



**Centro de Ciencias Básicas
Doctorado en Ciencias Biológicas**

TÍTULO DE TESIS

**Inducción de genes de virulencia en *Mycobacterium tuberculosis* por
la nicotina**

Tesis que presenta Jeny Patricia de Haro Acosta
para optar el grado de
Dr. en Ciencias Biológicas

COMITÉ

**COTUTOR: DR. BRUNO RIVAS SANTIAGO
COTUTOR: DRA. EVA MARIA SALINAS MIRALLES
ASESOR: DR. RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA**

Aguascalientes, Ags., febrero 2023

CARTA DE VOTO APROBATORIO

COMITÉ TUTORAL

en C. JORGE MARTÍN ALFERÉZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **JENY PATRICIA DE HARO ACOSTA** con ID 226248 quien realizó la tesis titulado: **INDUCCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS POR LA NICOTINA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 27 de Junio de 2023

Dra. Eva María Salinas Miralles
Co-Tutora de tesis

Dr. Bruno Rivas Santiago
Co-Tutor de tesis

Dr. Rodolfo Gonzáles Segovia
Asesor de tesis/trabajo práctico

.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.

Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.

Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16

Actualización: 00

Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 28-jul-23

NOMBRE: JENY PATRICIA DE HARO ACOSTA ID 226248

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD DIRECTA LGAC (del posgrado): ROTEÍNAS EN LA RESPUESTA INMUNE Y LA SECRECIÓN NEUR/

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: INDUCCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS POR LA NICOTINA

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

El trabajo incide sobre seguridad Alimentaria

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN SUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

DE ACUERDO AL PE DEL DCB , LA ALUMNA NO ES ACREEDORA PARA SUMMA CUM LAUDE



Nicotine associates to intracellular *Mycobacterium tuberculosis* inducing genes related with resistance to antimicrobial peptides

Jeny de Haro-Acosta^{a,b}, Yolanda M. Jacobo-Delgado^a, Adrian Rodríguez-Carlos^a, Flor Torres-Juárez^a, Zaida Araujo^c, Carmen J Serrano^a, Irma Gonzalez-Curiel^d, Rogelio Hernández-Pando^e, Eva Salinas^b and Bruno Rivas-Santiago^a

^aMedical Research Unit-Zacatecas, Mexican Institute for Social Security-IMSS, Zacatecas, Mexico; ^bLaboratory of Immunology, Department of Microbiology, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico; ^cLaboratory of Immunology of Infectious Diseases, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Central University of Venezuela, Caracas, Venezuela; ^dLaboratory of Immunotoxicology and Experimental Therapeutics, Post-graduate program in Sciences and Chemical Technology, Chemistry Sciences School, University Autonomous of Zacatecas, Zacatecas, Mexico; ^eLaboratory of Experimental Pathology, Nacional Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador-Zubiran", Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Tobacco consumption is related to an increased risk to develop tuberculosis. Antimicrobial peptides are essential molecules in the response to *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) because of their direct antimicrobial activity. The aim of this study was to demonstrate that nicotine enters into *Mtb* infected epithelial cells and associates with the mycobacteria inducing genes related to antimicrobial peptides resistance. Epithelial cells were infected with virulent *Mtb*, afterwards cells were stimulated with nicotine. The internalization of nicotine was followed using electron and confocal microscopy. The *lysX* expression was evaluated isolating mycobacterial RNA and submitted to RT-PCR analysis. Our results indicated that nicotine promotes *Mtb* growth in a dose-dependent manner in infected cells. We also reported that nicotine induces *lysX* expression. In conclusion, nicotine associates to intracellular mycobacteria promoting intracellular survival.

ARTICLE HISTORY

Received 2 November 2021
Accepted 11 November 2021

KEYWORDS

Nicotine;
Mycobacterium tuberculosis;
antimicrobial peptides;
lysX

Introduction

In the last decades tobacco consumption has been associated with an increased risk for developing tuberculosis (Tb) up to 2 to 4 times.^{1,2} Indeed, more than 20% of Tb disease may be attributable to smoking. Among individuals without a history of Tb, the risk of death due this infectious disease is nine times higher for smokers than for never-smokers. When smokers quit smoking, the risk of death due to Tb drops significantly, which indicates that smoking cessation is an important factor in reducing Tb-related mortality.³ Cigarette smoke has 4,500 different compounds, nonetheless, the nicotine is the main compound associated with immunoregulation.^{4,5} Indeed, previous studies by our group have shown that nicotine

decreases the expression of the TLR2, TLR4, NOD2 receptors and the production of keystone molecules for the immunity versus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) such as surfactant proteins, cytokines, and chemokines.⁶ It is evident that the nicotine affects the immunity against *Mtb*, nonetheless scarce information has been generated regarding the effect that nicotine might have over *Mtb*. The antimicrobial peptides (AMPs) are essential to mount an appropriate immunity versus *Mtb* since these peptides have direct antimicrobial activity against the bacilli and possess a potent immunomodulatory activity (reviewed elsewhere⁷) which in fact is indispensable to eliminate mycobacteria. There are several virulence-related genes in *Mtb* that have been associated with severe progression of Tb such as

CONTACT Bruno Rivas-Santiago  rondo_vm@yahoo.com  Medical Research Unit-Zacatecas, Mexican Institute for Social Security-IMSS, Interior de la Alameda 45, colonia centro, Zacatecas 98000, Mexico; Eva Salinas  emsalin@correo.uaa.mx  Laboratory of Immunology, Department of Microbiology, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Av. Universidad 940, Colonia Ciudad Universitaria, Aguascalientes 20100, Mexico.
© 2021 Taylor & Francis Group, LLC

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, al Instituto Mexicano del Seguro Social y a CONACYT por brindarme apoyo para la realización de mi doctorado, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A mis tutores la Dra. Eva Salinas Miralles un ejemplo de tenacidad, disciplina y pasión por su trabajo, gracias por no desistir y creer en mí. Al Dr. Bruno Rivas por formar parte integral en mi desarrollo humano y profesional, gracias por compartir su conocimiento y su trabajo, por todas las horas de laboratorio juntos, por todos los consejos y todas las exigencias que me forzaron a ser mejor cada día y sobre todo gracias por esperar mi proceso de crecimiento personal y seguir apoyándome. Al Dr. Rodolfo Segovia por todo el tiempo y la disposición.

A mis compañeros del laboratorio en el IMSS por compartir su conocimiento, por guiarme y acompañarme durante todo el proceso. Gracias Flor por tu ayuda en la técnica de microscopía confocal, gracias a Claudia y Alberto por ser mis compañeros de proyecto y avanzar juntos. Gracias Yolanda por tu ayuda en la escritura del artículo. Gracias Sara y Adrian por todo tu apoyo para el cultivo celular y bacteriano.

A mi familia por apoyarme en cada paso y nunca dejar de confiar en mí. Gracias por no desistir y forzarme a terminar.

Gracias a la vida que me permite seguir aprendiendo.

Dedicatorias

A mi papá por apoyarme en cada decisión y por guiarme con el ejemplo, enseñándome que si trabajas duro y no desistes los sueños se cumplen. A mi mamá que desde el cielo me ayuda, me apoya y me cuida.

A mi hermana Ana, que no solo es mi ejemplo de vida, si no mi pilar, mi amiga, mi confidente y esa voz que me regaña cuando necesito o no, escuchar la verdad. A Zoraira y Maricruz que me demuestran su apoyo incondicional. A Elvia y Manuel que, aunque estan lejos, siento su cercanía. A mis sobrinos que son mi motor de vida Mariana, Emi y Max.

A mi chinita por apoyarme, cuidarme y acompañarme en todas las decisiones de mi vida, y darme mi tiempo para poder levantarme, por no juzgarme y quedarse a mi lado en todos los momentos buenos y en las malos. Gracias por alentarme y recordarme mi pasión. Sin ti no lo hubiera logrado.

A compañeros de Doctorado por demostrarme que estaba equivocada porque aunque dije que no venía a hacer amigos, me encontré con maravillosas personas que serán mis amigos para toda la vida: Diana, Josué, Adriana, Laura, Cristian y Diego.

A mis compañeros del laboratorio del IMSS gracias por su apoyo dentro y fuera del laboratorio, formaron parte vital de mi aprendizaje y crecimiento, espero que seamos compañeros de vida: Claudia, Adrian, Yolanda, Wendo, Alberto, Sara y Alan.

A cualquier lector que encuentre en este trabajo algún nuevo conocimiento o interés por la ciencia.

Índice General

Índice General.....1

Índice de tablas..... 3

Índice de figuras..... 4

Resumen 6

Abstract 7

1.0 Introducción..... 8

2.0 Antecedentes..... 10

 2.1 Tabaquismo 10

 2.2 Componentes del humo del cigarro 10

 2.3 Nicotina 12

 2.4 Efecto de la nicotina sobre el sistema inmune..... 16

 2.5 La nicotina y la tuberculosis 17

 2.6 Tuberculosis 19

 2.7 Patogenia 20

 2.8 Factores de Virulencia..... 21

3.0 Justificación..... 29

4.0 Hipótesis 30

5.0 Objetivos..... 30

 5.1 Objetivo General..... 30

 5.2 Objetivos específicos 30

6.0 Metodología 31

 6.1 Cultivo de la línea celular A549 31

 6.2 Crecimiento de la cepa *Pseudomonas aureginosa* 31

 6.3 Crecimiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis*..... 31

 6.4 Microscopía confocal 31

 6.5 *Mycobacterium tuberculosis* en diferentes condiciones experimentales 32

 6.6 Extracción de ADN bacteriano 33

 6.7 Extracción de ARN y síntesis de ADNc..... 34

 6.8 Diseño de los oligonucleótidos 35

 6.9 PCR en tiempo real..... 36

7.0 Resultados 38

 7.1 Alícuotas de trabajo de *Mycobacterium tuberculosis* 38

7.2 Interacción física entre la nicotina y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
7.2.1 Tinción para Faloidina	39
7.2.2 Tinción para nicotina.....	40
7.2.3 Tinción para <i>M. tuberculosis</i> , tubulina y núcleo.....	43
7.2.4 Tinción para <i>Mycobacterieum tuberculosis</i> , nicotina y núcleo.....	44
7.3 Crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en diferentes condiciones.....	46
7.3.1 Crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con nicotina	46
7.3.2 Crecimiento de <i>Pseudomonas aureginosa</i> a diferentes concentraciones de nicotina.....	48
7.3.3 Crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con nicotina en presencia de mecamilamina y bungarotoxina.....	50
7.4 Evaluación de genes de virulencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> expuesta a nicotina	51
7.4.1 Evaluación de los oligonucleótidos con ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52
7.4.2 Evaluación del gene de virulencia involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> expuesta a nicotina	53
7.4.3 Evaluación de genes de virulencia relacionados con moléculas secretadas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> expuesta a nicotina	55
7.4.4 Evaluación de genes de virulencia relacionados con la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> expuesta a nicotina	5960
8.0 Discusión.....	64
9.0 Conclusión.....	72
10.0 Referencias	73
11.0 Anexos	80

Índice de tablas

Tabla 1 Alteraciones de la nicotina	-----14
Tabla 2 Características de genes relacionados con los factores de virulencia su descripción y su efecto	-----26
Tabla 3 Diseño de oligonucleótidos para diferentes genes de <i>M. tuberculosis</i> divididos por categoría.	-----35



Índice de figuras

Figura 1. Estructura de los receptores nAChR.	-----15
Figura 2. Relación entre el humo de cigarro y tuberculosis.	-----18
Figura 3. Efecto de la interacción de la nicotina y <i>M. tuberculosis</i> en células de la respuesta inmune	-----19
Figura 4 Curva de crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	-----38
Figura 5 Tinción de Faloidina y DRAQ7 en células A549.	-----40
Figura 6. Tinción para nicotina y DRAQ5 en células A549	-----41
Figura 7 Tinción para nicotina y DRAQ7 en células A549.	-----42
Figura 8. Tinción de tubulina, <i>M. tuberculosis</i> y núcleo en células A549.	-----44
Figura 9 Tinción de nicotina, <i>M. tuberculosis</i> y núcleo en células A549.	-----45
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> con estímulo de nicotina	-----47
Figura 11. Unidades formadoras de colonias de la cepa <i>M. tuberculosis</i> con estímulo de nicotina.	-----47
Figura 12. Evaluación de la contaminación en la condición 10µM de nicotina y <i>M. tuberculosis</i>	-----48
Figura 13. Efecto de toxico de la nicotina en <i>Pseudomonas aureginosa</i> .	-----50
Figura 14. Curva de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> con estímulo nicotina con mecamelamina y bungarotoxina.	-----51
Figura 15. Evaluación de los oligonucleótidos diseñados con ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-----52
Figura 16. Nicotina incrementa la expresión del gen involucrado en la resistencia a peptidos antimicrobianos	-----54
Figure 17. Nicotina incrementa la expresión del gen involucrado en la resistencia a peptidos antimicrobianos	-----54

Figura 18. Nicotina no modifica la expresión del gen <i>esxA</i> relacionado con la secreción de moléculas de virulencia en <i>M. tuberculosis</i> .	-----56
Figura 19. La nicotina incrementa la expresión del gen <i>caeA</i> relacionado con la secreción de moléculas de virulencia en <i>M. tuberculosis</i> .	-----56
Figure 20. La nicotina incrementa en la expresión de los genes <i>esxA</i> y <i>esxB</i> relacionado en la secreción de moléculas de virulencia en <i>M. tuberculosis</i>	-----58
Figure 21. Nicotina incrementa en la expresión de los genes <i>hspX</i> y <i>katG</i> relacionado en la secreción de moléculas de virulencia en <i>M. tuberculosis</i>	-----59
Figure 22. Nicotina incrementa en la expresión de los genes <i>IpqH</i> y <i>caeA</i> relacionado en la secreción de moléculas de virulencia en <i>M. tuberculosis</i> .	-----59
Figura 23. Nicotina modifica la expresión del gen <i>fad26</i> relacionado con la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .	-----60
Figure 24. Nicotina incrementa la expresión del gen <i>fad26</i> involucrados con pared celular en <i>M. tuberculosis</i> .	-----61
Figure 25. Nicotina incrementa la expresión de genes involucrados con pared celular en <i>M. tuberculosis</i> .	-----62
Figure 26. Nicotina incrementa la expresión de genes involucrados con pared celular en <i>M. tuberculosis</i>	-----63
Figura 27 Esquema de interacción de nicotina y <i>M. tuberculosis</i> en pneumocitos tipo II.	-----65
Figura 28 Efecto de la interacción entre la nicotina y <i>M. tuberculosis</i> .	-----71

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el agente causal *Mycobacterium tuberculosis* y se estima actualmente que un tercio de la población a nivel mundial se encuentra infectado. Un importante factor de riesgo es fumar. El tabaquismo es una adicción de problemática mundial y la OMS reportó que fumar incrementa hasta 1.6 veces el riesgo de padecer tuberculosis. La nicotina es el componente del humo del cigarro más estudiado, ya que genera una respuesta pro-inflamatoria desde el punto de vista del huésped. Desde el punto de vista del agente causal, no se tiene información acerca de la respuesta cuando el huésped está en contacto con el humo del cigarro. Por eso es importante saber si la nicotina genera algún cambio directamente en la virulencia de *M. tuberculosis*. En este trabajo se evaluó el crecimiento de *M. tuberculosis* expuesta a la nicotina, además de la interacción física dentro de neumocitos tipo II entre la nicotina y la bacteria mediante microscopía confocal y la expresión de los siguientes genes de virulencia *lys X*, *pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompAtb*, *hbhA*, *esxA* (*esat 6*), *esxB* (*cfp10*), *HspX*, *katG*, *LpqH* y *caeA*. Se encontró que la nicotina entra y se distribuye de manera uniforme en el citoplasma de los neumocitos tipo II, gracias a su naturaleza lipofílica. Se observó interacción entre la bacteria y la nicotina, debido a la colocalización de ambas dentro de la célula. Se demostró que la nicotina incrementa el crecimiento de la micobacteria, creemos que este efecto en la bacteria puede deberse por la expresión de una estructura similar al receptor *alfa 7* nicotínico de acetilcolina, que reconoce la nicotina en el medio de crecimiento y produce cambios en la virulencia de la bacteria al inducir la expresión de genes que se relacionan con cambios en la secreción y superficie celular, en la envoltura bacteriana y en la respuesta a péptidos antimicrobianos, dando como resultado una cepa más virulenta y metabólicamente más activa.

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease caused by the causative agent *Mycobacterium tuberculosis*. It is currently estimated that one third of the world's population is infected. A major risk factor is smoking. Smoking is a global addiction problem. The WHO reported that smoking increases up to 1.6 times the risk of suffering from tuberculosis. Nicotine is the most studied component of cigarette smoke, since it generates a pro-inflammatory response from the host's point of view. From the point of view of the causative agent, there is no information about the response when the host is in contact with cigarette smoke. For this reason, it is important to know whether nicotine generates any changes directly in the virulence of *M. tuberculosis*. In this work, the growth of *M. tuberculosis* exposed to nicotine was evaluated, as well as the physical interaction between nicotine and the bacterium within type II pneumocytes using confocal microscopy, as well as the expression of the following virulence genes: *16S*, *lys X*, *pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompA_{tb}*, *hbhA*, *esxA* (*esat 6*), *esxB* (*cfp10*), *Hspx*, *katG*, *LpqH* and *caeA*. It was found that nicotine enters into the cell and is evenly distributed in the cytoplasm of type II pneumocytes, due to its lipophilic nature. There is also an interaction between the bacteria and nicotine, as shown by the colocalization of both elements within the cell. It was demonstrated that nicotine increases bacteria growth and it is suggested that this effect might be mediated through a structure similar to the *alpha 7* nicotinic acetylcholine receptor, which recognizes nicotine in the growth medium and produces changes in the virulence of the bacteria, upregulating the expression of genes that are related to changes in the secretion and cell surface, in the bacterial envelope and in the response to antimicrobial peptides, resulting in a more virulent and metabolically active strain.

1.0 Introducción

El consumo de tabaco es una adicción de problemática mundial, que causa millones de muertes directas o indirectas por las consecuencias de salud que ocasiona (Health, 2015). Estas se producen tanto por la interacción del humo directo y el de segunda mano (Feng *et al.*, 2014). Los gastos vinculados a las complicaciones en salud son altos y cuestan millones de dólares al año, aunado a que se generan durante la edad económicamente activa lo que empeora la situación económica (Ariyothai *et al.*, 2004).

La comorbilidad con otras enfermedades ha aumentado ya que ocasiona efectos adversos en todo el organismo, incrementa significativamente el riesgo de cáncer de pulmón, boca, laringe, esófago y vejiga, de enfermedades del corazón y a padecer infecciones microbianas como la tuberculosis (TB) (Siewchaisakul *et al.*, 2021).

La TB es causada por el agente causal *Mycobacterium tuberculosis* y se estima actualmente que un tercio de la población a nivel mundial se encuentra infectada. Los factores de riesgo son desnutrición, el nivel socioeconómico, la edad o fumar. En forma específica ser fumador activo o pasivo aumenta la incidencia para contraer o reactivar la TB (Koch, 2018).

Los componentes del humo del cigarro son alrededor de 4000, tanto en la fase gaseosa como en la fase sólida o de partículas. La nicotina es uno de estos compuestos, que genera cambios en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa dando lugar a una respuesta pro-inflamatoria (Marino, 2004). En fumadores se ha encontrado niveles séricos de $10\mu\text{M}$ (incluso se han evaluado hasta de $50\mu\text{M}$) (Thome *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista del huésped la patogenicidad en la TB inicia por inhalación de gotitas infecciosas, eliminadas al aire por el estornudo de un paciente infectado. *M. tuberculosis* entra por la nariz, pasa a la tráquea, bronquios, bronquiolos y alveolo. Una vez en el alveolo es fagocitado. Este proceso es necesario ya que se trata de un patógeno intracelular. Se genera una respuesta Th1 (para la formación de granulomas) en la cual las células T activadas producen interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o bien responden eliminando al patógeno sin generar granulomas.

Desde el punto de vista del agente infeccioso la respuesta se encuentra poco estudiada. Sabemos que *M. tuberculosis* son bacilos gram positivo, ácido-alcohol resistentes, con tamaño entre 0.2-0.7 micras (μm) de ancho y 1-10 μm de largo , ligeramente curvados, aerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas y de crecimiento lento. Su respuesta depende de los factores de virulencia. Se define como factor de virulencia al conjunto de mecanismos con los que cuenta un microorganismo para poder entrar al organismo, invadir los tejidos y provocar enfermedad (Liu *et al.*, 2016).

Sin embargo, no hay una respuesta concreta acerca de los factores de virulencia relacionados a la progresión de la TB en el ser humano, ni tampoco en su interacción cuando el huésped está en contacto con la nicotina.

Gracias a la secuenciación del gen de *M. tuberculosis* se ha logrado determinar una serie de genes involucrados en la virulencia y se pueden clasificar en diferentes grupos: los involucrados en la envoltura y secreción celular, los componentes de superficie celular, los involucrados en las enzimas del metabolismo celular, los encargados en la incorporación de metales y los reguladores transcripcionales.

Entonces resulta importante estudiar la relación entre los factores de virulencia de *M. tuberculosis* cuando se encuentra en presencia de la nicotina.

2.0 Antecedentes

2.1 Tabaquismo

El tabaquismo es de las mayores amenazas para la salud pública que ha tenido que afrontar el mundo, se estima que la mitad de las personas que consumen tabaco mueren. En el año 2022, se reportaron casi 8 millones muertes a nivel mundial relacionadas con el consumo de tabaco, de los cuales más de 1,200,000 son no fumadores expuestos al humo de segunda mano y se estima que cada año mueren 65,000 niños según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Salud, 2022). Casi el 80% de los fumadores que hay en el mundo viven en países de ingresos bajos o medios. En 2020, el 22,3% de la población mundial consumía tabaco, concretamente el 36,7% de todos los hombres y el 7,8% de las mujeres del mundo (Salud, 2022; Salud, 2015).

Los gastos relacionados con el consumo del tabaco son muy altos, además de que las complicaciones en salud también cuestan millones de dólares. En Estados Unidos, se han reportado más de 300 mil millones de dólares por año, incluyendo casi 170 mil millones de dólares para atención médica directa para adultos, más de 156 mil millones de dólares en pérdida de productividad, incluidos 5,6 mil millones en pérdida de productividad debido a la exposición al humo de segunda mano (Bishwakarma *et al.*, 2015). La adicción al tabaco y sus efectos nocivos en la salud está relacionada con los componentes del humo del cigarro por eso es importante conocerlos.

2.2 Componentes del humo del cigarro

Los componentes del humo del cigarro son alrededor de 4,685 sustancias diferentes y son altamente tóxicas, tanto para los tejidos del sistema respiratorio y circulatorio como para las células del conjunto del organismo humano. Las sustancias que aparecerán en el humo de la combustión se dividen en dos fases: fase gaseosa y fase sólida o de partículas (Ariyothai *et al.*, 2004). La separación de las fases se realiza pasando el humo del tabaco por un filtro formado por agujas de vidrio muy finas que retienen las partículas dejando pasar la fase gaseosa.

Posteriormente se identifican las sustancias con espectrometría de masas o cromatografía gaseosa (Ariyothai *et al.*, 2004). Algunos de los componentes identificados en la fase gaseosa son los siguientes: monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), acetona, acetonitrilo, acetileno, NH₃ (amonio), dimetilnitrosamina, ácido cianídrico (HCN), metano, propano, piridina, metil clorhidrato, metil furano, óxido nítrico (NO), nitrospirrolidina, propionaldehido, 2-butano, 3-picolina, 3-binilpiridina, entre otros (Liao *et al.*, 2015).

De la fase de partículas se han aislado: nicotina, anilina, benzopireno, catecolamina, hidracina, naftalina, metil naftalina, metil quinolinas, fenol, pireno, quinolona, tolueno, 2-naftilamina, 4-aminopifenil, entre otros (Liao *et al.*, 2015).

Se observan variaciones cuantitativas de los componentes en los diferentes tipos de cigarrillos, debido a características del tipo de filtros, factores de producción, uso de fertilizantes, métodos analíticos, etc. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha incluido algunos agentes químicos procedentes del humo del tabaco en el “Grupo I de carcinógenos humanos”: benceno, Cadmio (Cd), Arsénico (As), Niquel (Ni), Cromo (Cr), 2-naftil-amino, cloro vinil, 4 aminobifenil y Berilio (Be). Cuando se usan los piretroides como insecticidas en el cultivo del tabaco, algunos residuos de estos componentes pueden aparecer en el humo del cigarrillo.

Al consumir cigarrillos se tienen dos clases de usuarios:

- El primer grupo ingiere el humo mediante una maniobra de aspiración en que el fumador lo dirige hacia su propio aparato respiratorio, pasando de la cavidad oral directamente a los pulmones (Ariyothai *et al.*, 2004).
- Un segundo grupo o lateral que se produce al consumirse espontáneamente el humo del cigarro, que es la que inhala el fumador pasivo (Ariyothai *et al.*, 2004).

La absorción de los componentes va a depender del pH y de la solubilidad, así los elementos más solubles en agua se absorberán en vías aéreas superiores y los de baja

solubilidad se absorberán a nivel alveolar. Una vez absorbidos pasan a circulación ejerciendo su efecto en cerebro y tejidos periféricos. Muchas de estas sustancias no permanecen como tales en el organismo, sino que forman metabolitos o sustancias intermedias que reaccionan con otros componentes del propio organismo o componentes externos (Feng *et al.*, 2014).

2.3 Nicotina

La nicotina es un compuesto orgánico, un alcaloide encontrado principalmente en la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*), con alta concentración en sus hojas (constituye cerca del 5% del peso de la planta y del 3% del peso del tabaco seco) (Armitage *et al.*, 1970).

La nicotina (C₁₀ H₁₄ N₂) posee dos núcleos heterocíclicos nitrogenados: un anillo piridínico y otro pirrolidínico, es liposolubles, se fija selectivamente a los receptores colinérgicos nicotínicos, presentando una acción activadora al principio y bloqueadora posteriormente. El equilibrio entre sus formas ionizadas y no ionizadas dependen del pH del medio. Cuando éste es ácido la nicotina tiende a estar ionizada y consecuentemente presenta una notable dificultad para atravesar las membranas biológicas. Por el contrario, cuando el medio es básico, la nicotina tiende a estar en su forma no ionizada, por lo que dada su liposolubilidad atraviesa con facilidad las membranas biológicas (Benowitz *et al.*, 1988).

La nicotina es la responsable de la adicción al tabaco. La mayoría de los cigarrillos del mercado contienen 10 mg o más de nicotina, de la cual se inhala entre 1 y 2 mg/cigarrillo. En fumadores se ha encontrado en promedio, niveles séricos de 10 µM (incluso se han evaluado hasta 50 µM). Es el alcaloide más importante (90 – 95 % del total de alcaloides) (Liao *et al.*, 2015).

En el humo de los cigarrillos está principalmente en forma de sales ácidas (en el humo de los puros se encuentra en forma de sales básicas), por lo que su absorción a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nivel bucal es mínima; de ahí la necesidad del fumador de hacer inhalaciones profundas para absorber la nicotina a nivel pulmonar, arrastrando consigo todas las sustancias tóxicas presentes en el humo del pulmón, a través de la circulación pulmonar, pasa a circulación arterial, por lo que accede al cerebro muy rápidamente, en un plazo de 9-10 segundos. Posteriormente se distribuye vía sanguínea por otros tejidos, como pulmón o hígado (Metcalf *et al.*, 2014).

El metabolismo ocurre mayoritariamente en el hígado a través del citocromo P-450, formándose metabolitos sin capacidad adictiva: cotinina y nicotina 1'-N-óxido (Ko *et al.*, 2015). La excreción de estos metabolitos, así como de la nicotina no metabolizada (entre un 5 y un 10 %) se produce principalmente a través del riñón, dependiendo del pH de la orina (a pH ácido se favorece la eliminación). Otras vías de eliminación son la saliva, el sudor, la leche materna y a través de la placenta (Zacharasiewicz, 2016).

A nivel cerebral una parte de la nicotina se transforma en metabolitos intermedios (como nornicotina) que pueden ser neurotóxicos, y actuar sobre los receptores colinérgicos nicotínicos en el sistema nervioso central. Recientes investigaciones en ratas han demostrado que la nornicotina tiene efectos estimulantes en el aparato locomotor y refuerza los efectos de la nicotina (Liao *et al.*, 2015).

Los efectos de la nicotina son inmediatamente después de la absorción, produce una activación de las glándulas adrenales y una descarga de adrenalina que produce estimulación corporal y descarga súbita de glucosa, aumento de la presión arterial, la respiración y el ritmo cardíaco (Feng *et al.*, 2014).

Además, su potencial adictivo también se debe a que produce liberación de dopamina en las regiones del cerebro que controlan las sensaciones de placer y bienestar; hay que tener en cuenta que la nicotina crea tolerancia. En contraposición, dependiendo de la dosis de nicotina inhalada y del nivel de estimulación del sistema nervioso, la nicotina puede producir efecto sedante (Kearley *et al.*, 2015). En la tabla 1 se enumeran alteraciones ocasionadas por la exposición a la nicotina en diferentes partes del organismo.

Tabla 1. Alteraciones de la nicotina (Liao *et al.*, 2015)

Efectos neuroendocrinos	Aumento de la liberación de hormona cortisol, vasopresina, aldosterona, hormona del crecimiento y prolactina.
Aparato circulatorio	Aumento de la presión sanguínea y vasoconstricción a nivel de pequeños vasos periféricos, lo que implica menor aporte sanguíneo a la parte irrigada y disminución de la temperatura sobre todo de manos y pies.
Sistema gastrointestinal	Se sabe que el fumar aumenta la amenaza de los cánceres del páncreas, del estómago, de la boca, del hígado, del recto, del colon y del esófago, y puede causar condiciones tales como enfermedad del reflujo gastro del esófago.
Sistema respiratorio	El aumento de la frecuencia respiratoria hace que se reduzca la función inmunitaria del pulmón, lo que favorece la aparición de infecciones y el desarrollo de neoplasias.
Perfil lipídico	Aumento en el recuento celular y en el tamaño de plaquetas y disminución en la capacidad de deformación plaquetaria. El mayor número de plaquetas, junto con la disminución en la síntesis de prostaglandinas favorece la adhesividad y la agregación plaquetaria. Pero además la nicotina produce aumento de tromboxanos, trombina y fibrinógeno, lo que también favorece la formación de trombos plaquetarios intravasculares.
Metabolismo	Aumento del metabolismo basal.
Interacciones metabólicas	Se van a producir interacciones con muchas sustancias, incluidos fármacos, que utilizan la misma vía de metabolización que la nicotina (P-450), bien compitiendo con ellos, o bien acelerando su metabolismo (es el caso de la teofilina).

La nicotina se detecta por el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), el cual pertenecen a la superfamilia de receptores ionotrópicos. Existen diferentes subtipos, formados por la asociación de cinco subunidades que están codificadas por diversos genes (Carlsom, 2022). Hasta el momento, los genes codifican para dos subfamilias, una de nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y otra de tres subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$), cuya expresión se ha detectado en diversas células del cuerpo. Estas subunidades se ensamblan formando pentámeros, que pueden ser homoméricos o heteroméricos, dejando un canal central permeable a iones que posee diferentes propiedades estructurales, funcionales y farmacológicas (Hendrickson, 2022).

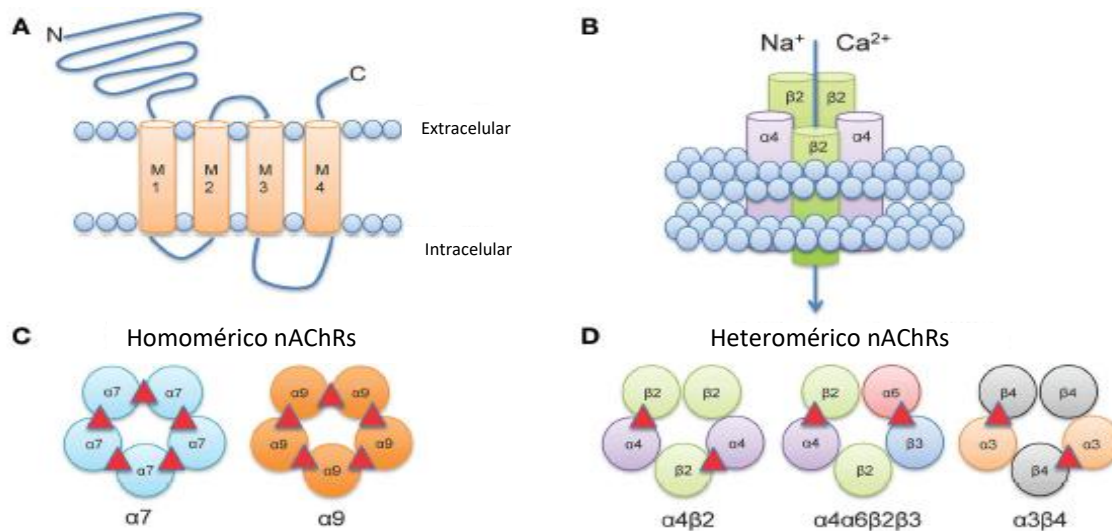


Figura 1. Estructura de los receptores nAChR . (A) Estructura del receptor nAChR homomérico se notan los dominios extracelular e intracelular, las subunidades (M1-M4). (B) Estructura del receptor nAChR heteromérico con cinco subunidades funcionales. (C) Los receptores homoméricos constan de una sola subunidad y por lo general tienen agonistas de baja afinidad. Se muestran dos receptores con subunidades *alpha-7*, *alpha-9*. (D) Los receptores heteroméricos tienen alta afinidad y consisten en una combinación de subunidades *alpha* y *beta*, los sitios de unión se describen como triángulos rojos (*Hendrickson et al., 2013*). Traducido por JPHA.

Los nAChR pueden agruparse en dos familias: los sensibles a α -bungarotoxina (α -BgTx) que es una toxina de la serpiente krait (*Bungarus multicinctus*) (Whiting, 1987), los cuales están formados por subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$, que pueden formar receptores homoméricos o heteroméricos; y los heteroméricos formados por subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$, a los que se une con elevada afinidad la nicotina y diversos agonistas nicotínicos. En función de las subunidades que los forman, los nAChR son permeables a los cationes Na^+ , K^+ o Ca^{2+} . (*Hendrickson et al., 2013*)

Otro inhibidor del receptor nAChR es la mecamelamina (Inversine®), el primer agente antihipertensivo disponible por vía oral lanzado en la década de 1950, aunque rara vez se utiliza hoy en día para la hipertensión debido a sus efectos secundarios. Sin embargo, estudios clínicos más recientes sugieren que la mecamilamina es eficaz a dosis mucho

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

más bajas para bloquear los efectos centrales y periféricos de la nicotina. Farmacológicamente, la mecamelamina se ha caracterizado bien como un antagonista no selectivo y no competitivo de los nAChRs, debido a que la mecamelamina atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica en dosis relativamente bajas (2.5 a 10 mg) (Bacher *et al.*, 2009).

2.4 Efecto de la nicotina sobre el sistema inmune

La exposición al humo de tabaco ha sido considerada como una causa importante de muerte en todo el mundo y se relaciona con el desarrollo de enfermedades respiratorias, cardiovasculares, infecciones y cáncer. Mientras tanto, fumar ha sido implicado en la producción de muchas proteínas inmunes o mediadores inflamatorios y los antiinflamatorios.

Recientemente, muchos estudios han demostrado que fumar cigarrillos tiene muchas implicaciones en otras enfermedades incluyendo la artritis reumatoide (AR), psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el lupus eritematoso sistémico (LES) (Ariyothai *et al.*, 2004).

La creciente evidencia ha asociado a fumadores con anomalías en la respuesta de las células inmunes innatas (Liao *et al.*, 2015; Zacharasiewicz, 2016), aunque los mecanismos todavía son poco conocidos. Kearley y colaboradores (2015), encontraron que la exposición al humo del cigarro elevó la concentración de IL-33 de células epiteliales, en contraste que la exposición al humo mejoró la expresión del receptor ST2 por los macrófagos y las células asesinas naturales (NK), pero disminuyó en las células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2s)..

Las células inmunes innatas, incluyendo las células dendríticas (DC), células NK y macrófagos, entre otros juegan un papel importante en la defensa del huésped contra las infecciones (Qiu *et al.*, 2017).

Los macrófagos responden a patógenos exógenos por medio de la fagocitosis y digestión, encargados de reclutar y activar linfocitos a través de su capacidad de presentar antígenos. Ko y colaboradores (2015) informaron que tanto fumar como los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tratamientos con nicotina inducen la producción de IL-8 en macrófagos tanto en humanos como ratones (Ariyothai *et al.*, 2004). Metcalfe y colaboradores (M2014), por otro lado, reportaron que el extracto de humo de cigarro inhibe las respuestas de los macrófagos alveolares derivados de pacientes con EPOC a señalizar vía TLR-2 así como a la estimulación por *Haemophilus influenzae*.

Estudios sobre macrófagos de ratón demostraron que el tabaquismo suprime notablemente fagocitosis de los macrófagos (Ni *et al.*, 2015). Otro estudio mostró una tendencia similar en la función fagocítica de los macrófagos humanos THP-1 tratados con extracto de humo de cigarrillo (Henkels *et al.*, 2016).

2.5 La nicotina y la tuberculosis

Información reciente acerca de la relación entre la exposición al humo de cigarro y la TB muestra que la nicotina es el principal componente que genera cambios en la inmunidad del huésped, además incrementa la aparición de la tos y la severidad, frecuencia y duración de ésta como síntoma.

En pacientes fumadores existe un incremento en los cultivos positivos en pruebas de esputo, esto genera un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad. Aunado a los factores de riesgo como malnutrición o un estado de hacinamiento, hacen que la probabilidad de infectarse sea de 1.5 a 2.5 veces mayor cuando se está en contacto con el humo de cigarro (Bai *et al.*, 2018). En la figura 2 se ejemplifica el aumento del riesgo de contagio en personas expuestas al humo del cigarro.

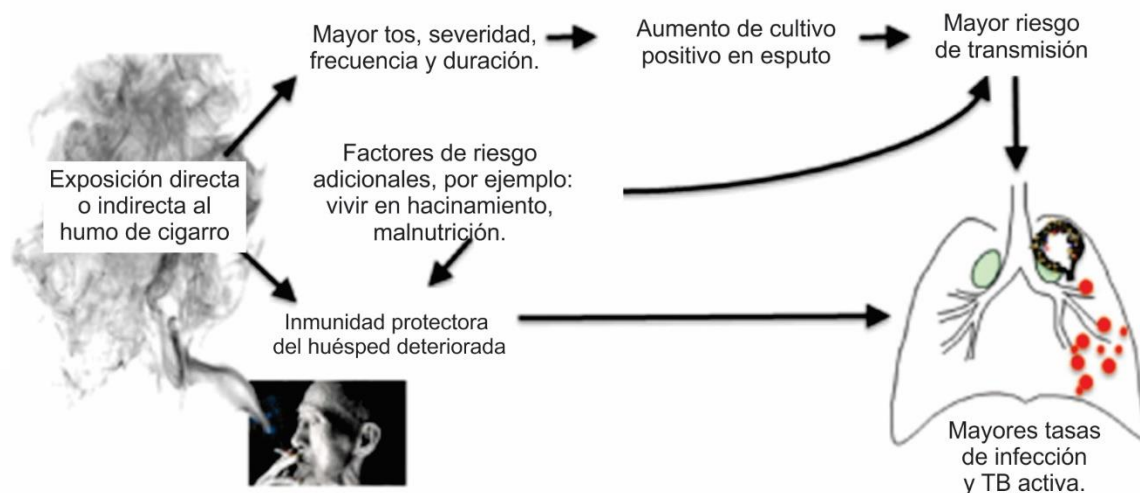


Figura 2. **Relación entre el humo de cigarrillo y tuberculosis.** La relación entre la exposición al humo de cigarrillo de manera directa o indirecta, tienen efecto en el deterioro de la inmunidad del huésped, aunado a el efecto directo en el aumento de la tos tanto la severidad, frecuencia y duración de la misma, además aumentan la cantidad de cultivos positivos en esputo y por tanto existe un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad, todo esto ocasiona mayores tasas de infección de tuberculosis activa. (Bishwakarma *et al.*, 2015) Modificado por Jeny de Haro.

Estudios recientes en ratones *C57BL/6* que fueron expuestos al humo del cigarrillo y después infectados con *M. tuberculosis*, reportan incremento en el crecimiento bacteriano, además de cambios en los perfiles de linfocitos T CD4 y disminución en la cantidad de macrófagos tipo M1 (Figura 3-A). (Miramontes *et al.*, 2021).

En macrófagos infectados con *M. tuberculosis* y expuestos a nicotina se incrementa la carga bacteriana intracelular, pero se disminuyen la producción de péptidos antimicrobianos como HBD-2, HBD-3 y LL-37 (Miramontes, 2021), se modifica la expresión de los receptores tipo Toll (TLR)-2, TLR-4 y NOD-2 (Chan *et al.*, 2021) y disminuye la autofagia (Bai *et al.*, 2018). (figura 3-B)

En pneumocitos tipo II expuestos a nicotina e infectados con *M. tuberculosis*, aumenta la carga bacteriana intracelular y disminuye de expresión de HBD-2 y LL-37 (Miramontes *et al.*, 2021) (Figura 3-C). Los efectos tanto en macrófagos como en neumocitos tipo II por la nicotina, son causados parcialmente por el nAChR $\alpha 7$, ya que al bloquearlo se revierte parcialmente el efecto (Bai *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2021).

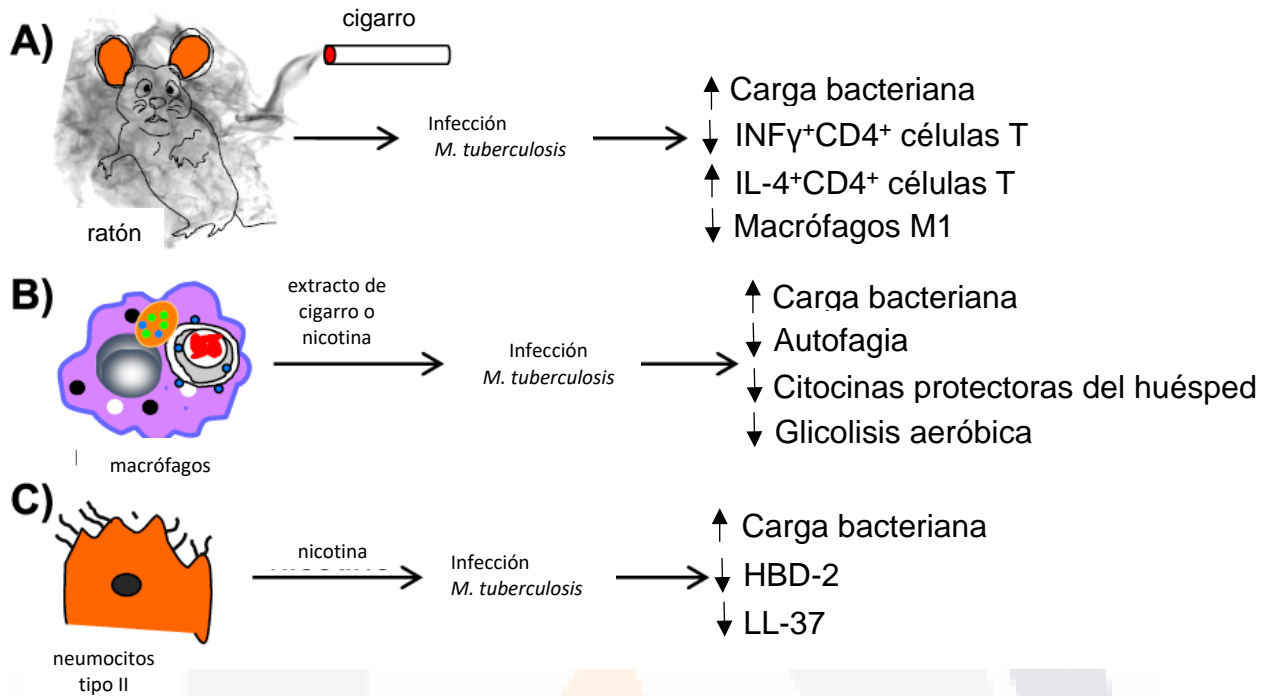


Figura 3. Efecto de la interacción de la nicotina y *M. tuberculosis* en células de la respuesta inmune.

(A) Resumen de los estudios murinos *in vivo* de exposición a extracto de cigarro e infección por *M. tuberculosis*. (B) Resumen de los estudios de macrófagos *in vitro* de exposición a extracto de la nicotina o nicotina e infección por *M. tuberculosis*. (C) Resumen de Valdez-Miramontes *et al.* trabajo de exposición a nicotina e infección por *M. tuberculosis* con neumocitos tipo II. (Chan *et al.*, 2021) Modificado por Jeny de Haro.

2.6 Tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa causada por *M. tuberculosis* que afecta principalmente al pulmón, pero puede infectar otros órganos y sistemas (Marino *et al.*, 2004), es la decimotercera causa de muerte y la enfermedad infecciosa más mortífera por detrás de la COVID-19. La OMS reportó en el año 2015 que la incidencia mundial de la TB fue de 8.8 millones de casos (136 por 100 000 habitantes), de los cuales 3.9 millones (60 por 100 000) eran casos pulmonares confirmados mediante baciloscopia directa del esputo, a diferencia del año 2021 que se reportó 10.6 millones de personas

que contrajeron la enfermedad llegando a 1.6 millones fallecieron a causa de ella (Mathers, 2006).

Se estima que un tercio de la población mundial está infectado con TB latente (Gutsmann, 2016). Su control requiere identificar los factores de riesgo entre ellos está la desnutrición, el estado socioeconómico, la edad o fumar. Ser fumador activo o pasivo aumenta hasta en un 70% la posibilidad de contraer TB o reactivar el estado de latencia (Ariyothai *et al.*, 2004).

2.7 Patogenia

M. tuberculosis se transmite por inhalación de gotitas infecciosas, eliminadas al aire por el estornudo de un paciente con tuberculosis, a través de las heces y mediante la orina. La transmisión puede ser indirecta, ya que la micobacteria es muy resistente a la desecación y puede estar por muchos meses en el polvo o en los objetos de uso diario (Amador, 2001). Su dosis infectiva mínima (DIM) es de menos de 10 bacilos por inhalación (Perez-Lago *et al.*, 2016).

Las barreras como la piel y las mucosas respiratorias íntegras de las personas sanas resisten a la invasión. Para que haya infección, es necesario transportar bacilos hasta los espacios aéreos distales del pulmón es decir hasta los alvéolos (Amador, 2001). Una vez depositados en los alvéolos, las manifestaciones clínicas dependen de una combinación de factores genéticos del huésped, genes bacterianos (factores de virulencia), estado nutricional del huésped, sistema inmune del huésped y respuesta Th1 (para la formación de granulomas) (Lerner *et al.*, 2015).

M. tuberculosis entra por la nariz pasa a la tráquea, bronquios, bronquiolos y alveolos. La respuesta mediada por las células epiteliales se divide en 3:

- a) Células epiteliales de la vía aérea, como barrera que previene la invasión (Lerner *et al.*, 2015).

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- b) La lamina propia, que es una capa de tejido conectivo y células inmunes, incluidos linfocitos y macrófagos (Lerner *et al.*, 2015).
 - c) Líquido de la superficie de las vías aéreas que contiene péptidos antimicrobianos (Lerner *et al.*, 2015).

Después de la infección primaria las micobacterias son opsonizadas con moléculas de complemento (C3b), inmunoglobulinas G (IgG), proteína de unión a manosas (MBP), y el factor surfactante A (SPA). Esto permite a la bacteria ingresar al macrófago de manera eficiente (Marino *et al.*, 2004).

La replicación ocurre inicialmente en vías aéreas terminales dentro de células fagocíticas. Los macrófagos y células dendríticas los distribuyen a otras áreas pulmonares y a ganglios linfáticos regionales activando las linfocitos (Marino *et al.*, 2004).

En los pulmones, las células T activadas producen citocinas, tales como IFN- γ y TNF- α . El IFN- γ es esencial para la activación de los macrófagos, que producen entonces NO, que contribuye fundamentalmente en el control de la infección. Una vez que se monta una respuesta inmune celular, las bacterias disminuyen y se desarrollan granulomas (Lerner *et al.*, 2015; Marino *et al.*, 2004).

Varios componentes de la pared celular de las micobacterias tienen actividad inmunomoduladora, entre ellos un glicolípidio fenólico, manósidos de fosfatidil-inositol, la lipo-arabinomanana y lipoproteínas.

Estas moléculas son reconocidas por los TLRs y otros receptores innatos en macrófagos y CD, que activan tanto la respuesta inmune protectora como la respuesta patogénica (Metcalf *et al.*, 2014).

2.8 Factores de Virulencia

La secuenciación de todo el genoma de *M. tuberculosis* ofrece nuevas herramientas genéticas para el estudio de la patogenicidad de este microorganismo. La habilidad de un patógeno bacteriano para sobrevivir dentro de un organismo hospedero requiere de la expresión de una serie de determinantes genéticos involucrados en la

interacción patógeno-hospedero, situación que le permite resistir el estrés fisiológico y ambiental. La virulencia de *M. tuberculosis* puede ser medida durante la infección de macrófagos y animales mediante diferentes herramientas (Jia *et al.*, 2017).

Desafortunadamente, no hay una respuesta concreta acerca de los factores de virulencia relevantes para la progresión de la TB en el ser humano. Sin embargo, ésta puede ser cuantificada a través de la estimación de morbilidad y mortalidad causada por aislados clínicos o cepas mutantes en modelos animales (conejo, ratón, primates, bovino, entre otros).

De esta manera, cepas de *M. tuberculosis* mutantes respecto de su virulencia han sido clasificadas como fenotipos SGIV ("severe growth in vivo"), GIV ("growth in vivo") y PER ("persistence genes") (Jia *et al.*, 2017).

Asimismo, se ha descrito diferencias entre el perfil de expresión génica de *M. tuberculosis* dentro de los pulmones y bazo de ratón, así como diferencias entre la expresión de ciertos genes de éstos con respecto al pulmón de pacientes con TB crónica activa (Jia *et al.*, 2017).

De igual manera, la virulencia se puede determinar *ex vivo* (estudio de la primera etapa de la infección), utilizando macrófagos de ratón o humanos, CD o neumocitos. La combinación de las citadas estrategias experimentales ha permitido identificar una serie de genes relevantes para la patogenicidad de *M. tuberculosis*, los que se han agrupado en base a su función en distintos tipos de factores de virulencia: envoltura y secreción celular; componentes de superficie celular; enzimas del metabolismo celular; incorporación de metales y reguladores transcripcionales (Jia *et al.*, 2017).

El primer grupo, **factores de virulencia de envoltura y secreción celular**, se refiere a las proteínas que se espera sean expuestas al medio ambiente en que crece *M. tuberculosis*, ya sea *in vitro* o dentro del micofagosoma, tales como las CFPs (Culture Filtrate Proteins), que se encuentran en el medio de cultivo del bacilo o asociadas a células (Jia *et al.*, 2017). Se conoce alrededor de doscientas (*KatG*, *SodA*, *HspX*, *ESAT6/CF-10*, Glutamina sintasa, entre otras), algunas de éstas son reconocidas por el suero de pacientes con TB activa (*HspX*, *ESAT-6*, *CFP-10*, *LpqH*, otras).

Entre los factores de virulencia proteicos se encuentra la proteína *HspX*, la cual es análoga de la proteína de 16 kDa. Esta proteína es considerada como un importante elemento controlador de la latencia de *M. tuberculosis*, debido a que la sobreexpresión de la misma inhibe el crecimiento del microorganismo (Liu *et al.*, 2016).

Por otra parte, la lipoproteína de *LpqH* induce la expresión y secreción de ciertos péptidos antimicrobianos a través de TLRs en células epiteliales de pulmón, los cuales son capaces de eliminar a la micobacteria. Es posible que la presencia de esta molécula esté ligada a factores de resistencia natural y pueda variar entre individuos debido a polimorfismos genéticos (Jia *et al.*, 2017). La señalización de TLRs en forma prolongada por *M. tuberculosis* y la lipoproteína *LpqH*, inhibe ciertas respuestas del macrófago al IFN- γ , particularmente aquellas relacionadas a la expresión de MHC-II y la presentación de antígenos.

Esta inhibición posiblemente promueve la evasión del *M. tuberculosis* a la respuesta inmunitaria mediada por las células T, lo que implica la persistencia de la infección en la enfermedad (Metcalf *et al.*, 2014).

ESAT-6 y *CFP-10* son secretados por el sistema de secreción *ESX-1* (tipo VII) de *M. tuberculosis*, el cual se encuentra codificado en la región RD-1 del cromosoma de *M. tuberculosis*. *ESX-1* resulta crítico para la virulencia de *M. tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. *ESX-1* media la exportación de factores de virulencia que permiten modular la respuesta inmune de los macrófagos en las primeras etapas de la infección (Jia *et al.*, 2017).

Acerca del grupo de **factores de virulencia de superficie celular** se sabe, que son exclusivos de la pared celular de los *Mycobacterium* patógenos, y que es una estructura compleja y única, que contiene proteínas, lípidos y carbohidratos (*Erp*, *Mas*, *FadD26*, *FadD28*, *MmpL7*, *FbpA*, *MmaA4*, *PcaA*, *OmpA*, *HbhA*, *LAM*, entre otros), por tanto, eventualmente excelentes blancos para contrarrestar la virulencia de *M. tuberculosis*. Se conoce además que *OmpA*, proteína familia de las porinas y encontrada en *M. tuberculosis H37Rv*, juega un papel fundamental en la respuesta bacteriana frente a condiciones de pH ácido (Jia *et al.*, 2017).

Las proteínas *FbpA*, *B* y *C* (micolil-transferasas) se definen como los antígenos inmuno dominantes 85A, B y C (Jia *et al.*, 2017).

Los **factores de virulencia** del grupo de las **enzimas involucradas en el metabolismo celular general** se relacionan con el hecho de que *M. tuberculosis* utiliza preferentemente carbohidratos cuando crece *in vitro* y ácidos grasos cuando infecta a su hospedero. Actualmente, se describen más de 200 genes (*Icl*, *lipF*, *fadD33*, Fosfolipasas *C*, *panC/panD*, entre otros) involucrados en el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos (Kumar *et al.*, 2017). Por ejemplo, *Icl* (isocitratoliasa) convierte isocitrato en succinato, permitiendo que *M. tuberculosis* crezca en ácidos grasos o acetato vía ciclo de Krebs. La actividad de *Icl* se incrementa en fase estacionaria (*in vitro*) y el mRNA aumenta dentro del macrófago humano (Jia *et al.*, 2017).

En cuanto a los estudios realizados con el grupo de **factores de virulencia asociados a la respiración anaeróbica y el estrés oxidativo**, estos sugieren que la anaerobiosis y la microaerofilia son importantes para la fisiología de *M. tuberculosis* durante la infección, especialmente en las fases tardías de la infección (granuloma pulmón). Además, *M. tuberculosis* codifica enzimas (*SodA*, *SodC*, *KatG*, *AhpC*) que combaten los intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) generados durante la respiración aeróbica y aparentemente también los generados dentro del macrófago (Jia *et al.*, 2017).

Los **factores de virulencia asociados a la captura de metales** (hierro y el magnesio), los cuales son esenciales para la vida de *M. tuberculosis*, pueden exacerbar la progresión de la tuberculosis en los humanos y modelos animales como lo es en el caso del hierro. A menudo, defectos en sus sistemas de incorporación (*MgtC*, *MbtB*, *IdeR*) se traducen en la atenuación de los patógenos. Por ejemplo, *IdeR* es esencial para *M. tuberculosis* (Jia *et al.*, 2017).

En relación a los **factores de virulencia del tipo regulador transcripcional**, encargados de controlar la transcripción de numerosos genes [*RpoS*; Reguladores de respuesta (*PhoP*)] un estudio sobre la inactivación del gen *phoP*, responsable de la supervivencia de *M. tuberculosis* intracelularmente, demostró la elevada atenuación que

se obtenía al inactivar este gen que codifica para el factor transcripcional del sistema de dos componentes *phoP/phoR* (Liu *et al.*, 2016).

Este estudio demostró que *phoP* regula funciones esenciales requeridas para la virulencia y persistencia de *M. tuberculosis*. Se ha estudiado otros mutantes en los sistemas de dos componentes (*RegX3*, *TrcS*, *MprAB*, *PrrA*) pero sólo *PhoP* ha afectado la virulencia de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos. Sigma alternativos (*SigA*, *SigB*, *SigE*, *SigF*, *SigH*), son importantes para la virulencia de *M. tuberculosis*, similar a lo descrito para otros patógenos humanos (Liu *et al.*, 2016). Tal es el caso del factor sigma *SigA*, el cual es esencial y el principal factor para la transcripción de la mayoría de los genes "housekeeping" (Jia *et al.*, 2017).

En la actualidad se ha logrado determinar una serie de genes involucrados en la virulencia de *M. tuberculosis*, mediante la utilización de diferentes modelos de experimentación animal y diversas técnicas de biología molecular. El empleo de la bioinformática y la proteómica, así como la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis*, han permitido corroborar la función de los productos codificados por estos genes en la patogénesis de la tuberculosis. Estos resultados evidencian que la patogenia del bacilo es un fenómeno multifactorial donde están involucrados, de forma directa o indirecta, moléculas con diferente función y localización en la célula bacteriana (Jia *et al.*, 2017).

En la tabla 2.0 se muestra una lista de genes en donde se indica la categoría donde se ubica el gen, el nombre la ubicación en el genoma de H37Rv, la descripción del gen y el efecto medible que genera cada uno (Forrellad *et al.*, 2013).

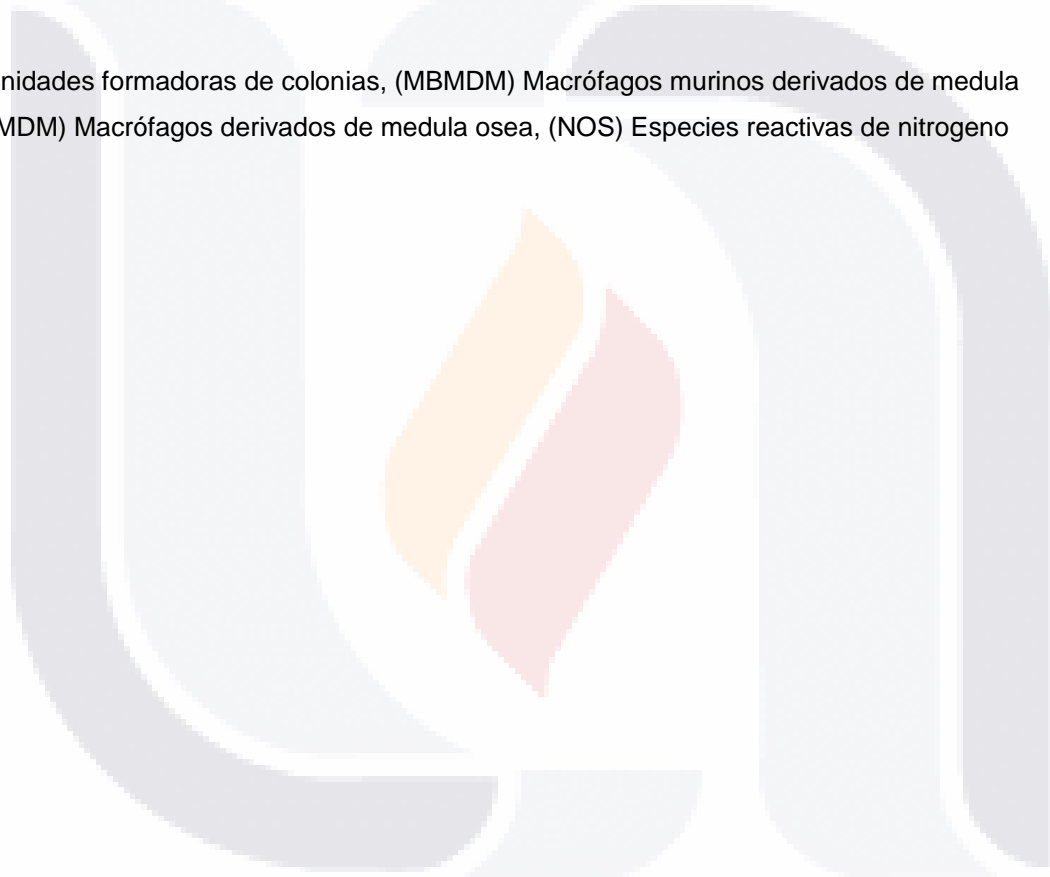
Tabla 2 Características de genes relacionados con los factores de virulencia su descripción y su efecto (Forrellad *et al.*, 2013)

Categoría	Nombre del gen	Número Rv	Descripción	Modelo	Efecto	Referencia
Sintasa de ácido micólico	<i>mymA operon</i>	Rv3083 to Rv3089	Probable monoxidasas (hidroxilasa).	Macrófagos J774	Reduce UFC	(Singh <i>et al.</i> , 2005)
Síntesis de lípidos	<i>ilc1/ccl2</i>	Rv0467/Rv1915 y Rv1916	Isocitrato liasa	MBMDM/BMDM	Falla la persistencia/ Reduce UFC	(Munoz-Elias <i>et al.</i> , 2005)
Proteína de la envoltura celular	<i>Erp</i>	Rv3810	Exportador de proteínas	MBMDM	Reduce UFC	(Berthet <i>et al.</i> , 1998)
Proteínas de la pared celular	<i>fbpA</i>	Rv3804	Proteína unida a la fibrinectina, micólico transferasa	Macrófagos THP-1/j774	Reduce UFC	(Armitige <i>et al.</i> , 2000)
	<i>ompAtb</i>	Rv0899	Proteína formadora de poro	THP-1	Reduce UFC	(Raynaud <i>et al.</i> , 2002)
	<i>hbhA</i>	Rv0475	Proteína hemaglutinina de unión a heparina (adhesión)	A549	Reduce UFC y adhesión	(Pethe <i>et al.</i> , 2001)
	<i>kef</i>	Rv3236c	Antitransporte de H ⁺ /K ⁺ , afecta producción de ROS	Macrófagos J774	Reduce el fagosoma y ROS	(Butler <i>et al.</i> , 2010)
	<i>cat</i>	Rv2200c	Cytochrome C oxidase	MBMDM	Reduce UFC	(McCann <i>et al.</i> , 2011)
Lipoproteínas	<i>lprG-p55</i>	Rv1411c-Rv1410c	Bomba de flujo de antibióticos P55	Macrófagos J774	Reduce UFC	(Bianco <i>et al.</i> , 2011)
Sistema de secreción	<i>EsxA</i>	Rv3875	<i>Esx-1</i> componente y sustrato (C o S)	THP-1-1	Reduce UFC	(Bianco <i>et al.</i> , 2011)
	<i>EsxB</i>	Rv3874	<i>Esx-1</i> componente y sustrato (C o S)	THP-1-1	Reduce UFC	(Pallen, 2002)
	<i>espH</i>	Rv3867	<i>Esx-1</i> componente y sustrato (C o S)	THP-1/BMDM	Reduce UFC	(Pallen, 2002)
	<i>espC</i>	Rv3615	<i>Esx-1</i> componente y sustrato (C o S)	BMDM	Reduce UFC	(MacGurn <i>et al.</i> , 2005)
	<i>eccCd</i>	Rv3877	<i>Esx-1</i> componente y sustrato (C o S)	BMDM	Reduce UFC	(Munoz-Elias <i>et al.</i> , 2005)
	<i>mycP1</i>	Rv3883	<i>Esx-1</i> componente y sustrato (C o S)	MBMDM	Reduce UFC	(Ohol <i>et al.</i> , 2010)
	<i>eccD5</i>	Rv1795	<i>Esx-1</i> componente y sustrato (C o S)	MBMDM	Reduce UFC	(Bottai <i>et al.</i> , 2012)
	<i>ppe25 a ppe19</i>	Rv1787/Rv1791	Señal peptidasa para lipoproteínas	MBMDM	Reduce UFC	(Bottai <i>et al.</i> , 2012)
	<i>IspA</i>	Rv1539	ATPasa protein traslocasa	Macrófagos J774	Reduce UFC	(Berthet <i>et al.</i> , 1998)

Efectos de la inhibición de los péptidos antimicrobianos en macrófagos	<i>acr1(hspX)</i>	Rv2031c	Proteína asociada a inactividad	MBMDM/THP-1	Reduce UFC	(Wilson <i>et al.</i> , 1998)
Estrés oxidativo y nitroso	<i>ahpC</i>	Rv2428	Alquil hidroperoxidasa reductasa C	Macrófagos J774	Reduce UFC	(Yuan <i>et al.</i> , 1998)
	<i>mel2</i>	Rv1936/Rv1941	Enzima peroxido catalasa	j774 macrófagos/MBMDM/PBMC	Reduce UFC	(Bianco <i>et al.</i> , 2011)
	<i>katG</i>	Rv1908	Tirosin fosfatada de bajo peso molecular	BMDM RNS- activados	Reduce UFC	(Berthet <i>et al.</i> , 1998)
Arresto del fagosoma	<i>ptpA</i>	Rv2234	Miembro de la familia PE	THP-1	Reduce UFC	(Bach <i>et al.</i> , 2008)
	<i>pe_pgrs30</i>	Rv1651c	Serina/treonina kinasa E	Macrófagos J774/THP-1	Reduce UFC	(Amador, 2001)
Inhibición de apoptosis	<i>pknE</i>	Rv1743	CHIP	THP-1	Reduce supervivencia de la bacteria	(Butler <i>et al.</i> , 2010)
		Rv3654c/Rv3655c	Serina proteasa	Macrófagos U937 apoptosis	Reduce UFC	(Butler <i>et al.</i> , 2010)
Proteasas	<i>mycp1</i>	Rv3883c	Regulador transcripcional	MBMDM	Reduce UFC	(Mathers, 2006)
Proteasa dependiente de ATP	<i>clgR</i>	Rv2745c	Metaloproteasa dependiente de Zn ²⁺	MBMDM/J774/RAW264.7	Reduce UFC	(Estorninho <i>et al.</i> , 2010)
Metaloproteasas	<i>zmp1</i>	Rv0198c	ATPasa mycobacterium proteosoma	THP-1	Sin diferencia en UFC	(Butler <i>et al.</i> , 2010)
Proteosoma asociado a proteínas	<i>Mpa</i>	Rv2115c	Transportador de hierro	MBMDM	Reduce UFC	(Rodriguez, 2006)
Proteínas de transporte de metales	<i>mbtB</i>	Rv2383c	Proteína reguladora dependiente de hierro	THP-1	Reduce UFC	(Rodriguez, 2006)
Importador de metales	<i>irtAB</i>	Rv1348-Rv1349	Transportador de ATPasa para Zn ²⁺	THP-1	Reduce UFC	(Rodriguez, 2006)
Exportador de metales	<i>ctpC</i>	Rv3270	Transportador de ATPasa para Cu ²⁺	macrófagos humanos	Reduce UFC	(Ward <i>et al.</i> , 2010)
	<i>ctpV</i>	Rv0969	Sistema de dos componentes	THP-1	Reduce UFC	(Ward <i>et al.</i> , 2010)
Reguladores de expresión de genes	<i>phoPR</i>	Rv0757/Rv0758	Regulador transcripcional	MBMDM	Reduce UFC	(Walters <i>et al.</i> , 2006)
Sistema de dos componentes	<i>phoP</i>	Rv0757	Sistema de dos componentes	macrófagos humanos	Reduce UFC	(Walters <i>et al.</i> , 2006)
	<i>senX3-regX3</i>	Rv04920-Rv0491	Factor <i>sigma E</i>	THP-1	Reduce UFC	(Parish <i>et al.</i> , 2003)
Factores sigma	<i>sigE</i>	Rv1221	Factor <i>sigma g</i>	THP-1/ Macrófagos J774	Reduce UFC	(Manganelli <i>et al.</i> , 2001)
	<i>sigG</i>	Rv0182c	Factor <i>sigma H</i>	J774	Reducción moderada de UFC	(Manganelli <i>et al.</i> , 2001)
	<i>sigH</i>	Rv3223c	Sistema de reguladores transcripcionales/	BMDM	Reduce UFC post infección	(Manganelli <i>et al.</i> , 2001)

			probable transportador de fosfatasa			
Otros reguladores transcripcionales	<i>phoY2</i>	Rv0821c	Familia de <i>PE_PGRS</i>	Macrófagos J774 activados	Reduce UFC	(Shi, 2010)
Familia PE/PPE	<i>pe_pgrs51</i>	Rv3367	Familia <i>PPE</i>	BMDM/ macrófagos J774	Reduce UFC	(Estorninho <i>et al.</i> , 2010)
	<i>ppe46</i>	Rv3018	Proteínas de membrana conservados	BMDM	Reduce UFC	(Estorninho <i>et al.</i> , 2010)
Otras proteínas de función desconocida	<i>ppe47</i>	Rv0199	Regiones de diferencia	MBMDM	Reduce UFC	(Estorninho <i>et al.</i> , 2010)

(UFC) Unidades formadoras de colonias, (MBMDM) Macrófagos murinos derivados de medula osea, (BMDM) Macrófagos derivados de medula osea, (NOS) Especies reactivas de nitrogeno



3.0 Justificación

El tabaquismo es una adicción de problemática mundial, afecta tanto a hombres como a mujeres, principalmente en países en desarrollo y genera ganancias millonarias lo que complica su regulación. Se reportan 8 millones de muertes anuales relacionadas al consumo del tabaco ya sea de manera directa por complicaciones en salud o indirecta por su comorbilidad con otras enfermedades.

El humo de cigarro contiene alrededor de 4,000 compuestos, tanto en la fase sólida, gaseosa o de partículas. La nicotina es la molécula más estudiada, forma parte de la fase de partículas, es la responsable de generar la adicción al tabaquismo y se considera como la principal molécula inmunoreguladora.

Otra problemática mundial es la TB que es causada por *M. tuberculosis*, una bacteria que casi siempre afecta a los pulmones. Se estima que una cuarta parte de la población mundial se encuentra infectado, es la decimotercera causa de muerte en el mundo y la segunda enfermedad infecciosa más mortal. Los factores de riesgo para el contagio son desnutrición, el nivel socioeconómico, la edad o fumar. Específicamente, la OMS reportó que el consumo de tabaco incrementa hasta 1.6 veces el riesgo de padecer tuberculosis.

Con el fin de entender la relación entre consumir tabaco y tener TB reportes recientes muestran que la nicotina como molécula inmunoreguladora genera cambios tanto en macrófagos como pneumocitos tipo II modificando la expresión tanto de receptores como de péptidos antimicrobianos y promoviendo el crecimiento intracelular de la bacteria, ocasionando que la nicotina genere un efecto inmunodeficiente para el huésped. Sin embargo, no hay una respuesta concreta acerca de la interacción directa entre la nicotina y *M. tuberculosis*, entonces resulta importante estudiar la relación entre los factores de virulencia como característica de la bacteria implicada con su habilidad de causar TB pulmonar en presencia de la nicotina.

4.0 Hipótesis

La nicotina induce genes de virulencia en *M. tuberculosis*

5.0 Objetivos

5.1 Objetivo General

- Determinar el efecto de la nicotina sobre la expresión de genes de virulencia en *M. tuberculosis*

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la interacción física entre la nicotina y *M. tuberculosis* en la fase intracelular a través de microscopia confocal.
- Determinar si la nicotina (10 μ M, 30 μ M y 50 μ M) induce la expresión de genes de virulencia relacionados con la resistencia a péptidos antimicrobianos en *M. tuberculosis*.
- Determinar si la nicotina (10 μ M, 30 μ M y 50 μ M) induce la expresión de genes de virulencia involucrados con moléculas secretadas en *M. tuberculosis*.
- Determinar si la nicotina (10 μ M, 30 μ M y 50 μ M) induce la expresión de genes de virulencia relacionada con la pared celular en *M. tuberculosis*.

6.0 Metodología

6.1 Cultivo de la línea celular A549

La línea celular A549 (ATCC[®] CCL185[™]; Manassas, VA, USA) (pneumocitos tipo II) se cultivó en RPMI (Thermofisher scientific, USA) en botellas de cultivo de 75cm² a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Una vez que estaban en 85% de confluencia se añadió tripsina (Thermofisher scientific, USA) y se congelaron en viales de 3x10⁶ células/mL y se colocaron a -70°C hasta su uso.

6.2 Crecimiento de la cepa *Pseudomonas aureginosa*

Se creció *Pseudomonas aureginosa* en infusión cerebro corazón (Becton Dickinson, USA) en botellas de cultivo de 25cm² y se colocaron diferentes concentraciones a nicotina (10µM, 30µM y 50µM) (SIGMA ALDRICH, USA) se dejó incubando a 37°C en movimiento y se midió la densidad óptica a 600nm 18 y 24 horas después del estímulo.

6.3 Crecimiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis*

Para conocer la curva de crecimiento de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294, Manassas, VA, USA), se cultivó en botellas de 25cm² con medio de cultivo 7H9 (Thermofisher scientific, USA) a 37°C en movimiento. Se midió la densidad óptica cada tercer día a 600nm y se estableció la fase logarítmica o fase exponencial de crecimiento entre el día 6 al día 14 (figura 4), se realizaron las alícuotas de trabajo el día 9 con una concentración inicial de 3x10⁸ bacterias/mL que se corroboró por unidades formadoras de colonias (UFC) que se cultivaron a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂, en placas con medio 7H10 (Thermofisher scientific, USA) y se revisaron después de 21 días, llegando a una concentración final de 7x10⁸ bacterias/mL.

6.4 Microscopía confocal

Las células A549 se adhirieron por 18 horas en pozo de cultivo sobre porta objetos (Nunc, New york USA) y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 minutos. Se utilizó

la solución de permeabilización y fijación (Becton Dickinson) durante 20 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo se incubó con el anticuerpo anti-Faloidina con Alexa 488 (Santacruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Finalmente se colocó el colorante DRAQ7 2µM (Deep Red Anthraquinone 7; BioStatus, Charnwood Road, United Kingdom) para teñir los núcleos. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal DM 2500 LED de Leica en el software LASX (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).

Se realizó la infección de las células A549 (10:1) con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv previamente teñida con colorante para lípidos PKH67 (SIGMA ALDRICH, USA), ya que la pared celular de la bacteria esta recubierta de lípidos durante 3 horas, una vez transcurrido el tiempo se lavó con PBS y se estimuló con nicotina (SIGMA ALDRICH, USA) durante 1 hora, después se fijó con paraformaldehído al 4% por 30 minutos. Se utilizó la solución de permeabilización y fijación (Becton Dickinson) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se incubó con anticuerpos primarios: anti-tubulina (ratón IgG: sc-23950) en dilución 1:100, anti-faloidina (ratón IgG Alexa Fluor® 532: A22282) a diferentes diluciones o anti-nicotina (ratón IgG: MBS568947) (MyBioSource, USA). Para los ensayos en los que se utilizaron los anticuerpos anti-tubulina y anti-nicotina, se realizó una segunda incubación de las células con el anticuerpo secundario (cabra IgG: Alexa Fluor 532: A-11002) en dilución 1:1000 (Thermofisher scientific, USA) y el anticuerpo secundario (cabra IgG: Alexa Fluor 488: A-11013) en dilución 1:1000. Finalmente se colocó el colorante DRAQ7 2µM (Deep Red Anthraquinone 7; BioStatus, Charnwood Road, United Kingdom) o DRAQ5 5µM (Deep Red Anthraquinone 5; BioStatus, Charnwood Road, United Kingdom) para teñir los núcleos, transcurrido el tiempo se lava con PBS y se colocó medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, USA). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal DM 2500 de Leica en el software LASX (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).

6.5 *Mycobacterium tuberculosis* en diferentes condiciones experimentales

Para evaluar si la interacción entre la nicotina y *M. tuberculosis* tiene efecto en su crecimiento, se colocó a la bacteria con diferentes concentraciones de nicotina (10µM,

30µM y 50µM), además de dos condiciones extras 10 µM de nicotina con 30 µM de mecamilamina (SIGMA ALDRICH, USA) y 10 µM de nicotina con 10 nM de Bungarotoxina (SIGMA ALDRICH, USA). Para asegurar que el efecto en el crecimiento se debiera a la presencia de cada reactivo según la condición, el medio 7H9 (al 10% con OADC (suplemento compuesto por ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa)) se suplementó con OADC adicional para asegurar que la cantidad de nutrientes en cada condición fuera la misma. Se colocó a 37°C en movimiento y se midió la densidad óptica cada tercer día. El día 29 se realizaron UFC que se plaquearon en agar 7H10. Finalmente se realizó la tinción Ziehl-Neelsen (ZN) una vez fijadas las bacterias con metanol. Se inició agregando fuscina fenicada previamente filtrada hasta cubrir la muestra y se pasó la flama por debajo de la laminilla. Una vez que comenzó a salir vapor se contaron 5 minutos. Después se realizaron 3 baños en agua corriente y 1 con alcohol ácido. Luego se sumergió en azul de metileno por 4 minutos, posteriormente se dio un baño en agua corriente, y finalmente se deshidrato, se dejó secar y se observó.

6.6 Extracción de ADN bacteriano

Para la obtención de ADN bacteriano se cultivó a la cepa H37Rv en 10 mL de 7H9 con 10% de OADC en movimiento a 37°C por 4 semanas, se dividió en 10 alícuotas en tubos de 1.5mL de rosca y se inactivó por calor a 65°C por 30 minutos. Una vez inactivada se agregó 50 µL de Lizosima (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 10 mg/mL y se dejó incubar por 2 horas a 37°C para lisar la pared celular, finalizado el tiempo de agregó una mezcla de 70 µL de SDS (dodecilsulfato sódico) (Thermo Fisher Scientific) al 10% y 5 µL de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific) a 10mg/mL y se dejó a 65°C por 15 minutos. Cuando pasó el tiempo se agregó CTAB-NaCl (4.1% NaCl/10% CTAB) (Thermo Fisher Scientific) para deshacer los complejos de lípidos y proteínas. Se añadió cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13 226 x g por 15 minutos, para separar dos fases. La fase acuosa o superior se pasó a otro tubo nuevo y se le agregó isopropanol frío. Se mezcló por inmersión 8 veces y se dejó por una hora a -70°C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75% frío y se volvió a centrifugar, para después

dejarse secar. Tras haberse secado se resuspendió en 30µl de agua con tratamiento de pirocarbonato de dietileno (DEPC). Y se cuantificó en el espectrómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

6.7 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Una vez que las cepas de *M. tuberculosis* se estimularon con nicotina (10µM, 30µM y 50µM) o en ausencia de nicotina a diferentes tiempos, las bacterias se homogenizaron en Trizol. Se añadió cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13 226 x g por 15 minutos, se separan dos fases. La fase acuosa o superior se pasó a otro tubo nuevo y se le agregó isopropanol frío. Se mezcló por inmersión 8 veces y se dejó por una hora a -70°C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75% frío y se volvió a centrifugar, para después dejarse secar. Tras haberse secado se resuspendió en 8µl de agua con tratamiento de DEPC y se agregó 1 µl de DNasa, 1 µl de buffer 10x de DNasa (Invitrogen, California, USA) y 1 µl de EDTA 25 µM y se dejó a 65°C por 10 minutos. Finalmente se guardó a -70°C hasta su uso.

La síntesis del ADNc se realizó por transcripción inversa utilizando ARN total obtenido de cada una de las extracciones, para lo cual se empleó el sistema de Superscript II reverse Transcriptasa (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Se tomaron 10 µl del RNA y se agregó 1µl de Random Primers. Se incubó por 10 minutos a 72°C y después 5 minutos a 4°C. Luego se añadieron 7µl de la mezcla de reacción (2µl de Buffer PCR 10X, 2µl de MgCl₂ 25mM, 1µl de Nucleótidos 10mM y 2µl de DTT) y se incubó 5 minutos a 42°C, después 5 minutos a 4°C y finalmente se agregó 1µl la enzima retro transcriptasa. La mezcla final se sintetizó utilizando un ciclo de 42°C durante 50 minutos y posteriormente 15 min a 70°C. Se inactivó la reacción a 4°C durante 15 minutos. Todas las incubaciones se realizaron en un termociclador (Perkin-Elmer 9600, Norwalk CT, USA)

6.8 Diseño de los oligonucleótidos

Una vez que se seleccionaron los genes de *M. tuberculosis* que serían evaluados, se diseñaron mediante bioinformática los oligonucleótidos. En la tabla 3 se muestran los genes clasificados por grupo, incluyendo el nombre del gen, su número de clasificación según la base de datos de Rv y los oligonucleótidos derecho e izquierdo, que se diseñaron por bioinformática para cada gen.

Tabla 3 Diseño de oligonucleótidos para diferentes genes de *M. tuberculosis* divididos por categoría.

Gen	Rv	Características	Oligonucleótido derecho	Oligonucleótido izquierdo
Resistencia a péptidos antimicrobianos				
<i>lysX</i>	Rv1640	Relacionada con la lysil-sintetasa y lysil transferasa ligada con la resistencia a péptidos antimicrobianos	gga act cca ccg ttg atc gt	caa cgg tcg caa aca ctt ac
Moléculas secretadas				
<i>esxA (esat 6)</i>	Rv3875	Es una proteína secretora y un potente antígeno de células T	gga act cca tcg ttg atc gt	acc tgg tcg atc tgg gtt t
<i>esxB (cfp10)</i>	Rv3874	Forma un complejo con ESAT-6	gga act cca tcg ttg atc gt	acc tgg tcg atc tgg gtt t
<i>hspX</i>	Rv2031c	Proteína secretada en estados de anaerobiosis	gcg tac ggt tcc ttc gtt c	tgt cgt agg tgg cct taa tgt
<i>katG</i>	Rv1908	Enzima catalasa-peroxidasa	gtt ccg tgg tag cga caa g	cag ggt gcg aat gac ctt
<i>lpqH</i>	Rv3763	Lipoproteína que inhibe la producción de INF <i>gamma</i>	Ggacggcagccactacaa	Cctcgattcgaacgacttg
<i>caeA</i>	Rv2224c	Necesaria para que el patógeno sobreviva dentro de los macrófagos	caa gga cct gga tgc cat t	gag tag ccc agg tag gtc agc
Pared celular				
<i>pirG</i>	Rv3810	<i>Erp</i> que se usa para la unión de <i>poa</i>	aac act ggg gac cat acc g	tca cgt cgt tga cga gac c
<i>fad26</i>	Rv2930	Acil coenzima A (<i>acil-CoA</i>) sintetasa involucrada en la degradación de los ácidos grasos	cac gat atg ggc ctg att ct	att ggg ctc atc aac atc g

fbpA	Rv3804c	Enzima micolil tranferasa	ttg ccg gtg gag tac ctg	cac ttt gga att gga cct tga
ompAtb	Rv0899	Proteína tipo porina para formar poros en liposomas	tag cgg caa tcg gtt acg	cag tgt cgg caa cac acc
hbhA	Rv0475	Proteína hemaglutinante de unión a heparina	gga gga gac tcg tac gga ca	ctt cct gca gct tgg tca g

6.9 PCR en tiempo real

Para evaluar los oligonucleótidos que se diseñaron se midió la expresión de cada gen con ADN bacteriano previamente extraído y se comparó su expresión con el gen 16S.

Una vez cuantificado el ADNc a una longitud de onda 260/280 nm, en el espectrómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific), se utilizaron cebadores para los genes 16S, *lysX*, *esxA* (*esat 6*), *esxB* (*cfp10*), *HspX*, *katG*, *lpqH*, *caeA*, *pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompAtb* y *hbhA*. Se utilizó Ssofast™ EvaGreen® Supermix (BIO-RAD, USA). En la tabla 3 se muestran los primers para qPCR.

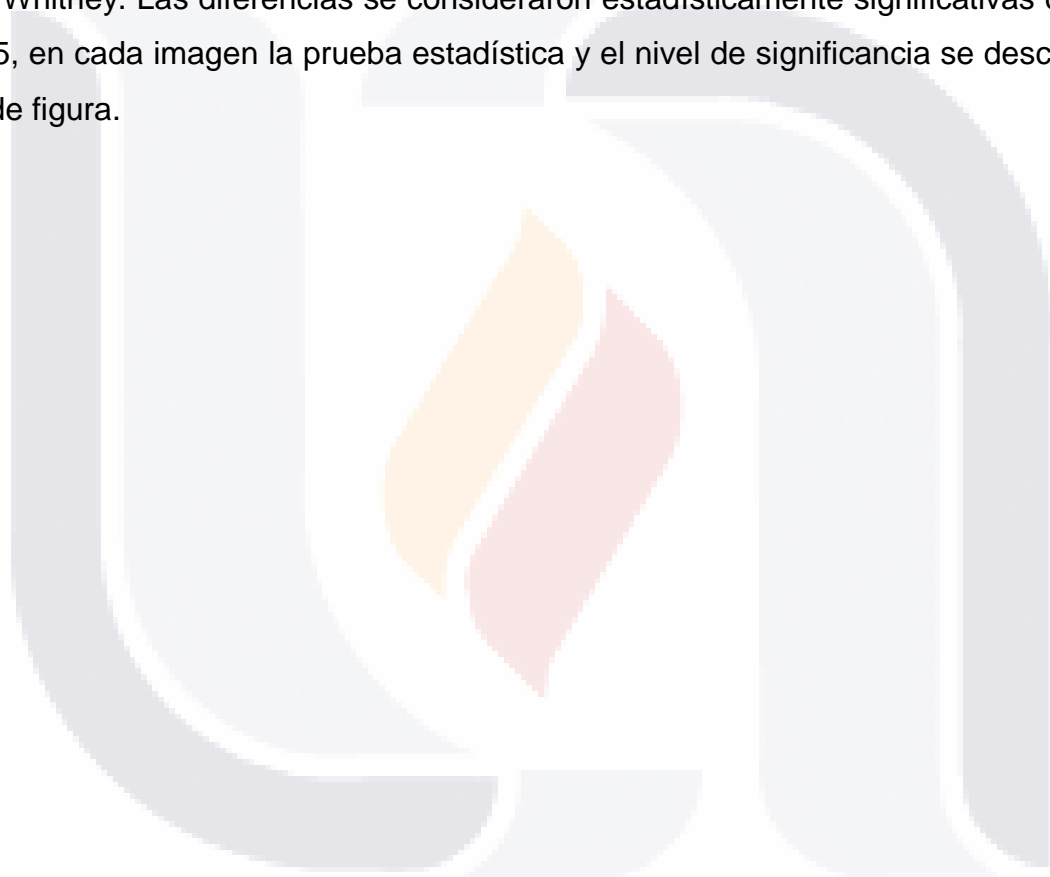
El análisis de las curvas de amplificación para la determinación de los CPs (puntos de cruce) se realizará con el termociclador AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Para normalizar los valores promedios en el CP se utilizará el valor de CP del gen 16S. El método para el cálculo de expresión relativa que se utilizará será el de $\Delta\Delta C_t$ de Livak y Schmittgen (2001) usando la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

$$\text{donde } \Delta\Delta C_p = (C_{p_{gen\ problema}} - C_{p_{gen\ de\ referencia}})_{Experimental} - (C_{p_{gen\ problema}} - C_{p_{gen\ de\ referencia}})_{Control}$$

6.10 Análisis estadístico

Para los datos que mostraron una distribución normal, se representó la media de los valores \pm el error estándar de la media (SEM), para la representación del crecimiento *M. tuberculosis* y la expresión de genes de virulencia en tiempos cortos se realizó la prueba de ANOVA de dos vías y el post- test de Bonferroni, para la prueba de las UFC y el crecimiento de *P. aureginosa* se comparó con Kruskall Wallis y el post-test de Dunn. Finalmente, la expresión de genes de virulencia restantes se realizó la prueba de U-Mann- Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$, en cada imagen la prueba estadística y el nivel de significancia se describe en el pie de figura.



7.0 Resultados

7.1 Alícuotas de trabajo de *Mycobacterium tuberculosis*

Lo primero que se realizó para comenzar la fase experimental fueron las alícuotas de trabajo de *M. tuberculosis*, en la figura 4 se muestra la curva de crecimiento de la bacteria. La fase logarítmica se obtuvo entre los días 6 a 14 de cultivo, mientras que la fase estacionaria se desarrolló a partir del día 14. Las alícuotas de trabajo se realizaron en el día 9.

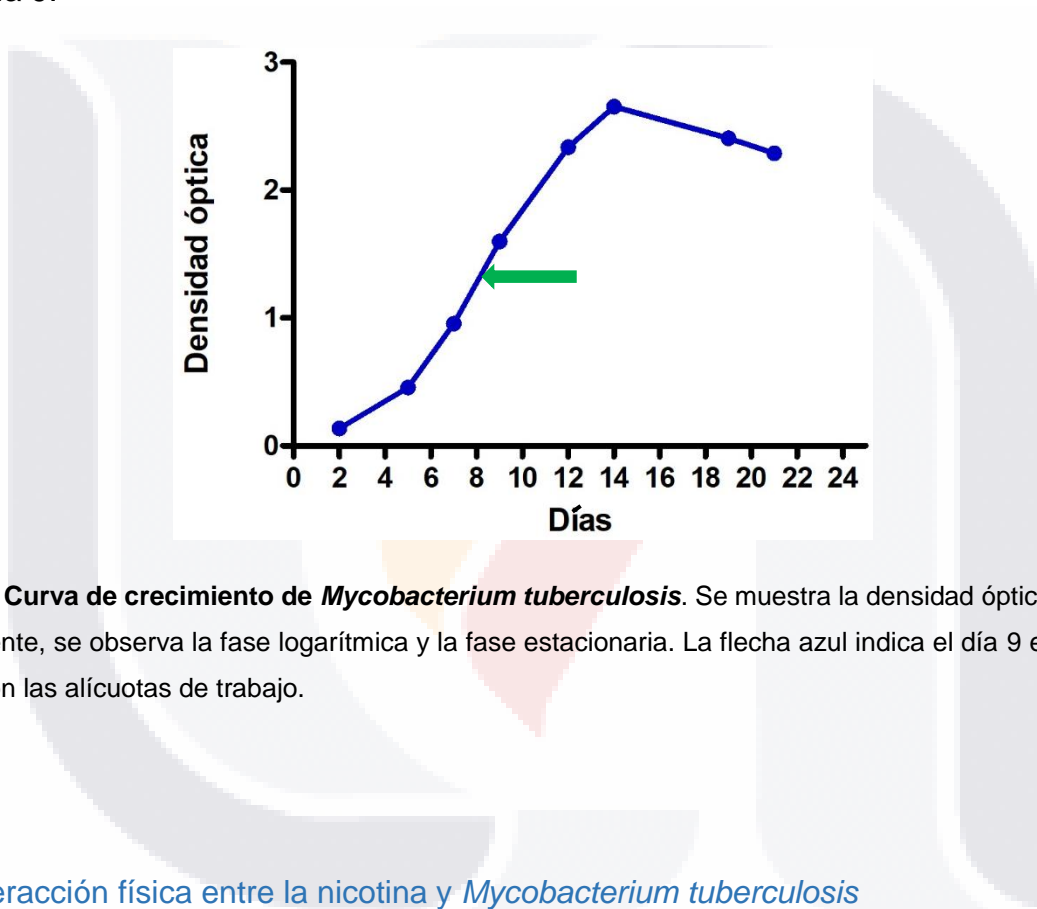


Figura 4 **Curva de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis***. Se muestra la densidad óptica medida diariamente, se observa la fase logarítmica y la fase estacionaria. La flecha azul indica el día 9 en que se realizaron las alícuotas de trabajo.

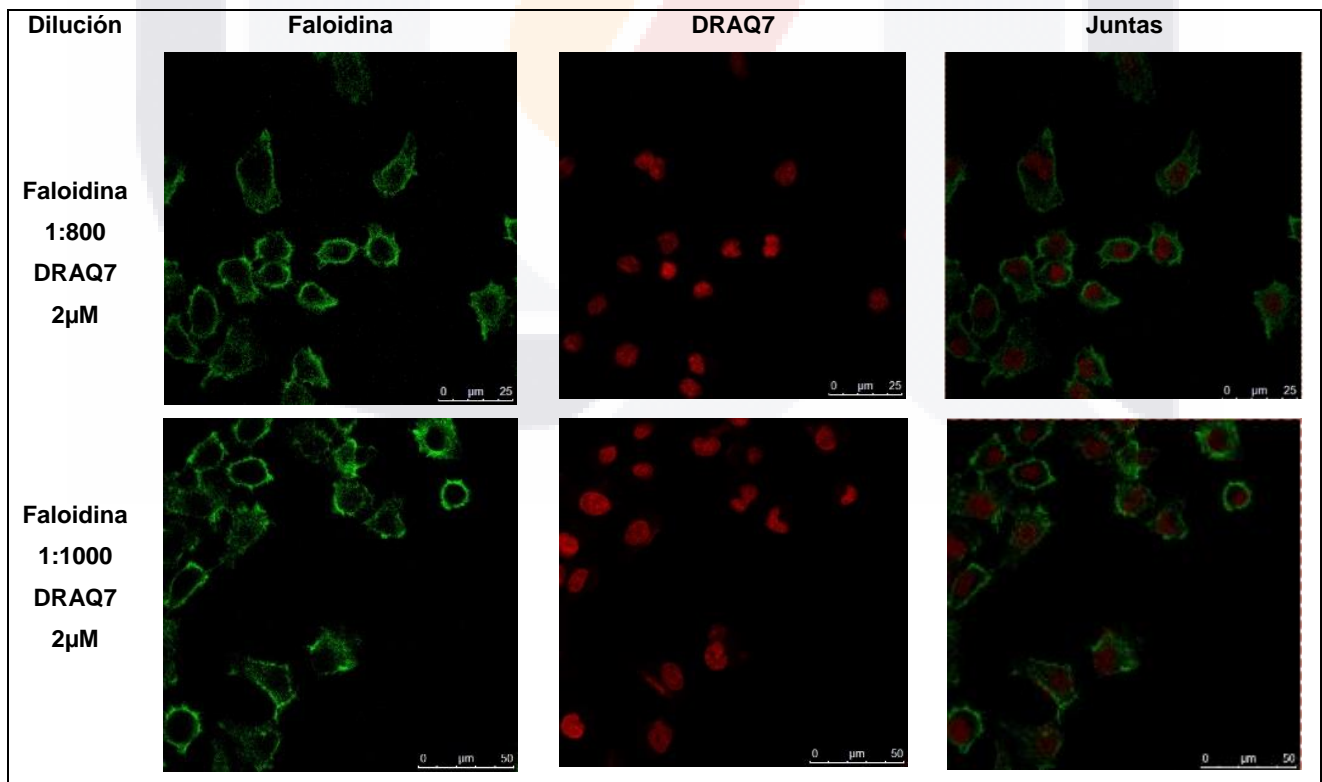
7.2 Interacción física entre la nicotina y *Mycobacterium tuberculosis*

Para evaluar la interacción de la nicotina con la micobacteria se utilizó la microscopía confocal, una técnica que permite observaciones a una resolución mayor que la que se puede lograr con la microscopía óptica convencional. Mediante esta técnica se tiñen organelos e incluso moléculas citoplasmáticas (Eliot, 2020). Para aprender y estandarizar el uso del microscopio se inició con la tinción del citoesqueleto con un

anticuerpo para Faloidina unida a Alexa 488 y el núcleo con DRAQ 7 en la línea celular A549.

7.2.1 Tinción para Faloidina

Para la Faloidina se probaron diferentes concentraciones del colorante para el núcleo DRAQ7 (Deep Red Anthraquinone 7; BioStatus, Charnwood Road, United Kingdom) para tratar de optimizar lo mayor posible el reactivo. En la figura 5 se puede observar imágenes de las células A549 incubadas con diferentes diluciones del anticuerpo anti-Faloidina en color verde y de DRAQ7 en color rojo. Se pudieron apreciar las características morfológicas del citoesqueleto rodeando el núcleo y la forma característica de las células A549. Cuando se juntaron las dos imágenes se observó cómo cada núcleo corresponde a una célula.



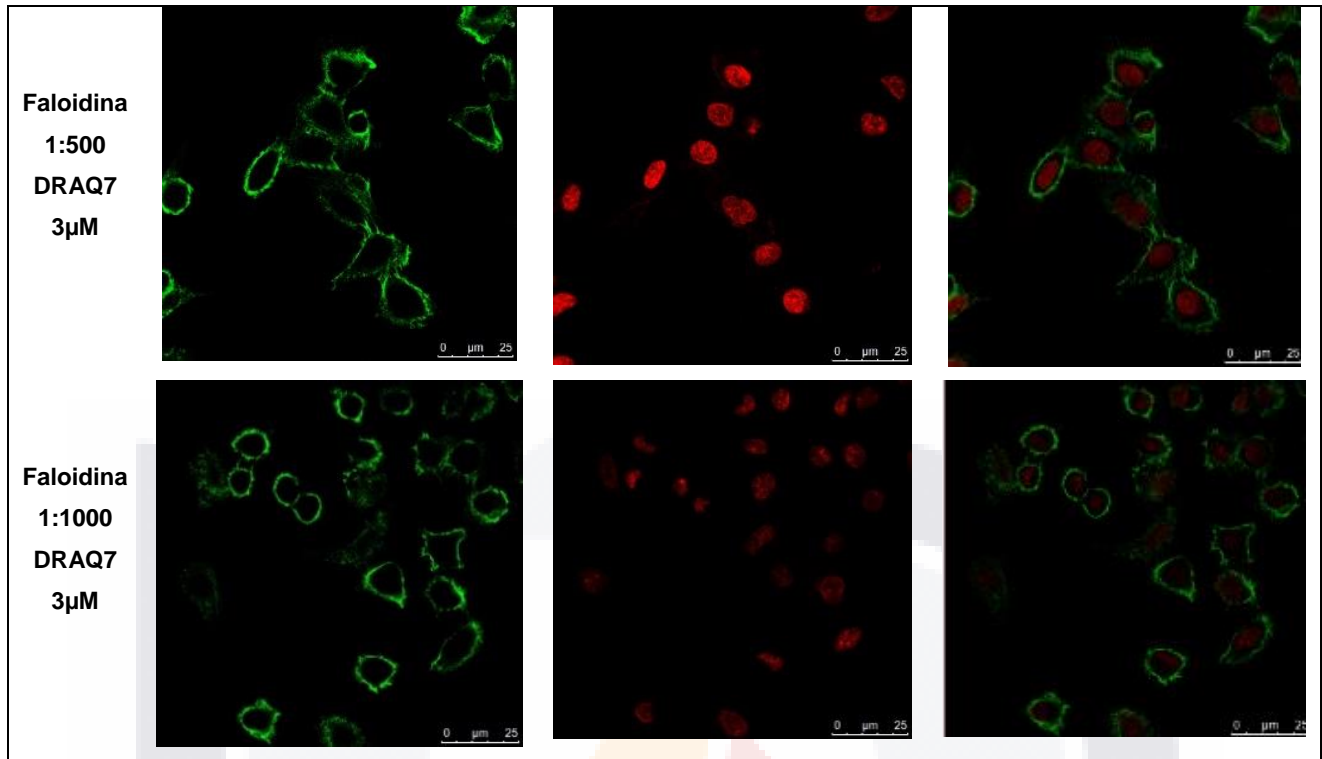


Figura 5 **Tinción de Faloidina y DRAQ7 en células A549.** En la figura se muestran fotografías tomadas mediante microscopía confocal (400 aumentos) de las células A549 marcadas con diferentes diluciones del anticuerpo para faloidina (en color verde el citoesqueleto) y diferentes concentraciones del colorante DRAQ7(en color rojo el núcleo); o imágenes solapadas con el doble marcaje

7.2.2 Tinción para nicotina

Para probar la calidad de tinción del reactivo DRAQ5 (Deep Red Anthraquinone 5; BioStatus, Charnwood Road, United Kingdom) que se puede utilizar tanto para células vivas y fijadas, se realizó la tinción para nicotina utilizando un anticuerpo primario (a diferentes diluciones) para la nicotina y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con FITC. Como control las células se incubaron solo con el anticuerpo secundario y el colorante para el núcleo. En la figura 6 se muestran las imágenes que se obtuvieron. Se pudo observar que el colorante DRAQ5 no es específico para el núcleo y se traslapa con la tinción de la nicotina. Las imágenes teñidas con el anticuerpo anti-nicotina muestran su distribución en el citoplasma de la célula y no en el núcleo.

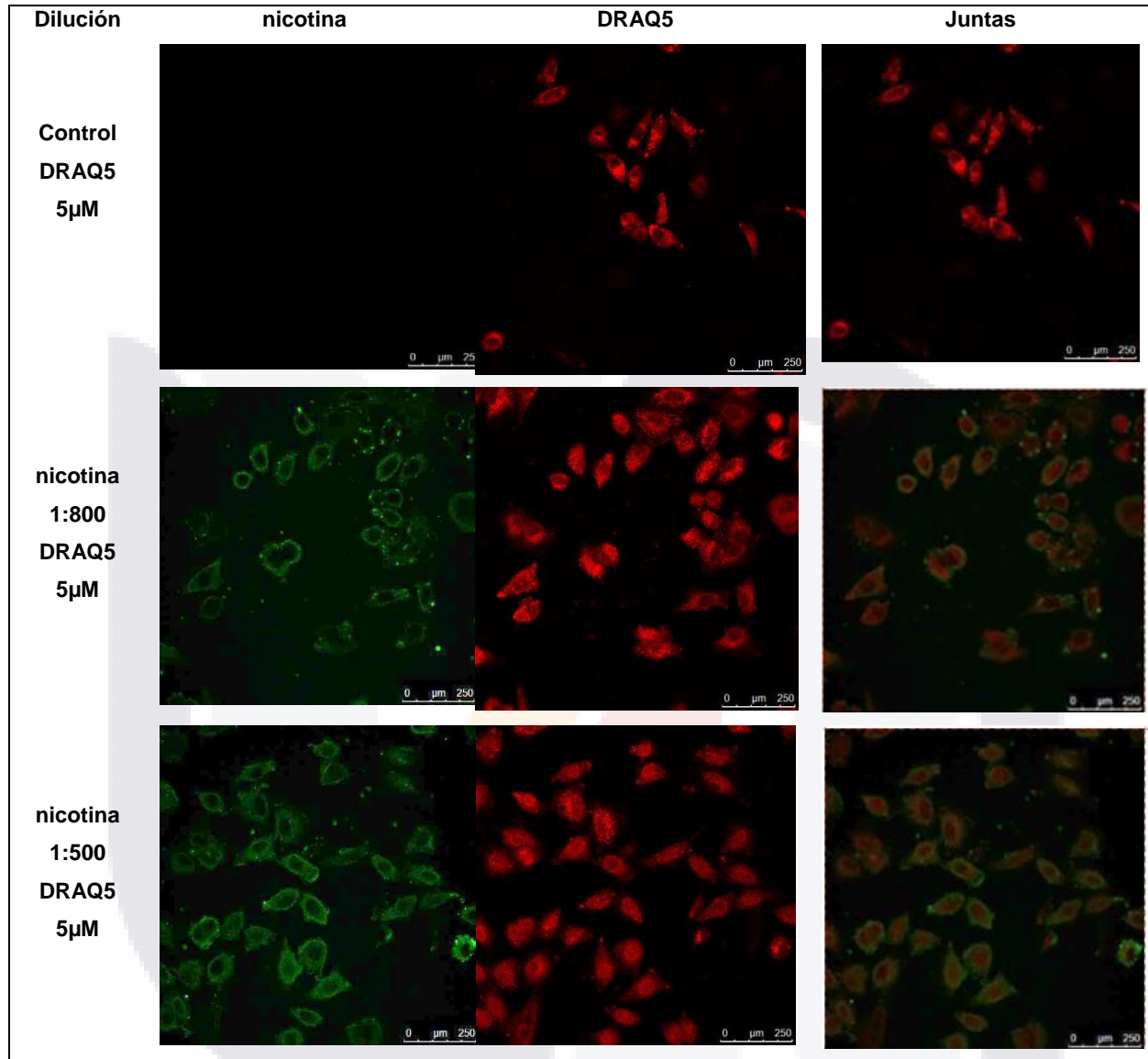


Figura 6. **Tinción para nicotina y DRAQ5 en células A549.** En la figura se muestran fotografías tomadas mediante microscopía confocal (400 aumentos) de células A549 marcadas con diferentes diluciones del anticuerpo primario anti-nicotina hecho en ratón, usando como anticuerpo secundario anti-ratón con FITC (en color verde) y DRAQ5 (en color rojo el núcleo).

Como alternativa para mejorar las imágenes de la tinción de nicotina se optó por cambiar el colorante para el núcleo a DRAQ7, y analizar la condición de si las células tienen auto fluorescencia. Estos resultados se muestran en la figura 7. Se observó que la

línea celular A549 no tiene auto fluorescencia (panel A) y que la tinción es específica para la nicotina, ya que el ensayo de control que sólo tiene el anticuerpo secundario y el colorante DRAQ7, muestra sólo fluorescencia para el núcleo (panel B). La nicotina mostró una distribución en el citoplasma de las células A549 (panel C). Al solapar ambas tinciones, se observó la tinción de nicotina en verde y el núcleo de las células en rojo, bien definidas ambas estructuras y de nuevo la nicotina estuvo distribuida de manera homogénea en el citoplasma.

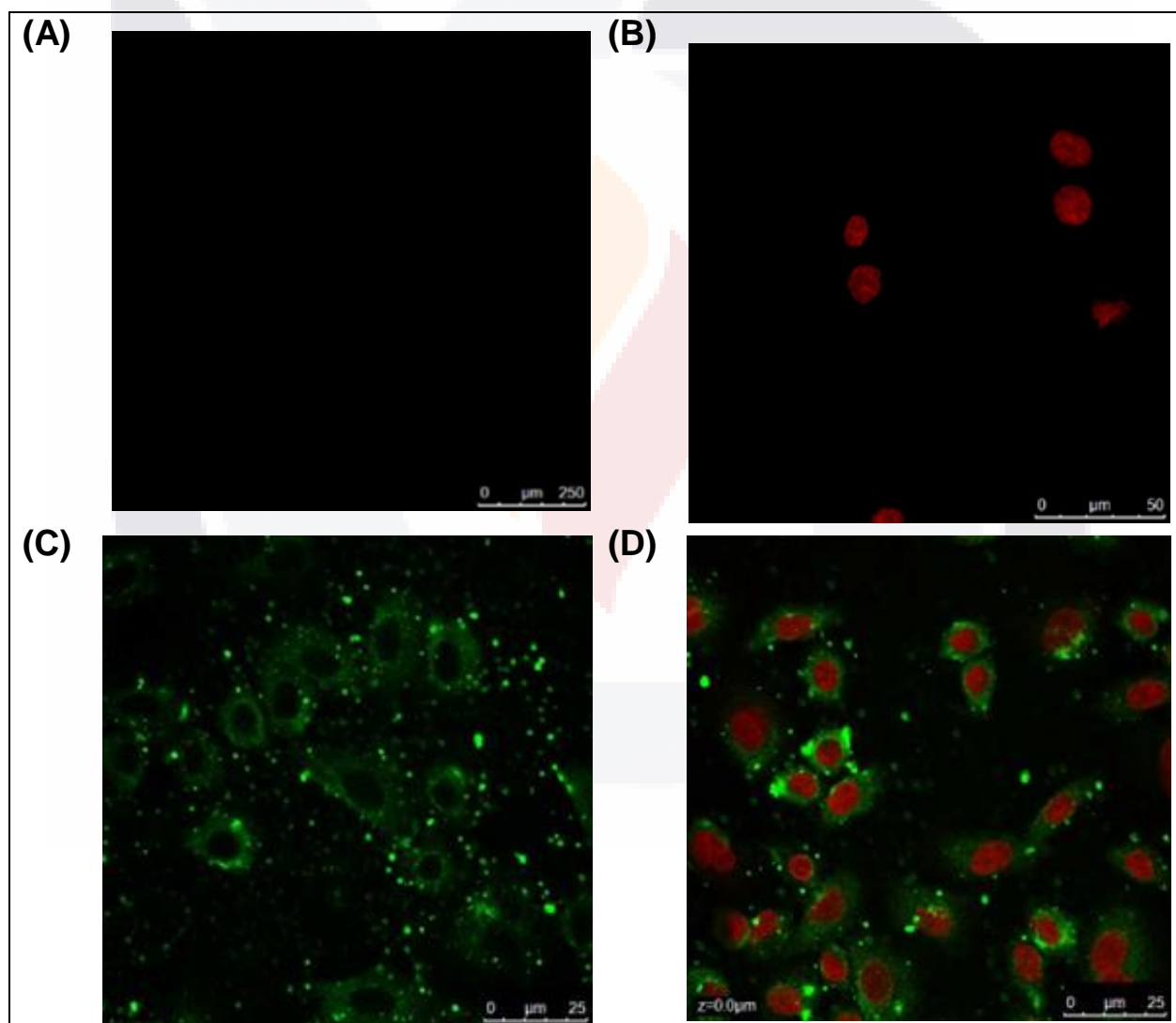


Figura 7 **Tinción para nicotina y DRAQ7 en células A549.** En la figura se muestran fotografías tomadas mediante microscopía confocal (1000 aumentos) se presentan en color verde la nicotina y en rojo el núcleo.

A. Se muestran solo las células para evaluar si tienen auto fluorescencia. B. Se muestra el control que sólo tiene el anticuerpo secundario y DRAQ7 a 2µM. C. Se muestra las células con la nicotina teñida con una dilución 1:100 del anticuerpo secundario sin teñir el núcleo. D. Se observan las células con la nicotina teñida en verde a una dilución 1:100 y el núcleo en rojo con DRAQ 7 a 2µM.

7.2.3 Tinción para *M. tuberculosis*, tubulina y núcleo

En los experimentos siguientes se usó otro anticuerpo secundario para poder observar la triple tinción. Para establecer la mejor dilución para el anticuerpo, se realizó una tinción para tubulina en células A549 que previamente fueron infectadas con la cepa H37Rv previamente teñida con el colorante de lípidos PKH67.

Ya que el proceso de tinción se realiza con las bacterias vivas antes de infectar, para saber si el proceso no afecta la viabilidad se corrobora la concentración del vial de infección, realizando UFC que se plaquearon en agar 7H10. Finalmente, para la tinción del núcleo se utilizó el colorante DRAQ7. En la figura 8 se pueden observar imágenes de las células A549 incubadas con diferentes condiciones. En el panel (a) el control que es la tinción de los núcleos en color rojo en células no infectadas. En el panel (B) la condición de infección MOI 10:1, en color verde se observan la tubulina, que se distribuye de manera homogénea a lo largo de la célula, ya que forma parte del citoesqueleto. Las bacterias se muestran en color azul, se puede observar que la bacteria se encuentra distribuida en el citoplasma de la célula, marcadas con las flechas blancas.

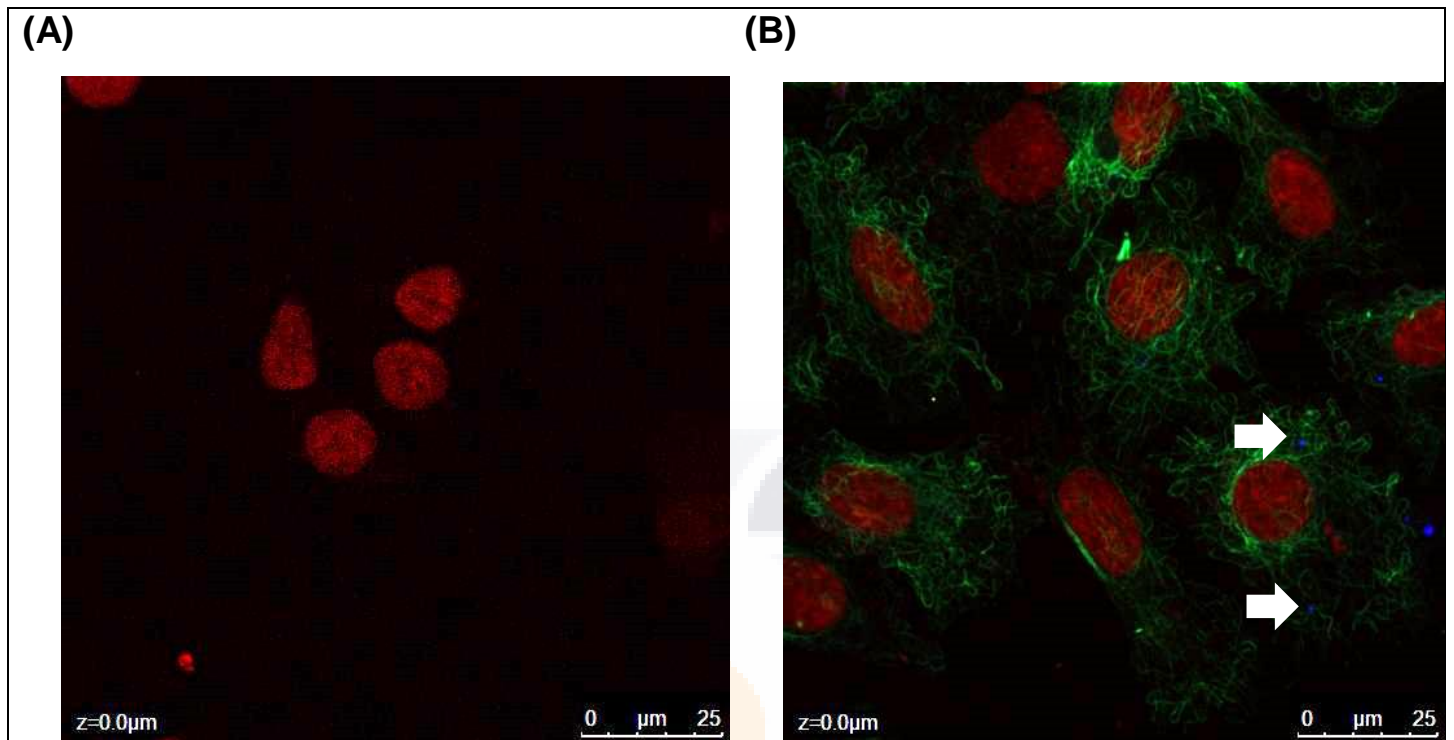


Figura 8 **Tinción de tubulina, *M. tuberculosis* y núcleo en células A549.** En la figura se muestran fotografías tomadas mediante microscopía confocal (1000 aumentos) de las células A549, en el panel (A) se observa el control y en el panel (B) la infección 10:1 en color rojo se observan los núcleos teñidos con DRAQ7, en color verde la tubulina marcada con el colorante secundario Alexa 532 y en color azul bacterias teñidas con el PKH67, las flechas blancas señalan las bacterias que se encuentran en el citoplasma de las células.

7.2.4 Tinción para *Mycobacterium tuberculosis*, nicotina y núcleo

Una vez que se estableció que la mejor dilución del anticuerpo secundario era 1:1000 y ya se tenía que la dilución el anticuerpo anti-nicotina era 1:100, se procedió a realizar la triple tinción en células A549. Después de ser adheridas 18 horas se infectaron con la cepa *M. tuberculosis* que fue teñida con el colorante de lípidos PKH67 que permite visualizar la micobacteria en color rojo. Una vez finalizado el tiempo, se estimuló con nicotina, se permeabilizó y se tiñó con el colorante secundario Alexa 532 que se observa en color verde y finalmente para el núcleo se utilizó el colorante DRAQ7 que se observa en color azul. En la figura 9 se puede observar imágenes de las células A549 incubadas con diferentes características. En el panel (A) el control que es la tinción de los núcleos

en color azul en células no infectadas. En el panel (B) la condición de infección 10:1 en color verde se observan la nicotina a una concentración de $10\mu\text{M}$ de nicotina se distribuye de manera homogénea en el citoplasma de las células, también se muestran a las bacterias en color rojo, se puede observar que la bacteria se encuentra en el citoplasma de la célula señalas con la flecha blanca, además de que la colocalización entre la nicotina y la micobacteria en color amarillo, se señala con la cabeza de la flecha en color blanco.

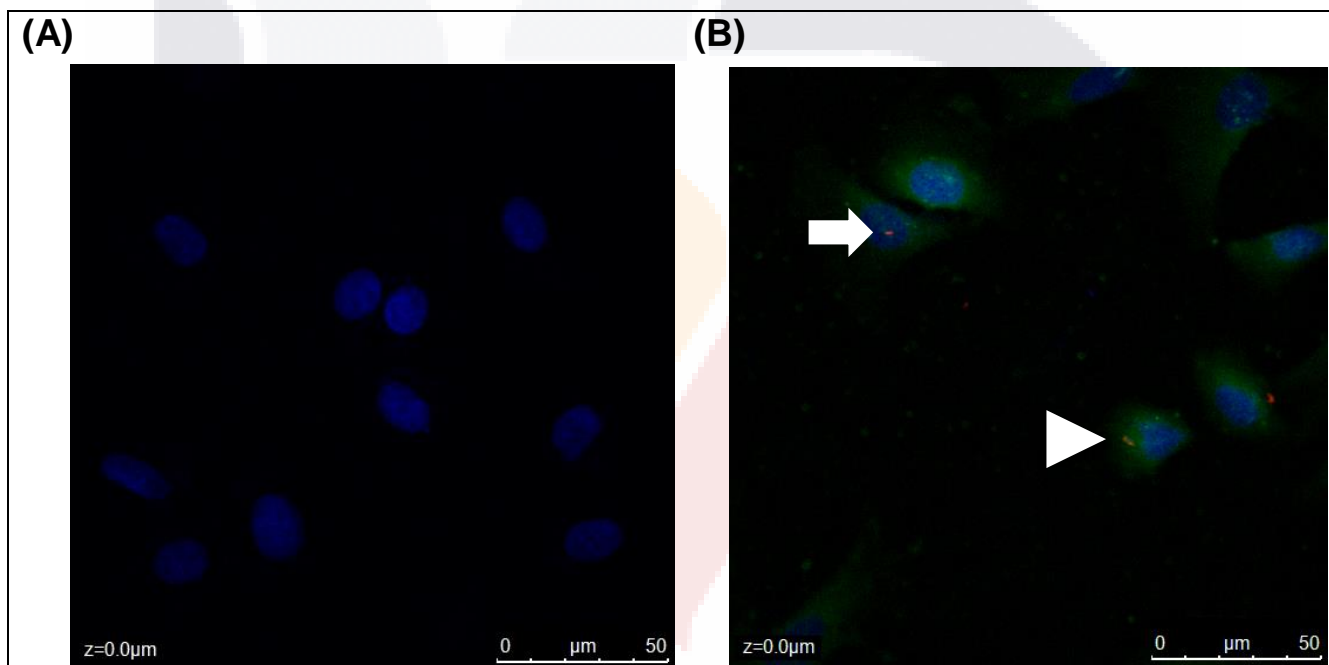


Figura 9 **Tinción de nicotina, *Mycobacterium tuberculosis* y núcleo en células A549.** En la figura se muestran fotografías tomadas mediante microscopía confocal (1000 aumentos) de las células A549, en el panel (A) el control de células no infectadas, en color azul los núcleos teñidos con DRAQ7; en el panel (B) se utilizó la infección 10:1 y en color azul se observan los núcleos teñidos con DRAQ7, en color verde la nicotina marcada con el colorante secundario Alexa 532 y en color rojo bacterias teñidas con el PKH67, las flechas blancas señalan las bacterias y las cabezas de flechas señalan la colocalización entre la nicotina y la bacteria dentro de la célula.

7.3 Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en diferentes condiciones

Una vez que se encontró que la nicotina y *M. tuberculosis* interactúan dentro de los pneumocitos tipo II, se evaluó si la nicotina con diferentes concentraciones genera algún efecto directamente en *M. tuberculosis*.

7.3.1 Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* con nicotina

Se evaluó el crecimiento durante 29 días de *M. tuberculosis* con nicotina a diferentes concentraciones 10 μ M, 30 μ M y 50 μ M, las cuales están basadas en las encontradas en niveles séricos de fumadores (Thome *et al.*, 2012). Además, se incluyó un control positivo (*M. tuberculosis* sola) y negativo (*M. tuberculosis* con penicilina y estreptomicina).

En la figura 10, se muestran las curvas de crecimiento de *M. tuberculosis* a diferentes condiciones de experimentación a lo largo del tiempo. El control positivo (negro) tuvo un comportamiento muy parecido al que se describió en la figura 4 y se asemejó al de las condiciones de 30 μ M de nicotina (rojo) y 50 μ M de nicotina (morado). Esto nos indica que ninguna de estas condiciones tiene efectos en el crecimiento normal de la bacteria. Para el control negativo (verde) como se esperaba no se obtuvieron mediciones ya que la bacteria no es resistente al antibiótico.

Para la condición de 10 μ M de nicotina (azul) se observó un comportamiento muy diferente. La fase logarítmica de crecimiento se mantuvo hasta el día 25 y después entró en meseta.

La cantidad final de *M. tuberculosis* en el día 29 en cada condición experimental se corroboró mediante la realización de UFC plaqueadas en agar 7H10 y se graficó en la figura 11. Se observó que la condición de 10 μ M de nicotina tuvo el doble de UFC en comparación con las demás condiciones experimentales. El control negativo no presentó crecimiento.

Con el fin de evaluar si el incremento del crecimiento bacteriano de la condición de 10 μ M de nicotina se debió a alguna fuente de contaminación se realizó la tinción Ziehl-Neelsen (ZN) específica para bacterias ácido alcohol resistente. En la figura 12 se puede

observar bacilos positivos en color rosa pero no otra fuente de contaminación, es decir que el cambio en el crecimiento se debió solo a *M. tuberculosis*.

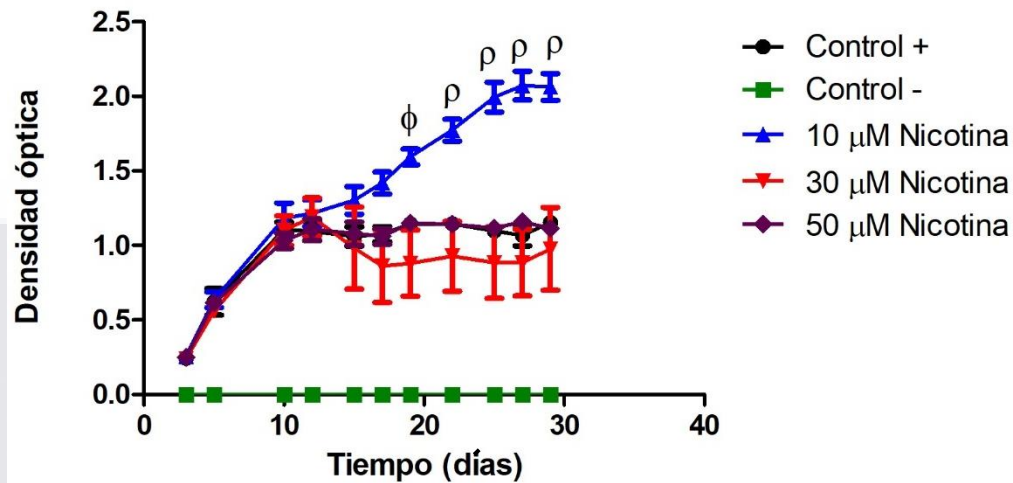


Figura 10. **Curva de crecimiento de *M. tuberculosis* con estímulo de nicotina.** Se muestra la densidad óptica medida cada tercer día hasta el día 29, en donde se observa la fase logarítmica y la fase estacionaria. Se observa el control positivo (negro), control negativo (verde) con penicilina/estreptomicina (10 000 μg/mL), 10μM de nicotina (azul), 30μM de nicotina (rojo), 50μM de nicotina (morado); n=6 (tres ensayos independientes por duplicado). Se realizó prueba múltiple de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el comportamiento de los datos con post-test de Bonferroni, $\Phi = P < 0.05$ $\rho = P < 0.001$ respecto al control.

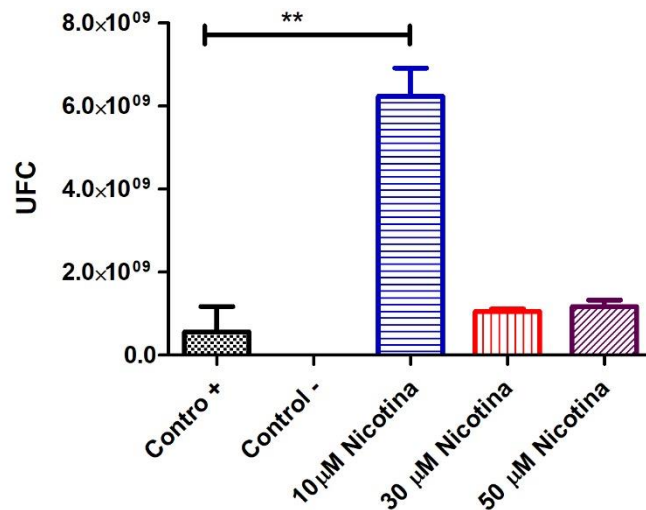


Figura 11. **Unidades formadoras de colonias de la cepa *M. tuberculosis* con estímulo de nicotina.** Se muestran las UFC realizadas el día 29 de crecimiento, se observa el control positivo (morado), el control negativo con penicilina/estreptomicina (10 000 µg/mL), 10µM de nicotina (azul), 30µM de nicotina (verde), 50µM de nicotina (naranja), n=6 (tres ensayos independientes por duplicado) se realizó la prueba Kruskal Wallis post test de Dunn en el programa GraphPad Prism versión 6.0 (**P<0.01).

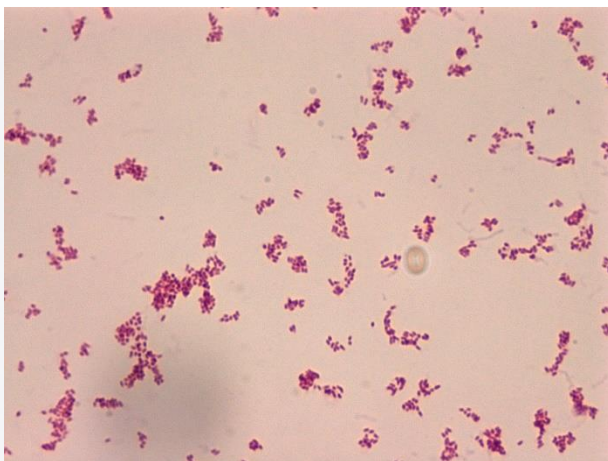


Figura 12. **Evaluación de la posible contaminación en la condición 10µM de nicotina y *M. tuberculosis*.** Se realizó la tinción ZN en la condición de 10µM de nicotina en el día 29 de crecimiento, se observan únicamente bacilos positivos en color rosa consistentes con la *M. tuberculosis* y no se observa alguna fuente de contaminación. Imagen tomada a 1000 aumentos.

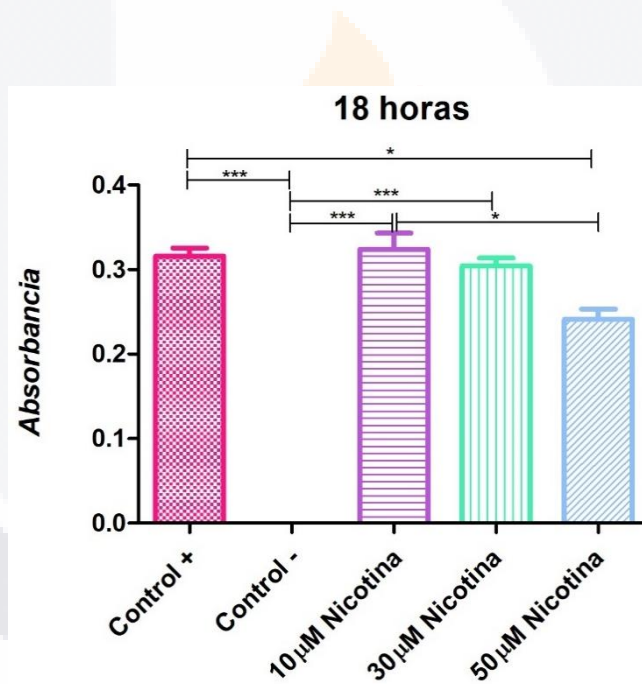
7.3.2 Crecimiento de *Pseudomonas aureginosa* a diferentes concentraciones de nicotina

Para evaluar si el efecto de la concentración de 10µM de nicotina en el crecimiento de *M. tuberculosis* es específico, se propuso utilizar otra bacteria importante en las enfermedades de vías respiratorias como la *Pseudomonas aureginosa* y exponerla a diferentes concentraciones de nicotina. En la figura 13 se muestran dos tiempos de exposición 18 horas y 24 horas. En la figura 13A se observan las siguientes condiciones, el control positivo corresponde solo a infusión cerebro corazón, el control negativo tiene la misma cantidad de medio y 1ml del antibiótico (penicilina y estreptomicina). Después, 3 diferentes concentraciones de nicotina 10µM, 30µM y 50µM. Las mismas condiciones se grafican en la figura 13 B pero a 24 horas de exposición.

En la figura 13A se muestra que la condición del control positivo y el estímulo 30µM y 50µM de nicotina tienen diferencia estadísticamente significativa, también se observa diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes condiciones de nicotina. Se observó que conforme aumenta la cantidad de nicotina disminuye la cantidad de bacterias, en la figura 13B el comportamiento es similar al del estímulo de 18 horas, pero al tener más tiempo de estímulo la cantidad de bacterias en el control positivo es mayor. Se puede observar que el efecto de la presencia de la nicotina con *P. aureginosa* es tóxico, ya que a mayor concentración de nicotina menor cantidad de bacterias.

El control negativo tiene diferencia estadísticamente significativa con todas las condiciones en los dos tiempos de estímulo, pero en las figuras no se muestra esta diferencia.

A)



B)

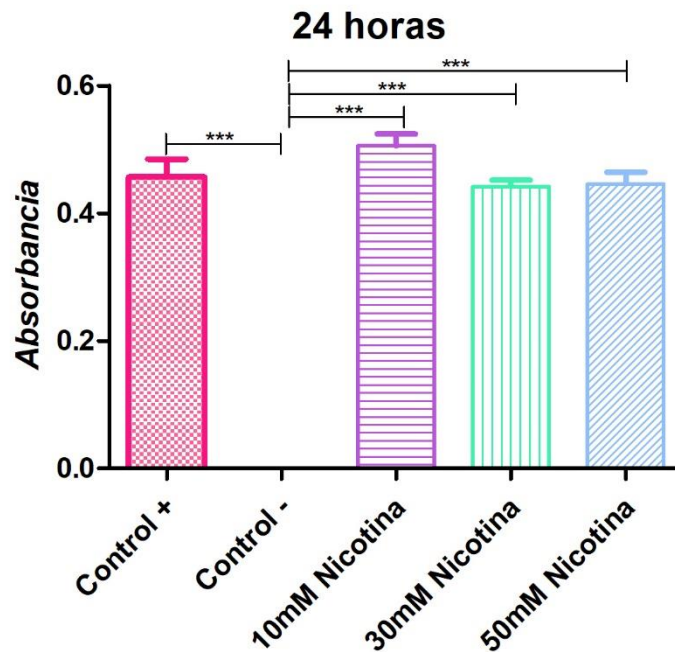


Figura 13. **Efecto de tóxico de la nicotina en *Pseudomonas aureginosa***. Se muestra la densidad óptica a dos tiempos de estímulo de A) 18 horas y B) 24 horas. Se observa el control positivo (sólo infusión cerebro corazón), control negativo (infusión cerebro corazón con penicilina/estreptomicina (10 000 µg/mL)) después 10µM, 30µM y 50µM de nicotina, n=6 (tres ensayos independientes por duplicado) se realizó la prueba Kruskal Wallis post test de Dunn en el programa GraphPad Prism versión 6.0.

7.3.3 Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* con nicotina en presencia de mecamilamina y bungarotoxina

Para evaluar si el efecto de la concentración de 10µM de nicotina en el crecimiento de *M. tuberculosis* es específico, se propuso el siguiente experimento que se muestran en la figura 14. El control positivo que corresponde a *M. tuberculosis* sola (morado) tuvo un comportamiento muy parecido al que se describió en la figura 10, de igual manera la condición de *M. tuberculosis* y 10µM de nicotina (azul) se parece al de la figura 10, las condiciones de *M. tuberculosis* con 10µM de nicotina y mecamelamina (negro) se puede

observar que el crecimiento de la bacteria es similar al del control positivo a pesar de que tiene el estímulo de nicotina. Finalmente, en la condición de *M. tuberculosis* con 10µM de nicotina y bungarotoxina (rojo) el crecimiento es muy parecido al del control positivo y similar a la condición con mecamelamina. Tanto la mecamelamina como la bungarotoxina son afines al receptor alfa 7 nicotínico de acetilcolina en humanos.

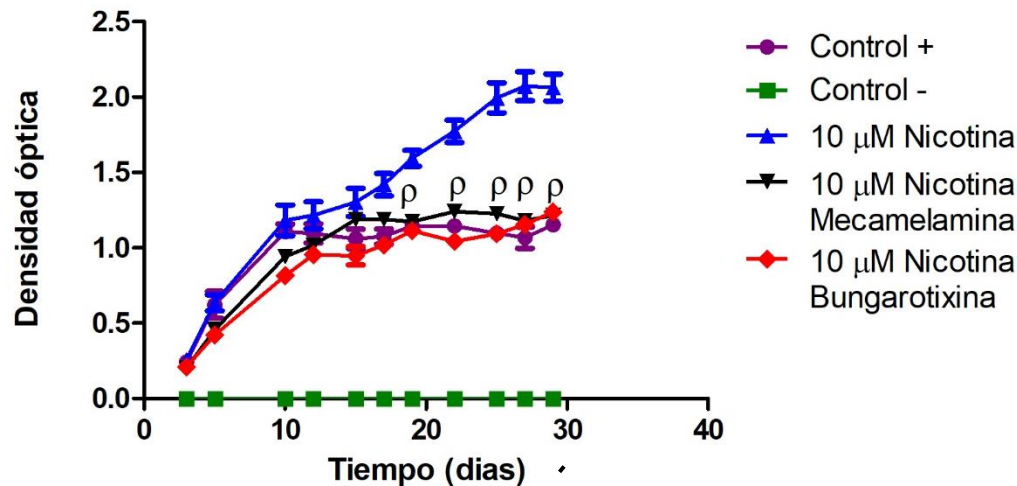


Figura 14. **Curva de crecimiento de *M. tuberculosis* con estímulo de nicotina con mecamelamina y bungarotoxina.** Se muestra la densidad óptica medida cada tercer día hasta el día 29, en donde se observa la fase logarítmica y la fase estacionaria. Se observa el control positivo *M. tuberculosis* sola (morado), control negativo *M. tuberculosis* con penicilina/estreptomicina (10 000 µg/mL) (verde), *M. tuberculosis* y 10µM de nicotina (azul), *M. tuberculosis* con 10µM de nicotina y mecamilamina 30µM (negro), *M. tuberculosis* con 10µM de nicotina y bungarotoxina 10nM (rojo); n=6 (tres ensayos independientes por duplicado) se realizó prueba múltiple de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el comportamiento de los datos con post-test de Bonferroni, $\rho = P < 0.001$ corresponde a Control +, 10µM de nicotina y bungarotoxina 10nM y 10µM de nicotina y mecamilamina 30µM con respecto a 10µM de nicotina.

7.4 Evaluación de genes de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* expuesta a nicotina

Al observar que la nicotina incrementa la fase exponencial de crecimiento de *M. tuberculosis*, se evaluó el efecto en la expresión de 12 genes de virulencia divididos en

3 grupos: primero el gen involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos (*lysX*), el segundo grupo los genes relacionados con las moléculas secretadas (*esxA* (*esat-6*), *esxB*(*cfp-10*), *hspX*, *katG*, *lpqH* y *caeA*) y finalmente los genes involucrados con la pared celular (*pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompAtb* y *hbhA*).

7.4.1 Evaluación de los oligonucleótidos con ADN de *Mycobacterium tuberculosis*

Con el fin de evaluar los oligonucleótidos que se diseñaron se midió la expresión de cada gen con ADN de bacterias previamente extraído. En la figura 15 se muestra la expresión de cada de uno de los genes en relación con 16S como gen constitutivo. Se puede observar que todos los oligonucleótidos son funcionales, y que el ADN es un buen control positivo para todos los genes a evaluar.

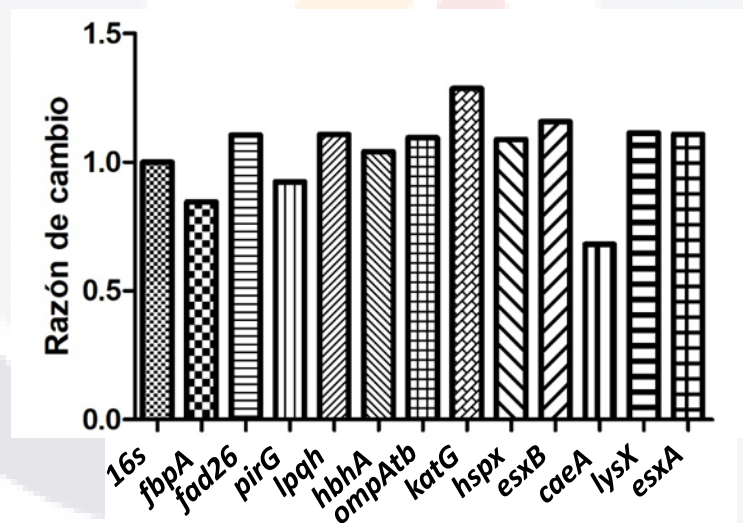


Figura 15. Evaluación de los oligonucleótidos diseñados con ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. Se evaluó por PCR la expresión de los oligonucleótidos diseñados, se normalizó con la expresión de 16S.

7.4.2 Evaluación del gene de virulencia involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos de *Mycobacterium tuberculosis* expuesta a nicotina

Una vez que se corroboró el funcionamiento de los oligonucleótidos se procedió a evaluar el primer gen de virulencia de *M. tuberculosis* *lys-x*, en relación a la exposición a 10 μ M de nicotina. Para entender el comportamiento de la bacteria se realizaron dos cinéticas de tiempo, la primera con una exposición en horas (1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 18 horas) y la segunda en días (día 10, día 22 y día 28).

En la figura 16 se muestra la primera cinética de exposición y se evaluó la expresión de *lys-x* normalizada con el gen *16S*. Se observó que, en la condición de 1 hora, la expresión del gen es significativamente mayor que en todos los otros tiempos evaluados, a excepción de las dos horas. La expresión del gen aumenta en el tiempo de 1 hora y disminuye hasta la condición de 4 horas, la expresión de 4, 6 y 18 horas es parecido a la condición sin estímulo. Recordemos que *lys-x* es un gen involucrado en la actividad de los péptidos antimicrobianos que son importante para la respuesta inmunitaria del huésped.

Como ya se había observado que la nicotina promueve la fase exponencial de crecimiento en *M. tuberculosis*, se decidió evaluar la expresión de *lys-x* durante la curva de crecimiento en los días 0, 10, 22 y 28, en la figura 17 se observan que en el día 10, 22 y 28 incrementa la expresión del gen con el estímulo de nicotina (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

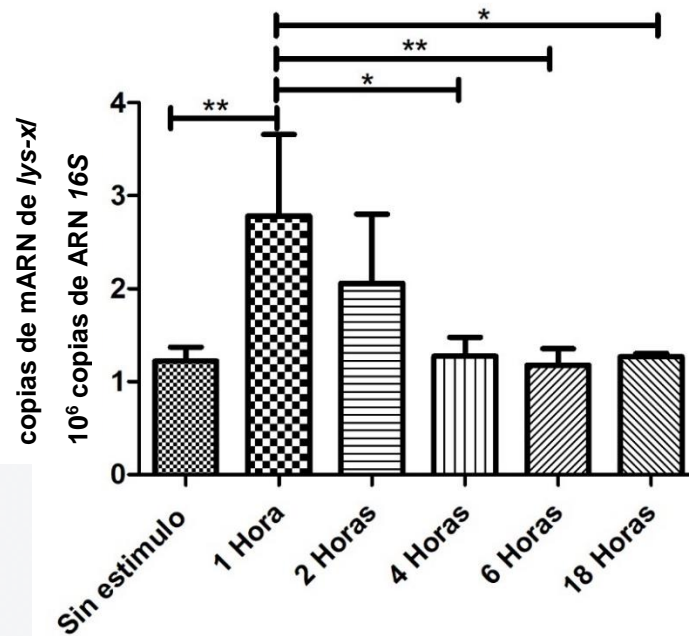


Figura 16. **La nicotina incrementa la expresión del gen involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos.** Se presentan los cambios en la expresión del gen *lys-x* de bacterias expuestas a 10µM de Nicotina, las muestras se evaluaron a 1, 2, 4, 6 y 18 horas de estímulo. Se normalizó con la expresión del gen de referencia 16S; $n=6$, 3 ensayos independientes, por duplicado; se realizó prueba múltiple de varianza (ANOVA) de dos vía para evaluar el comportamiento de los datos con post-test de Bonferroni, * = $P<0.01$, ** = $P<0.05$.

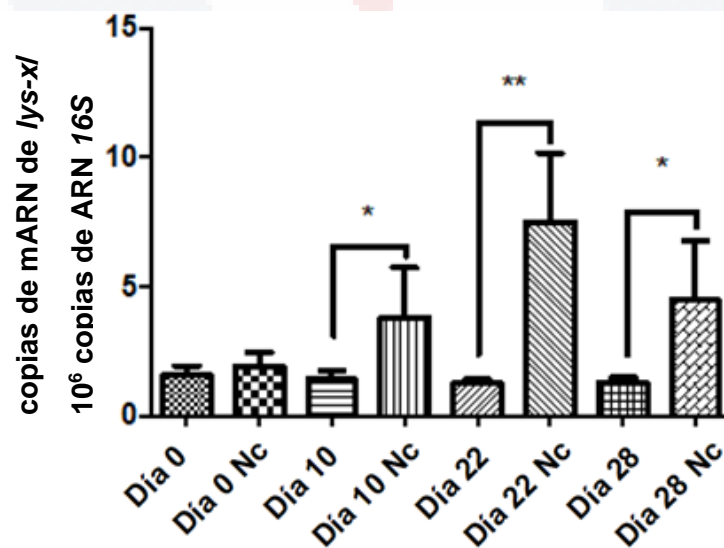


Figure 17. **La nicotina incrementa la expresión del gen involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos.** Se presentan los cambios en la expresión del gen *lys-x* de bacterias expuestas a 10µM de Nicotina (Nc), las muestras se evaluaron los días 0, 10, 22 y 28. Se normalizó con la expresión del gen de referencia *16S*, $n=6$, 3 ensayos independientes por duplicado, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. (U-Mann-Whitney)

7.4.3 Evaluación de genes de virulencia relacionados con moléculas secretadas de *Mycobacterium tuberculosis* expuesta a nicotina

Después de observar cambios en la expresión del gen *lys-x* en ambas cinéticas de exposición a nicotina, se continuó con el grupo de genes que están involucrados en la secreción de moléculas de virulencia de *M. tuberculosis*. Este grupo está conformado por los siguientes genes *esxA* (*esat-6*), *esxB*(*cfp-10*), *hspX*, *katG*, *lpqH* y *caeA*.

Dentro de este conjunto de genes, dos muy importantes durante el proceso de infección son *esxA* que codifica a *esat-6*, una proteína de secreción que junto con *cfp-10* son moléculas altamente inmunogénicas durante la infección y *caeA* que codifica para una proteasa que esta involucrada en el crecimiento de bacterias y promueve la supervivencia dentro de los macrófagos.

Debido a su importancia durante el proceso de infección se eligieron ambos genes para evaluar se expresión al estímulo de nicotina en la cinética a corto plazo (1, 2, 4, 6 y 18 horas). Los resultados para el gen *esxA* se muestran en la figura 18, los valores fueron normalizados con con *16S*, no se observa diferencia estadísticamente significativa en ninguna condición entonces la expresión de *esxA* no se ve afectado por el estímulo de nicotina ni el tiempo de exposición.

En la figura 19, se muestran los resultados de *caeA* en la cinética a corto plazo, normalizados con *16S*. Se observó diferencia estadística entre el tiempo de 1 hora y 4 horas y una tendencia de disminución en la expresión, tomando como punto más alto la condición de 1 hora disminuyendo hasta las 4 horas y manteniéndose con una expresión similar a la columna sin estímulo hasta las 18 horas. Entonces, el estímulo de nicotina aumenta la expresión de *caeA* a tiempos cortos.

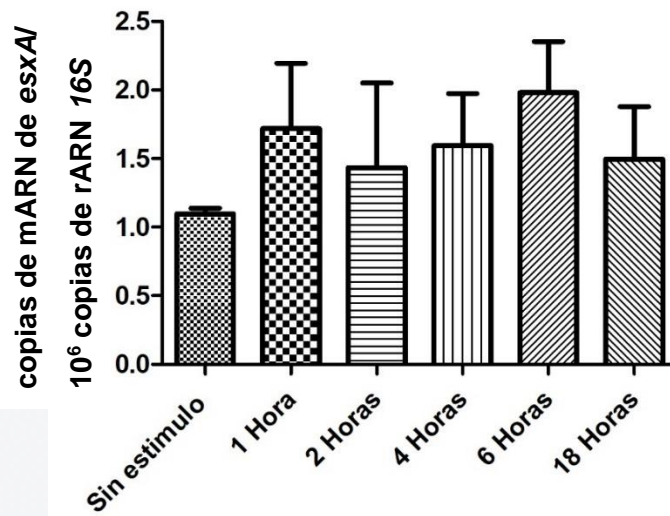


Figura 18. La nicotina no modifica la expresión del gen *esxA* relacionado con la secreción de moléculas de virulencia en *M. tuberculosis*. Se presentan los cambios en la expresión del gen *esxA* de bacterias expuestas a 10µM de Nicotina, las muestras se evaluaron a 1, 2, 4, 6 y 18 horas de estímulo. Se normalizó con la expresión del gen de referencia *16S*; $n=6$, 3 ensayos independientes por duplicado; se realizó prueba múltiple de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el comportamiento de los datos con post-test de Bonferroni.

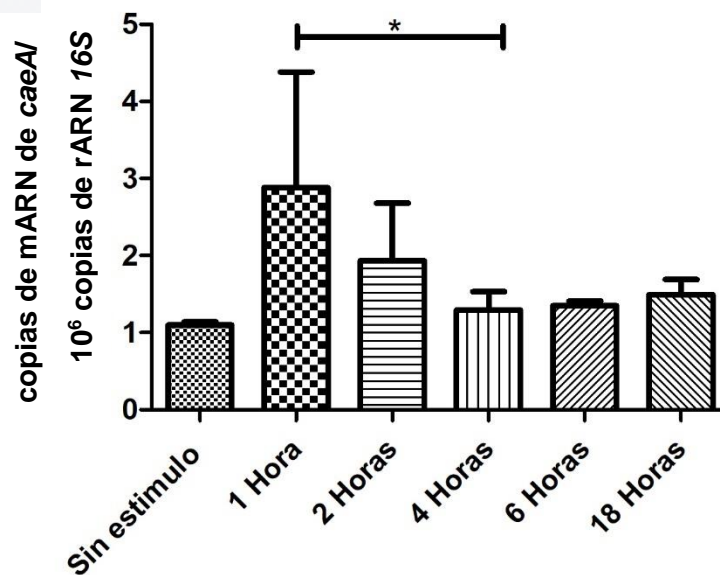


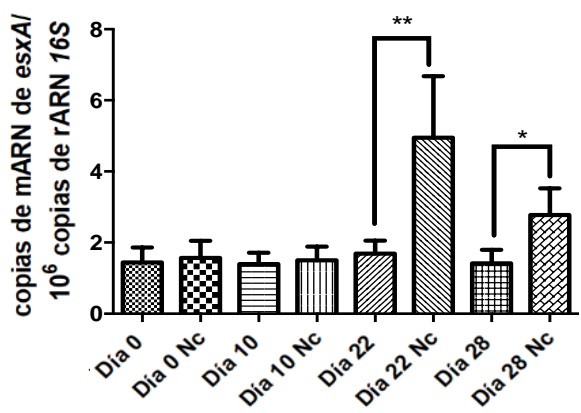
Figura 19. **La nicotina incrementa la expresión del gen *caeA* relacionado con la secreción de moléculas de virulencia en *M. tuberculosis*.** Se presentan los cambios en la expresión del gen *caeA* de bacterias expuestas a 10µM de Nicotina, las muestras se evaluaron a 1, 2, 4, 6 y 18 horas de estímulo. Se normalizó con la expresión del gen de referencia *16S*, $n=6$, 3 ensayos independientes por duplicado, se realizó prueba múltiple de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el comportamiento de los datos con post-test de Bonferroni, * = $P<0.01$.

Una vez que se demostró que el estímulo de nicotina en el rango de horas genera cambios en la expresión de los genes *esxA* y *caeA* modificando la virulencia de *M. tuberculosis*, se evaluó si la exposición a nicotina durante la curva de crecimiento en días (día 10, día 22 y día 28) genera cambios en la expresión de los genes *esxA* (*esat-6*), *esxB* (*cfp-10*), *hspX*, *katG*, *lpqH* y *caeA*.

En la figura 20 se muestran los cambios en los genes *esxA* y *esxB*, en la sección 20A solo se observa que el gen *esxA* incrementa su expresión el día 22 y 28 comparados con la expresión de las bacterias no estimuladas (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

El siguiente gen es *esxB*, se muestra cambio estadísticamente significativo en el día 0, aproximado de 4 veces en comparación a las no expuestas a nicotina del mismo día (** $P<0.01$). Para el día 10, la expresión disminuye en comparación con el día 0, pero si tiene diferencia estadística en comparación a las bacterias no estimuladas del mismo día (* $P<0.05$). El día 22 y 28 tiene diferencia estadísticamente significativa en comparación con las bacterias no expuestas de cada día (* $P<0.05$, ** $P<0.01$). El incremento es dependiente del tiempo de exposición (Figura 20B).

A)



B)

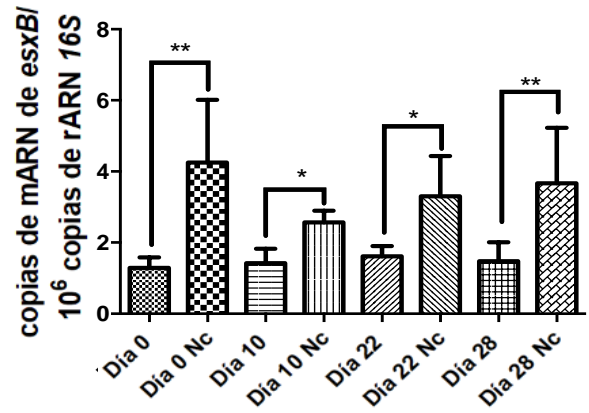
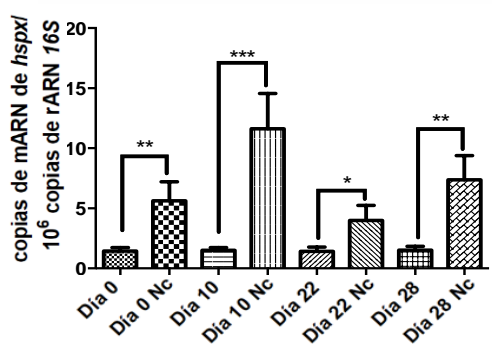


Figure 20. La nicotina incrementa en la expresión de los genes *esxA* y *esxB* relacionado en la secreción de moléculas de virulencia en *M. tuberculosis*. Se presentan los cambios en la expresión de bacterias expuestas a 10µM de nicotina, las muestras se evaluaron los días 0, 10, 22 y 28. Se normalizó con la expresión del gen de referencia 16S (A) Expresión del gen *esxA*, (B) Expresión del gen *esxB*, $n=6$, 3 ensayos independientes por duplicado, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. (U-Mann-Whitney).

En la figura 21A se evaluó el gen *hspX* el cual tiene incremento en la expresión en todos los tiempos en comparación con las bacterias no expuestas. El día 10 tiene el incremento mayor, aproximado de 9 veces en comparación a las no estimuladas (** $P<0.001$). La nicotina mantiene un incremento en expresión del gen *hspX* durante la curva de crecimiento. Para el caso de *katG* solo se observa incremento en la expresión del día 10 (** $P<0.01$), se representa en la figura 21B.

A)



B)

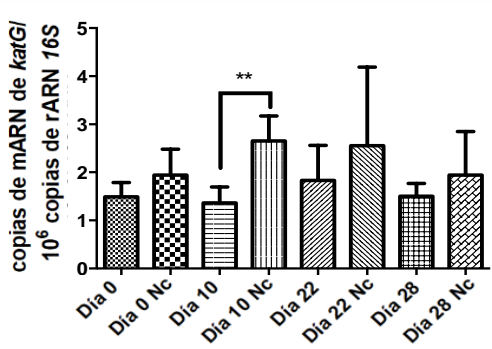


Figure 21. **La nicotina incrementa en la expresión de los genes *hsp*x y *kat*G relacionado en la secreción de moléculas de virulencia en *M. tuberculosis*.** Se presentan los cambios en la expresión de bacterias expuestas a 10µM de nicotina, las muestras se evaluaron los días 0, 10, 22 y 28. Se normalizó con la expresión del gen de referencia *16S* (A) Expresión del gen *hsp*x, (B) Expresión del gen *kat*G, (*n*=6, 3 ensayos independientes, por duplicado), **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. (U-Mann-Whitney).

Los últimos genes que se evaluaron del grupo de moléculas virulentas secretadas son *lpqH* y *caeA*. En la figura 22A se observa un incremento en la expresión de *lpqH* a partir del día 10 y hasta el día 28 (***P*<0.01). Finalmente, en la figura 22B, el gen *caeA* presenta incremento en la expresión, con diferencia estadística sólo el día 28 (**P*<0.05), y sin cambios los días 0, 10 y 22.

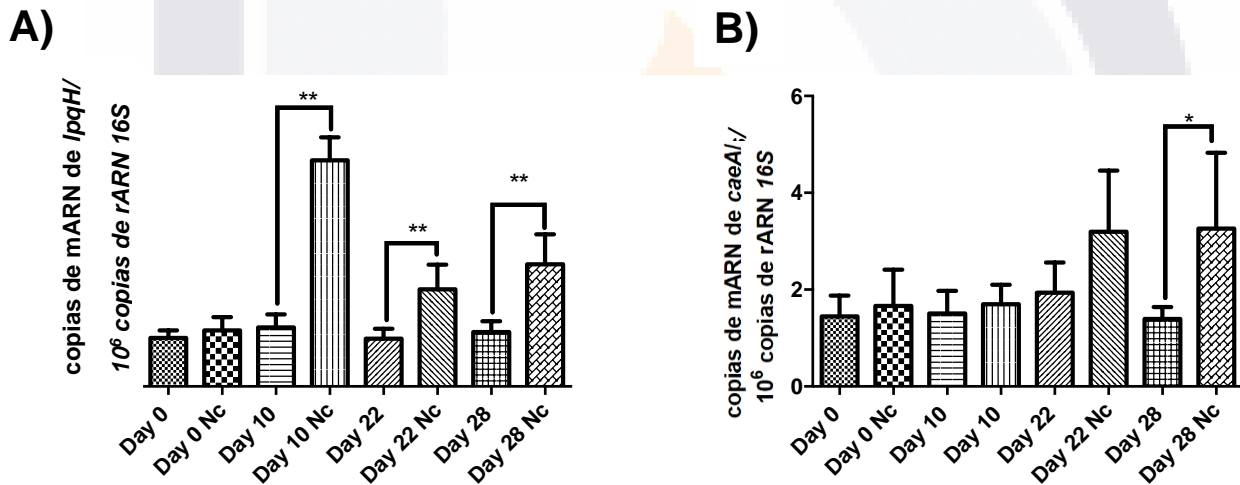


Figure 22. **La nicotina incrementa en la expresión de los genes *lpqH* y *caeA* relacionado en la secreción de moléculas de virulencia en *M. tuberculosis*.** Se presentan los cambios en la expresión de bacterias expuestas a 10µM de nicotina, las muestras se evaluaron los días 0, 10, 22 y 28. Se normalizó con la expresión del gen de referencia *16S* (A) Expresión del gen *lpqH*, (B) Expresión del gen *caeA*, *n*=6, 3 ensayos independientes por duplicado, **P*<0.05, ***P*<0.01 (U-Mann-Whitney).

7.4.4 Evaluación de genes de virulencia relacionados con la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* expuesta a nicotina

Después de comprobar que la nicotina modifica la expresión de genes de virulencia del grupo de resistencia a péptidos antimicrobianos y de moléculas secretadas,

se procedió a evaluar el tercer grupo, los genes involucrados con la pared celular (*pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompA* y *hbhA*).

De este grupo se eligió al gen *fad26* que codifica para la acil coenzima A (*acil-CoA*) sintetasa involucrada en la degradación de los ácidos grasos, para evaluarlo en la cinética de exposición a nicotina en horas. Los resultados se muestran en la figura 23. Se observa diferencia estadísticamente significativa en el tiempo 1 hora en comparación a la condición sin estímulo (* $P < 0.01$). La condición 2 horas tiene una expresión mayor en comparación a 1 hora, pero no es estadísticamente significativa. Se observó una tendencia de disminuir la expresión a partir de la estimulación de 4 y 6 horas y se mantuvo hasta las 18 horas. La condición 2 horas tiene diferencia estadísticamente significativa en comparación a la condición de 6 y 18 horas (* = $P < 0.01$).

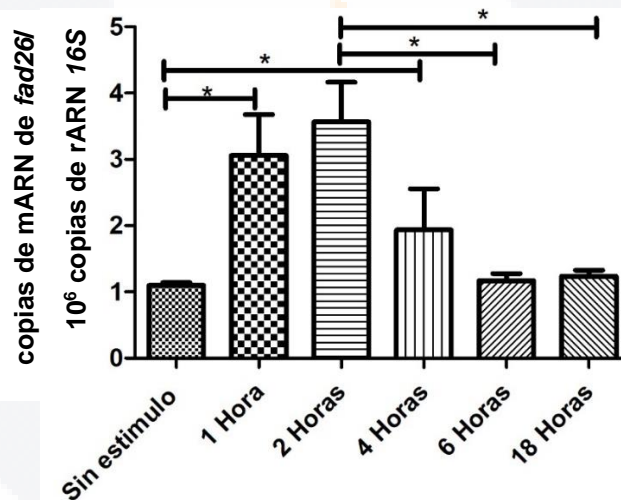


Figura 23. **La nicotina modifica la expresión del gen *fad26* relacionado con la pared celular de *M. tuberculosis*.** Se presentan los cambios en la expresión del gen *fad26* de bacterias expuestas a 10 μ M de nicotina, las muestras se evaluaron a 1, 2, 4, 6 y 18 horas de estímulo. Se normalizó con la expresión del gen de referencia 16S, $n=6$, 3 ensayos independientes por duplicado, se realizó prueba múltiple de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar el comportamiento de los datos con post-test de Bonferroni, * = $P < 0.01$.

El gen *fad26* también se evaluó en la segunda cinética de exposición a nicotina durante la curva de crecimiento y los resultados se muestran en la figura 24. Se observa un incremento

al doble en la expresión comparado con la condición no estimulada en el día 10 (*P<0.05). En todas las demás condiciones (día 0, día 22 y día 28) no genera cambios.

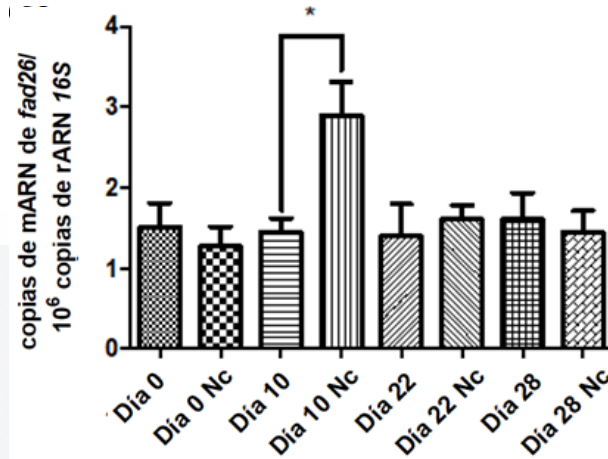


Figure 24. **La nicotina incrementa la expresión del gen *fad26* involucrado con pared celular en *M. tuberculosis*.** Se presentan los cambios en la expresión de bacterias expuestas a 10µM de nicotina, las muestras se evaluaron los días 0, 10, 22 y 28. Se normalizó con la expresión del gen de referencia 16S, n=6, 3 ensayos independientes por duplicado, *P<0.05. (U-Mann-Whitney)

Los genes *pirG*, *fbpA*, *ompA* y *hbhA* involucrados en las proteínas de superficie celular se evaluaron en la cinética de exposición a nicotina durante la curva de crecimiento a los días 0, 10, 22 y 28. En la figura 25A se muestran los resultados para *pirG*, se observa un incremento en la expresión en el día 10, 22 y 28 en comparación a la condición sin estímulo en cada día (*P<0.05, **P<0.01), podemos decir que se observa un incremento en la expresión dependiente del tiempo. El siguiente gen es *fbpA*, se muestra en la figura 25B un incremento en la expresión a partir del día 10 y hasta el día 28 en comparación con las *M. tuberculosis* no estimuladas (*P<0.05), tiene un comportamiento de expresión similar al observado con el gen *pirG*.

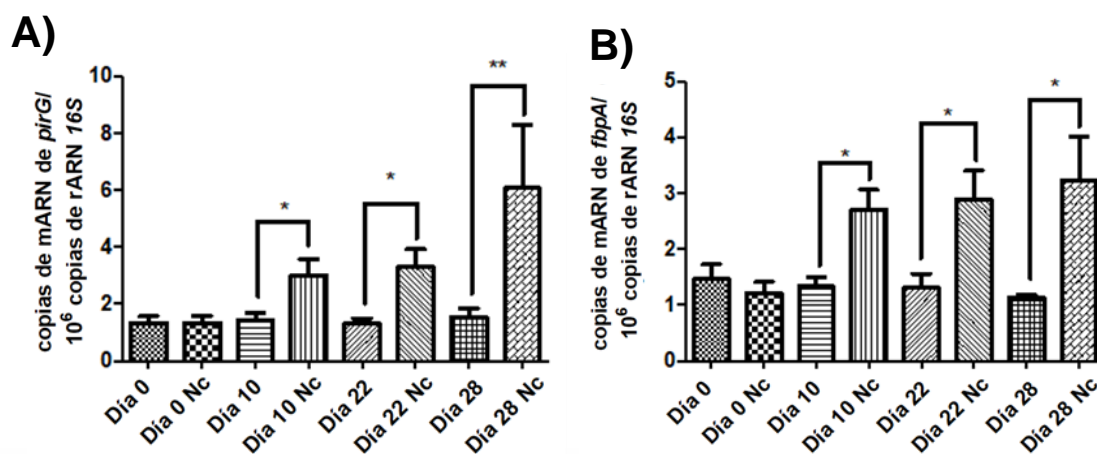


Figure 25. **La nicotina incrementa la expresión de genes involucrados con pared celular en *M. tuberculosis*.** Se presentan los cambios en la expresión de bacterias expuestas a 10 μ M de nicotina, las muestras se evaluaron los días 0, 10, 22 y 28. Se normalizó con la expresión del gen de referencia 16S, (A) Expresión del gen *pirG*, (B) Expresión del gen *fbpA*, $n=6$, 3 ensayos independientes por duplicado, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ (U-Mann-Whitney)

Los últimos genes que se evaluarón fueron *ompA* y *hbhA*. En la figura 26A se observa incremento en la expresión del gen *ompA* en el día 10 en comparación con las bacterias no estimuladas (* $P<0.05$). Además, en el día 22 se observa un incremento en la expresión aproximadamente de 9 veces en comparación a las no expuestas (** $P<0.001$). Finalmente la figura 26B, para el gen *hbhA*, muestra un incremento en la expresión en el día 0, 10, 22 y 28 comparadas con las bacterias no estimuladas de cada condición (* $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$). Para este gen la nicotina genera cambios en la expresión dependiente del tiempo.

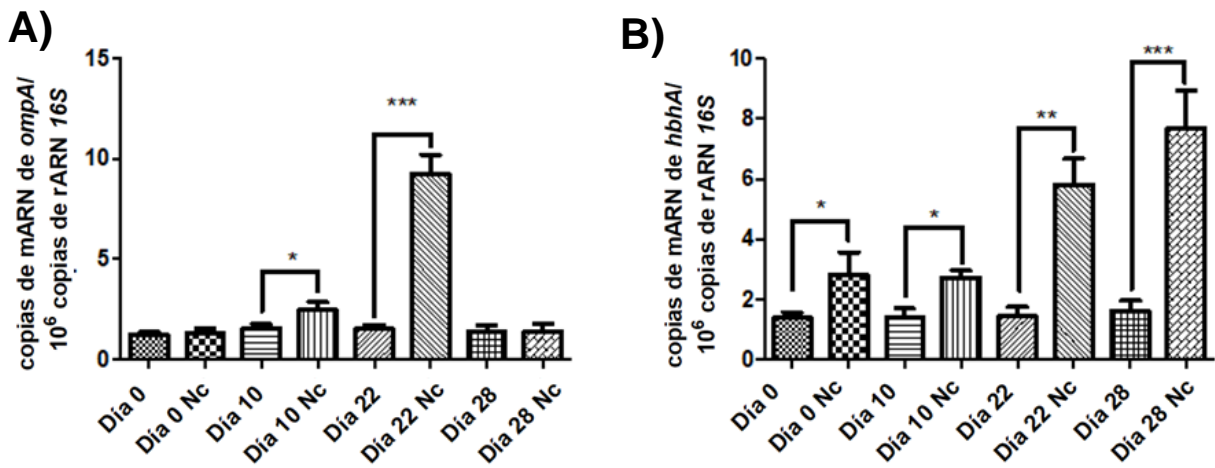


Figure 26. La nicotina incrementa la expresión de genes involucrados con pared celular en *M. tuberculosis*. Se presentan los cambios en la expresión de bacterias expuestas a 10µM de nicotina, las muestras se evaluaron los días 0, 10, 22 y 28. Se normalizó con la expresión del gen de referencia 16S, (A) Expresión del gen *ompA*, (B) Expresión del gen *hbhA*, $n=6$ ensayos independientes por duplicado, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. (U-Mann-Whitney)

8.0 Discusión

En este trabajo se demostró que la nicotina entra y se distribuye de manera homogénea en el citoplasma de los pneumocitos tipo II además de que tienen la capacidad de internalizar a *M. tuberculosis*. Se probó que la nicotina interacciona con la bacteria al interior de los pneumocitos tipo II. Se evaluó el efecto directo de nicotina en *M. tuberculosis* y se encontró que prolonga la fase exponencial de crecimiento e incrementa la expresión de al menos 12 genes de virulencia, los cuales se asocian al desarrollo de una cepa metabólicamente más activa y virulenta.

Inicialmente se evaluó la interacción de la nicotina durante el proceso de infección en TB primaria, ya que hasta ahora solo se había evaluado su efecto directo en la células (Daffner *et al.*, 2015, Sagheddu, *et al.*, 2018, Kudelska *et al.*, 2018). Se demostró que la nicotina es capaz de atravesar la membrana de los pneumocitos tipo II y distribuirse homogéneamente en el citoplasma, entonces no solamente interacciona con los receptores nicotínicos si no que tiene la capacidad de atravesar la membrana. Se propone que podría deberse a su propiedad lipofílica dependiente del pH (Fowler, 2007: Hukkanen, 2005).

El siguiente paso fue evaluar si los pneumocitos tipo II pueden infectarse por *M. tuberculosis*. Para comprobarlo se utilizó la tinción de tubulina y se observó que la bacteria si es internalizada por las células. Ya se había reportado que las células A549 pueden internalizar *Mycobacterium smegmatis* mediante macropinocitosis (García *et al.*, 2003), se propone que al tratarse de otra cepa de *Mycobacterium* patógena la macropinocitosis también podría ser utilizada como mecanismo de internalización.

Ya se comprobó que los pneumocitos tipo II pueden internalizar tanto a la nicotina como a *M. tuberculosis* por separado, entonces nuestro interés fue evaluar si ambos entraban en contacto durante la infección. Para comprobarlo se realizó una triple tinción: la célula, la nicotina y la bacteria. Se comprobó la interacción física intracelular entre la nicotina y *M. tuberculosis*, ya que colocalizan en el citoplasma de los pneumocitos. Se propone que esta interacción inicia una vez que el pneumocitos tipo II reconoce a la bacteria y la internalizan formando un endosoma, que se forma con el movimiento del citoesqueleto y la membrana celular para rodear a la bacteria. Después se estimula con

nicotina, que como ya se describió tiene la capacidad de atravesar la membrana celular, distribuyéndose homogéneamente en el citoplasma. Si el endosoma donde se encuentra la bacteria está formado por membrana celular, entonces, la nicotina pudo atravesar el endosoma e interactuar físicamente con la bacteria dentro de la célula. Este mecanismo propuesto se ejemplifica en la figura 27.

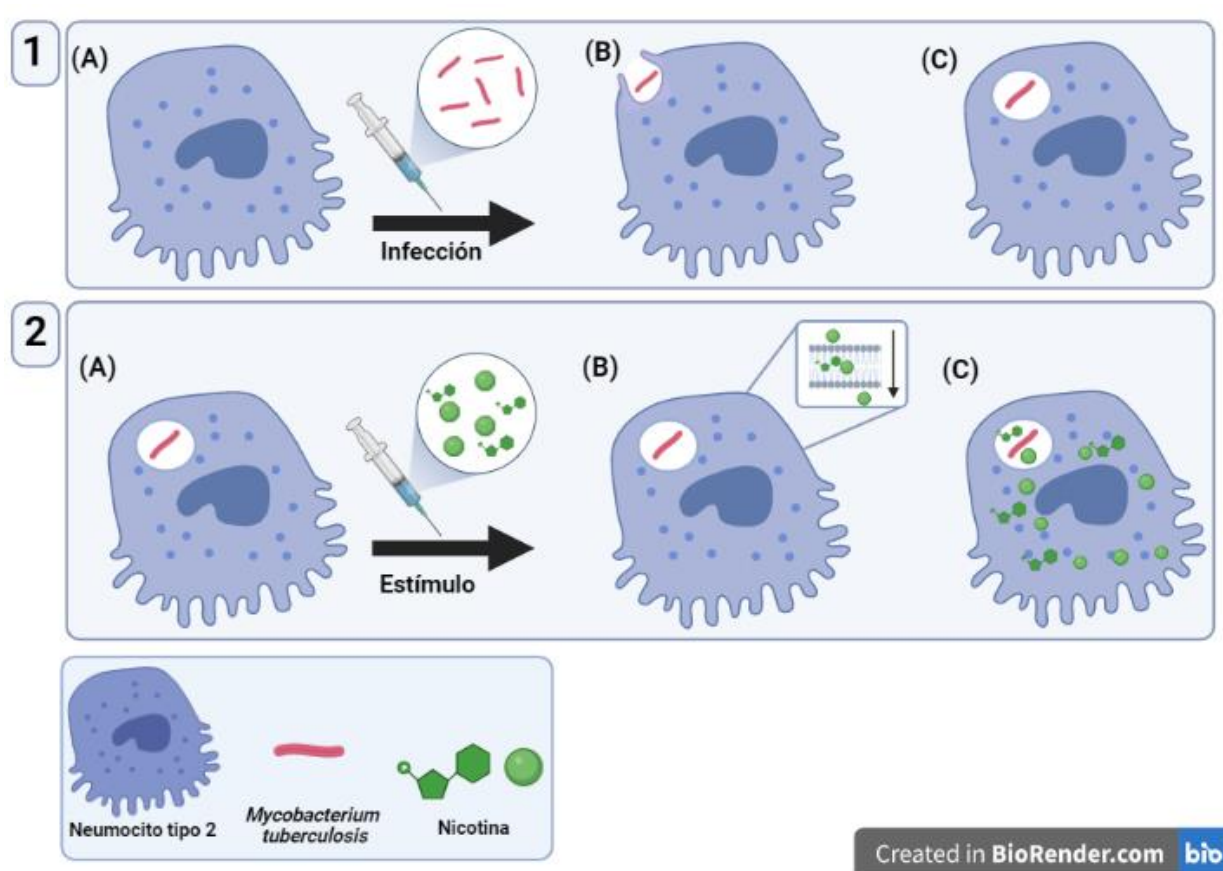


Figura 27 **Esquema de interacción de la nicotina y *M. tuberculosis* en neumocitos tipo II.** Se esquematiza el mecanismo propuesto de interacción intracelular entre la nicotina y *M. tuberculosis*. En la sección 1 (A) se muestra al neumocito tipo II que se infecta con *M. tuberculosis*, (B) Se ejemplifica que los neumocitos son capaces de reconocer y fagocitar a *M. tuberculosis* moviendo el citoesqueleto (C) Esquema de un neumocito tipo II y *M. tuberculosis* internalizada. En la sección 2: (A) en neumocitos tipo II previamente infectados con *M. tuberculosis* se expone a nicotina (B) La nicotina es capaz de atravesar la membrana y distribuirse en el citoplasma probablemente por su capacidad lipofílica (C) La

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

bacteria en el endosoma que esta formado por un fragmento de membrana celular y puede ser atravesado por la nicotina y de esta manera interaccionar físicamente con la bacteria.

Al establecer que existe una interacción física entre la bacteria y la nicotina intracelularmente, es importante conocer si la nicotina tiene efecto directo en *M. tuberculosis*. Para comprobarlo, se evaluó el efecto durante la curva de crecimiento de la bacteria. Se encontró que *M. tuberculosis* a la concentración menor de nicotina, prologa la fase exponencial de crecimiento. Se propone que no utiliza a la nicotina como nutriente (Feng, 2014), ya que la concentración más alta de nicotina no presentó incremento. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se demostró que la adición de la nicotina en el medio Löwenstein-Jensen disminuye los días de crecimiento de la bacteria para acelerar el diagnóstico de la TB.

Para saber si el efecto en la prolongación del crecimiento es específico del estímulo de nicotina, se colocaron dos inhibidores del receptor nicotínico en humanos: la mecamelamina (específica para el receptor nicotínico alfa 7 de acetilcolina y el receptor nicotínico alfa 4 beta 2 de acetilcolina) y la bungarotoxina (específica para el receptor nicotínico alfa 7 de acetilcolina). Ambos inhibidores son capaces de revertir el efecto. Entonces *M. tuberculosis* tiene una estructura que es capaz de reconocer tanto a la mecamilamina y a la bungarotoxina. En específico se propone que podría expresar un sistema de dos componetnes parecido al receptor alfa 7 nicotínico de acetilcolina que es capaz de reconocer a la nicotina. Esto se sustenta con lo reportado en el 2002 donde la exposición al extracto de cigarro genera cambios en la composición de los ácidos grasos de la pared de *M. tuberculosis* (Shprykov *et al.*, 2002).

Para comprobar si el incremento en el crecimiento de *M. tuberculosis* por la nicotina se replica en otras bacterias, se expuso a *P. aureginosa* a nicotina. Se encontró que al contrario de *M. tuberculosis* disminuye el crecimiento dependiente de la concentración. Entonces, el efecto de la nicotina es específico para cada bacteria. Por ejemplo, estudios recientes de *Staphylococcus epidermidis* expuesta a nicotina muestran que mejora la formación de biopelículas, alteran la autólisis bacteriana y la liberación de ADN extracelular (Wu, 2018), en *Pseudomonas putida* ya se tiene descrito el mecanismo

regulador de la degradación de la nicotina, mediante el grupo de genes *nic2* (Hu *et al.*, 2021). Por lo tanto, la nicotina no sólo genera cambios en el crecimiento de las bacterias, sino que también en la expresión de diferentes genes.

El siguiente paso es comprobar si la exposición a nicotina modifica la expresión de genes en *M. tuberculosis*, durante dos cinéticas la primera con tiempo máximo de 18 horas y la segunda durante la curva de crecimiento. Se eligieron 12 importantes factores de virulencia divididos en tres grupos: primero los involucrados con la resistencia a péptidos antimicrobianos (*lys-x*), el segundo relacionado con proteínas secretadas (*esxA*, *esxB*, *hspX*, *katG*, *lpqH* y *caeA*) y los involucrados con la envoltura celular (*pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompA* y *hbhA*) (Forrellad, 2013).

El primer grupo es el de resistencia a los péptidos antimicrobianos; el gen se llama *lys-x*. Este gen se relaciona con la agregación de residuos de lisina a los fosfolípidos de la superficie celular para cambiar su carga neta, se expresa diferencialmente entre las cepas de *M. tuberculosis* y afecta la virulencia de la bacteria (Montoya-Rosales *et al.*, 2017). Se demostró que la nicotina promueve la expresión del gen *lys-x*, generando una cepa más virulenta, ya que se ha reportado que entre más virulenta sea la cepa, mayor expresión del gen (Montoya-Rosales *et al.*, 2017). Se propone que gracias a la nicotina, *M. tuberculosis* evade de manera más eficiente el efecto antimicrobiano de los péptidos.

El siguiente grupo de genes relacionados con la virulencia, son los que codifican para las proteínas secretadas. Los primeros genes evaluados son *esxA*, que codifica para la diana antigénica de secreción temprana de 6 kDa o *Esat 6*, y *esxB* es codifica para el antígeno filtrado de cultivo de 10 kDa o *CFP-10*. Las dos son moléculas altamente inmunogénicas durante la infección (Brodin *et al.*, 2004). Ambas proteínas se encuentran en el sistema de secreción RD1 que es importante para cepas virulentas. Las cepas carentes de RD1 tienen un fenotipo como *M. bovis* atenuado. En un estudio donde se coloca RD1 (*Esat-6* y *CFP 10*) a cepas carentes de estas proteínas, se promueve el crecimiento (Brodin *et al.*, 2004). El estímulo de nicotina promueve la expresión de ambos genes, sugiriendo que este incremento aumenta la expresión de ambas proteínas, promueve el crecimiento de la bacteria, modificando la virulencia.

Acr1, también llamado α -crystallin de 16 kDa o *HspX*, inhibe la respiración aeróbica y evita la replicación del bacilo, lo que regula la expresión de una gran cantidad de proteínas asociadas a la latencia (Kendall *et al.*, 2004). *HspX* es un elemento de control importante ya que la sobreexpresión de la proteína inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* (Forrellad *et al.*, 2013). El estímulo de nicotina promueve la sobreexpresión de este gen, lo que nos lleva a proponer que este sea un mecanismo regulatorio para el crecimiento de la bacteria.

El siguiente gen es *katG* que codifica para la única enzima con actividad catalasa en *M. tuberculosis*, peroxidasa que degrada el H_2O_2 y los peróxidos orgánicos. *katG* está regulado negativamente por la proteína FurA (Forrellad *et al.*, 2013). El estímulo de nicotina incrementa la expresión de *katG* promoviendo la actividad catalítica de la bacteria, en la respuesta de los macrófagos ante *M. tuberculosis* el estallido respiratorio en el fagosoma elimina las bacterias internalizadas, la nicotina incrementa la actividad de catalasa de *katG* incrementando la supervivencia de la bacteria inactivando el estallido respiratorio (Chavez-Galan *et al.*, 2009).

La lipoproteína de 19 kDa o *lpqH* induce la expresión y secreción de diferentes moléculas de la respuesta inmune del huésped, a través de la señalización de los TLR en células epiteliales, linfocitos B y neutrófilos (Echeverría-Valencia, 2017). Las cepas carentes de esta lipoproteína son eliminadas fácilmente. El estímulo de nicotina promueve la expresión de *lpqH*, se propone que se genera una cepa que mejora la señal a TLR y es más difícil de eliminar.

El último gen es *caeA* que codifica para una carboxilesterasa relacionada con las lipoproteínas de la pared de la bacteria (Rengarajan *et al.*, 2008). En un estudio donde se modifica a la bacteria para no expresar este gen se disminuyeron las UFC en modelo *in vivo* de infección (Rengarajan *et al.*, 2008). Esta enzima tiene como sustrato a GroEL2, que es una proteína chaperona que se encarga del plegamiento intracelular de las proteínas (Chilukoti *et al.*, 2016). El estímulo de nicotina incrementa la expresión de *caeA* en la etapa de meseta, se propone que durante esta etapa esta enzima esté más activa debido a un incremento en el plegamiento intracelular de proteínas.

El último grupo de factores de virulencia está conformado por 5 genes (*pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompA* y *hbhA*), que se relacionan con la pared celular. Al tratarse de una estructura compleja y única se vuelve excelente blanco para contrarrestar la virulencia de *M. tuberculosis* (Forrellad, 2013). El primer gen es *pirG*, que codifica para la proteína repetitiva exportada (*erp*), una proteína secretada de 36 kDa que contiene varias repeticiones de prolina-glicina-leucina-treonina-serina (PGLTS) involucrada en el crecimiento intracelular (Betts *et al.*, 2002). Berthet y colaboradores (1998) demostraron que la ausencia de *erp* en *M. tuberculosis* afecta la replicación de esta cepa en macrófagos de ratón derivados de médula ósea infectados. Ya que la nicotina incrementa la expresión de *pirG*, podría relacionarse con la prolongación de la fase exponencial de crecimiento y proponemos que es un factor crucial para la supervivencia y la multiplicación de bacterias.

Fad26 es una acil coenzima A (acil-CoA) sintetasa involucrada en la degradación de ácidos grasos (Smith *et al*, 2003). Es un factor de virulencia que disminuye las UFC en un modelo *in vivo* en C57BL/6 de ratón (Forrellad *et al*, 2013). El principal ácido graso de la bacteria es el ácido micólico que forma parte de la pared bacteriana y es importante para su estructura (Gorocica *et al*, 2005). Cuando *M. tuberculosis* se expone a nicotina aumenta la expresión de *fad26*, por lo que se sugiere que el estímulo aumenta la degradación de ácidos grasos en la bacteria, disminuyendo la concentración de ácido micólico y debilitando estructuralmente la pared celular, generando una cepa menos virulenta.

Las proteínas de los genes *fbpA*, *fbpB* y *fbpC* (micolil-transferasas) se definen como los antígenos inmuno dominantes 85A, 85B y 85C. Las cepas carentes del gen *fbpA* resultan atenuadas en el proceso de infección en macrófagos humanos y murinos (Forrellad, 2013); como ya se mencionó el ácido micólico es el principal ácido graso de la pared bacteriana. El incremento producido por el estímulo de la nicotina en la expresión de *fbpA*, puede deberse a un aumento en la síntesis del ácido micólico, probablemente para contrarrestar el efecto causado por el incremento en la expresión de *fad26*.

Otra proteína importante es la responsable de formar poros en la membrana (porina) que codifica el gen *ompA* (Forrellad, 2013), que es un factor de virulencia

requerido para la resistencia a los ácidos en los fagosomas del huésped (Yang et al., 2011). Forma poros con un diámetro de 1.4 y 1.8 nm, facilitando el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas como la arabinosa, glucosa, sacarosa y serina al citoplasma, funciona bajo condiciones ácidas (Forrellad, 2013). La exposición a nicotina aumenta la expresión de *ompA*, lo que le permitiría a la bacteria continuar adquiriendo moléculas del microambiente en el que está creciendo y, por lo tanto, prolongar la supervivencia.

Finalmente, el antígeno de hemaglutinina de unión a la heparina (*hbhA*), es la principal adhesina expuesta en la superficie de la célula. Promueve la fijación de las micobacterias a las células epiteliales y fibroblastos, pero no a células similares a los macrófagos. Induce la agregación micobacteriana, que le da a la bacteria capacidad de formar una biopelícula primaria (Forrellad, 2013). Se propone que el estímulo de nicotina en *M. tuberculosis* incrementa expresión de *hbhA*, promoviendo la formación de una biopelícula desde el inicio de la curva de crecimiento.

En resumen, el efecto de la nicotina sobre *M. tuberculosis* se puede dividir en dos, primero durante la curva de crecimiento, ya que prolonga la fase exponencial y retarda la fase de meseta, y en segundo lugar porque incrementa la expresión de 12 genes de virulencia, lo que sugiere la generación de una cepa metabólicamente más activa, más resistente a péptidos antimicrobianos, con mayor producción de proteínas virulentas como *Esat6* y *CFP-10*, promoviendo la actividad catalítica, mejorando la señal a TLR, incrementando el plegamiento intracelular de proteínas, aumentando la supervivencia, modificando la producción de ácidos grasos y promoviendo la formación de biopelículas. El resumen del efecto de la nicotina sobre *M. tuberculosis* se ejemplifica en la figura 28.

Se propone que una manera de explicar el incremento en la probabilidad de contagio por TB al fumar es que la nicotina no solo afecta la inmunidad del huésped, si no que genera una cepa de *M. tuberculosis* más virulenta y más difícil de eliminar.

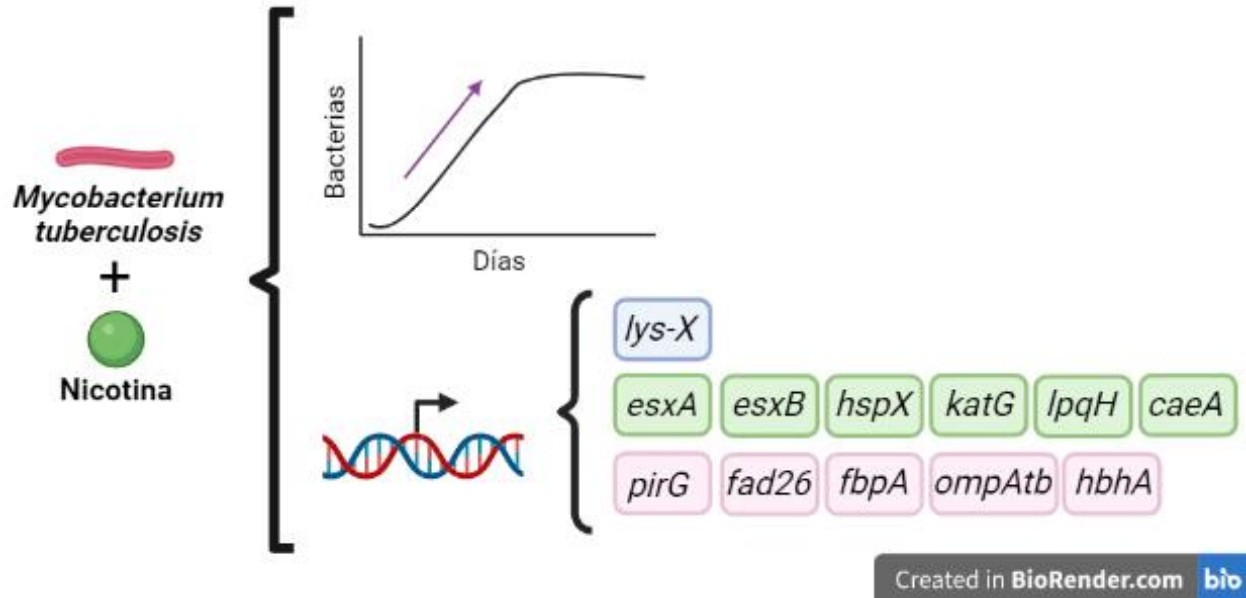


Figura 28 **Efecto de la interacción entre la nicotina y *M. tuberculosis*.** Se resumen los efectos entre la nicotina y *M. tuberculosis*. En la parte superior se ejemplifica que la nicotina incrementa la fase exponencial de crecimiento de la bacteria y en la parte inferior que la nicotina incrementa la expresión de los genes de virulencia *lys-x*, *esxA*, *esxB*, *hspX*, *katG*, *lpqH*, *caeA*, *pirG*, *fad26*, *fbpA*, *ompAtb* y *hbhA*, generando una nueva cepa más virulenta y metabólicamente más activa.

9.0 Conclusión

La nicotina, por su capacidad lipófilica, puede internalizarse en pneumocitos tipo II. Si las células se encuentran infectadas con *M. tuberculosis*, la nicotina también puede interaccionar con las bacterias intracelulares, generando un panorama más amplio para la TB activa, ya que la nicotina no solo afecta la respuesta inmune del huésped si no que presenta un efecto directo en el patógeno.

El estímulo de nicotina directamente en *M. tuberculosis* incrementa el crecimiento de las bacterias. Aunque no se tiene descrito ningún receptor que sea capaz de reconocer a la nicotina, se describió que el efecto en el crecimiento se debe a que la bacteria presenta una estructura similar a los receptores nicotínicos humanos, que puede reconocerla e inactivarse con bloqueadores como mecamelamina y bungarotoxina.

Otro efecto de la a nicotina en *M. tuberculosis* es que induce la expresión de al menos 12 genes de virulencia, sugiriendo la generación de una nueva cepa con mayor resistencia a los péptidos antimicrobianos, incremento en la liberación de moléculas inmunoregulatoras como *Esat-6* y *CPF-10*, promoviendo la supervivencia, metabólicamente más activa y que favorece la formación de biopelículas. Es decir, una cepa más virulenta y difícil de eliminar. Sin embargo, para evaluar la respuesta completa es necesario continuar el estudio de otros genes de virulencia en la bacteria para entender el panorama completo.

Entonces la nicotina, como molécula inmunoregulatora del cigarro, podría ser la responsable del incremento en la probabilidad de contagio por TB al fumar, generando cambios en la respuesta inmune del huésped y generando una nueva cepa de *M. tuberculosis* más virulenta.

10.0 Referencias

- Amador, D. E. M. L. y. Y. L. (2001). Tuberculosis. *Rev Cubana Estomatol*, 38(1), 33-51.
- Ariyothai, N., Podhipak, A., Akarasewi, P., Tornee, S., Smithtikarn, S., & Thongprathum, P. (2004). Cigarette smoking and its relation to pulmonary tuberculosis in adults. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 35(1), 219-227.
- Armitage, A.K., Turner, D.M.(1970) Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoke through the oral mucosa. *Nature (London)* 226:1231-1232.
- Armitage, L. Y., Jagannath, C., Wanger, A. R., & Norris, S. J. (2000). Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect Immun*, 68(2), 767-778.
- Bach, H., Papavinasasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe*, 3(5), 316-322. doi:10.1016/j.chom.2008.03.008
- Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z, Av-Gay Y. *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe*. 2008;3:316–22. doi: 10.1016/j.chom.2008.03.008.
- Bacher I, Wu B, Shytle DR, George TP. Mecamylamine - a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin Pharmacother*. 2009 Nov;10(16):2709-21. doi: 10.1517/14656560903329102. PMID: 19874251.
- Bai X, Aerts SL, Verma D, Ordway DJ, Chan ED. Epidemiologic Evidence of and Potential Mechanisms by Which Second-Hand Smoke Causes Predisposition to Latent and Active Tuberculosis. *Immune Netw*. 2018 Jun 26;18(3):e22. doi: 10.4110/in.2018.18.e22. PMID: 29984040; PMCID: PMC6026693.
- Benowitz, N.L., Porchet, H., Sheiner, L. and Jacob, P., III (1988), Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: Comparison with cigarettes and nicotine gum. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 44: 23-28. <https://doi.org/10.1038/clpt.1988.107>
- Berthet, F. X., Lagranderie, M., Gounon, P., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Chavarot, P., . . . Gicquel, B. (1998). Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* erp gene. *Science*, 282(5389), 759-762.
- Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol*. 2002 Feb;43(3):717-31. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02779.x. PMID: 11929527.
- Bianco, M. V., Blanco, F. C., Imperiale, B., Forrellad, M. A., Rocha, R. V., Klepp, L. I., . . . Bigi, F. (2011). Role of P27 -P55 operon from *Mycobacterium tuberculosis* in the resistance to toxic compounds. *BMC Infect Dis*, 11, 195. doi:10.1186/1471-2334-11-195
- Bishwakarma R, Kinney WH, Honda JR, Mya J, Strand MJ, Gangavelli A, Bai X, Ordway DJ, Iseman MD, Chan ED. Epidemiologic link between tuberculosis and cigarette/biomass smoke exposure: Limitations despite the vast literature.

- Respirology. 2015 May;20(4):556-68. doi: 10.1111/resp.12515. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25808744.
- Bottai, D., Di Luca, M., Majlessi, L., Frigui, W., Simeone, R., Sayes, F., . . . Esin, S. (2012). Disruption of the ESX-5 system of Mycobacterium tuberculosis causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Mol Microbiol*, 83(6), 1195-1209. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08001.x
- Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol*. 2004 Nov;12(11):500-8. doi: 10.1016/j.tim.2004.09.007. PMID: 15488391
- Butler, R. E., Cihlarova, V., & Stewart, G. R. (2010). Effective generation of reactive oxygen species in the mycobacterial phagosome requires K⁺ efflux from the bacterium. *Cell Microbiol*, 12(8), 1186-1193. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01463.x
- Carlson AB, Kraus GP. Physiology, Cholinergic Receptors. 2022 Aug 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan—. PMID: 30252390.
- Chang MX, Xiong F, Wu XM, Hu YW. The expanding and function of NLRC3 or NLRC3-like in teleost fish: Recent advances and novel insights. *Dev Comp Immunol*. 2021 Jan;114:103859. doi: 10.1016/j.dci.2020.103859. Epub 2020 Sep 5. PMID: 32896535.
- Chavez-Galan, L., Del Carmen Arenas-Del Ángel, M., Sada-Ovalle, I., & Lascurain, R. (2009). Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por Mycobacterium tuberculosis. *Gaceta Medica De Mexico*, 145(4), 323-330. http://anmm.org.mx/GMM/2009/n4/58_vol_145_n4.pdf
- Chilukoti N, Kumar CM, Mande SC. GroEL2 of Mycobacterium tuberculosis Reveals the Importance of Structural Pliability in Chaperonin Function. *J Bacteriol*. 2015 Nov 9;198(3):486-97. doi: 10.1128/JB.00844-15. PMID: 26553853; PMCID: PMC4719451.
- Daffner SD, Waugh S, Norman TL, Mukherjee N, France JC. Effect of serum nicotine level on posterior spinal fusion in an in vivo rabbit model. *Spine J*. 2015 Jun 1;15(6):1402-8. doi: 10.1016/j.spinee.2015.02.041. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25725367.
- Echeverria-Valencia, G., Flores-Villalva, S., & Espitia, C. I. (2018). Virulence Factors and Pathogenicity of Mycobacterium. InTech. doi: 10.5772/intechopen.72027
- Estorninho, M., Smith, H., Thole, J., Harders-Westerveen, J., Kierzek, A., Butler, R. E., . . . Stewart, G. R. (2010). CigR regulation of chaperone and protease systems is essential for Mycobacterium tuberculosis parasitism of the macrophage. *Microbiology*, 156(Pt 11), 3445-3455. doi:10.1099/mic.0.042275-0
- Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020 Mar;92(1):e68. doi: 10.1002/cpcy.68. PMID: 31876974; PMCID: PMC6961134.
- Feng, J. Y., Huang, S. F., Ting, W. Y., Lee, M. C., Chen, Y. C., Lin, Y. Y., . . . Su, W. J. (2014). Impact of cigarette smoking on latent tuberculosis infection: does age matter? *Eur Respir J*, 43(2), 630-632. doi:10.1183/09031936.00118313

- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffre, A., Sabio y Garcia, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., . . . Bigi, F. (2013). Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*, 4(1), 3-66. doi:10.4161/viru.22329
- Fowler, R. T. (2007). A redetermination of the ionization constants of nicotine. *Journal of Applied Chemistry*, 4(8), 449452. doi:10.1002/jctb.501004081110.1002/jctb.5010040811
- García-Pérez BE, Mondragón-Flores R, Luna-Herrera J. Internalization of Mycobacterium tuberculosis by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microb Pathog*. 2003 Aug;35(2):49-55. doi: 10.1016/s0882-4010(03)00089-5. PMID: 12901843.
- Gorocica, Patricia, Jiménez-Martínez, María del Carmen, Garfias, Yonathan, Sada, Isabel, & Lascurain, Ricardo. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), 142-153. Recuperado em 27 de maio de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852005000200010&lng=pt&tlng=es.
- Gutsmann, T. (2016). Interaction between antimicrobial peptides and mycobacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1858(5), 1034-1043. doi:10.1016/j.bbamem.2016.01.031
- Health, O. W. (2015). Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo.
- Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Front Psychiatry*. 2013 Apr 30;4:29. doi: 10.3389/fpsy.2013.00029. PMID: 23641218; PMCID: PMC3639424.
- Henkels, K. M., Muppani, N. R., & Gomez-Cambronero, J. (2016). PLD-Specific Small-Molecule Inhibitors Decrease Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils Infiltration in Breast Tumors and Lung and Liver Metastases. *PLoS One*, 11(11), e0166553. doi:10.1371/journal.pone.0166553
- Hukkanen, J. (2005). *Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine*. *Pharmacological Reviews*, 57(1), 79–115. doi:10.1124/pr.57.1.3 doi:10.1124/pr.57.1.3
- Hu H, Wang L, Wang W, Wu G, Tao F, Xu P, Deng Z, Tang H. Regulatory Mechanism of Nicotine Degradation in *Pseudomonas putida*. *mBio*. 2019 Jun 4;10(3):e00602-19. doi: 10.1128/mBio.00602-19. PMID: 31164460; PMCID: PMC6550519.
- Jia, X., Yang, L., Dong, M., Chen, S., Lv, L., Cao, D., . . . Chen, F. (2017). The Bioinformatics Analysis of Comparative Genomics of Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC) Provides Insight into Dissimilarities between Intraspecific Groups Differing in Host Association, Virulence, and Epitope Diversity. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 88. doi:10.3389/fcimb.2017.00088
- Kearley, J., Silver, J. S., Sanden, C., Liu, Z., Berlin, A. A., White, N., . . . Humbles, A. A. (2015). Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity*, 42(3), 566-579. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.011
- Kendall SL, Withers M, Soffair CN, Moreland NJ, Gurcha S, Sidders B, Frita R, Ten Bokum A, Besra GS, Lott JS, Stoker NG. A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in Mycobacterium

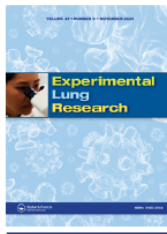
- smegmatis and Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*. 2007 Aug;65(3):684-99. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05827.x. PMID: 17635188; PMCID: PMC1995591.
- Ko, H. K., Lee, H. F., Lin, A. H., Liu, M. H., Liu, C. I., Lee, T. S., & Kou, Y. R. (2015). Regulation of Cigarette Smoke Induction of IL-8 in Macrophages by AMP-activated Protein Kinase Signaling. *J Cell Physiol*, 230(8), 1781-1793. doi:10.1002/jcp.24881
- Koch A, Mizrahi V. Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol*. 2018 Jun;26(6):555-556. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.012. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29580884.
- Kudelska MM, Lewis A, Ng CT, Doyle DA, Holden-Dye L, O'Connor VM, Walker RJ. Investigation of feeding behaviour in *C. elegans* reveals distinct pharmacological and antibacterial effects of nicotine. *Invert Neurosci*. 2018 Nov 7;18(4):14. doi: 10.1007/s10158-018-0219-1. PMID: 30406344.
- Kumar, A., Manisha, Sangha, G. K., Shrivastava, A., & Kaur, J. (2017). The immunosuppressive effects of a novel recombinant LipQ (Rv2485c) protein of Mycobacterium tuberculosis on human macrophage cell lines. *Microb Pathog*. doi:10.1016/j.micpath.2017.04.015
- Lerner, T. R., Borel, S., & Gutierrez, M. G. (2015). The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol*, 17(9), 1277-1285. doi:10.1111/cmi.12480
- Liao, S. X., Ding, T., Rao, X. M., Sun, D. S., Sun, P. P., Wang, Y. J., . . . Ou-Yang, Y. (2015). Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Med Rep*, 11(1), 219-225. doi:10.3892/mmr.2014.2759
- Liu, Q., Luo, T., Dong, X., Sun, G., Liu, Z., Gan, M., . . . Gao, Q. (2016). Genetic features of Mycobacterium tuberculosis modern Beijing sublineage. *Emerg Microbes Infect*, 5, e14. doi:10.1038/emi.2016.14
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609
- MacGurn, J. A., Raghavan, S., Stanley, S. A., & Cox, J. S. (2005). A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*, 57(6), 1653-1663. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04800.x
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., & Smith, I. (2001). The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol*, 41(2), 423-437.
- Marino, S., & Kirschner, D. E. (2004). The human immune response to Mycobacterium tuberculosis in lung and lymph node. *J Theor Biol*, 227(4), 463-486. doi:10.1016/j.jtbi.2003.11.023
- Mathers C.D, L. D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PL.S Med.*, 3(11), 442.
- McCann, J. R., McDonough, J. A., Sullivan, J. T., Felcher, M. E., & Braunstein, M. (2011). Genome-wide identification of Mycobacterium tuberculosis exported proteins with roles in intracellular growth. *J Bacteriol*, 193(4), 854-861. doi:10.1128/JB.01271-10
- Metcalfe, H. J., Lea, S., Hughes, D., Khalaf, R., Abbott-Banner, K., & Singh, D. (2014). Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic

- obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages. *Clin Exp Immunol*, 176(3), 461-472. doi:10.1111/cei.12289
- Miramontes CV, Rodríguez-Carlos A, Marin-Luévano SP, Trejo Martínez LA, de Haro Acosta J, Enciso-Moreno JA, Rivas-Santiago B. Nicotine promotes the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in epithelial cells. *Tuberculosis (Edinb)*. 2021 Mar;127:102026. doi: 10.1016/j.tube.2020.102026. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33262029.
- Montoya-Rosales A, Provvedi R, Torres-Juarez F, Enciso-Moreno JA, Hernandez-Pando R, Manganelli R, Rivas-Santiago B. *lysX* gene is differentially expressed among *Mycobacterium tuberculosis* strains with different levels of virulence. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017 Sep;106:106-117. doi: 10.1016/j.tube.2017.07.005. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28802397.
- Morales, R. R. (2009). *Desarrollo De Un Microscopio Confocal Para La Obtención De Imágenes En 3d De Dispositivos Desarrollados Con Microlitografía*. (Maestro En Ingeniería), Universidad Nacional Autónoma De México,
- Munoz-Elias, E. J., & McKinney, J. D. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med*, 11(6), 638-644. doi:10.1038/nm1252
- Ni, I., Ji, C., & Vij, N. (2015). Second-hand cigarette smoke impairs bacterial phagocytosis in macrophages by modulating CFTR dependent lipid-rafts. *PLoS One*, 10(3), e0121200. doi:10.1371/journal.pone.0121200
- Neal L. Benowitz, M.D.(1988) Pharmacology aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. 319:1.318-1.330
- Ohol, Y. M., Goetz, D. H., Chan, K., Shiloh, M. U., Craik, C. S., & Cox, J. S. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe*, 7(3), 210-220. doi:10.1016/j.chom.2010.02.006
- Pallen, M. J. (2002). The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol*, 10(5), 209-212.
- Parish, T., Smith, D. A., Roberts, G., Betts, J., & Stoker, N. G. (2003). The *senX3-regX3* two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. *Microbiology*, 149(Pt 6), 1423-1435. doi:10.1099/mic.0.26245-0
- Perez-Lago, L., Izco, S., Herranz, M., Tudo, G., Carcelen, M., Comas, I., . . . Garcia-de-Viedma, D. (2016). A novel strategy based on genomics and specific PCR reveals how a multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain became prevalent in Equatorial Guinea 15 years after its emergence. *Clin Microbiol Infect*. doi:10.1016/j.cmi.2016.10.006
- Pethe, K., Alonso, S., Biet, F., Delogu, G., Brennan, M. J., Loch, C., & Menozzi, F. D. (2001). The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature*, 412(6843), 190-194. doi:10.1038/35084083
- Qiu, F., Liang, C. L., Liu, H., Zeng, Y. Q., Hou, S., Huang, S., . . . Dai, Z. (2017). Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget*, 8(1), 268-284. doi:10.18632/oncotarget.13613

- Raynaud, C., Papavinasasundaram, K. G., Speight, R. A., Springer, B., Sander, P., Bottger, E. C., . . . Draper, P. (2002). The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, *46*(1), 191-201.
- Rengarajan J, Murphy E, Park A, Krone CL, Hett EC, Bloom BR, Glimcher LH, Rubin EJ. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2224c modulates innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 8;105(1):264-9. doi: 10.1073/pnas.0710601105. Epub 2008 Jan 2. PMID: 18172199; PMCID: PMC2224198.
- Rodriguez, G. M., & Smith, I. (2006). Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, *188*(2), 424-430. doi:10.1128/JB.188.2.424-430.2006
- Sagheddu C, Scherma M, Congiu M, Fadda P, Carta G, Banni S, Wood JT, Makriyannis A, Malamas MS, Pistis M. Inhibition of N-acylethanolamine acid amidase reduces nicotine-induced dopamine activation and reward. *Neuropharmacology*. 2019 Jan;144:327-336. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.013. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30439418.
- Salud, O. M. d. I. (2022). Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo, 2015. Retrieved from http://www.who.int/tobacco/global_report/2015/summary/es/
- Shi, W., & Zhang, Y. (2010). PhoY2 but not PhoY1 is the PhoU homologue involved in persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, *65*(6), 1237-1242. doi:10.1093/jac/dkq103
- Shpyrkov AS, Zhdanov VZ, Lazovskaia AL, Levchenko TN. Izmenenie struktury mikobakterii tuberkuleza pod deistviem kondensata tabachnogo dyma [Tobacco smoke condensate-induced structural changes in *Mycobacteria tuberculosis*]. *Probl Tuberk*. 2002;(2):39-41. Russian. PMID: 11899805.
- Siewchaisakul P, Nanthanangkul S, Santong C, Suwanrungruang K, Vatanasapt P. Survival of Cancer Patients with Co-Morbid Tuberculosis in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021 Aug 1;22(8):2701-2708. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.8.2701. PMID: 34452577; PMCID: PMC8629483
- Singh, A., Gupta, R., Vishwakarma, R. A., Narayanan, P. R., Paramasivan, C. N., Ramanathan, V. D., & Tyagi, A. K. (2005). Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in the spleens of guinea pigs. *J Bacteriol*, *187*(12), 4173-4186. doi:10.1128/JB.187.12.4173-4186.2005
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jul;16(3):463-96. doi: 10.1128/CMR.16.3.463-496.2003. PMID: 12857778; PMCID: PMC164219
- Thome, G. R., Oliveira, L. S., Schetinger, M. R., Morsch, V. M., Spanevello, R. M., Fiorenza, A. M., . . . Melazzo Mazzanti, C. (2012). Nicotine alters the ectonucleotidases activities in lymphocytes: In vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother*, *66*(3), 206-212. doi:10.1016/j.biopha.2011.09.014
- Walters, S. B., Dubnau, E., Kolesnikova, I., Laval, F., Daffe, M., & Smith, I. (2006). The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol*, *60*(2), 312-330. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05102.x

- Ward, S. K., Abomoelak, B., Hoyer, E. A., Steinberg, H., & Talaat, A. M. (2010). CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 77(5), 1096-1110. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x
- Whiting P, Lindstrom J. Purification and characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(2):595-9. doi: 10.1073/pnas.84.2.595. PMID: 3467376; PMCID: PMC304257.
- Wilson, T., de Lisle, G. W., Marcinkeviciene, J. A., Blanchard, J. S., & Collins, D. M. (1998). Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology*, 144 (Pt 10), 2687-2695. doi:10.1099/00221287-144-10-2687
- Wu Y, Ma Y, Xu T, Zhang QZ, Bai J, Wang J, Zhu T, Lou Q, Götz F, Qu D, Zheng CQ, Zhao KQ. Nicotine Enhances *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation by Altering the Bacterial Autolysis, Extracellular DNA Releasing, and Polysaccharide Intercellular Adhesin Production. *Front Microbiol*. 2018 Oct 29;9:2575. doi: 10.3389/fmicb.2018.02575. PMID: 30420846; PMCID: PMC6215848.
- Yuan, Y., Crane, D. D., Simpson, R. M., Zhu, Y. Q., Hickey, M. J., Sherman, D. R., & Barry, C. E., 3rd. (1998). The 16-kDa alpha-crystallin (*Acr*) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9578-9583.
- Zacharasiewicz, A. (2016). Maternal smoking in pregnancy and its influence on childhood asthma. *ERJ Open Res*, 2(3). doi:10.1183/23120541.00042-2016

11.0 Anexos



Experimental Lung Research



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ielu20>

Nicotine associates to intracellular *Mycobacterium tuberculosis* inducing genes related with resistance to antimicrobial peptides

Jeny de Haro-Acosta, Yolanda M. Jacobo-Delgado, Adrian Rodríguez-Carlos, Flor Torres-Juárez, Zaida Araujo, Carmen J Serrano, Irma Gonzalez-Curiel, Rogelio Hernández-Pando, Eva Salinas & Bruno Rivas-Santiago

To cite this article: Jeny de Haro-Acosta, Yolanda M. Jacobo-Delgado, Adrian Rodríguez-Carlos, Flor Torres-Juárez, Zaida Araujo, Carmen J Serrano, Irma Gonzalez-Curiel, Rogelio Hernández-Pando, Eva Salinas & Bruno Rivas-Santiago (2021): Nicotine associates to intracellular *Mycobacterium tuberculosis* inducing genes related with resistance to antimicrobial peptides, *Experimental Lung Research*, DOI: [10.1080/01902148.2021.2006829](https://doi.org/10.1080/01902148.2021.2006829)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01902148.2021.2006829>



Published online: 22 Nov 2021.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 15



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ielu20>



Nicotine associates to intracellular *Mycobacterium tuberculosis* inducing genes related with resistance to antimicrobial peptides

Jeny de Haro-Acosta^{a,b}, Yolanda M. Jacobo-Delgado^a, Adrian Rodríguez-Carlos^a, Flor Torres-Juárez^a, Zaida Araujo^c, Carmen J Serrano^a, Irma Gonzalez-Curiel^d, Rogelio Hernández-Pando^e, Eva Salinas^b and Bruno Rivas-Santiago^a

^aMedical Research Unit-Zacatecas, Mexican Institute for Social Security-IMSS, Zacatecas, Mexico; ^bLaboratory of Immunology, Department of Microbiology, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico; ^cLaboratory of Immunology of Infectious Diseases, Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, Central University of Venezuela, Caracas, Venezuela; ^dLaboratory of Immunotoxicology and Experimental Therapeutics, Post-graduate program in Sciences and Chemical Technology, Chemistry Sciences School, University Autonomous of Zacatecas, Zacatecas, Mexico; ^eLaboratory of Experimental Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador-Zubiran”, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Tobacco consumption is related to an increased risk to develop tuberculosis. Antimicrobial peptides are essential molecules in the response to *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) because of their direct antimicrobial activity. The aim of this study was to demonstrate that nicotine enters into *Mtb* infected epithelial cells and associates with the mycobacteria inducing genes related to antimicrobial peptides resistance. Epithelial cells were infected with virulent *Mtb*, afterwards cells were stimulated with nicotine. The internalization of nicotine was followed using electron and confocal microscopy. The *lysX* expression was evaluated isolating mycobacterial RNA and submitted to RT-PCR analysis. Our results indicated that nicotine promotes *Mtb* growth in a dose-dependent manner in infected cells. We also reported that nicotine induces *lysX* expression. In conclusion, nicotine associates to intracellular mycobacteria promoting intracellular survival.

ARTICLE HISTORY

Received 2 November 2021
 Accepted 11 November 2021





KEYWORDS

Nicotine;
Mycobacterium tuberculosis;
 antimicrobial peptides;
lysX

Introduction

In the last decades tobacco consumption has been associated with an increased risk for developing tuberculosis (Tb) up to 2 to 4 times.^{1,2} Indeed, more than 20% of Tb disease may be attributable to smoking. Among individuals without a history of Tb, the risk of death due this infectious disease is nine times higher for smokers than for never-smokers. When smokers quit smoking, the risk of death due to Tb drops significantly, which indicates that smoking cessation is an important factor in reducing Tb-related mortality.³ Cigarette smoke has 4,500 different compounds, nonetheless, the nicotine is the main compound associated with immunoregulation.^{4,5} Indeed, previous studies by our group have shown that nicotine

decreases the expression of the TLR2, TLR4, NOD2 receptors and the production of keystone molecules for the immunity versus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) such as surfactant proteins, cytokines, and chemokines.⁶ It is evident that the nicotine affects the immunity against *Mtb*, nonetheless scarce information has been generated regarding the effect that nicotine might have over *Mtb*. The antimicrobial peptides (AMPs) are essential to mount an appropriate immunity versus *Mtb* since these peptides have direct antimicrobial activity against the bacilli and possess a potent immunomodulatory activity (reviewed elsewhere⁷) which in fact is indispensable to eliminate mycobacteria. There are several virulence-related genes in *Mtb* that have been associated with severe progression of Tb such as

CONTACT Bruno Rivas-Santiago  rondo_vm@yahoo.com  Medical Research Unit-Zacatecas, Mexican Institute for Social Security-IMSS, Interior de la Alameda 45, colonia centro, Zacatecas 98000, Mexico; Eva Salinas  emsalin@correo.uaa.mx  Laboratory of Immunology, Department of Microbiology, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Av. Universidad 940, Colonia Ciudad Universitaria, Aguascalientes 20100, Mexico.
 © 2021 Taylor & Francis Group, LLC

lysX (rv1640c), which encodes a membrane protein that catalyzes the synthesis of lysyl-phosphatidylglycerol (L-PG) by transferring lysine residues to phosphatidylglycerol (PG) to generate L-PG.⁸ This molecule reduces the negative charge of the bacterial cell membrane increasing resistance to AMPs by electrostatic repulsion, indeed the *lysX* produced by the bacterial cell is an important variable for the modulation of *Mtb* virulence.⁹ In the present study we determined whether nicotine interacts with intracellular *Mtb* and whether this interaction promotes the *lysX* expression.

Material and methods

Mtb and cell culture

Mtb was grown as previously described.¹⁰ Briefly, mycobacteria were grown in 25-cm² in plastic culture flasks with 15 mL of Middlebrook 7H9 medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 10% oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment medium; BBL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), 0.5% Tween 80 and 0.2% glycerol and incubated at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere until the bacteria reached the logarithmic phase of growth, which was determined by daily measurements at the optical density of 600 nm (OD₆₀₀). Once raised the log phase, the cultures were divided into working aliquots of 2 × 10⁸ colony-forming units (CFU)/mL and frozen at -80 °C until use. The A549 cell line (A549 ATCC[®] CCL185[™] Manassas, VA, USA), further referred as type II pneumocytes was grown in 75-cm² culture flasks (Thermo Scientific, MA, USA) with Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, Biowest, Nuaille, FR) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest, Nuaille, FR) and 100 µg/mL of antibiotic (penicillin 100X, Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ until they reached a confluence between 80 and 85%, thereafter were seeded in 24-well dishes plates (Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) at a concentration of 5 × 10⁵ cells/mL with 1% FBS and maintained for 24 h in the presence of 5% CO₂ at 37 °C until infection with *Mtb*.

Infection, stimulus and CFU counts

For the infection, the type II pneumocytes were seeded in 24-well plates (Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) with 1% FBS and maintained with 5% CO₂ at 37 °C. Subsequently, cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 5. Cells were infected and after 2 h, the non-internalized mycobacteria were removed with amikacin (50 µg/mL)-supplemented phosphate-buffered saline (PBS) washes. In order to confirm the extracellular mycobacteria was discarded, supernatants were seeded onto 7H10 agar and incubated for 21 days. To determine the index and percentage of internalization, the cells were cultured and adhered into 4 well-chamber slides (Costar, Corning, NY) and after the infection, cells were fixed and stained with the conventional Ziehl-Neelsen method.¹¹ Then, at least 300 cells were counted and those cells with at least one intracellular mycobacterium were counted as positive. The internalization index was calculated as the number of internalized bacilli per infected cell.

Then, cells were stimulated with nicotine hydrogen tartrate salt (dissolved in water, Sigma Aldrich, Missouri, USA) using 10 µM and 30 µM, since these are the average plasma concentrations found in smokers.¹² As negative control of *Mtb* growth, cells were treated with streptomycin (1 µg/mL). To evaluate whether nicotine has any effect on the growth of intracellular *Mtb*, infected cells were lysed with SDS 0.1% (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA) for 10 min at room temperature and the reaction was then stopped with 20% bovine serum albumin (BSA). Serial dilutions (1:10) were then prepared and plated (10 µL each) in triplicate onto 7H10 agar plates supplemented with OADC (Difco, Detroit, MI, USA). The plates were incubated at 37 °C for 21 days and after that time CFUs/mL were counted. To determinate cellular viability after the infection and stimuli, a cell viability assay was performed, using Guava ViaCount Assay (Millipore, Billerica, MA, USA), showing at least 95% of viability.

***Mtb* RNA extraction, cDNA synthesis, and gene expression analysis by real-time qPCR**

After stimulation, mycobacteria were lysed with Trizol reagent (Sigma, Life Science, St. Louis, MO, USA). RNA extraction and DNA synthesis were carried out as described previously.⁹ The real-time qPCR was performed using Ssofast™ EvaGreen® Supermix (BIO-RAD, USA) in thermocycler AriaMx Real-Time (Agilent, California, USA) PCR System, using the next sequence for *lysX* (*Rv1640*) F – 5′ gga act cca ccg ttg atc gt 3′ and R – 5′ caa cgg tcg caa aca ctt ac 3′. The following sequences of 16srRNA gene F – 5′ gct ggt ggg gct tat ggt 3′ R – 5′ tgt gca cca ctt cgg tga 3′ were used as reference gene. The analysis of relative gene expression was performed using the Livak method.¹³ This method is based on the expression levels of a target gene vs. a reference gene (16S gene) comparing between stimulated and not stimulated conditions. The comparative threshold cycle method was used to assess relative changes in mRNA levels between untreated bacteria (control) and presented in fold changes. Thus, untreated bacteria were uniformly normalized to a value of 1.

Confocal microscopy analysis

Confocal microscopy was carried out as described previously.¹⁴ Briefly, 1.5×10^5 type II pneumocytes were seeded in 4 well/chamber slides (Nunc Inc, Naperville, IL). After 18h of adherence, cells were infected as described above with PKH67-stained *Mtb* (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for 3h to evaluate the co-localization of *Mtb* and nicotine. Subsequently, cells were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde and permeabilized (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Then, cells were incubated with BSA 3% for 30 min at room temperature to block the unspecific binding and incubated with anti-nicotine antibody (1:100) (MyBioSource, Vancouver, Canada) for 2h at room temperature. Later, cells were incubated with anti-goat-IgG-Alexa Fluor 532 antibody (1:500) (Santacruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and incubated for 60 min at room

temperature. For nuclei staining, the DAQ7 was used at 5 μM (Biostatus, Shepshed, UK) for 20 min at 4°C. Finally, cell preparations were mounted with vectashield hard (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed with the Leica confocal microscopy DM2500 using the Leica software LASX (Leica, Microsystems, Mannheim, Germany).

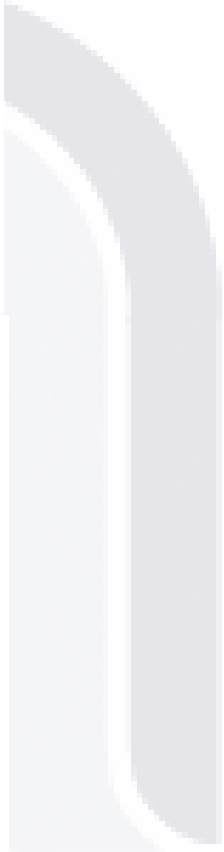
Detection of nicotine by immuno-electron microscopy

Type II pneumocytes were infected with *Mtb* as described above. After 18 h, infected cells were fixed within 4% paraformaldehyde and dissolved in 0.2M Sörensen buffer. Afterward, free aldehyde groups were blocked with 0.5M ammonium chloride in PBS for 1h. Fixed cells were then dehydrated in graded ethyl alcohols and embedded in LR-White hydrosoluble resin (London Resin Co., Hampshire, UK). Thin sections from 70 to 90 nm were placed on nickel grids. The grids were incubated overnight at 4°C with specific anti-nicotine antibody (Santa Cruz biotechnology, Dallas TX, USA) diluted 1:200 in PBS with 1% BSA and 0.5% Tween-20. After rinsing with PBS, the grids were incubated

for 1h at room temperature with donkey anti-goat IgG (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) conjugated to 5 nm gold particles (Sigma) diluted 1:20 in PBS. The grids were stained with uranium salts (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) and examined with a M-10 Zeiss electron microscope (Karl Zeiss, Jena Germany).

Statistical analyses

The statistical analyses were carried out using the GraphPad Prisms software version 6.0 for Mac (GraphPad Software version 6, San Diego, CA, USA). Normal distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test for each data set. Two group comparison U-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis analysis was carried out to identify differences among the groups. Differences among groups were considered statistically significant when $P < 0.05$.



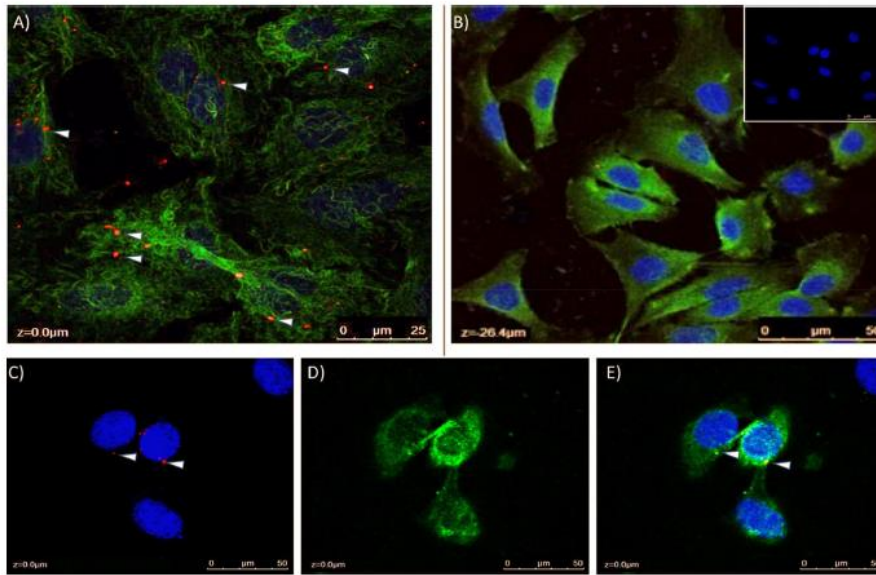


Figure 1. Nicotine diffuses in cell cytoplasm and associates with intracellular *Mtb*. Type II pneumocytes were infected with *Mtb* at a MOI of 5 for 3 h and submitted for confocal microscopy analysis. Panel A shows intracellular *Mtb* in red (pointed by white arrowheads) and tubulin (green). Subsequently, 10mM nicotine-treated cells were immunostained with anti-nicotine antibody and with anti-mouse-IgG-Alexa-Fluor 532 as second antibody. Panel B shows that nicotine diffuses in the intracellular space uniformly (green), and intracellular stain is absent in non-nicotine-treated cells (inset). Panel C shows nuclear staining (blue) and *Mtb* (red, white arrowheads). Panel D shows same cells but immunostained for nicotine (green), and panel E shows the merged microphotographs, showing colocalization of nicotine and *Mtb* (pointed by white arrowheads). Microphotographs are representative of at least three independent experiments (X400).

Results

Nicotine associates with intracellular *Mtb*

In order to determine whether nicotine is capable to get into the epithelial cells and associates with *Mtb*, we used microscopy procedures. First, infected cells were submitted to Ziehl-Neelsen staining which showed that *Mtb* entered into the cells. Furthermore, cells were infected with stained *Mtb* and anti-tubulin immunostaining confirming the intracellular location of *Mtb* (Figure 1A,C). To assess whether nicotine enters and diffuses into the cells, epithelial cells were treated with nicotine and immunostained as described above. Results showed that nicotine uniformly diffuses in epithelial cells (Figure 1B,D) and associates with intracellular mycobacteria (Figure 1E). To confirm that this phenomenon could be observed at the sub-cellular level, infected cells were submitted for

immuno-electron-microscopy studies and results showed that immunostained nicotine can be observed diffused in the cytoplasm (Figure 2A,B) and associated to the *Mtb* (Figure 2B,C). Uninfected control cells or *Mtb*-infected cells that were incubated without the primary anti-nicotine antibody did not have any immunolabeling for nicotine.

Nicotine association to intracellular mycobacteria promotes *lysX* overexpression and increases bacilli burden.

Once we determined that nicotine associates with intracellular *Mtb*, then we evaluated whether this interaction led to an increment in *lysX* expression. Our results showed that nicotine induced an evident overexpression of this gene at 1, 2, 4, 6, 8, and 18 h post stimulation (Figure 3A). As depicted in Figure 3B, the increment of *lysX* expression correlated with an increment in bacilli burden.

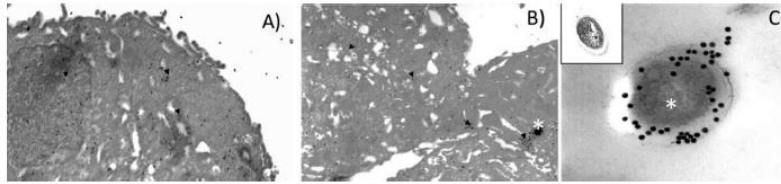


Figure 2. Subcellular association of nicotine with *Mtb*. Representative immunoelectron microscopy micrographs showing that nicotine labeled with 20nm gold particles (black dots pointed by black arrows heads) diffuses in the cell cytoplasm (Panel A X6,000 and B X8,000) and interacts with intracellular mycobacteria (asterisk in Panel B and Panel C, X50,000). *Mtb*-infected cells that were incubated without the primary anti-nicotine antibody did not have any immunolabeling for nicotine (inset).

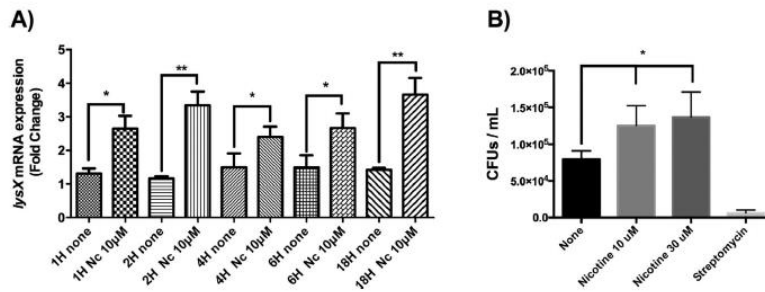


Figure 3. Nicotine promotes the expression of *lysX* and is reflected by an increment of bacilli burden. The expression of *lysX* was evaluated in intracellular *Mtb* treated with 10µM of nicotine (Nc) and compared with its respective non-treated condition for several time-points (Panel A). Subsequently, CFUs were evaluated after 24 h of 10µM and 30µM nicotine treatment (Panel B). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Data are presented as mean ± SD. n=8.

Discussion

The effect of nicotine on host cells has been extensively described, including those related to the innate immunity either in phagocytes or epithelial cells.⁶ However, nicotine does not only enter in close contact with host cells but likely with intracellular mycobacteria and might activates genetic mechanisms involved with virulence. *Mtb* has the potential to remain dormant in several sort of cells, until some external stimulus induces the bacilli reactivation leading to active Tb.¹⁵ Previous studies have demonstrated that a possible mechanism used by epithelial cells to content *Mtb* into the dormant stage are the AMPs.¹⁶ Following this rationale, we first evaluated whether nicotine could enter into the cells and diffused in the cytoplasm. Our results showed

that nicotine entered into the intracellular milieu and associated with intracellular *Mtb*. The intracellular diffusion of nicotine in the cytoplasm could be related to the activation of several intracellular pathways associated with the impairment of the cell immune response; for instance, *Mtb* infected-mice exposed to nicotine showed worse pulmonary lesion compared to no-exposed mice.¹⁷ Furthermore, several studies have reported that nicotine downregulates TLR2 and TLR4 expression and activates MyD88 leading to a proinflammatory profile.¹⁸ Nicotine has also been related to the downregulation of key molecules involved in the elimination of *Mtb*.^{4,6,19-21} To assess whether nicotine was really associating with intracellular *Mtb*; ultrastructural studies were carried out and showed that nicotine interacts with *Mtb*. Certainly, we do not know whether this interaction is

through a specific receptor, but previous studies have revealed that *Mtb* is capable of producing nanomolar concentrations of acetylcholine (ACh) in liquid culture. In addition, the administration of ACh and nicotinic antagonists to *Mtb* cultures induced or inhibited bacterial proliferation, respectively. These results suggest that *Mtb* possesses a cholinergic system and upregulates non-neuronal cholinergic system in lung,²² interestingly, this system could be activated by nicotine in cigarette smoke.

Once we demonstrated that nicotine is capable to disseminate in the intracellular milieu and interacts with intracellular *Mtb*, next, we determined whether this interaction led to the expression of *lysX* gene. *lysX* expression is essential for the resistance to AMPs.²³ Indeed, strains with higher *lysX* expression showed increased levels of intracellular survival and induced more severe lesion related to pneumonia; therefore, *lysX* is an important virulence factor for *Mtb* that could be regulated by a mechanism that depends on the AMPs concentration.⁹ Interestingly, in the present study nicotine induced the expression of *lysX* at different exposure times. Although we did not explore further than 18 h, it is likely that the expression could last until the nicotine concentration decreased because of the cell metabolism. The increment in the *lysX* expression would lead the resistance to AMPs promoting intracellular growth. Interestingly, when we stimulated *Mtb* extracellularly with nicotine, the *lysX* expression increased significantly though in lower degree than the expression observed in intracellular *Mtb* (data not shown), which could be due *lysX* is partially induced by the presence of AMPs.⁹ Thus, we also determined whether intracellular *Mtb* growth increased in the presence of nicotine and our results showed that nicotine promoted the bacillary growth in the infected cells in a dose dependent-manner. Although lung epithelial cells possess several mechanism to contain *Mtb*, such as the production of IL-26,²⁴ production of nitric oxide²⁵ and autophagy,²⁶ the most described in the last years has been the mechanism related with AMPs. Therefore, nicotine might be modulating not only the AMP-related mechanisms but other antibacterial mechanisms in epithelial cells. Further investigation is needed to elucidate this issue.

Conclusions

In conclusion, nicotine promotes the *lysX* expression in *Mtb* and increases the intracellular bacillary loads in lung epithelial cells. Whether this phenomenon could be reproduced in other cells or whether nicotine induces other virulence factors in *Mtb* or impairs other immune-related mechanisms to eliminate the mycobacteria, remains to be further elucidated.

Disclosure statement

The authors have no conflict of interest

Funding

JdHA has a scholarship from CONACyT CVU764945/G603953. This study was supported by the Mexican Institute for Social Security FIS/IMSS/PROT/PRI0/18/064.

References

1. Davies PDO, Yew WW, Ganguly D, et al. Smoking and tuberculosis: the epidemiological association and immunopathogenesis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(4):291–298. doi:10.1016/j.trstmh.2005.06.034.
2. Loddenkemper R, Brönnecke M, Castell S, Diel R. Tuberculosis and tobacco smoking. *Pneumologie.* 2016;70(1):17–22. doi:10.1055/s-0041-109601.
3. Wen CP, Chan TC, Chan HT, Tsai MK, Cheng TY, Tsai SP. The reduction of tuberculosis risks by smoking cessation. *BMC Infect Dis.* 2010;10(156):1–9.
4. Bai X, Stitzel JA, Bai A, et al. Nicotine impairs macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;57(3):324–333. doi:10.1165/rcmb.2016-0270OC.
5. Vassallo R, Kroening PR, Parambil J, Kita H. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. *Mol Immunol.* 2008;45(12):3321–3329. PMC2857673
6. Valdez-Miramontes CE, Trejo Martinez LA, Torres-Juarez F, et al. Nicotine modulates molecules of the innate immune response in epithelial cells and macrophages during infection with *M. tuberculosis*. *Clin Exp Immunol.* 2020;199(2):230–243.
7. Rivas-Santiago B, Torres-Juarez F. Antimicrobial peptides for the treatment of pulmonary tuberculosis, allies or foes? *Curr Pharm Des.* 2018;24(10):1138–1147. doi:10.2174/1381612824666180327162357.
8. Samant S, Hsu FF, Neyfakh AA, Lee H. The *Bacillus anthracis* protein MprF is required for synthesis of lysylphosphatidylglycerols and for resistance to cationic antimicrobial peptides. *J Bacteriol.* 2009;191(4):1311–1319.

9. Montoya-Rosales A, Proveddi R, Torres-Juarez F, et al. lysX gene is differentially expressed among Mycobacterium tuberculosis strains with different levels of virulence. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017;106:106–117. doi:10.1016/j.tube.2017.07.005.
10. Torres-Juarez F, Cardenas-Vargas A, Montoya-Rosales A, et al. LL-37 immunomodulatory activity during Mycobacterium tuberculosis infection in macrophages. *Infect Immun*. 2015;83(12):4495–4503.
11. Castaneda-Delgado J, Hernandez-Pando R, Serrano CJ, et al. Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(3):542–550. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04199.x.
12. Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J*. 1980;280(6219):972–976. PMC1601132 doi:10.1136/bmj.280.6219.972.
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
14. Torres-Juarez F, Touqui L, Leon-Contreras J, et al. RNase 7 but not psoriasin nor sPLA2-IIA associates with Mycobacterium tuberculosis during airway epithelial cell infection. *Pathog Dis*. 2018;76(2):1–8.
15. Hernandez-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, et al. Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*. 2000;356(9248):2133–2138. doi:10.1016/s0140-6736(00)03493-0.
16. Rivas-Santiago B, Contreras JC, Sada E, Hernandez-Pando R. The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2008;67(5):448–452. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02088.x.
17. Shang S, Ordway D, Henao-Tamayo M, et al. Cigarette smoke increases susceptibility to tuberculosis—evidence from in vivo and in vitro models. *J Infect Dis*. 2011;203(9):1240–1248.
18. AlQasrawi D, Naser S. Nicotine modulates MyD88-dependent signaling pathway in macrophages during mycobacterial infection. *Microorganisms*. 2020;8(11):1804. doi:10.3390/microorganisms8111804.
19. Miramontes CV, Rodriguez-Carlos A, Marin-Luevano SP, et al. Nicotine promotes the intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in epithelial cells. *Tuberculosis (Edinb)*. 2021;127:102026.
20. AlQasrawi D, Naser SA. Nicotine modulates MyD88-dependent signaling pathway in macrophages during mycobacterial infection. *Microorganisms*. 2020;8(11):1840–1819.
21. Kulkarni R, Jeyaseelan S. Aiding and abetting the enemy: nicotine impairs the macrophage defense against Mtb. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;57(3):263–264.
22. Islas-Weinstein L, Marquina-Castillo B, Mata-Espinosa D, et al. The cholinergic system contributes to the immunopathological progression of experimental pulmonary tuberculosis. *Front Immunol*. 2020;11:581911. doi:10.3389/fimmu.2020.581911.
23. Maloney E, Stankowska D, Zhang J, et al. The two-domain LysX protein of Mycobacterium tuberculosis is required for production of lysinylated phosphatidylglycerol and resistance to cationic antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*. 2009;5(7):e1000534. doi:10.1371/journal.ppat.1000534.
24. Hawerkamp HC, van Geelen L, Korte J, et al. Interleukin-26 activates macrophages and facilitates killing of Mycobacterium tuberculosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):17178. doi:10.1038/s41598-020-73989-y.
25. Rodrigues TS, Alvarez ARP, Gembre AF, et al. Mycobacterium tuberculosis-infected alveolar epithelial cells modulate dendritic cell function through the HIF-1α-NOS2 axis. *J Leukoc Biol*. 2020;108(4):1225–1238. doi:10.1002/JLB.3MA0520-113R.
26. Guo XG, Ji TX, Xia Y, Ma YY. Autophagy protects type II alveolar epithelial cells from Mycobacterium tuberculosis infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(2):308–313. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.111.