007. **282**: 36223–36229.
- 22 Divangahi, M., Mostowy, S., Coulombe, F., Kozak, R., Guillot, L., Veyrier, F., Kobayashi, K. S. et al., NOD2-deficient mice have impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection through defective innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 2008. **181**: 7157–7165.
- 23 Brooks, M. N., Rajaram, M. V., Azad, A. K., Amer, A. O., Valdivia-Arenas, M. A., Park, J. H., Nunez, G. et al., NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG in human macrophages. *Cell Microbiol.* 2011. **13**: 402–418.
- 24 Amer, A. O. and Swanson, M. S., Autophagy is an immediate macrophage response to Legionella pneumophila. *Cell Microbiol.* 2005. **7**: 765–778.
- 25 Amer, A. O., Byrne, B. G. and Swanson, M. S., Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes. *Autophagy* 2005. **1**: 53–58.
- 26 Martineau, A. R., Wilkinson, K. A., Newton, S. M., Floto, R. A., Norman, A. W., Skolimowska, K., Davidson, R. N. et al., IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J. Immunol.* 2007. **178**: 7190–7198.
- 27 Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T. et al., Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006. **311**: 1770–1773.
- 28 Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E. et al., LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 2000. **19**: 5720–5728.
- 29 Ferwerda, G., Kullberg, B. J., de Jong, D. J., Girardin, S. E., Langenberg, D. M., van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. et al., Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J. Leukoc. Biol.* 2007. **82**: 1011–1018.
- 30 Barnich, N., Aguirre, J. E., Reinecker, H. C., Xavier, R. and Podolsky, D. K., Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J. Cell. Biol.* 2005. **170**: 21–26.
- 31 Rivas-Santiago, B., Hernandez-Pando, R., Carranza, C., Juarez, E., Contreras, J. L., Aguilar-Leon, D., Torres, M. et al., Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect. Immun.* 2008. **76**: 935–941.
- 32 Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. and Deretic, V., Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006. **313**: 1438–1441.
- 33 Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I. and Deretic, V., Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 2004. **119**: 753–766.
- 34 Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., De Haro, S., Ponpuak, M. and Singh, S., Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009. **335**: 169–188.
- 35 Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y. G., Magalhaes, J. G., Yuan, L. et al., Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 2009. **11**: 55–62.
- 36 Juarez, E., Nunez, C., Sada, E., Ellner, J. J., Schwander, S. K. and Torres, M., Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir. Res.* 2010. **11**: 2.
- 37 Rivas-Santiago, B., Schwander, S. K., Sarabia, C., Diamond, G., Klein-Patel, M. E., Hernandez-Pando, R., Ellner, J. J. et al., Human β -defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* 2005. **73**: 4505–4511.

Abbreviations: CARD: caspase activation recruitment domain · IRGM: immunity-related GTPase M · MDP: muramyl dipeptide · NLR: nod-like receptor · NOD: nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor · NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor · Rip2: receptor interacting protein 2

Full correspondence: Dr. Eduardo Sada, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México City, México. Calz. Tlalpan 4502, Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico D.F. Fax: +52-54871700, ext 5123 e-mail: eduardosadadiaz@yahoo.com

Received: 14/9/2011
Revised: 18/11/2011
Accepted: 22/12/2011
Accepted article online: 4/1/2012