



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

**La Participación del Sistema Colinérgico
en un Modelo Murino de
Tuberculosis Pulmonar Experimental**

T E S I S

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

León David Islas Weinstein

Director de Tesis:

ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
Facultad de Medicina

Comité tutor

RICARDO LASCURAIN LEDESMA
Facultad de Medicina

EDDA LYDIA SCIUTTO

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México, Septiembre de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en la *Sección de Patología Experimental* del *Departamento de Anatomía Patológica* del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) bajo la tutoría del **Dr. Rogelio Hernández Pando** y el comité tutorial integrado por el **Dr. Ricardo Lascurain Ledesma** y la **Dra. Edda Lydia Sciutto**. El desarrollo de todos los experimentos fue llevado a cabo en instalaciones de Bioseguridad Nivel III (BSLIII) pertenecientes al laboratorio de Patología Experimental con el apoyo de los doctores Jorge Barrios Payán, Brenda Marquina Castillo y Dulce Mata Espinosa. Durante los estudios de doctorado, el autor de la tesis recibió generosos apoyos del programa de **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, de la UNAM. Además, el autor contó con una beca del CONACYT para estudios de posgrado.

DEDICATORIAS

A ELY

A MIS PAPÁS POR SUS ESFUERZOS, CONSEJOS, EJEMPLO Y APOYO INCONDICIONAL Y SOBRE TODO POR CREER EN MÍ.

A MI HERMANA Y A JAN POR EJEMPLO ACADEMICO

A MIS ABUELOS POR APOYO INCONDICIONAL, LOS FALLECIDOS TAMBIÉN

A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Rogelio Hernández-Pando y a todos los miembros de su laboratorio por su asesoría y confianza.

A MIS AMIGOS DE NUTRICIÓN DE LA UNAM POR COMPRENSIÓN ACADÉMICA EN MOMENTOS DE DESESPERACIÓN gran apoyo, consejos y experiencias.

Índice General

| | |
|--|------|
| Índice de Figuras | VI |
| Índice de Tablas | VIII |
| Abreviaturas | IX |
| 1. Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| 2. Introducción | 4 |
| 3. Marco teórico | 8 |
| 3.1 | 9 |
| TuberculosisTB..... | |
| 3.1.0 Microbiología..... | 9 |
| 3.1.1 Epidemiología..... | 11 |
| 3.1.2 Patogénesis..... | 12 |
| 3.1.3.1 Respuesta Innata..... | 14 |
| 3.1.3.2 Respuesta Adaptativa..... | 16 |
| 3.1.3.3 Granuloma..... | 18 |
| 3.1.3.4 Neumonía y Fibrosis..... | 20 |
| 3.2 Alteraciones NIE..... | 22 |
| 3.3.2 Receptores de ACh..... | 29 |
| 3.3.3 Inmunomodulación por ACh..... | 31 |
| 4. Justificación | 34 |
| 5. Planteamiento del problema | 36 |
| 5. Hipótesis | 39 |
| 6. Objetivos | 41 |
| 7. Métodos | 43 |
| Experimentos <i>in vivo</i> | 44 |
| Experimentos <i>in vitro</i> | 52 |

| | |
|--|-----|
| 8. Resultados | 61 |
| Respuesta colinérgica en el pulmón infectado..... | 62 |
| Efecto de la manipulación farmacológica del sistema colinérgico en el curso y la progresión de la TB pulmonar..... | 67 |
| Expresión y Manipulación del Sistema Colinérgico en una Línea Celular de Macrófagos Alveolares Murinos..... | 78 |
| Expresión y Manipulación del Sistema Colinérgico en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 81 |
| 9. Discusión y conclusiones | 88 |
| 11. Referencias Bibliográficas | 102 |
| 12. Apéndices | 125 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Complejos moleculares de importancia en la relación hospedero-parásito..... | 7 |
| Figura 2. Esquema General de la Respuesta Inmunológica en la Tuberculosis Pulmonar..... | 22 |
| Figura 3. Estructura química de acetilcolina..... | 38 |
| Figura 4. Estructura y cascada de señalización intracelular de los receptores de ACh..... | 30 |
| Figura 5. Modelo experimental de TB pulmonar..... | 38 |
| Figura 6. Inducción de la tuberculosis pulmonar experimental..... | 45 |
| Figura 7. Representaciones esquemáticas del modelo experimental y la terapia con antagonistas nicotínicos..... | 49 |
| Figura 8. Reacción esquemática de la conversión de MTS a Formazán..... | 53 |
| Figura 9. Metodología para diferenciar monocitos humanos hacia distintos subtipos de macrófagos..... | 57 |
| Figura 10. Cinética de expresión de acetilcolina, la enzima colina acetiltransferasa y de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico en pulmón durante el curso de la tuberculosis pulmonar..... | 65 |
| Figura 11. Cinética de expresión pulmonar de la enzima colina acetiltransferasa y de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico en ratones no infectados..... | 65 |
| Figura 12. El tratamiento con antagonistas nicotínicos no reduce el porcentaje de inflamación pulmonar..... | 68 |
| Figura 13. La administración de dihidro-beta-eritroidina durante la fase progresiva de la tuberculosis pulmonar experimental aumenta la transcripción los mediadores proinflamatorios pulmonares..... | 70 |
| Figura 14. El tratamiento con antagonistas nicotínicos durante la fase progresiva de la enfermedad no afecta la sobrevida en el modelo experimental..... | 72 |

- Figura 15. La administración de los antagonistas nicotínicos sinergiza con la terapia de antibióticos y acelera la reducción en la carga bacilar y la neumonía..74
- Figura 16. *Mycobacterium tuberculosis* induce la producción de diversas concentraciones de acetilcolina durante la infección de macrófagos alveolares murinos de la línea celular MH-S.....77
- Figura 17. La subunidad $\alpha 7$ nAChR es expresada de forma diferencial por distintos subtipos de macrófagos y la concentración de ACh administrada a macrófagos del subtipo M1 expuestos a *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* es proporcional a la inhibición en la producción del TNF- α78
- Figura 18. *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* produce diferentes concentraciones de acetilcolina (ACh) durante su curva de crecimiento.....82
- Figura 19. El crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* es estimulado por la administración de ACh y revertido por la administración de antagonistas nicotínicos.....83

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Secuencias sentido y antisentido de los iniciadores utilizados para los análisis de PCR cuantitativo en tiempo real..... | 31 |
|--|----|

Abreviaturas

| | |
|-------|-----------------------------------|
| ACh | Acetilcolina |
| CarAT | Carnitina Acetiltransferasa |
| ChAT | Colina Acetiltransferasa |
| mAChR | Receptor Muscarínico |
| Mtb | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| nAChR | Receptor Nicotínico |
| TB | Tuberculosis |

1. Resumen

El sistema colinérgico es un sistema bioquímico evolutivamente antiguo presente en organismos unicelulares y multicelulares. Este sistema controla la producción de acetilcolina (ACh) así como la estimulación de los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). En organismos multicelulares, el sistema colinérgico coordina una multitud de funciones celulares y regula la respuesta inmune generada durante el curso de una infección. La tuberculosis (TB), una infección bacteriana crónica que afecta principalmente a los pulmones, es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y actualmente es considerada una epidemia mundial. Sin embargo, la expresión del sistema colinérgico durante la TB pulmonar y en su agente causal no ha sido reportada.

Por lo tanto, en esta tesis se demuestra la participación del sistema colinérgico en la progresión inmunopatológica de esta enfermedad. En cultivos de macrófagos alveolares murinos se demuestra que las cepas virulentas de *Mtb* inducen una mayor secreción de ACh y que la estimulación colinérgica favorece la supresión de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citocina protectora crucial. Por otra parte, se empleó un modelo murino de TB pulmonar para cuantificar ACh pulmonar mediante cromatografía líquida de alta eficiencia e inmunohistoquímica del tejido pulmonar para determinar la expresión celular de diversos componentes del sistema colinérgico. La ACh pulmonar se eleva durante la etapa temprana de la enfermedad y coincide con la expresión de su enzima sintetizadora, la colina-acetiltransferasa (ChAT) en células epiteliales pulmonares. Durante la fase progresiva de la enfermedad, ocurre una segunda elevación en la producción de ACh pulmonar, así como en la expresión de la enzima ChAT y el $\alpha 7$ nAChR en células inmunológicas pulmonares. Asimismo, la administración de antagonistas nicotínicos redujo la carga bacteriana pulmonar y aumentó la transcripción de citocinas pro-inflamatorias en ratones infectados con una cepa drogo-sensible. La administración de antagonistas de los nAChRs también tuvo un efecto sinérgico con la antibioticoterapia de segunda línea en ratones infectados con una cepa multidrogoresistente (MDR) e importantemente lograron

reducir la inflamación pulmonar. Finalmente, se demuestra la producción de ACh por *Mtb*, así como el incremento en el crecimiento bacteriano posterior a la adición de concentraciones nanomolares de ACh y un efecto bactericida por los antagonistas nicotínicos.

En resumen, el sistema colinérgico está presente en *Mtb* y su expresión se ve incrementada en células pulmonares no neuronales durante la infección. La sobreexpresión del sistema colinérgico no neuronal durante la TB pulmonar parece ser una estrategia empleada por el huésped para regular la inflamación local. Sin embargo, esta estrategia falla al alterar la respuesta inmune protectora del pulmón, favoreciendo el crecimiento bacteriano y la progresión de la enfermedad. Importantly, el sistema colinérgico podría representar un blanco terapéutico en esta enfermedad.

Abstract

The cholinergic system is an evolutionary ancient biochemical system present in unicellular and multicellular organisms including bacteria and mammals. This system controls the production of acetylcholine (ACh) as well as the stimulation of nicotinic (nAChR) and muscarinic (mAChR) ACh receptors. In eukaryotes, the cholinergic system regulates a plethora of cellular functions including the immune response during infection. Tuberculosis (TB), a chronic bacterial infection which mainly affects the lungs, is caused by the bacilli *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and currently is considered a global epidemic. The expression of the cholinergic system during pulmonary TB and in its causative agent however, has not been reported.

Therefore, in this thesis, we demonstrate the involvement of the cholinergic system in the immunopathological progression of pulmonary TB. Virulent strains of *Mtb* induced increased ACh secretion in alveolar macrophage cultures, and cholinergic stimulation favored the suppression of the production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), a crucial protective cytokine. Furthermore, using a BALB/c mouse model of pulmonary *Mtb* infection, ACh was quantified using high performance liquid chromatography and immunohistochemistry of lung tissue was performed to determine the cellular expression of cholinergic system components. Our results show that lung ACh is elevated during early

disease and coincides with the expression of its synthesizing enzyme, choline acetyltransferase (ChAT) in lung epithelial cells. During late disease, a second elevation of pulmonary ACh overlapped with ChAT and $\alpha 7$ nAChR expression in lung immune cells. Moreover, the administration of nAChR antagonists reduced lung bacterial burden and increased pro-inflammatory cytokines in mice infected with a drug-sensible strain. In addition, nAChR antagonists synergized with antibiotic therapy in multidrug-resistant (MDR) infection and reduced pulmonary inflammation. Finally, we showed ACh production by *Mtb* and enhancement of its growth after exposure to nanomolar concentrations of ACh. On the other hand, nAChR antagonists demonstrated bactericidal activity.

In summary, the cholinergic system is present in *Mtb* and is upregulated in non-neuronal lung cells during infection. Overexpression of the non-neuronal cholinergic system during pulmonary TB appears to be a strategy employed by the host to regulate local inflammation. This strategy backfires however, because it alters the pulmonary protective immune response favoring bacterial growth and disease progression. Importantly, the cholinergic system might be a potential therapeutic target for this disease.

2.Introducción

2.1 La Biología Integrativa

La homeostasis es un proceso constante en los organismos vivos en el cual se generan cambios energéticos para mantener una condición interna estable y en equilibrio dinámico con los cambios presentados en el ambiente externo para favorecer su supervivencia. Los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico ayudan a regular el estado de homeostasis en organismos vertebrados por medio de una red neuroinmunoendocrinológica (NIE) (Figura 1A). Bajo el modelo de la red NIE, se considera que existe una interacción tripartita entre estos sistemas, en la cual los ligandos neuroinmunoendócrinos regulan las funciones del sistema inmunológico y viceversa.

Previamente, se consideraba que la mayoría de los sistemas fisiológicos, incluyendo el sistema nervioso y el sistema inmunológico, poseían elementos bioquímicos distintivos (ligandos, receptores, y enzimas) exclusivos de los componentes celulares que los conforman y que no compartían estos elementos con otros sistemas. Sin embargo, con el advenimiento de la biología integrativa, una de las áreas de investigación que actualmente disponen de un mayor crecimiento dentro del campo de la investigación biomédica, se comienza a reconocer que elementos bioquímicos “tradicionalmente distintivos” de un sistema fisiológico pueden ser expresados, si bien en menor medida, por otros sistemas fisiológicos. Por ejemplo, las neuronas y glándulas endócrinas producen y tienen receptores para citocinas y las células inmunológicas producen y tienen receptores para hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos. Es importante poner en contexto para esta tesis, que a principios del siglo XIX Sir Henry Dale aisló ACh a partir del bazo, un órgano inmunológico y que fue hasta finales del siglo XX que se descubrió que las células inmunológicas poseían receptores colinérgicos y tenían la capacidad de producir ACh.

2.2 La Teoría de la Unificación Microbiana

La teoría de la unificación fue propuesta en 1985 por Roth y colaboradores y expone que los neuroquímicos (hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores), moléculas inmunológicas y sus receptores provienen de moléculas que originaron en bacterias y otros microorganismos hace billones de años (Figura 1B). Por lo tanto, los orígenes de la red NIE podrían estar fundamentados en un lenguaje bioquímico iniciado en microbios. Crucialmente, microorganismos patógenos podrían tener la capacidad de emplear este lenguaje bioquímico para adaptarse y manipular la red NIE durante el curso de una infección, especialmente durante infecciones prolongadas, como en el caso de la TB pulmonar, que ha sido asociada no solamente con la disfunción inmunológica sino también con la disfunción de la respuesta neuroendócrina del hospedero. Además, los microbios también son capaces de producir los mismos neuroquímicos presentes en la red NIE y poseen receptores ancestrales para ellos. Interesantemente, la primera observación en la que un neuroquímico fue aislado a partir de un microorganismo, fue cuando Sir Arthur Ewins aisló ACh a partir del hongo parasítico *Claviceps purpúrea* a principios del siglo XX.

En esta tesis se expone evidencia que sustenta la participación del sistema colinérgico no neuronal pulmonar y su papel patogénico en la progresión de la TB pulmonar. El sistema colinérgico se encarga de la síntesis, efectos y degradación de la ACh, que ha sido catalogada como el ‘citotransmisor universal’. En la visión de este trabajo se enfatiza el enfoque de la biología integrativa para explicar como el sistema colinérgico pulmonar se potencia durante la progresión de la TB pulmonar con la intención de favorecer la homeostasis pulmonar pero termina por favorecer la progresión de la enfermedad. Además, se aborda la perspectiva de la teoría de la unificación microbiana, al

demostrar que el bacilo es capaz de producir ACh e inducir la potenciación del sistema colinérgico para modular la respuesta inmune y favorecer la progresión de la infección.

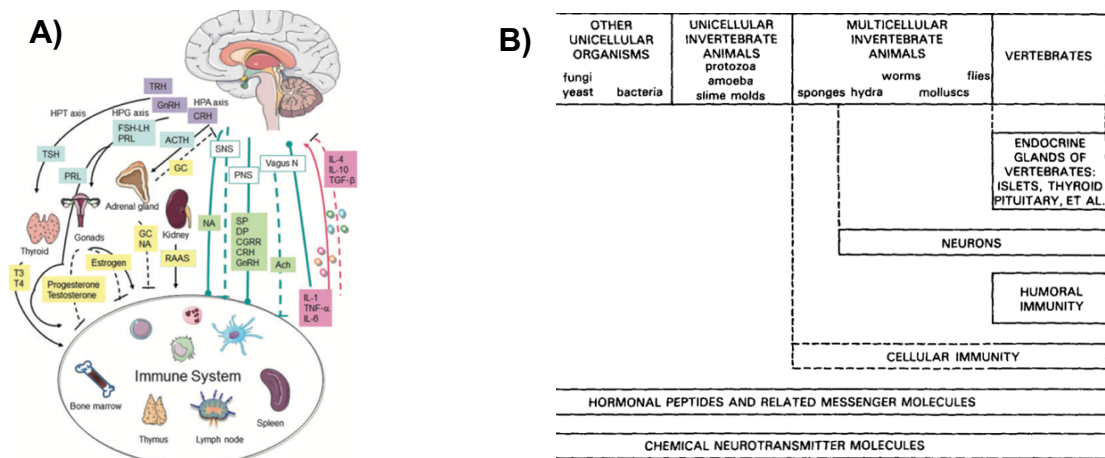


Figura 1. Complejos moleculares de importancia en la relación hospedero-parásito.

(A) Modelo de la Red Neuroinmunoendócrina (NIE). El eje hipotalámico-pituitario (líneas negras) controla la liberación de glucocorticoides, hormonas sexuales y hormonas tiroideas. En contraparte, las interacciones nerviosas (cuadros y líneas verdes) ocurren gracias a los sistemas simpático, parasimpático y periférico. A su vez, las células inmunes producen citoquinas al activarse (cuadros y líneas rosas), mismas que afectan las funciones neuronales. Los cuadros amarillos indican hormonas de órganos endocrinos periféricos, los cuadros grises indican hormonas de la glándula pituitaria, los cuadros púrpura indican hormonas del hipotálamo. Las líneas discontinuas indican señales inhibitorias. ACh, acetilcolina; ACTH, hormona de la adrenocorticotropina; CGRR, péptido regulado por el gen de la calcitonina; CRH, hormona liberadora de corticotropina; DP, dopamina; FSH, hormona estimulante de los folículos; GC, glucocorticoides; GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; HPG, eje hipotalámico-hipófisis-gonadal; HPT, eje hipotalámico-hipófisis-tiroideo; IL, interleucina; LH, hormona luteinizante; NA, noradrenalina; PNS, sistema nervioso periférico; PRL, prolactina; RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS, sistema nervioso simpático; SP, sustancia P; TGF- β , factor de crecimiento transformante- β ; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; TRH, hormona liberadora de tirotropina; TSH, hormona estimulante de la tiroides. Tomado de (Miyake, 2012).

(B) Teoría de la Unificación Microbiana. Se muestran los orígenes evolutivos de los elementos bioquímicos de los sistemas endocrino, nervioso e inmunológico en un margen seriado de izquierda a derecha. Las hormonas, neurotransmisores y péptidos mensajeros emergieron desde el advenimiento de organismos unicelulares, mientras que sistemas fisiológicos más complejos como el sistema inmunológico, neuronal y endócrino emergieron con el advenimiento de organismos multicelulares. Tomado de (Roth et al., 1985).

3. Marco teórico

3.1 Tuberculosis

3.1.0 Microbiología

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica, predominantemente pulmonar, causada por el patógeno intracelular facultativo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), un bacilo ácido-alcohol resistente de la familia Mycobacteriaceae. Esta bacteria es un aerobio estricto altamente resistente a condiciones de frío y desecación pero significativamente sensible a la luz UV y al calor. Bajo condiciones de regularidad, *Mtb* se divide cada 18 horas; sin embargo, bajo condiciones de estrés la bacteria puede entrar en latencia retrasando su división por días o hasta por años (Koch & Mizrahi, 2018). Se estima que esta enfermedad originó al menos hace 70,000 años y desde entonces *Mtb* ha fungido como un patógeno gracias a su diversificación en linajes, o secuencia de especies en línea directa de descendencia a partir de una especie ancestral, de acuerdo a los patrones de migración de la especie humana (Comas et al., 2013). Se han descrito siete linajes filogenéticamente distintos de *Mtb*: los linajes de Indo-Oceanía, Asia oriental, África oriental y Euroamérica forman los linajes 1, 2, 3 y 4 respectivamente, los linajes 5 y 6 incluyen abarcan los linajes del Oeste Africano, mientras que el linaje 7 o Etíope, es el de incorporación más reciente (Senghore et al., 2020). Los linajes de Asia y el Euroamericano son los linajes más extendidos a nivel mundial y son probablemente los más virulentos, es decir que poseen una mayor capacidad de causar enfermedad severa en el hospedero.

Dentro de ellos, el genotipo Beijing, una familia miembro del linaje 2 distinguida por su secuencia génica, destaca por su alta virulencia (Comas et al., 2013).

Roberto Koch descubrió al agente causal de la TB en 1892, pero las cepas o poblaciones de bacterias provenientes de muestras de *Mtb* estudiadas por este científico, se desconocen en la actualidad. La cepa de *Mtb* más estudiada hoy en día es una cepa del linaje Euroamericano denominada H37Rv, la cual fue aislada por primera vez por el Dr. Edward Baldwin en 1905, misma que provenía de un paciente de 19 años con TB pulmonar crónica auspiciado en el Sanatorio Trudeau en Nueva York. Con el tiempo se determinó que la cepa H37Rv poseía una virulencia (capacidad para generar enfermedad) variable en modelos animales. Presentemente, no queda muy claro el grado en el que H37Rv ha evolucionado después de más de un siglo de estar sometida a condiciones artificiales en diferentes laboratorios y qué tanto esta difiere en su comportamiento de cepas salvajes (Camus, Pryor, Médigue, & Cole, 2002; Kubica, Kim, & Dunbar, 1972; W. Steenken, Oatway, & Petroff, 1934; William Steenken, 1935).

Existen diversos grados de virulencia entre distintas cepas de *Mtb*. Para obtener una cepa avirulenta que no producía enfermedades en cobayos y ratones a partir de la cepa H37Rv, en 1935 William Steenken llevó a cabo un estudio de disociación basado en el envejecimiento de los bacilos en medios de huevo sólido donde se les dejó envejecer durante cuatro meses a 37 grados centígrados generando la cepa H37Ra. La cepa H37Ra difiere de su cepa hermana H37Rv en diversas características incluyendo una disminución en la capacidad para penetrar la membrana fagosómica, así como una supervivencia disminuida en el interior de los macrófagos. Dentro de las variaciones génicas entre ambas cepas destacan diferencias marcadas en los genes PE/PPE, los cuales han demostrado codificar proteínas que alteran la virulencia de la bacteria, así como múltiples genes responsables de variaciones antigénicas dentro de su superficie, cruciales para desempeñar la evasión inmunológica (Zheng et al., 2008). Más recientemente, en el año 2009 dentro de la comunidad Mexicana, se aisló la tercera cepa con la que se realizaron experimentos *in vitro* en esta tesis. Dicha cepa, denominada 5186, mostraba una alta tasa de transmisibilidad y pertenece al linaje Euroamericano de la familia Latino-Americana Mediterránea (LAM). Al emplearse en un modelo animal, la cepa 5186 se comportó como una cepa

hipervirulenta, generando una reactividad elevada a la tuberculina, así como la inducción pulmonar negligente de TNF- α , y una expresión elevada, de forma rápida o retrasada de IL-4 e IFN- γ respectivamente (Marquina-Castillo et al., 2009).

3.1.1 Epidemiología

Actualmente, la TB se considera como uno de los problemas de salud pública más importantes a pesar de que es una enfermedad curable, ya que está posicionada dentro de las diez primeras causas de muerte a nivel mundial y continua siendo la principal causa de muerte por un agente infeccioso único, por encima de la COVID-19. En el último reporte de la organización mundial de la salud (OMS), el cual menciona los datos recabados durante el 2018, se registraron aproximadamente 10 millones de nuevos casos de TB activa y tasas de TB latente que englobaron a un 25% de la población mundial, así como cerca de un millón y medio de muertes por TB (WHO, 2020). Actualmente, para finales del 2020 la cifra de muertes reportadas por la pandemia de COVID-19 podría sobrepasar al total de muertes generadas por TB, por lo que cobra importancia que ambas pandemias podrían favorecer el potenciamiento de la otra. Por una parte, los individuos con TB latente o activa son más susceptibles a la infección por SARS-CoV-2 (el agente causal de la COVID-19) y desarrollan COVID-19 de una forma más acelerada y letal que sus pares no infectados (Liu et al., 2020). Por otra parte, el retraso en el diagnóstico y tratamiento oportuno de los nuevos casos de TB causado por el desvío de la atención médica hacia la pandemia del COVID-19 podría elevar los casos de muerte por TB hasta por 20% durante los próximos cinco años (Hogan et al., 2020).

Comparado con la COVID-19, el financiamiento colectivo a nivel mundial de proyectos para tratar o prevenir la TB es significativamente menor, ya que a pesar de tener cifras de letalidad similares, la TB afecta exclusivamente a países y zonas con altos niveles de pobreza (M. J. Saunders & Evans, 2020). Dentro de estos países, predominan los del Sudeste asiático y África Subsahariana, que además poseen las tasas de mortalidad por TB más altas a nivel mundial (WHO, 2020). En México, el sistema nacional de vigilancia epidemiológica ha reportado un incremento de casi 3 veces en los casos de TB activa entre

el 2017 y el 2019, superando los 45 mil casos (Díaz-Quiñonez, Ramírez-Hernández, Rodríguez-Pérez, Viesca-Treviño, & Guzmán-Bracho, 2020). Además el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) reportó una tasa de mortalidad en el 2017 de 1.7 por cada 100 mil habitantes en el país y representa una cifra que ha permanecido relativamente estable durante las últimas décadas (Bello-López et al., 2019). Por lo tanto, parecería que en el futuro la incidencia de TB activa continuará aumentando a nivel nacional y a nivel mundial.

Importantemente, desde hace más de un siglo, se ha demostrado que la nicotina, uno de los principales componentes del humo del cigarrillo y un agonista exógeno de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), empeora la TB pulmonar (López-Hernández, Rivas-Santiago, López, Mendoza-Almanza, & Hernandez-Pando, 2018). Esto es debido a que todas las estirpes celulares pulmonares, incluyendo células inmunológicas, expresan alguno de los diez subtipos de nAChRs, así como otros elementos del sistema colinérgico. Más aún, un metaanálisis de 42 artículos seleccionados de diferentes bases de datos, concluyó que existe una asociación significativa entre el hábito de fumar y el desarrollo de TB pulmonar así como una falla en el tratamiento de la misma (Slama et al., 2007). Importantemente, de los mil millones de fumadores existentes a nivel mundial, aproximadamente el 80% vive en países donde la TB es endémica (López-Hernández et al., 2018). Por lo tanto, es de alta relevancia comprender a mayor detalle la dinámica del sistema colinérgico pulmonar durante la progresión de la enfermedad.

3.1.2 Patogénesis

La TB pulmonar es transmitida a través de la inhalación de bacilos que se encuentran suspendidos en líquido biológico el cual viaja en el aire cuando una persona infectada habla, tose o estornuda y puede permanecer en el aire por horas dentro de un ambiente con ventilación pobre. Este líquido biológico se conforma principalmente por microgotas de *Flügge* ($<5 \mu m$ de diámetro), las cuales cargan hasta 3 bacilos cada una, así como por núcleos de Well, los cuales son formados por cúmulos de estas gotas (Donald et al., 2018). Cuando un contacto no infectado inhala el líquido biológico que contiene al

bacilo pueden suceder tres posibles escenarios: no-infección, enfermedad activa o enfermedad latente (O'Garra, A Redford, 2013).

En el primero de estos escenarios, el cual representa aproximadamente el 57% de los casos, el bacilo no logra establecer una infección en el hospedero. La mayoría de los casos representados por este escenario ocurren por la exposición a una dosis insuficiente, debido a una fuente de contagio escasa o bien debido a la adecuada presencia de barreras físicas, biológicas o químicas (moco, movimiento ciliar) que no permiten que un número suficiente de bacilos activos llegue a las vías respiratorias inferiores. Se estima que alrededor de un mínimo de cinco bacilos activos son requeridos para causar infección en el hospedero. En contraste, la minoría de casos representados por este escenario ocurren por un fenómeno denominado “eliminación temprana” en el cual se monta una respuesta inmune innata que permite el control de la infección sin requerir de la respuesta inmune adaptativa (Drain et al., 2018). Importantemente, una población selecta de personas denominada “resistentes” tienen exposiciones recurrentes y significativas al bacilo, ya que muchos de ellos son contactos que viven en la misma vivienda con la persona infectada, pero jamás muestran evidencia de activación de la respuesta inmune adaptativa. La mayoría de los estudios sugieren que los contactos “resistentes” podrían generar respuestas de memoria de la inmunidad innata, un proceso denominado “inmunidad entrenada” (Verrall, G. Netea, Alisjahbana, Hill, & van Crevel, 2014).

El segundo escenario, designado como enfermedad activa, ocurre cuando el bacilo logra sobrepasar los mecanismos de contención de la infección del hospedero. La TB activa es la forma menos frecuente de presentación nosológica ya que solo ocurre en aproximadamente el 5% de los sujetos con primoinfección (Drain et al., 2018). Estos sujetos son primordialmente personas que poseen una inmunodeficiencia primaria (mutaciones alélicas) o secundaria como desnutrición, edad avanzada, VIH o diabetes (Hunter, 2018). Asimismo, pueden ser sujetos expuestos a factores exógenos que les hayan generado una inmunodeficiencia secundaria, entre los cuales destacan la exposición a minerales inhalados, el alcohol o el tabaco. Importantemente, el consumo de tabaco podría ser el factor de riesgo ambiental que genere un mayor número de casos de TB activa y se estima que el cese del consumo de este a nivel mundial podría permitir el descenso total de

los casos de TB activa a menos de la mitad de las cifras actuales (Miggiano, Rizzi, & Ferraris, 2020).

Finalmente, el tercer escenario, o enfermedad latente ocurre en aproximadamente un 38% de las personas tras una sola exposición a un contacto con TB pulmonar (Drain et al., 2018). Estimaciones recientes sugieren que hasta una cuarta parte de la población mundial podría tener TB latente (Tufariello, Chan, & Flynn, 2003). En este estado, el sistema inmune innato es incapaz de eliminar al bacilo y le permite entrar en un estado de *dormición* en cualquier tejido del cuerpo para evitar ser reconocido por largos períodos de tiempo (Barrios-Payán et al., 2012; Cudahy & Sheno, 2016). Sin embargo, el sistema inmune adaptativo es activado, por lo que los ensayos de liberación de interferón gamma (IFN- γ) y pruebas cutáneas de tuberculina son positivos en estos sujetos a pesar de que permanecen libres de síntomas (Drain et al., 2018). Debe considerarse que aunque sujetos con TB latente no desarrollan síntomas de la enfermedad, un cinco por ciento de ellos desarrollará TB pulmonar activa durante el curso ulterior de su vida debido a una falla en la contención del patógeno (Lin & Flynn, 2010; Lin et al., 2009). Nuevamente, la adquisición de una inmunodeficiencia secundaria, así como la exposición a diversos agentes ambientales como el tabaco, pueden favorecer esta transición (Chan, Keane, & Iseman, 2010).

3.1.3.1 La Respuesta Inmune Innata Protectora en la TB Pulmonar

La respuesta inmunológica en la TB pulmonar es el resultado de la compleja interacción entre diversas células y moléculas de la respuesta inmune innata y adaptativa, misma que está influenciada por factores genéticos y ambientales tanto de la bacteria como del huésped (Ramos-Espinosa, Islas-Weinstein, Peralta-Álvarez, López-Torres, & Hernández-Pando, 2018). Las partículas de *Mtb* entran en las vías respiratorias, donde pueden llegar a las células epiteliales bronquiales y alveolares, las cuales generan respuestas inmunitarias protectoras contra la infección que se conforman principalmente por la producción de péptidos antimicrobianos y surfactante lipídico (Gutsmann, 2016). Si los bacilos inhalados logran evadir los mecanismos iniciales de barrera presentes desde vías

respiratorias superiores y hasta bronquios, estos pueden continuar su avance hacia las vías respiratorias inferiores donde serán fagocitados por macrófagos alveolares. Los macrófagos en general son células inmunológicas cruciales en el control de la TB pulmonar, ya que son capaces de fagocitar y eliminar a *Mtb*. Además, el subtipo alveolar generalmente representa el primero centinela inmunológico en entrar en contacto con el bacilo (Guirado, Schlesinger, & Kaplan, 2013). El reconocimiento inicial de los antígenos de la pared de *Mtb* por células del sistema inmune parece ser mediado por receptores de reconocimiento de patrones entre los que destacan: los receptores tipo Toll (TLRs), los de Manosa, los del sistema del complemento y los receptores tipo *Scavenger* (Van Crevel, Kleinnijenhuis, Oosting, Joosten, & Netea, 2011).

La fagocitosis activa en macrófagos puede ser inducida por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) tales como el TLR4 (Reiling et al., 2002). Tras ser fagocitada por macrófagos, *Mtb* es ingresada dentro de una estructura denominada el fagosoma. Posteriormente, los fagosomas se fusionan con lisosomas preformados, los cuales contienen enzimas degradativas y sustancias microbicidas y de esta forma se inducen los fagolisosomas. Además, se producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que dañan al bacilo dentro del fagolisosoma. Sin embargo, *Mtb*, ha desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir dentro del interior de los macrófagos. Entre estas se encuentran el escape del fagosoma hacia el citosol, la prevención de la unión fagolisosomal y la adaptación a estados de escasez de nutrientes e hipoxia (Simeone et al., 2012). Por lo que los macrófagos pueden terminar convirtiéndose en un nicho de replicación cardinal para la micobacteria (Guirado et al., 2013).

Para reducir la carga bacteriana y facilitar la presentación antigénica, los macrófagos y otras células de la respuesta innata favorecen procesos como la autofagia y dirigen los procesos de muerte celular hacia la apoptosis. Sin embargo, las cepas de *Mtb* altamente virulentas suelen redirigir la muerte celular hacia la necrosis para evitar la eliminación bacteriana y prevenir la presentación antigénica (Zhao et al., 2017). La gama de citocinas es un determinante crucial tanto en la inducción del tipo de muerte celular, como un efecto de la misma, que llevan a cabo las células innatas (Carmona et al., 2013). La micobacteria puede regular la producción de especies reactivas de oxígeno y de TNF- α ,

así como de eicosanoides dentro de los macrófagos para controlar el momento y tipo de muerte celular (Roca & Ramakrishnan, 2013). Asimismo, la producción de IL-1 β por el inflamasoma puede regular crecimiento intracelular de *Mtb* y por tanto también puede ser manipulada por *Mtb* para evitar su eliminación (O'Garra, A Redford, 2013).

La producción de una diversa gama de citocinas producidas por células de la respuesta inmune innata y neumocitos inducen un gradiente quimiotáctico que permite la migración de células mieloides a la zona de infección y además permite la activación de otros subconjuntos de células inmunes especializadas (Monin & Khader, 2014). La activación del TLR4 en macrófagos activa la vía de MyD-88, la cual favorece la translocación nuclear de NF- κ B y la síntesis de citocinas que favorecen la respuesta adaptativa celular, así como la migración de macrófagos y células dendríticas (O'Garra, A Redford, 2013). Por otra parte, se ha demostrado que las micobacterias pueden inducir la producción de la quimiocina CCL2 para reclutar a monocitos que expresan el receptor CCR2 y que funcionan como nichos para su diseminación sanguínea (Cambier, O'Leary, O'Sullivan, Keane, & Ramakrishnan, 2017). Además, las citocinas producidas durante la respuesta innata inicial permiten la activación de células inmunológicas claves en la TB, tales como células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT), las células T asesinas naturales (NK), los linfocitos $\gamma\delta$ y neutrófilos (Rothchild et al., 2017). En esta etapa inicial, una vez activados, los neutrófilos liberan el contenido de sus gránulos, el cual incluye péptidos antimicrobianos y catelicidinas, así como especies reactivas de oxígeno, que favorecen la eliminación de micobacterias (Lowe, Redford, Wilkinson, O'Garra, & Martineau, 2012).

Las células dendríticas intersticiales también son capaces de fagocitar bacilos posterior a su llegada a los alveolos y después los procesan y presentan, a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, a linfocitos vírgenes en ganglios linfáticos regionales (Srivastava, Ernst, & Desvignes, 2014). Este proceso ha sido denominado la "fase interválica" por su duración mayor a 3-5 días en modelos murinos, así como en humanos, después de la cual la respuesta inmune adaptativa es inducida (Ramos-Espinosa et al., 2018). Asimismo, la producción de citocinas y factores solubles tales como el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) por macrófagos pulmonares

igualmente promueve la generación de la respuesta inmune adaptativa, así como la inducción de granulomas pulmonares (Das et al., 2013). En contraposición, la micobacteria ha desarrollado mecanismos para retrasar la afluencia de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos, así como obstaculizar la presentación antigénica por estas células con el propósito de impedir la activación de la respuesta inmune adaptativa (Espinosa-Cueto, Magallanes-Puebla, Castellanos, & Mancilla, 2017; Garcia-Aguilar, Espinosa-Cueto, Magallanes-Puebla, & Mancilla, 2016).

3.1.3.2 La Respuesta Inmune Adaptativa Protectora en la TB Pulmonar

La respuesta inmune adaptativa es requerida en la etapa avanzada de la TB pulmonar, la cual ha sido denominada la “fase de linfocitos T” (Figura 2), para evitar la proliferación y la propagación de las micobacterias (Ramos-Espinosa et al., 2018). Al terminar la fase interválica, los linfocitos activados en ganglios linfáticos se dirigen hacia el pulmón siguiendo un gradiente quimiotáctico. El tipo y cantidad de quimiocinas producidas en el pulmón resultarán cruciales para la adecuada migración y localización de los linfocitos. Por ejemplo, las células T $CD4^+ CXCR5^+$, un subtipo esencial para la respuesta inmune celular contra *Mtb*, responden al gradiente mediado por la quimiocina CXCL13 (Slight et al., 2013; Srivastava & Ernst, 2013). Al llegar a las zonas de inflamación, diferentes subtipos de linfocitos T cooperadores denominados Th (de “T helpers”), producirán citocinas localmente para potenciar la respuesta inmune celular. Entre estos, destacan los linfocitos Th1, los cuales producen citocinas como IL-2, IL-12 e interferón gamma ($IFN-\gamma$) que incrementan la capacidad fagocítica y la eliminación de bacilos por los macrófagos pulmonares (Hernández-Pando, Orozco, Sampieri, Pavón, et al., 1996;). Asimismo, otro subtipo de linfocitos Th1, producen el factor de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) para potenciar las funciones protectoras macrofágicas, a través del receptor nuclear gamma activado por el proliferador del peroxisoma gamma (PPAR γ) (Rothchild et al., 2017).

Por otra parte, los linfocitos Th17/Th22 producen las interleucinas 17A (IL-17A)/IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23 que también son cruciales en inducir una respuesta

inmunológica celular funcional (García Jacobo et al., 2014). La IL-17A está involucrada en la formación y estabilidad de los granulomas y en la producción de péptidos antimicrobianos, mientras que la IL-17F y la IL-23 ayudan a la expansión local de poblaciones celulares innatas, además de prevenir el agotamiento inmunológico en ellas. Por otra parte, la producción de IL-21 contribuye a aumentar el cebado y eficacia de las células T CD8⁺, así como a la expansión de linfocitos B y la producción de inmunoglobulina G (IgG) e IgA. Asimismo, la IL-22 también ayuda a inducir la producción de péptidos antibacterianos, incluyendo la β -defensina y la lipocalina, además de contribuir a la activación macrófaga. Varias de estas citocinas también inducen la producción de G-CSF y de CXCL-8/IL-8, promoviendo la producción y quimiotaxis de neutrófilos hacia los sitios de infección. Las respuestas Th17/Th22 por lo tanto juegan un papel defensivo, siempre y cuando se logre eliminar al bacilo de forma pronta y eficaz tras la generación de estas respuestas (Shen & Chen, 2018a).

La participación de otras poblaciones celulares de la respuesta inmune adaptativa, como son las de los linfocitos T CD8⁺ y de los linfocitos B, si bien en un principio se pensó que era menos importante que la de las células T CD4⁺, actualmente se ha reconocido que también desempeña un papel crítico en la respuesta protectora ante esta enfermedad (O'Garra, A Redford, 2013). Al igual que los linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺ son capaces de producir IL-2, IFN- γ y TNF, citocinas críticas en la activación macrófaga. Sin embargo, la función clave de las células T CD8⁺ parece ser la inducción del proceso de apoptosis en células infectadas por *Mtb*, a través de la liberación de sus gránulos que contienen perforina, granzimas y granulosis, así como por la interacción de su ligando de Fas con el receptor Fas de las células infectadas (Lin & Flynn, 2015). Por otra parte, los linfocitos B representan otra población celular ignorada en esta enfermedad. Sin embargo, recientemente se ha reconocido que también juegan un papel crucial protector ya que participan en la formación de granulomas, y sintetizan citocinas y anticuerpos que ayudan a afinar las respuestas celulares protectoras. Además, los anticuerpos producidos por las células plasmáticas (entre los que destacan la IgG en sangre y la IgA secretora en la mucosa del tracto respiratorio), un estadio avanzado de los linfocitos B, son capaces de neutralizar

directamente a la micobacteria y formar una respuesta de memoria protectora (Choreño-Parra, Weinstein, Yunis, Zúñiga, & Hernández-Pando, 2020).

3.1.3.3 El Granuloma en la TB Pulmonar

En la fase de linfocitos T de la TB pulmonar, se induce una respuesta de hipersensibilidad retardada en el pulmón que conduce a la formación estructuras nodulares inflamatorias, denominadas granulomas, las cuales son el sello histopatológico de la enfermedad. En esta fase además, se potencia la denominada “respuesta inmune celular” y los linfocitos T y macrófagos colaboran en la eliminación de la micobacteria (Ramos-Espinosa et al., 2018). El granuloma se caracteriza morfológicamente por contener un centro de macrófagos infectados el cual es rodeado por un aro intermedio de macrófagos epiteloideos, que contiene en menor medida linfocitos NK, células dendríticas, fibroblastos y neutrófilos, así como un aro externo de linfocitos T y B. Al ser una estructura dinámica, las poblaciones celulares pueden ingresar o salir del granuloma generando un alto grado de variabilidad en su morfología (Ramakrishnan, 2012). En una radiografía de tórax, los granulomas de gran tamaño y la inflamación contigua que presentan reciben la designación de “focos de Ghon” y si estos están calcificados se denominan “complejos de Ranke”. Importantemente, ambos hallazgos se aprecian típicamente en pacientes con TB latente (Delgado & Bajaj, 2020).

Actualmente, el papel de los granulomas no está completamente claro, pero parece estar altamente ligado con su morfología, así como con los fenotipos de las poblaciones inmunológicas que los conforman, los cuales a su vez se encuentran asociados con el grado de enfermedad en el hospedero, así como con el microambiente local de citocinas producidas en gran medida por los linfocitos de la capa externa (Ramos-Espinosa et al., 2018). Interesantemente, el pulmón de un hospedero infectado puede presentar diferentes fenotipos y estadios de sus granulomas a través de su superficie (Ramakrishnan, 2012). En la mayoría de los casos, esta estructura genera la contención de los bacilos infecciosos y se asocia con un microambiente local conformado por citocinas del fenotipo Th1, Th17 o Th22 (Shen & Chen, 2018a). Además, en algunos modelos experimentales y en humanos, los macrófagos pueden fusionarse tras la inducción de citocinas como GM-CSF, IFN- γ e

(IL)-1, -3, -4 y -6 y formar células gigantes multinucleadas gracias a la participación de factores como el calcio y las integrinas. Estas células son una fuente activa de citocinas inflamatorias y contribuyen a la iniciación y al mantenimiento del granuloma y algunos resultados experimentales, particularmente ensayos *in vitro*, han indicado que representan una adaptación morfológica con una mayor actividad fagocítica que aunque no eliminan por completo al bacilo, permiten restringir su proliferación (Rogelio Hernandez-Pando et al., 2000; Lay et al., 2007). Desafortunadamente, los granulomas con un fenotipo protector son altamente dependientes del estado inmunológico del hospedero y su morfología e integridad puede alterarse si este desarrolla una inmunodeficiencia secundaria, lo que resultará en la pérdida de contención del bacilo (O'Garra, A Redford, 2013).

Los granulomas pueden también favorecer la proliferación y propagación de la micobacteria cuando están asociados con marcadores de vulnerabilidad como son una mayor vascularización, así como una reducción en su tamaño y en el grado de fibrosis que presentan (Hernández-Pando, et al., 1996; Moreira et al., 1997; Cyktor et al., 2013; Oehlers et al., 2015). Típicamente, en estos fenotipos “no protectores” se observa un microambiente local en el cual predominan citocinas asociadas con la respuestas Th2 y T reguladora como la IL-4 y la IL-10 (Hernández-Pando et al., 1996; Hernández-Pando et al., 2006). Bajo este microambiente local, los macrófagos se diferencian en macrófagos espumosos los cuales presentan un alto contenido de lípidos y se tornan incapaces de eliminar al bacilo generando un incremento en la proliferación bacteriana (Russell, Cardona, Kim, Allain, & Altare, 2009b; Genoula et al., 2018) . El estado lipídico de estos macrófagos se puede además inducir o perpetuar cuando *Mtb* prolifera dentro de los macrófagos y desvía la vía de la glucólisis hacia la síntesis de cuerpos cetónicos, lo que lleva a la síntesis *de novo* de triglicéridos, así como a la acumulación de cuerpos lipídicos y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en su interior. La micobacteria ocupa estos triglicéridos como fuente de carbono y el citoplasma de estas células se termina convirtiendo en un reservorio crucial para las micobacterias (Russell, Cardona, Kim, Allain, & Altare, 2009a). Más aún, en el humano y en algunos modelos experimentales, *Mtb* induce la necrosis de macrófagos espumosos y sus detritos celulares y lípidos son liberados en el centro del granuloma para degenerar en una necrosis caseosa con la cual la micobacteria los emplea como una fuente

de carbón exógena (B. M. Saunders & Britton, 2007). Asimismo, algunos investigadores han observado que las células gigantes multinucleadas también pueden estar presentes en estos granulomas y las consideran una manifestación de la eliminación ineficiente de la micobacteria (Hernández-Pando et al., 2000). Aunado a esto, se pueden reclutar fagocitos previamente no infectados, como monocitos, macrófagos y neutrófilos, para ayudar a diseminar el bacilo a otras regiones anatómicas del hospedero, un mecanismo de transporte denominado “*caballo de Troya*”(Nguyen & Pieters, 2005). Posterior a la generación de granulomas con fenotipo “no protector”, la enfermedad progresa a su fase más avanzada y el hospedero desarrolla lesiones como neumonía y fibrosis que lo pueden conducir a su muerte.

3.1.3.4 La Neumonía y Fibrosis en la TB Pulmonar

En la etapa final de la enfermedad, es común encontrar exacerbadas tanto la respuesta de los linfocitos T reguladores, como la respuesta de los linfocitos Th2, las cuales pueden neutralizar a la respuesta Th1 que previamente confería protección contra la diseminación pulmonar del bacilo. Además, la producción de citocinas por esta respuesta mixta impide que los linfocitos T reguladores puedan ejercer una respuesta moduladora de la inflamación pulmonar y paradójicamente puede potenciar el reclutamiento de granulocitos y favorecer la generación de inmunopatología (Arriaga, Orozco, Aguilar, Rook, & Hernández Pando, 2002; Dheda et al., 2005; Rook & Hernandez-Pando, 1996). Un ejemplo de un efecto inmunopatológico de alta relevancia generado por esta respuesta son las bronquiectasias, dilataciones irreversibles de los bronquios en las cuales se daña el epitelio respiratorio y además se destruye la elastina de las paredes de las vías respiratorias resultando en una incapacidad para eliminar secreciones (Jordan, Spencer, & Davies, 2010).

Asimismo, en esta etapa, la micobacteria típicamente se libera de los granulomas y comienza a secretar lípidos, como el factor cuerda (trehalosa 6,6– dimicolato), el glucolípido más abundante en la capa periférica de la envoltura de la pared de micobacterias virulentas, así como proteínas y ácidos micólicos en las regiones alveolares (Dheda et al., 2005). Estos productos pueden ser reconocidos por receptores de

reconocimiento de patrones en células inmunológicas favoreciendo la producción de una alta cantidad de citocinas que eventualmente puede conducir al desarrollo de neumonía, en la cual se observa la inflamación de los espacios alveolares consecuente a la afección del parénquima pulmonar. Además, si esta respuesta se intensifica, puede también generar necrosis celular masiva (Welsh, Hunter, & Actor, 2013, Hunter, 2016, 2018).

La producción de diversas citocinas, como el TGF- β producidas por células de la respuesta inmune innata y adaptativa durante la TB pulmonar progresiva también pueden contribuir al desarrollo de fibrosis pulmonar. La fibrosis es el resultado del depósito excesivo de componentes de la matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina por miofibroblastos alrededor de tejido dañado. Importantemente, en esta fase, el reclutamiento de neutrófilos por citocinas como el TNF- α , la IL- β e IL-17 parece desempeñar un papel crucial en el desarrollo de fibrosis (Dheda et al., 2005). Además, la neutrofilia en el esputo al momento del diagnóstico también se asocia con un retraso en la eliminación de *Mtb* ya que los neutrófilos pueden funcionar como un reservorio para la bacteria. Por lo tanto, la presencia pulmonar de estas células durante la etapa avanzada de la enfermedad se correlaciona con una mayor gravedad (Lowe et al., 2012).

En varios modelos experimentales, así como en humanos, la diseminación de las micobacterias por el parénquima pulmonar requiere de la formación de cavidades, así como de la destrucción de la matriz extracelular. El colágeno tipo I y la elastina son los dos componentes más importantes de la matriz extracelular pulmonar, mientras que el colágeno tipo III y IV son componentes importantes de la pared alveolar y de la membrana basal. Sin embargo, los colágenos son muy resistentes a la ruptura por enzimas proteolíticas y sólo las metaloproteinasas de matriz (MMP) son capaces de degradarla completamente (Dheda et al., 2005). Por consiguiente, las MMP también desempeñan un papel importante en el desarrollo de procesos inmunopatológicos claves en la TB pulmonar progresiva asociados con la degradación del colágeno, como son las bronquiectasias, la formación de cavidades y la fibrosis pulmonar. En las etapas avanzadas de la TB pulmonar en humanos es común encontrar la elevación de las MMP en sangre y esputo, principalmente de la MMP-1, aunque también de los subtipos 3 y 7-9 (Stek et al., 2018).

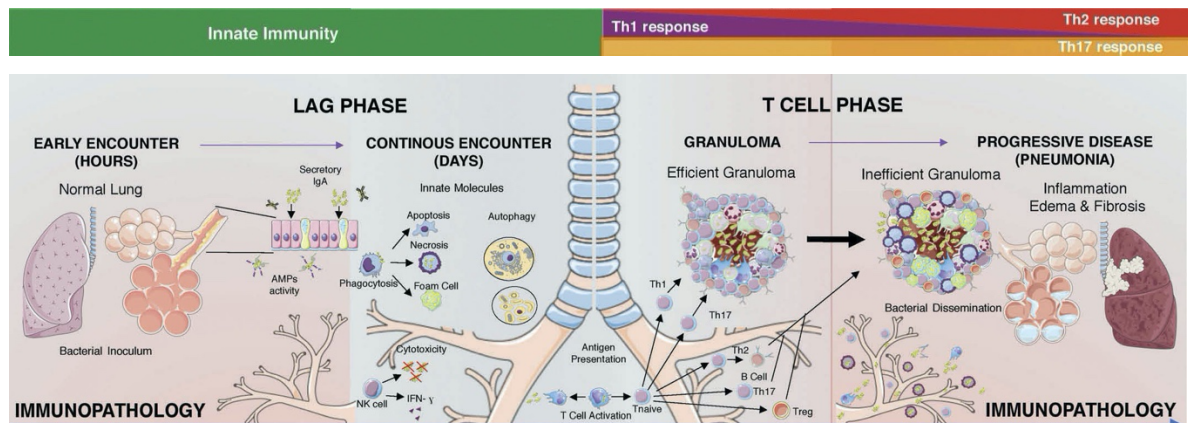


Figura 2. Esquema General de la Respuesta Inmunológica en la Tuberculosis (TB) Pulmonar. La evolución secuencial de la TB pulmonar progresiva se representa en el panel superior. La respuesta inmune se divide en dos fases: la respuesta inmune innata (fase retardada) y la respuesta inmune adaptativa (fase de células T). En la fase retardada, el aspecto macroscópico del pulmón es normal, ya que el recuento de bacterias sigue siendo bajo, pero hay una respuesta inflamatoria temprana, diferenciación fagocítica e inducción de la muerte celular (apoptosis), así como producción de péptidos antimicrobianos. Durante la fase de células T, la proliferación bacteriana induce cambios macroscópicos e histológicos en los pulmones, incluyendo la formación de granulomas, inflamación crónica extensa, necrosis y fibrosis. Inicialmente, se forman pocos granulomas, sin embargo, a medida que la infección progresa hay un predominio de granulomas ineficientes que se relaciona con una menor actividad protectora de la respuesta adaptativa Th1, lo que conduce al crecimiento y diseminación de la bacteria. Adaptado de (Ramos-Espinosa et al., 2018).

3.2 Alteraciones Neuroinmunoendócrinas en la TB pulmonar

Con el fin de lograr limitar la inflamación excesiva durante una infección se ponen en marcha varios mecanismos de contraregulación, incluyendo la producción y liberación de hormonas y neurotransmisores. En el caso de las infecciones crónicas, en las que los patógenos no se eliminan y la respuesta inmunológica debe mantenerse, es común que se encuentre alterada la respuesta neuroendocrina. La producción desregulada de hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos generada en infecciones crónicas a su vez puede desencadenar una respuesta inflamatoria no resolutive que conduce a cambios inmunopatológicos y que empeora el control de la infección generando un ciclo perpetuo (Oscar Bottasso, 2018b). Más aún, evidencia reciente demuestra que los microorganismos y

las células de sus hospederos pueden comunicarse entre sí y regular de forma recíproca sus funciones a través de diversos compuestos químicos. En el caso de patógenos bacterianos, estos pueden “secuestrar” las señales de la red NIE del hospedero para modular la respuesta inmunológica y favorecer su permanencia y replicación (Hughes & Sperandio, 2008; Lyte, 2016).

Durante la TB pulmonar se ha demostrado la producción exacerbada de hormonas hipofisarias en especial de la hormona del crecimiento y la prolactina, así como la expresión alterada de los receptores de varias hormonas pituitarias en células mononucleares de sangre periférica (O. Bottasso, Bay, Besedovsky, & Del Rey, 2007). Empleando el modelo experimental reportado en esta tesis, se demostró que la vasopresina se produce ectópicamente en el pulmón principalmente en macrófagos desde la infección temprana y aumenta a medida que esta progresa. La estimulación vasopresinérgica crónica durante la enfermedad tardía causó efectos profibróticos perjudiciales en el pulmón, sugiriendo que se encuentra desregulada. En contraparte, la supresión farmacológica de la vasopresina ayudó a reactivar la inmunidad protectora y contribuyó en acortar la quimioterapia convencional (Zetter et al., 2019).

La producción de hormonas esteroideas por parte de las glándulas suprarrenales también se encuentra significativamente alterada durante el curso de la TB pulmonar. Esta disrupción comienza desde la etapa inicial de la infección cuando la producción de cortisol en humanos, o cortisona en el modelo murino, pierde su variación circadiana al volverse sostenida y continua durante el transcurso de la enfermedad cuando se observa hipertrofia de la corteza adrenal (Hernandez-Pando et al., 1995; Oscar Bottasso, 2018a). La elevación del cortisol o de la cortisona promueve un cambio en el fenotipo de linfocitos T de un perfil Th1 hacia uno Th2, y de los macrófagos pulmonares hacia el subtipo M2c resultando en la fragmentación de la respuesta celular protectora (Cain & Cidlowski, 2017). La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal secundaria a la producción crónica e intensa de citocinas proinflamatorias (sobre todo de IL-1, IL-6 y TNF- α) por la enfermedad parece ser uno de los mecanismos responsables que conducen a la desregulación de la producción de esteroides suprarrenales (Oscar Bottasso, 2018b; Hernandez-Pando et al., 1995). Asimismo, empleando el modelo murino reportado en esta tesis, Bini y cols. mostraron una

intensa inmunopositividad para las citocinas IL-1 β y TNF- α en la corteza suprarrenal (resultados no publicados). Lo anterior sugiere que la producción de citocinas a nivel local podría ser otro mecanismo que conduce a la producción alterada de hormonas corticosuprarrenales.

Durante el curso de la TB pulmonar también se desregula la producción de hormonas androgénicas en la corteza adrenal. Por ejemplo, las concentraciones de dehidroepiandrosterona (DHEA) y de sus metabolitos oxigenados androstenediol, androstenetriol y 7-oxo-DHEA se encuentran anormalmente bajas en pacientes con TB activa. Estos andrógenos débiles generalmente contrarrestan la inhibición de la inmunidad celular mediada por los glucocorticoides, por lo que su depleción durante la TB anula este efecto (Vecchione et al., 2018). Además la DHEA inhibe directamente el crecimiento *in vitro* de otros patógenos como *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum* y se cree que podría inhibir también el crecimiento de *Mtb*, por lo que la inhibición en la producción de esta hormona podría favorecer directamente la proliferación del bacilo (Oscar Bottasso, 2018b). Citocinas como el TGF- β , así como sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica retadas con *Mtb* son capaces de disminuir la producción de la DHEA cuando se administran a cultivos de células suprarrenales, lo que sugiere que las citocinas producidas durante las etapas avanzadas de la enfermedad suprimen la producción suprarrenal de esta hormona (O. Bottasso et al., 2007; Rey et al., 2007; Bongiovanni et al., 2015). Finalmente, la disminución de la carga bacteriana pulmonar secundaria al tratamiento de la TB está asociada con una normalización del índice DHEA/cortisol y de los receptores de estas hormonas en células inmunológicas. Por lo tanto, parece ser que durante la infección activa, la bacteria altera de forma importante el sistema homeostático de las hormonas androgénicas suprarrenales (Díaz et al., 2017).

Las hormonas producidas en otras glándulas endócrinas también favorecen la adquisición y/o progresión de la TB pulmonar. Los andrógenos producidos en los testículos por ejemplo, pueden inhibir el perfil de linfocitos T cooperadores Th1, un efecto que contribuye a que los hombres tengan hasta dos veces más predisposición a desarrollar TB pulmonar activa comparados con las mujeres (Santucci et al., 2011). Este efecto se comprobó experimentalmente empleando el modelo descrito en estas tesis y se demostró

que ratones machos desarrollaron TB activa en un mayor grado comparado con machos a los que se les había realizado orquiectomía bilateral o hembras (Bini et al., 2014). Asimismo, otras alteraciones endócrinas observadas durante el curso de la TB pulmonar como la resistencia a la insulina, el incremento en la producción y secreción de las hormonas tiroideas T3 y T4 así como la disminución en la producción y secreción de la leptina también pueden favorecer la progresión de la enfermedad debido al impacto global que tienen sobre múltiples funciones inmunológicas. Entre las funciones inmunológicas alteradas por la producción desreglada de estas hormonas se encuentran: funcionalidad del timo residual disminuida, secreción de péptidos antimicrobianos en vías aéreas reducida, así como la inducción de inmunosupresión en diversas poblaciones celulares, entre muchas otras (Bay, & Bottasso, 2018, Bongiovanni et al., 2020; D'Attilio, Santucci, Bongiovanni; Fernández et al., 2020)

A pesar de que las investigaciones clínicas y epidemiológicas que estudiaban el impacto de las respuestas de estrés sobre el desarrollo de la TB pulmonar activa fueron mayormente abandonadas con el advenimiento de la quimioterapia antituberculosa, actualmente se ha retomado la importancia que tiene esta respuesta en el desarrollo de la TB pulmonar activa. Por ejemplo, la incidencia de casos de TB incrementa de forma notable en zonas con un alto porcentaje de estrés y de desnutrición como lo son: zonas de guerra, de desastres naturales o de pobreza (Biondi & Zannino, 1997; Zhang, 2004). Se piensa que el estrés puede desregular al sistema inmunológico a través de la modulación de los ejes neuroendocrinos hipotalámico-pituitario-suprarrenal cortical y del eje simpático-suprarrenal medular (Bishop, 1948; Wittkower, 1953; Pecyna & Hryniewiecka, 1988). Las respuestas de estrés originaron en mamíferos para ser empleadas en el corto plazo e incrementar las probabilidades de supervivencia ante una amenaza ambiental. Sin embargo, la liberación continua de hormonas y la movilización de recursos energéticos en estas respuestas puede ser percibida por bacterias como *Mtb* las cuales se aprovechan de este estado para incrementar la expresión de sus genes de virulencia, así como los de ingreso de nutrientes y de proliferación (Hughes & Sperandio, 2008).

De forma similar, algunas respuestas del sistema simpático también pueden resultar protectoras en esta enfermedad. Por ejemplo, en el modelo experimental aquí descrito, se ha

demostrado que durante las etapas tempranas de la infección se incrementa la liberación de noradrenalina en las terminales nerviosas pulmonares. La noradrenalina liberada parecería ser empleada por linfocitos T $\beta 2$ adrenérgicos⁺ presentes en el pulmón y en los nódulos linfáticos mediastínicos para promover su diferenciación hacia un perfil Th1 protector. En contraparte, durante la enfermedad avanzada la producción de noradrenalina y del receptor $\beta 2$ adrenérgico disminuye bruscamente, lo que sugiere que la actividad noradrenérgica pulmonar jugaría un papel de menor relevancia durante la fase progresiva en el modelo experimental aquí empleado (Barrios-Payán et al., 2016). En contraste, en el mismo modelo experimental se ha demostrado que la TB pulmonar induce un comportamiento depresivo y ansioso (“sickness behavior”) secundario a la producción alterada de los neurotransmisores norepinefrina, epinefrina, dopamina y serotonina en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo durante la mayor parte de la enfermedad. Este efecto se piensa que es debido a la elevación de las concentraciones cerebrales de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-12) y antiinflamatorias (IL-10, IL-4 y TGF- β), así como de las enzimas indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO) y de la óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) (Espinosa et al., 2020).

Por lo tanto, de forma categórica se ha evidenciado como durante la TB pulmonar la actividad del sistema neuroinmunoendócrino se encuentra significativamente alterada. Dicha alteración parecería favorecer la proliferación bacilar así como la progresión de la enfermedad.

3.3 El Sistema Colinérgico No Neuronal

El sistema colinérgico sintetiza, degrada y media la inmensa variedad de acciones de la acetilcolina (ACh) a través de su estimulación sobre receptores muscarínicos y nicotínicos (mAChRs y nAChRs) (Koichiro Kawashima, Fujii, Moriwaki, Misawa, & Horiguchi, 2015). A pesar de que tanto células neuronales como no neuronales son capaces de sintetizar ACh de forma rápida o lenta respectivamente, la ACh ha sido inapropiadamente etiquetada como un "neurotransmisor clásico" y no como un "citotransmisor" (Fujii et al., 2017a; Pavlov, Chavan, & Tracey, 2018). Importantemente, muchos aspectos del sistema colinérgico no-neuronal siguen sin ser dilucidados, entre ellos

los mecanismos de almacenamiento y liberación de ACh (Fujii et al., 2017a), debido a que la mayoría de las investigaciones han sido enfocadas en el estudio del sistema colinérgico neuronal. Sin embargo, las células no neuronales son una fuente de producción crucial de ACh y este sistema se encuentra altamente conservado en mamíferos, en los cuales la mayoría de las células son capaces de sintetizar o bien de expresar receptores para esta molécula (I. Wessler & Kirkpatrick, 2008).

3.3.1 Acetilcolina – “El Citotransmisor Universal”

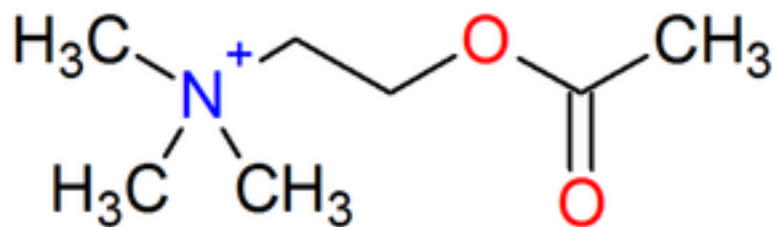
La acetilcolina (ACh), un éster de colina y ácido acético (Figura 3), fue químicamente caracterizada por Adolf Von Baeyer en 1867 y aislada por primera vez, a partir del hongo *Claviceps purpúrea*, en 1914 por Arthur Ewins. Una década después, fue catalogada como un neurotransmisor clásico gracias a los experimentos que llevaron a cabo Otto Lewi y Henry Dale (Grando, Kawashima, & Wessler, 2020). La ACh producida por células no neuronales contribuye en la regulación de múltiples procesos celulares cruciales tales como la mitosis y la organización del citoesqueleto. La multiplicidad de acciones generadas por la ACh tras la activación de los nAChRs y mAChRs, así como su presencia en diversas células de mamíferos y en otros organismos le ha otorgado la denominación reciente “el citotransmisor universal” (I. Wessler, Kirkpatrick, & Racké, 1999).

La principal enzima sintetizadora de ACh es la colina-acetiltransferasa (ChAT), una transferasa que traslada un grupo acetil del compuesto acetil-CoA a una molécula de colina. En células no neuronales, la ChAT está presente principalmente en el citosol, sin embargo, también puede ser secretada al medio extracelular por un mecanismo aún no dilucidado. Diversas isoformas de la enzima ChAT (R, N y M) pueden ser generadas a partir del "locus colinérgico", empleando una conformación grande de 82 kDa o una más pequeña de 69 kDa (Vijayaraghavan et al., 2013). La acetiltransferasa de carnitina (CarAT), es una segunda transferasa capaz de sintetizar ACh, pero que transfiere el grupo acetil a una molécula de carnitina. La localización principal de esta enzima es mitocondrial, aunque puede también encontrarse en el citosol, así como en otras regiones celulares.

Las células endoteliales, epiteliales y musculares de las vías respiratorias son capaces de expresar tanto ACh como ChAT. Las células no neuronales de mamíferos

contienen cantidades significativamente menores de ACh en comparación con células neuronales y no son capaces de almacenar ACh en vesículas, sino que la liberan continuamente como una hormona local, ayudando a regular la homeostasis celular (I. Wessler et al., 1999). Además, las células endoteliales de varios tejidos poseen el $\alpha 7$ nAChR, que al ser estimulado inhibe la expresión de las moléculas de adhesión (VCAM, ICAM-1 y E-Selectina, bloqueando la migración de leucocitos (Saeed et al., 2005). Durante diversas infecciones, se han documentado alteraciones importantes en la expresión y el funcionamiento del sistema colinérgico no neuronal. Por ejemplo, durante la infección por rinovirus en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la producción de ACh en vías aéreas incrementó de forma notable, así como la expresión de ChAT en células epiteliales bronquiales (Contoli, Marcellini, Caramori, & A. Papi, 2017).

La acetilcolinesterasa (AChE), es la principal enzima degradadora de ACh, fraccionando hasta 25 mil moléculas por segundo y debido a su alta eficiencia para degradar a la ACh, se ha reconocido que puede ser uno de los elementos reguladores más importantes del sistema colinérgico. Esta enzima se expresa en dos isoformas distintas (T y H) en mamíferos y se distribuye principalmente en células del sistema inmune, en la superficie de neuronas y en la placa neuromuscular (da Silva et al., 2012). Existe asimismo, una segunda enzima con capacidad para degradar a la ACh, denominada butirilcolinesterasa (BuChE), o pseudocolinesterasa, la cual se distribuye principalmente en el hígado y en el plasma sanguíneo (Ignaz Wessler, Kilbinger, Bittinger, Unger, & Kirkpatrick, 2003).



Colina

Grupo acetilo

Figura 3. Estructura química de acetilcolina (fórmula esquelética). La acetilcolina, también conocida como acetato de colina, es un éster del ácido acético (un grupo acetilo) y colina que pertenece a la clase de compuestos orgánicos denominados colinas acílicas (derivados acilados de la colina). La colina o 2-hidroxi-N, N, N-trimetiletanamina es una sal de amonio cuaternario con la fórmula química $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_2\text{OH}$. Tomado de “Structure and Activity of Acetylcholine” Nature (Beers & Reich, 1970).

3.3.2 *Receptores de la ACh*

Los efectos biológicos de la ACh son producidos tras su interacción con receptores de acción rápida (nAChRs) y/o de acción lenta (mAChRs). Los receptores nicotínicos son proteínas integrales de membrana y forman parte de la superfamilia de canales iónicos acoplados a ligando. El conjunto de cinco subunidades transmembranales, seleccionadas de un conjunto de diecisiete polipéptidos homólogos ($\alpha 1-10$, $\beta 1-4$, γ , δ y ϵ) forma un receptor. La activación de los nAChRs en células neuronales genera la apertura de canales iónicos que lleva a la despolarización celular (Figura 4). Por el contrario, en células no neuronales, el mecanismo de señalización de los nAChRs continúa incompletamente caracterizado, pero comparte elementos intracelulares con la vía de señalización de células neuronales. Importantly, el incremento de calcio observado en células inmunológicas tras la activación de los nAChRs se ha observado que proviene de la liberación de almacenes intracelulares un proceso que ocurre secundario a la apropiación de mediadores intracelulares de receptores vecinos y no a través de la entrada de cationes a partir del medio extracelular como ocurre con neuronas (Rea, 2014). A pesar de que en la actualidad sabemos muy poco sobre la dinámica de la expresión colinérgica entre diferentes géneros, etapas de maduración y regulación circadiana u hormonal de estos receptores, parecería que la expresión de sus subunidades en vías aéreas es altamente ubicua (Tabla 1). Finalmente, al igual que los nAChRs, se sabe más sobre el mecanismo de acción de los mAChRs en neuronas (Figura 4) que en células no neuronales (Islas Weinstein & Pando, 2020).

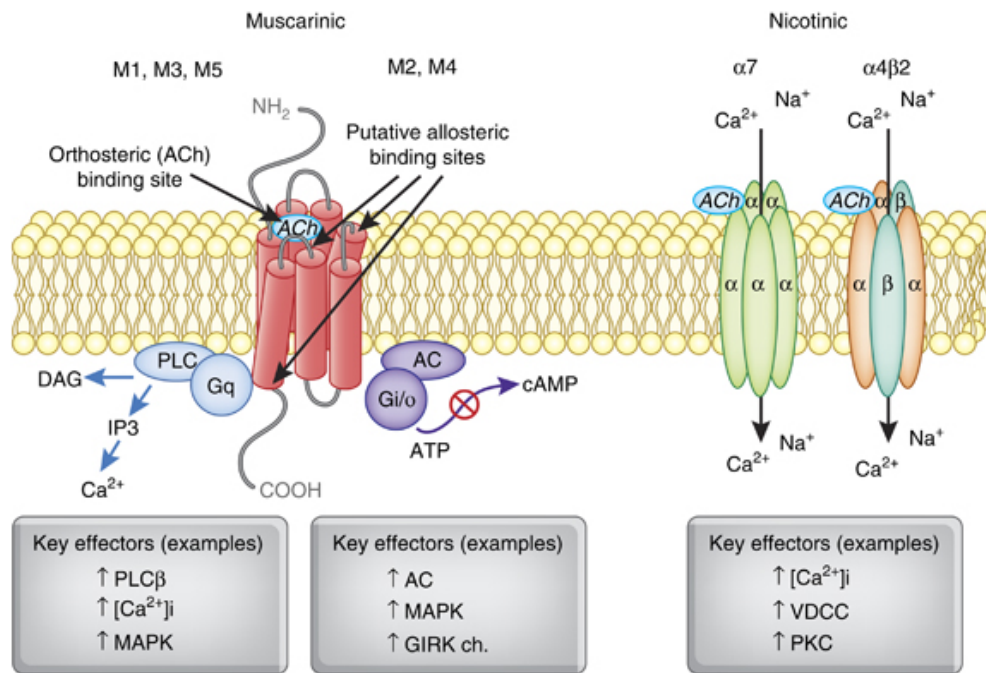


Figura 4. Estructura y cascada de señalización intracelular de los receptores de ACh.

Se muestra la estructura general y la cascada de señalización de los nAChRs y mAChRs en células neuronales. Los mAChRs son proteínas de siete dominios transmembranales, que pertenecen a dos clases funcionales basadas en su acoplamiento a diferentes tipos de proteína G. Los mAChRs M1, M3 y M5 se acoplan selectivamente a las proteínas G de tipo Gq/G11 dando como resultado la generación de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol (DAG) lo que lleva a un aumento de los niveles de calcio intracelular. Los mAChRs M2 y M4 activan preferentemente las proteínas G de tipo Gi/Go, inhibiendo así a la adenilato ciclasa, reduciendo la concentración intracelular de cAMP y prolongando la apertura de los canales de potasio. En cambio, los nAChRs son canales de iones pentaméricos, que incrementan la entrada de cationes como el Ca⁺ a la célula. PLCβ (fosfolipasa C isotipo β), MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos), AC (adenilato ciclasa), GIRK (canales de potasio rectificadores internos acoplados a proteína G), PKC (proteína cinasa C), VDCCs (canales de voltaje dependientes de calcio). Tomado de “Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia” *Neuropsychopharmacology* (Jones, Byun, & Bubser, 2012).

| Tipo Celular | Subunidades |
|--------------------------------------|--|
| Neuronas Ganglionares | $\alpha 2-\alpha 5, \alpha 7, \beta 2-\beta 4$ |
| Células Epiteliales Bronquiales | $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$ |
| Células Epiteliales Alveolares | $\alpha 3-\alpha 7$ |
| Células Neuroendócrinas | $\alpha 7, \beta 2$ |
| Glandulares Submucosas | $\alpha 7$ |
| Células Musculares Lisas Bronquiales | $\alpha 7$ |
| Células Endoteliales | $\alpha 7$ |
| Fibroblastos | $\alpha 7$ |
| Macrófagos Alveolares | $\alpha 4, \alpha 7, \beta 2$ |
| Linfocitos | $\alpha 4-\alpha 7, \beta 2$ |
| Leucocitos Polimorfonucleares | $\alpha 2, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$ |

Tabla 1. Detección de las subunidades de los receptores nicotínicos (nAChRs) en diversas poblaciones celulares en vías aéreas y pulmones. En tejidos pulmonares y vías respiratorias, la expresión de las subunidades de los nAChRs no está confinada a las neuronas ganglionares, sino que está presente en la mayoría de los tipos celulares. Los datos resumidos en esta tabla se obtuvieron a partir de distintas técnicas (RT-PCR, ELISA, autoradiografía con α -bungarotoxina [I^{125}]) realizadas en tejidos animales y líneas celulares humanas, por lo que deben considerarse preliminares, ya que no se dispone hasta el momento de estudios exhaustivos que hayan detectado la expresión de todas las subunidades nicotínicas en los diversos tipos celulares dentro de esta localización anatómica. Adaptado de "The airway cholinergic system: physiology and pharmacology." Pulmonary pharmacology & therapeutics (Racké & Matthiesen, 2004).

3.3.3 Efectos Inmunomoduladores de la ACh

La primera vez que se aisló ACh en un mamífero fue en el bazo, un órgano inmunológico, por Harold Dudley en 1921 (I. Wessler et al., 1999) sin embargo, la capacidad de esta molécula para regular la respuesta inmune tan solo ha comenzado a ser dilucidada en los últimos años. Durante este tiempo, se ha acumulado evidencia demostrando que las células inmunológicas tienen la capacidad de sintetizar y liberar ACh, así como otros neuroquímicos y pueden expresar receptores para ellos (Pavlov & Tracey, 2017). La estimulación de receptores de ACh (nAChRs y mAChRs) en células inmunológicas se ha relacionado con efectos inmunoreguladores principalmente por su acción inhibitoria sobre diversos factores de transcripción, entre los que destaca el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Los

efectos inmunoreguladores de los receptores para ACh han sido principalmente estudiados en el $\alpha 7$ nAChR, un receptor pentamérico (Huang, Zhao, & Su, 2019).

Los leucocitos mononucleares (linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas) son capaces de sintetizar la mayoría de los componentes del sistema colinérgico (K. Kawashima, Kajiyama, Fujimoto, Oohata, & Suzuki, 1993). Se ha demostrado que los linfocitos T producen mayores cantidades de ACh en comparación con los linfocitos B y otros subtipos celulares inmunológicos (Fujii et al., 2017a). La síntesis de ACh en las células T es generada en su mayor parte por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y en menor medida por la enzima carnitina acetiltransferasa (CarAT) (Fujii et al., 2017a). Importantemente, los linfocitos T CD4⁺ muestran cantidades significativamente mayores de producción de ACh en comparación con las células T CD8⁺ en diversos tejidos del sistema inmunológico (Fujii et al., 2017a; Rinner, Kawashima, & Schauenstein, 1998). Actualmente, la subpoblación de linfocitos productores de ACh mayormente aislada ha sido caracterizada por sus marcadores de superficie, TCR⁺ CD4⁺ CD25⁺ $\beta 2$ AR⁺ ChAT⁺ y produce ACh en respuesta a la estimulación de su receptor beta-2 adrenérgico ($\beta 2$ AR⁺) (Peña et al., 2011).

También es importante destacar que la activación inmunológica aumenta la producción de ACh en leucocitos mononucleares. Por ejemplo, la síntesis de ACh en las células T es inducida por la activación de sus TCRs (Perry et al., 2007) y las células T y B humanas expuestas a la toxina Cowan I de *Staphylococcus aureus* (SAC), un activador de los linfocitos B, incrementaron significativamente el contenido de ACh y la expresión del ARNm de ChAT (Fujii, Watanabe, Fujimoto, & Kawashima, 2005). Además, aunque la expresión de ChAT en macrófagos y células dendríticas parece ser marginal, factores como el huésped, el tejido, el estado inmunológico, así como el procedimiento de procesamiento pueden alterar su expresión (Fujii et al., 2017b). A modo de ejemplo, la exposición a PAMPs y a agonistas de los TLR aumenta notablemente el contenido de ChAT tanto en macrófagos como en células dendríticas (Peña et al., 2011; St-Pierre et al., 2016).

El sistema colinérgico regula la producción y varias funciones inmunológicas de los linfocitos. Por ejemplo, la expresión alterada de la AChE en los órganos linfoides primarios puede suprimir el proceso de linfopoyesis (Perry et al., 2007). Además, la estimulación del

$\alpha 7$ nAChR en células T suprime la inducción de los perfiles Th1 y Th17 y favorece la inducción del perfil T regulador (Fujii et al., 2017a). En el caso de los linfocitos B, la estimulación del $\alpha 7$ nAChR puede frenar su migración a distintas zonas del bazo y reducir la generación de anticuerpos durante la infección por *S. pneumoniae* (Mina-Osorio et al., 2012). Finalmente, la respuesta citotóxica de las células asesinas naturales (NK) se ve comprometida después de la adición de nicotina, incrementando la susceptibilidad del huésped a infecciones pulmonares (Eduardo et al., 2019).

Al igual que en los linfocitos, las funciones de otras células inmunológicas también pueden ser reguladas por elementos del sistema colinérgico. Los macrófagos y las células dendríticas expresan tanto nAChRs como mAChRs. La estimulación del $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ nAChR puede suprimir la fagocitosis y la presentación antigénica en células dendríticas y macrófagos y, por consiguiente, la diferenciación de las células T (Koichiro Kawashima, Yoshikawa, Fujii, Moriwaki, & Misawa, 2007). Asimismo, los neutrófilos humanos poseen la maquinaria bioquímica para producir ACh (Hagforsen, Einarsson, Aronsson, Nordlind, & Michaëlsson, 2000) y al igual que los fagocitos mononucleares, también pueden expresar los $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, los cuales incrementan su expresión en estas células a lo largo de su desarrollo y tras su activación inmunológica (Torres-Rosas et al., 2014). Importantemente, la estimulación de los nAChRs puede alterar el reclutamiento y la respuesta de los neutrófilos a IL-8 en vías respiratorias (Galle-Treger et al., 2016; McLean et al., 2016). Además, la estimulación del $\alpha 7$ nAChR en neutrófilos inhibe funciones inmunológicas básicas en ellas, tales como la fagocitosis, degranulación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fujii et al., 2017a).

4. Justificación

La tuberculosis (TB) continúa siendo la enfermedad infecciosa con mayor mortalidad a nivel mundial. En 2019 se notificaron 10 millones de casos de TB activa y 1.4 millones de muertes (WHO, 2020). La erradicación de la TB en los próximos decenios parece improbable a pesar de la emergencia de nuevos antibióticos y regímenes terapéuticos para tratarla. Esto es debido principalmente al abandono del tratamiento por los pacientes, secundario a su uso prolongado obligatorio y a su elevada toxicidad (Bouchikh et al., 2012; Ramappa & Aithal, 2013). Además, la infección por cepas de TB multidrogoresistentes (MDR-TB) emergentes que requieren una farmacoterapia aún más prolongada, suscitan mayor toxicidad en el hospedero (Field, 2015; Lauzardo & Peloquin, 2016; Mcgrath, Gey van pittius, Van helden, Warren, & Warner, 2014; Mendonça, Kritski, Land, & Sant'Anna, 2016; Xu et al., 2017).

La diversas respuestas inmunológicas que potencialmente pueden ser generadas durante esta enfermedad confieren protección o daño al hospedero. Estas repuestas pueden ser llevadas a cabo por el sistema inmune innato, el adaptativo, o bien por ambos y dependen de factores tanto genéticos como ambientales de la bacteria y el huésped. La respuesta inmunológica debe procurar un equilibrio ideal entre una respuesta agresiva necesaria para eliminar la bacteria y una respuesta reguladora necesaria para evitar daños colaterales en el hospedero. En particular, la respuesta reguladora del hospedero trata de impedir estados de inflamación crónica excesiva, así como fibrosis pulmonar (Ramos-Espinosa et al., 2018). Analizar la forma en la que el sistema colinérgico regula la interacción entre *Mtb* y el hospedero aportará un mejor entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad, el cuál actualmente es limitado y además favorecerá la generación de nuevos tratamientos. El descubrimiento de terapias inmunomoduladoras es un campo prometedor no solo para tratar la TB pulmonar sino para tratar diversas enfermedades, por lo que los hallazgos obtenidos pueden ser también de utilidad en otros campos.

5. Planteamiento del problema

La tuberculosis (TB) es una enfermedad cuya inmunopatogenia permanece incompletamente comprendida. Ratones BALB/c infectados con Mtb representan un modelo experimental para estudiar la TB pulmonar activa (Hernández-Pando, Orozco, Sampieri, Pavón, et al., 1996). En este modelo, se observa una “fase temprana” caracterizada por una respuesta inmune de tipo celular en la cual ocurre la contención de la bacteria. Posteriormente, se establece la denominada “fase progresiva” que culmina con la muerte de los animales, caracterizada por la disfunción de la respuesta inmune de tipo celular inicial y un aumento en la carga bacilar y de áreas neumónicas subsecuente (Figura 5). Bajo condiciones fisiológicas, se ha descrito la ausencia de tono colinérgico en vías aéreas de ratones BALB/c (Larcombe et al., 2008). Sin embargo, en modelos murinos de infecciones aéreas generadas por otros microorganismos patógenos, se ha descrito la potenciación de elementos del sistema colinérgico pulmonar con la subsecuente alteración de la respuesta inmune innata y adaptativa asociada a cambios inmunopatológicos locales (Engel et al., 2015; Enioutina et al., 2015; Giebelen, Leendertse, Florquin, & Van Der Poll, 2009; Lafargue et al., 2012; Matsunaga, Klein, Friedman, & Yamamoto, 2001). A pesar de la relevancia del sistema colinérgico pulmonar en dichos modelos, aún no se ha descrito la participación del sistema colinérgico en un modelo *in vivo* de TB pulmonar. Por ello, el presente trabajo pretende comprender la contribución del sistema colinérgico pulmonar en la progresión de esta enfermedad en un modelo animal.

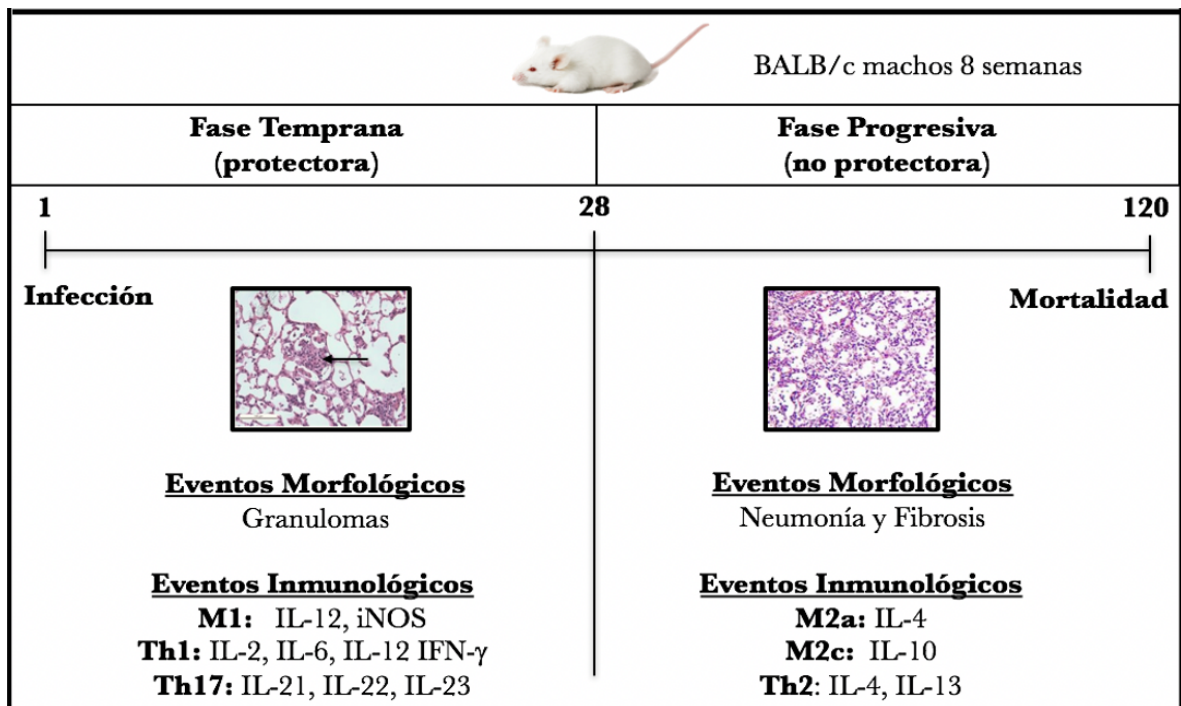


Figura 5. Modelo experimental de TB pulmonar. Ratones BALB/c infectados con Mtb representan un modelo experimental para estudiar la TB pulmonar activa. En este modelo, se observa una “fase temprana” caracterizada por una respuesta inmune de tipo celular en la cual ocurre la contención de la bacteria. Posteriormente, se establece la denominada “fase progresiva” que culmina con la muerte de los animales, caracterizada por la disfunción de la respuesta inmune de tipo celular inicial y un aumento en la carga bacilar y de áreas neumónicas subsecuente.

6. Hipótesis

En la TB pulmonar experimental murina, la potenciación del sistema colinérgico pulmonar conduce a la generación de cambios inmunopatológicos asociados con la progresión de la enfermedad.

7. Objetivos

Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue determinar la contribución del sistema colinérgico pulmonar en la inmunopatología del modelo murino de TB pulmonar.

Objetivos Específicos

1. Comprobar la expresión de acetilcolina (ACh), la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y del receptor nicotínico $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) en la cinética del modelo murino de TB pulmonar
2. Determinar el efecto de la ACh y de los antagonistas nicotínicos metililcaconitina (MLA) y dihidro-beta-eritroidina (DH β E) en el crecimiento de *Mtb*
3. Establecer la dinámica de producción de acetilcolina y del receptor nicotínico $\alpha 7$ por macrófagos expuestos a *Mtb* así como su efecto inmunomodulador.
4. Verificar el impacto de la administración de antagonistas nicotínicos en la carga bacteriana y en el porcentaje de inflamación en el modelo murino de TB pulmonar.
5. Evaluar si existe un efecto terapéutico sinérgico cuando se administran antagonistas nicotínicos en combinación con antibióticos en el modelo murino de TB pulmonar.

7. Métodos

7.1.0 Animales

Se obtuvieron ratones macho BALB/c libres de patógenos, de 6 a 8 semanas de edad (peso aproximado 22g), del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Todo el trabajo se realizó de acuerdo a los lineamientos de la Ley Orgánica de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos NOM 062-200-1999, y la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal (CICUAL) del INCMNSZ bajo el permiso gubernamental 224. Se realizó vigilancia diaria de los animales y ante la presencia de signos de insuficiencia respiratoria, caquexia acentuada o inmovilización total, se les indujo eutanasia por medio de la administración de pentobarbital (Nembutal, 400 mg/kg). Además, los ratones a los que se les realizó eutanasia programada para la obtención de muestras, fueron sometidos al desangramiento de la vena axilar por medio de una incisión realizada con tijeras quirúrgicas aunado a la administración de pentobarbital. Todos los protocolos, incluyendo los del manejo de ratones y de sus muestras se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad en instalaciones de nivel III de seguridad biológica.

7.1.1 Inducción de la Tuberculosis Pulmonar Experimental

Se prepararon cultivos bacterianos de la cepa de *Mtb.* referencia H37Rv (ATCC 25618) y del aislado multidrogoresistente (MDR) CIBIN-99 en la fase logarítmica de su curva de crecimiento y se indujo TB pulmonar experimental en los animales como se ha descrito anteriormente (Hernández-Pando, Orozcoe, Sampieri, Pavon, et al., 1996; Lai et al., 2016). Brevemente, las cepas de referencia fueron crecidas en medio selectivo 7H9 enriquecido con OADC (albúmina bovina, dextrosa, ácido oleico) y sometidas a pulsos de sonicación (CPX2800, Branson Ultrasonics, CT EUA) por 40 segundos para eliminar grumos. Los ratones fueron anestesiados previo a la inoculación en cajas con tapa acrílica mediante la inhalación de vapor de sevoflurano al 2% (Abbott Laboratories, IL, USA) en 2 litros de O₂. A continuación se inmovilizó a los ratones en un cartón de unicele cubierto de aluminio y se

les infectó mediante la instilación no invasiva (por vía oro-traqueal utilizando una cánula rígida de acero inoxidable [Thomas Scientific, Swedesboro, NJ] conectada a una jeringa de insulina) con 2.5×10^5 H37Rv *Mtb* o 3.25×10^4 MDR *Mtb* bacilos vivos resuspendidos en 100 μ l de solución salina isotónica estéril (Figura 6). Posteriormente, los ratones fueron agrupados en jaulas de cinco ratones equipadas con microaisladores y conectadas a presurizadores negativos dentro de una instalación de nivel III de bioseguridad animal.

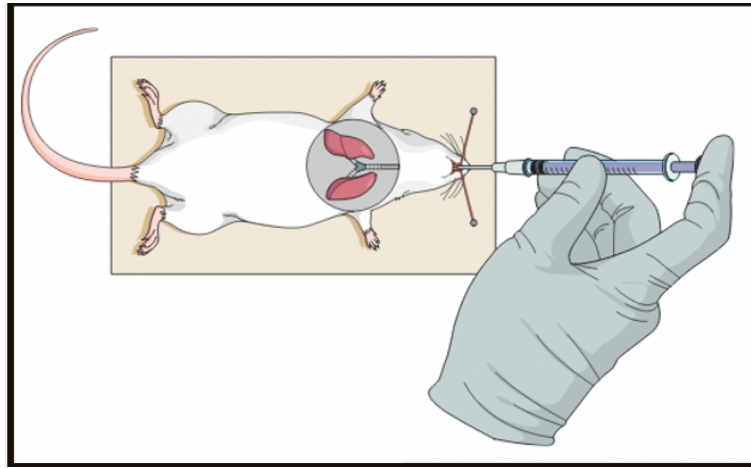


Figura 6. Inducción de la tuberculosis pulmonar experimental. Se muestra un esquema representativo de un ratón inmovilizado en una tabla de aluminio, siendo administrado de forma endotraqueal bacilos de *Mtb* resuspendidos en solución salina estéril, por medio de una cánula rígida de acero inoxidable conectada a una jeringa de insulina.

7.1.2 Cuantificación de Acetilcolina en Tejido Pulmonar por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Tras la extirpación de los ganglios linfáticos hiliares y del tejido tímico, se extrajeron los pulmones derechos de cuatro ratones 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días después de la infección con *Mtb* y se recopilaron en criotubos herméticos de 1.5 ml para su congelación inmediata en nitrógeno líquido. El almacenaje subsecuente de los pulmones hasta su procesamiento fue realizado en ultracongeladores a -80 grados centígrados. Para su procesamiento, los pulmones fueron homogenizados a 5500 RPM en el equipo Precellys 24 (Bertin Instruments, Rockville MD) usando el kit de lisado bacteriano CK01 (Bertin Corp,

Rockville MD). Las concentraciones de ACh y colina en los homogeneizados pulmonares se midieron mediante detección electroquímica por cromatografía líquida de alta eficiencia de intercambio catiónico (HPLC-EC) (Potter, Meek, & Neff, 1983). Brevemente, una columna analítica para ACh y colina (MF-6150; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN) y un reactor enzimático inmovilizado (Bioanalytical Systems) fueron acoplados en tándem al cromatógrafo (modelo 9012; Varian, Walnut Creek, CA) y conectados al detector electroquímico (Coulochem II; ESA, Chelmsford, MA). Para esta técnica, la fase móvil isocrática (50 mM de Tris/NaClO₄ más el reactivo ProClin al 1%, pH 8.5) se bombeó a una velocidad de 1 ml por minuto. Para la calibración se utilizaron las curvas estándar de ACh y colina (1-100 nM). El límite de detección del sistema fue de 0.1 nM para ambas moléculas usando 15 µl de la muestra. Los datos se almacenaron y analizaron utilizando un software de adquisición y análisis de datos (Star Chromatography Workstation v4.01, Varian). La ACh total se obtuvo sumando las concentraciones de ACh y colina y ajustándolas al contenido de proteínas (método de Bradford) y expresándolas como proteína mol/mg.

7.1.3 Detección de Elementos Colinérgicos por medio de Inmunohistoquímica

Pulmones izquierdos de cuatro animales 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días después de la infección con *Mtb* fueron perfundidos endotraquealmente con etanol absoluto, después del pinzamiento del bronquio derecho y embebidos en bloques de parafina. Se realizaron secciones de inmunohistoquímica de 5 µm de grosor, las cuales fueron montadas en laminillas electrocargadas recubiertas de silano, mismas que posteriormente fueron desparafinadas y rehidratadas. La recuperación del epítipo inducido por el calor se llevó a cabo utilizando una solución tampón de citrato de 0,01mol/L (pH 6.2) sumergiendo los portaobjetos durante 10 minutos en un baño de agua a 95 grados centígrados. La peroxidasa endógena fue neutralizada incubando las laminillas 20 minutos en bloqueador de peroxidasa (Bio SB, Santa Bárbara California). Posteriormente, los portaobjetos se dejaron incubando durante toda la noche en 200 µl de solución de bloqueo con anticuerpos policlonales de conejo anti-ratón [para la enzima ChAT (Santa Cruz, sc-20672, en una

dilución 1:250) y para la subunidad $\alpha 7$ del nAChR (Santa Cruz, sc-5544, en una dilución 1:100)]. Subsecuentemente, los portaobjetos fueron incubados durante 30 minutos con detector inmunológico de ratón/conejo (PolyDetector DAB, Bio SB). Finalmente, se reveló con diaminobencidina (1:100) y se realizó la contratinción de los cortes empleando hematoxilina de Weigert. El análisis histológico se efectuó empleando un microscopio de luz digital y su respectivo analizador de imágenes (Q-Win Leica 500, cámara Olympus DP70, Milton Keynes).

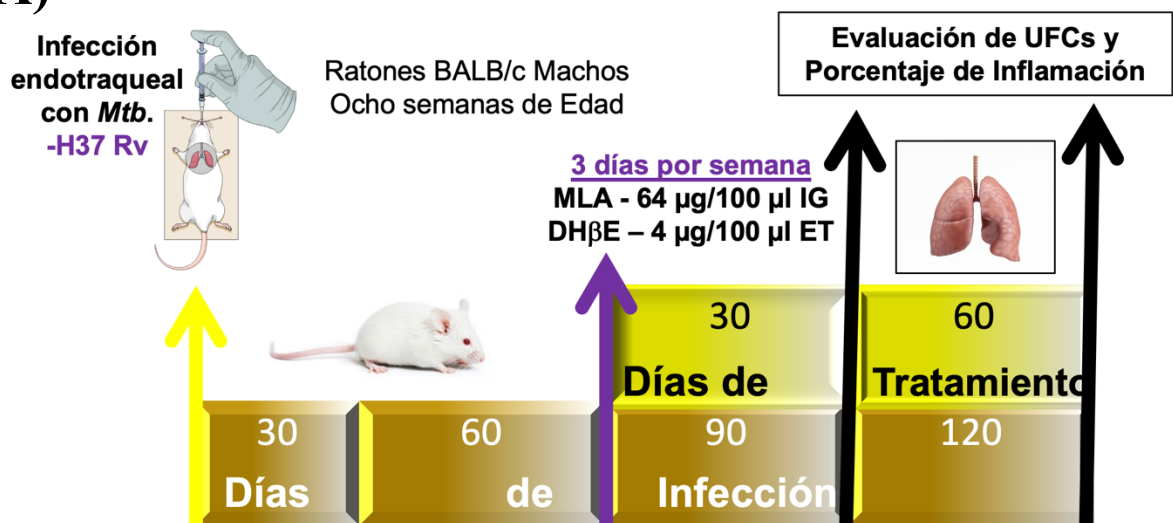
7.1.4 Experimentos de Administración Farmacológica de los Antagonistas Colinérgicos Metililcaconitina (MLA) y Dihidrobetaeritroidina (DH β E)

Tres grupos de seis ratones fueron infectados con *Mtb* H37Rv y recibieron tratamiento tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) por dos meses (Figura 7A). El primer grupo recibió la administración intragástrica (3 mg/kg) del antagonista del $\alpha 7$ nAChR, MLA (Sigma Aldrich, EUA). El segundo grupo recibió la administración endotraqueal, bajo anestesia con sevoflurane, del antagonista del nAChR, la dihidro-beta-eritroidina (DH β E, Tocris Bioscience - 0,19 mg/kg) [24]. La determinación de la dosis intratraqueal de DH β E se obtuvo utilizando el método de Akhila y otros [25]. Ambos tratamientos farmacológicos fueron resuspendidos en 100 μ l de solución salina isotónica estéril, preparados semanalmente y almacenados a 4 grados centígrados. El tercer grupo recibió 100 μ l de solución salina (vehículo) y sirvió como grupo de control. Los tratamientos comenzaron 60 días después de la infección y continuaron por un período de 60 días. La eutanasia se realizó a los 30 y 60 días después de haber iniciado el tratamiento. Se realizaron dos experimentos independientes.

Para determinar si los antagonistas del nAChR podían tener sinergia con el tratamiento antibiótico, los ratones infectados con una cepa MDR fueron tratados adicionalmente con un régimen ajustado recomendado por la OMS consistente en 1,1 mg/kg de amikacina (A, Sigma Aldrich), 0,55 mg/kg de etionamida (Et, Sigma Aldrich), 1,1 mg/kg de

moxifloxacin (M, Bayer) y 1,65 mg/kg de pirazinamida (Z, Sigma Aldrich) [26] (Figura 7B). El AEtMZ se administró diariamente durante cinco días por semana (de lunes a viernes) y sirvió como tratamiento exclusivo del grupo de control de ratones tratados con TB MDR. Todos los tratamientos farmacológicos recibidos por los ratones se suspendieron en 100 µl de solución salina isotónica estéril, preparada semanalmente y almacenada a 4 C. Los programas de tratamiento comenzaron 60 días después de la infección y continuaron durante un período de 60 días. Se realizaron dos experimentos independientes.

A)



B) Modelo de Tratamiento Durante la Fase Progresiva con Antibióticos

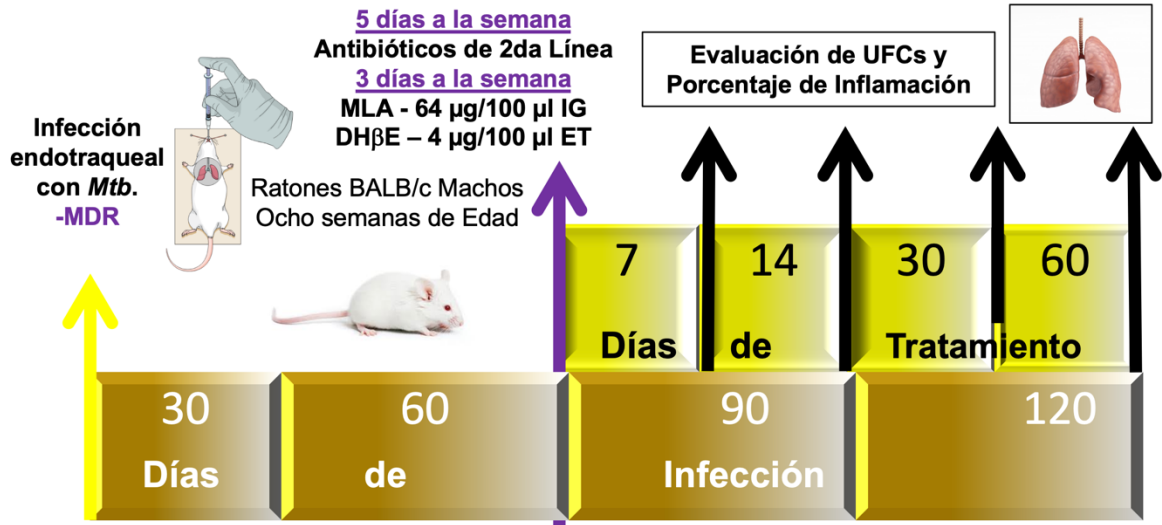


Figura 7. Representaciones esquemáticas del modelo experimental y la terapia con antagonistas nicotínicos. Esquema de tratamiento en el cual se administraron antagonistas nicotínicos en ratones infectados con la cepa drogossensible, H37 Rv (A). Esquema de tratamiento en el cual se administraron antagonistas aunados a antibióticos de segunda línea en ratones infectados con una cepa multidrogoresistente (MDR) (B). Las flechas amarillas señalan el inicio de la infección, las moradas el inicio del tratamiento, y las flechas negras los días en los que se llevaron a cabo las eutanasias.

7.1.5 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) en Pulmón

Se obtuvieron los pulmones derechos de los ratones en los días de eutanasia de ambos modelos de tratamiento para su almacenaje en criotubos herméticos de 1.5 ml y su congelación inmediata en nitrógeno líquido. Posteriormente, fueron almacenados en ultracongeladores a -80 grados centígrados hasta su procesamiento para la posterior medición de las UFC como se ha descrito anteriormente (Mata-espinoza, Barrios-payan, Herna, & Marquina-castillo, 2019; Veziris, Ibrahim, Lounis, Andries, & Jarlier, 2011;

Zetter et al., 2019). Brevemente, se colocó una perla de silicato de zirconio de bordes afilados y 1 ml de fosfato buffer-salino (PBS) + Tween 20 en cada criotubo. Posteriormente, cada tubo fue sometido a 3 ciclos de 20 segundos dentro de un homogeneizador de tejidos FastPrep (MP Biomedicals, EUA). Del homogenizado de cada pulmón, se tomaron 30 μ l para realizar diluciones decrecientes (1:10, 1:100 y 1:1000) en medio líquido 7H9. De cada dilución, así como de la muestra concentrada (1:1) se sembraron 10 μ l por duplicado en placas de Petri bacteriológicas estériles previamente preparadas con 15 ml de medio de cultivo sólido Middlebrook 7H10 (Difco Labs, Detroit, EUA) enriquecido con ácido oleico, albumina, catalasa y dextrosa (OADC, Difco Labs). Las placas fueron secadas y almacenadas en incubadoras térmicas a 37 grados centígrados, con 25% de humedad y una concentración de CO₂ del 3% por 21 días. Se realizaron cuentas de UFCs bajo un microscopio estereoscópico a los 10, 14 y 21 días de incubación. Las colonias con morfología algodonosa, características de *Mtb* fueron consideradas positivas. Se reportó el número de UFCs de cada pulmón por ratón, el cual fue obtenido multiplicando el conteo de las mismas por el factor de dilución y realizando un promedio entre replicados biológicos.

7.1.6 Preparación de Tejido Pulmonar para Análisis Morfométrico

Después de quitar los pulmones derechos para determinar la UFC, los pulmones izquierdos de 3 o 4 ratones de cada grupo de tratamiento de dos experimentos independientes se fijaron con 2 ml de etanol absoluto perfundido por la vía intratraqueal utilizando una jeringa de 5 ml después de pinzar el bronquio derecho. Posteriormente, dichos pulmones fueron removidos y luego fijados en 30 ml de etanol absoluto por 72 horas. Subsecuentemente, los pulmones fueron embebidos en bloques de parafina empleando un histokinette (HistoStar™, Thermo Scientific) y a partir de dichos bloques se realizaron cortes sagitales de 5 μ m de espesor. Los cortes fueron colocados sobre laminillas de vidrio y teñidos con hematoxilina y eosina para su análisis morfométrico. El estudio morfométrico de las laminillas empleó un microscopio de luz digital así como su respectivo analizador de

imágenes (Q-Win Leica 500, Milton Keynes, cámara Olympus DP70) y el análisis se realizó a partir de la conjunción de micrografías (tomadas con el objetivo 20x) de la sección pulmonar completa, que correspondía al 100% del área pulmonar. Posteriormente, se delimitaron y cuantificaron las áreas neumónicas (focos de consolidación de infiltrado rico en leucocitos en las paredes de las vías respiratorias y los espacios alveolares adyacentes) mediante un sistema histológico automatizado (Q-Win Leica 500). Por último, se determinó el porcentaje de la superficie pulmonar afectada por la neumonía. Las mediciones se realizaron a ciegas con respecto al tratamiento experimental al que pertenecía cada portaobjetos.

7.1.7 Detección de Transcritos (mRNA) y Cinética de Expresión de Citocinas en Pulmón por RT-qPCR

Para obtener el perfil de expresión, se realizó un análisis de detección de transcritos a partir del pulmón izquierdo de 3 o 4 ratones de cada grupo de tratamiento. Las muestras de los ratones evaluados fueron almacenadas en criotubos de 1.5 ml que contenían 1 ml de RLT plus, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido después de su obtención y almacenados posteriormente a -80 grados centígrados hasta su procesamiento. Cada muestra se homogenizó con perlas de zirconio y sílex (MP Biomedicals) en el equipo FastPrep-24™ por 3 ciclos de 20 segundos. La extracción del ARN fue llevada a cabo empleando el estuche comercial Rneasy Mini (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN fueron determinadas por espectrofotometría (espectrofotómetro EPOCH 2, A260/280). Posteriormente, 100 ng de ARN de cada pulmón fueron empleados para la producción de cDNA mediante transcripción reversa siguiendo las indicaciones del estuche comercial Omniscript (Qiagen). A partir del ADN complementario (cDNA) obtenido para cada muestra, se realizó PCR semicuantitativo de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR) con el instrumento PCR-RT 7500 (Applied Biosystems) y el estuche comercial Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen).

Para fines de este proyecto, se determinó la expresión de los transcritos de *iNOS*, *TNF- α* , *IFN- γ* e *IL-17A*, cuya secuencia de iniciadores se encuentra especificada en la Tabla 1. Los resultados fueron normalizados respecto al contenido de ARNm del gen constitutivo RPLP0 (secuencia de iniciadores especificada en la Tabla 1) de cada muestra. En la detección individual de cada gen se incluyó la curva estándar apropiada, además de dos controles negativos de transcripción reversa. Las condiciones de los ciclos utilizados fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 grados centígrados durante 15 minutos, seguida de 40 ciclos a 95 grados durante 20 segundos, 60 grados durante 20 segundos y 72 grados durante 34 segundos. El análisis de datos se calculó de acuerdo a la razón de cambio en la expresión génica utilizando la ecuación descrita por Livak (Schmittgen & Livak, 2008) y el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ ocupando un límite mínimo de detección de CT de 35 ciclos.

Tabla 1. Secuencias sentido y antisentido de los iniciadores utilizados para los análisis de PCR cuantitativo en tiempo real.

| Gen | Secuencia Sentido 5'-3' | Secuencia Antisentido 5'-3' |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------------|
| β -Actina | CTA AGG CCA ACC GTG AAA AGA | ACA ACA CAG CCT GGA TGG CTA |
| TNF- α | TCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC | TTG AGA TCC ATG CCG TTG G |
| IFN- γ | GGT GAC ATG AAA ATC CTG CAG | CCT CAA ACT TGG CAA TAC TCA TGA |
| IL-17A | CAC CAG CTG ATC AGG ACG CGC | GGA CCC CAA CAG CTG GAA TAG |
| iNOS | CAT TTC GCT GTC TCC CCAA | AGC GAG GAG CAG GTG GAAG |

7.2.0 Cultivo de Bacterias para los Ensayos *In Vitro*

Se prepararon cultivos bacterianos de la forma que ha sido descrita anteriormente (Hernández-Pando, Orozco, Sampieri, Pavon, et al., 1996; Lai et al., 2016). Brevemente, se tomaron hisopados de las cepas H37Ra, H37Rv (ATCC 25618), 5186 (Hernández-Pando, et al., 1996) y CIBIN-99 (Lai et al., 2016). Brevemente, se de *Mtb*, los cuales fueron cultivados en medio Middlebrook 7H9 (Difco Labs) complementado con 0.2% de glicerol y enriquecido con 10% de OADC y 0.02% de Tween-80 en agitación a 37 grados centígrados. Previo a su aplicación en los distintos ensayos, las bacterias fueron sometidas a pulsos de sonicación (sonicador CPX2800) por 40 segundos para eliminar grumos y el inóculo bacteriano se determinó mediante diluciones en serie empleando placas de agar 7H10 enriquecido con OADC (Difco Labs).

7.2.1 Ensayo de Concentración Mínima Proliferativa e Inhibitoria de *Mtb*

Estos ensayos se realizaron como se ha descrito anteriormente (Mata-espinosa et al., 2019). Brevemente, se colocaron 3×10^5 UFC (para el ensayo ACh) o 6×10^5 UFC (para el ensayo de antagonista nAChR) de la cepa H37 Rv de *Mtb*, que se encontraban en fase logarítmica media, en 100 μ l de medio 7H9 suplementado con OADC (Difco Labs) en pozos individuales dentro de una placa de 96 pozos. Se asignaron 3 pozos al grupo control, a los cuales se les agregó 200 μ l de medio 7H9. En contraparte, se asignaron grupos de 3 pozos a los que se les agregó 100 μ l de medio 7H9 con concentraciones graduales de ACh (Sigma-Aldrich) o cualquiera de los dos antagonistas de los nAChRs (DH β E y MLA) similares a las notificadas en reportes previos (Damaj, Welch, & Martin, 1995; Marrero et al., 2010; Ignaz Wessler et al., 1995). Adicionalmente, se añadió un grupo de 3 pozos a los que se les agregó isoniacida (INH) en su concentración inhibitoria mínima (0,5 μ g/ml) y un control con disolvente que contenía 10 μ l de solución salina y 90 μ l de medio 7H9. Finalmente, se agregó un grupo de 3 pozos que fue asignado como el control negativo, a los cuales solo se les agregó 300 μ l del medio 7H9 sin bacterias. Posteriormente, la placa fue colocada en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ a 37 grados centígrados durante 7 días. Cuatro horas antes del final del período de exposición, se agregaron 20 μ l del compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-5-3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) en solución acuosa (CellTiter 96, Promega, EUA) a cada pozo. El compuesto MTS es transformado al compuesto formazán por microorganismos metabólicamente activos (Figura 8). La conversión a formazán se rastreó por cuatro horas espectrofotométricamente a 492 nm (BioTek Instruments, ELX 800, USA) y se utilizó como medida indirecta de la cantidad de bacterias. Finalmente, se confirmó el número de bacterias contando las UFCs tomadas de 30 μ l de los pozos de control, además de los pozos expuestos a las concentraciones máximas y mínimas de ACh y realizando 4 diluciones seriadas en placas de agar 7H10 como se describió anteriormente.

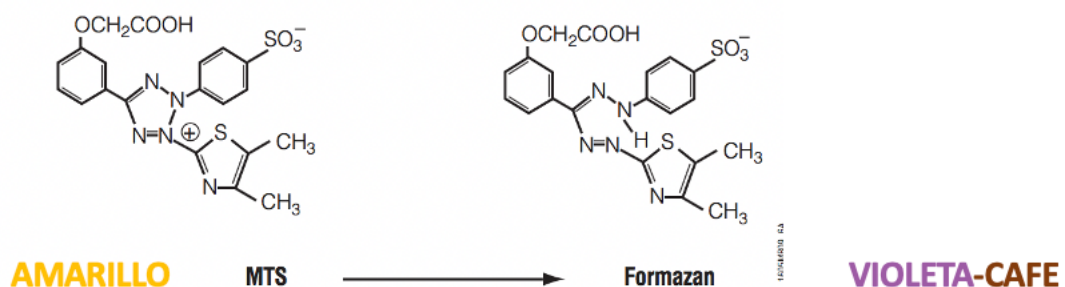


Figura 8. Reacción esquemática de la conversión de MTS a Formazán. Después de 4 horas de incubación, el MTS (o reactivo de Owen) es bioreducido por la actividad de deshidrogenasas provenientes de las enzimas NADH y NADPH que poseen las bacterias vivas pero no las muertas y genera como producto el formazán, el cual posee una mayor densidad óptica. Tomado de Cell Viability Assays, (Riss et al., 2004).

7.2.2 Preparación de Sobrenadantes y Lisados Bacterianos para el Ensayo Colorimétrico

Para los ensayos colorimétricos, se tomaron 9×10^5 UFCs de la cepa H37 Rv (ATCC 25618), a los 2, 10 y 18 días de iniciación del cultivo para representar las fases de crecimiento retardado, logarítmico y estacionario respectivamente. Las UFCs se diluyeron en 600 μ l de medio 7H9, se centrifugaron a $28,530 \times g$ durante 2 minutos a 4 grados centígrados y sus sobrenadantes fueron recuperados y mantenidos en hielo. El pellet bacteriano restante fue complementado con 500 μ l del buffer de ensayo del equipo de ensayo colorimétrico de ACh (Abcam, ab65345) y expuesto a tres ciclos de homogenización de 20 segundos a 5500 RPM (Precellys 24) usando el equipo de lisado bacteriano CK01 (Bertin Corp.). Después, las muestras fueron centrifugadas a $28,530 \times g$ durante 2 minutos a 4 grados centígrados y los sobrenadantes del lisado bacteriano fueron recogidos para su mantenimiento en hielo.

7.2.3 Ensayo de Fagocitosis de *Mtb* en Cultivos Celulares de Macrófagos Alveolares Murinos (MH-S)

Los ensayos se realizaron como se describió anteriormente (Zetter et al., 2019). Brevemente, los macrófagos alveolares murinos BALB/c (línea celular MHS, ATCC CRL-2019) se incubaron durante 2 horas en pozos triplicados (6×10^4 células por pozo) que contenían 200 μ l de medio RPMI complementado con suero bovino fetal dentro de una placa de 96 pozos sin *Mtb* (control negativo) o a una multiplicidad de infección (MOI) de 5:1 con la cepa H37Rv (ATCC 25618) inactivada por calor, así como con las cepas vivas de *Mtb* H37Ra, H37Rv (ATCC 25618) y 5186 (Marquina-Castillo et al., 2009).

7.2.4 Preparación de Sobrenadantes y Lisados Celulares para el Ensayo Colorimétrico

Posterior al ensayo de fagocitosis, se retiraron los sobrenadantes de los pozos de la placa de 96 y se realizaron tres lavados con RPMI libre de suero bovino fetal complementado con estreptomycin al 1% y un lavado con PBS. Subsecuentemente, las células se incubaron con 200 μ l de RPMI libre de suero bovino fetal durante dos horas en una incubadora a 37 grados centígrados con las condiciones de O₂ y CO₂ mencionadas anteriormente. A continuación se recogió el contenido del pozo y las células MH-S se lisaron mediante pipeteo, después de haber añadido el tampón de ensayo y se centrifugaron posteriormente a 25.830 x g durante 2 minutos a 4 C para recuperar los sobrenadantes. Los sobrenadantes se recogieron más tarde y se mantuvieron en hielo y se realizó un análisis posterior de UFC como medida de control.

7.2.5 Determinación de la Concentración de Acetilcolina por Análisis Colorimétrico

Se siguieron las instrucciones del kit de ensayo de ACh colorimétrica (Abcam, ab65345). Brevemente, los estándares, la sonda de colina, la solución de acetilcolinesterasa y la mezcla de enzimas de colina se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se llenaron pozos por cuadruplicado con 50 μ l

que contenían: la curva estándar, medio 7H9 que sirvió como blanco, los sobrenadantes celulares, así como los sobrenadantes y lisados bacterianos obtenidos previamente. A la mitad de estos pozos se les agregó 2 µl de solución con acetilcolinesterasa y a la otra mitad no, para determinar los valores de colina total y libre respectivamente. A continuación, se añadieron 50 µl de la mezcla de reacción a cada pozo y la placa se dejó incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos, protegida de la luz. Posteriormente se hizo una lectura colorimétrica a una densidad óptica de 570 nm y se extrapolaron los valores empleando la curva estándar y la siguiente ecuación para determinar la concentración de cada muestra: acetilcolina = colina total – colina libre.

7.2.6 Aislamiento de monocitos a partir de la capa leucocitaria

Los ensayos se realizaron en la Academia de Medicina de Buenos Aires en Argentina como se describió anteriormente (Zwerdling et al., 2008). Brevemente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas a partir de paquetes de sangre tomados de donadores sanos, mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, NJ, EUA). Después, se purificaron monocitos a partir de los PBMCs utilizando un gradiente de Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences) y se resuspendieron en medio estándar. Por medio de citometría de flujo se determinó que la pureza de los monocitos aislados (CD14⁺) fue mayor del 80%. Además, la viabilidad celular fue mayor del 95% en todos los experimentos, de acuerdo a la prueba de exclusión del azul de tripano.

7.2.7 Diferenciación y Polarización de Macrófagos Derivados de Monocitos Humanos

Los ensayos se realizaron en la Academia de Medicina de Buenos Aires, Argentina, como se ha descrito anteriormente (Genoula et al., 2018; Zwerdling et al., 2008). Brevemente, 5 x 10⁵ monocitos/pozo previamente aislados fueron incubados por 2 horas en de RPMI sin suero fetal bovino en una placa completa de 24 pozos bajo condiciones de humidificación,

a 37 grados centígrados y bajo 5% de CO₂ para permitir su adherencia. Subsecuentemente, el medio celular fue reemplazado por RPMI 1640 (10% FBS, 1 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina; PeptoTech) con 10 ng/ml del factor recombinante estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en 6 pozos y de macrófagos (M-CSF) (Laboratorios Gautier, Uruguay) en doce pozos. Las células se incubaron en estos medios por 5 días (con reemplazo por nuevos medios a los 3 días de haber iniciado su incubación) bajo las mismas condiciones para permitir su diferenciación hacia macrófagos del subtipo M1 o M2 respectivamente. Posteriormente, el medio de los macrófagos previamente tratados con GM-CSF fue reemplazado por medio suplementado con IFN- γ (200 U/ml) y se continuó la incubación por 2 días bajo las mismas condiciones para completar su inducción hacia macrófagos de tipo M1. Por otra parte, al termino de 5 días, se reemplazó el medio de los macrófagos M2 por medio suplementado con 20 ng/ml de interleucina recombinante (IL)-4 o 10 ng/ml de IL-10 (PeptoTech, NJ EUA) y se continuó su incubación por 2 días para inducirlos hacia el subtipo macrofágico M2a o M2c respectivamente (Figura 9).

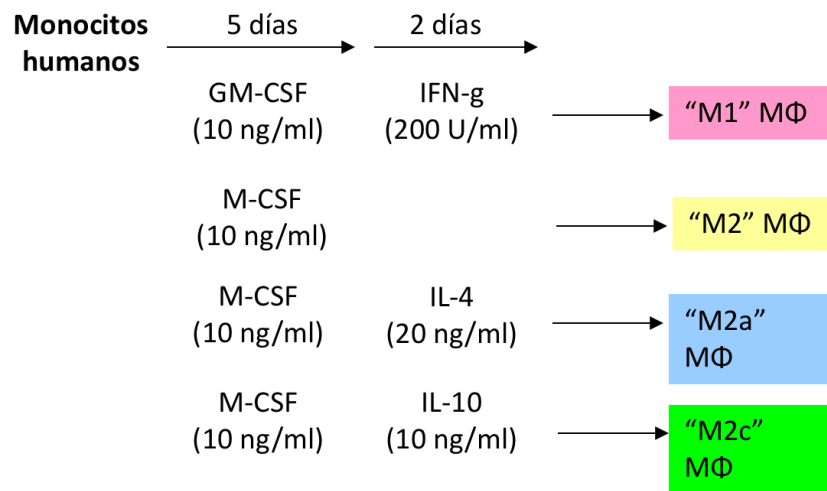


Figura 9. Metodología para diferenciar monocitos humanos hacia distintos subtipos de macrófagos. Los monocitos fueron incubados por 5 días con GM-CSF o M-CSF para diferenciarlos hacia macrófagos del subtipo M1 o M2 respectivamente. Posteriormente, los monocitos previamente tratados con GM-CSF fueron incubados por dos días con IFN- γ para completar su inducción a macrófagos tipo M1. De forma similar, los monocitos

tratados con M-CSF fueron incubados con IL-4 o IL-10 por dos días para inducirlos hacia el subtipo macrofágico M2a o M2c respectivamente.

7.2.8 Medición de la Subunidad $\alpha 7$ del Receptor Nicotínico $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) en Diferentes Subtipos de Macrófagos por Citometría de Flujo.

Los ensayos se realizaron en la Academia de Medicina de Buenos Aires, Argentina, como se ha descrito anteriormente (Genoula et al., 2018). Brevemente, se recolectaron en 100 μ L de PBS (+ 5% estándar de citometría de flujo) por centrifugación 1×10^6 células de cada subtipo macrofágico (M1, M2a, M2b y M2c) previamente diferenciadas. La suspensión celular se lavó con 1 mL de tampón de tinción (Thermo Fisher Scientific) y 200 μ L de solución de paraformaldehído al uno por ciento. Posteriormente, las células fueron resuspendidas y luego fueron incubadas a 37 grados centígrados durante 30 minutos en oscuridad con 10 μ L del anticuerpo primario para la subunidad $\alpha 7$ del nAChR conjugado a ficoeritrina (Santa Cruz Biotechnology, Sc-58607-PE). Posteriormente, al menos 1×10^4 células de cada grupo celular fueron analizadas empleando un citómetro de flujo Accuri™ C6 (Becton Dickinson, NJ EUA) y los datos se expresaron utilizando el valor de intensidad media de fluorescencia (IMF). Con el fin de controlar para la autofluorescencia, los valores de la IMF del nAChR $\alpha 7$ fueron corregidos restando los valores de la IMF del FL2 derivados del análisis de las células no marcadas por el anticuerpo. Cada grupo experimental se conformó de tres replicados biológicos y el experimento se realizó por duplicado.

7.2.9 Medición del Factor de Necrosis Tumoral en Sobrenadantes de Distintos Subtipos de Macrófagos Expuestos a Acetilcolina

Los ensayos de infección se realizaron en el BSL-3 de la Unidad 195 Operativa Centro de Contención Biológica ANLIS-Malbrán de acuerdo con las directrices institucionales, mientras que los ensayos de medición por ELISA se realizaron en la Academia de Medicina de Buenos Aires, Argentina, como se ha descrito anteriormente (Colado et al., 2018). Brevemente, en una placa de 96 pozos de fondo plano, los macrófagos (4×10^4 células por pozo) fueron pretratados con vehículo (solución salina) o distintas dosis (10^{-2} a 10^{-6} molar) de cloruro de ACh (Sigma Aldrich) durante 30 minutos y después fueron expuestos a 10^8 UFCs de *Mtb* irradiada. Para los ensayos se empleó la cepa H37Rv de *Mtb* (NR-49098) (BEI Resources, MD EUA) la cual fue irradiada con rayos gamma y la infección se llevó a una MOI equivalente a dos. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados 24 horas después de la infección y la secreción de TNF- α fue determinada por el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y empleando anticuerpos de captura (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). La lectura del ELISA se realizó a 450/570 nm y los valores se determinaron empleando una curva estándar y utilizando un límite de detección para TNF- α de 2 pg/ml. Cada grupo experimental se conformó por tres replicados biológicos y el ensayo se realizó por duplicado.

7.3.0 Análisis Estadístico

En los ensayos cromatográficos, colorimétricos y de citometría de flujo, los valores numéricos fueron graficados en barras expresando la media \pm el error estándar de la media (SEM) y se empleó la prueba de análisis unidireccional de la varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. En los ensayos de carga bacilar, inflamación y transcripción de moléculas inflamatorias pulmonares, los valores numéricos fueron graficados como puntos individuales expresando la mediana \pm el rango intercuartílico (IQR) y se empleó la prueba de Kruskal-Wallis con la comparación múltiple de Dunn. Además, se empleó un ajuste logarítmico a escala de log₁₀ para las gráficas de

carga bacilar pulmonar. Para el análisis estadístico de la sobrevida se emplearon las pruebas de Mantel-Cox, de Logrank y de Gehan-Breslow. Todas las pruebas se realizaron utilizando el GraphPad Prism Software, Inc. (versión 8.0, La Jolla, EE.UU.). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando *P<0.05; **P< 0.01; ***P<0.001 ****P<.0001 (CI:95%).

8. Resultados

Apartado I:

Dinámica de Expresión y Manipulación del Sistema Colinérgico Durante el Curso de la Tuberculosis Pulmonar Experimental

8.1.1 Cinética de Producción de Acetilcolina en pulmón Durante el Curso de la Tuberculosis Pulmonar.

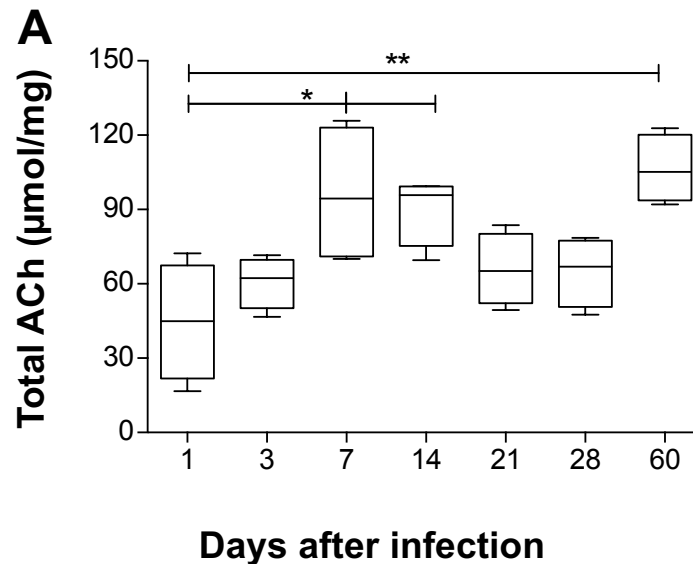
Para registrar las concentraciones de ACh pulmonar durante la TB experimental y determinar si estas variaban durante el curso de la enfermedad, los pulmones de ratón de días representativos de la cinética experimental se sometieron a un análisis por HPLC

(Figura 10A). Importantemente, se detectó ACh en pulmones de los ratones desde la etapa inicial de la enfermedad, así como durante la progresión de la misma. La concentración pulmonar de ACh obtenida durante el primer día posterior a la infección registró un valor medio de 45 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, la concentración de ACh más baja reportada en toda la cinética. Este valor por lo tanto, fue empleado como un valor control con el que se compararon el resto de las concentraciones pulmonares de ACh registradas. El análisis de comparación reveló un incremento de aproximadamente el doble en los valores registrados de las concentraciones de ACh pulmonar, 7 y 14 días después de la infección, que reportaron un valor promedio de 93 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, ($P < 0.05$). Importantemente, la concentración más alta de ACh (106 $\mu\text{mol}/\text{mg}$) se observó 60 días después de la infección ($P < 0.01$). Por lo tanto, aunque las concentraciones de ACh fueron medibles durante toda la cinética de infección de TB, se mostraron dos etapas de mayor expresión. La primera de estas etapas tuvo lugar durante la infección temprana (días 7 y 14) y la segunda que expresó la concentración más alta de ACh, ocurrió durante la enfermedad tardía (día 60). Es relevante mencionar que precisamente en esta última etapa, se observan los cambios histopatológicos responsables de la muerte en el modelo animal: edema alveolar en conjunto con alveolitis, extensión de infiltrado inflamatorio y neumonía.

8.1.2 Cinética de Expresión de la Enzima Colina Acetiltransferasa (ChAT) y del Receptor Nicotínico alfa-7 ($\alpha 7$ nAChR) en Células Pulmonares del Modelo Experimental

Para conocer la dinámica de expresión pulmonar de la enzima ChAT y de la subunidad $\alpha 7$ nAChR durante las etapas de elevación de ACh en vías aéreas en la infección temprana (días 7 y 14) y tardía (día 60) se estudiaron secciones de tejido pulmonar por inmunohistoquímica (Figura 10B-E). Ratones que no habían sido inoculados intratraquealmente con *Mtb* fungieron como controles. El análisis inmunohistoquímico del tejido de ratones no infectados no mostró tinción para la enzima ChAT o para la subunidad $\alpha 7$ nAChR (Figura 11). Estos hallazgos son congruentes con los reportes de ausencia de tono colinérgico en ratones BALB/c sanos (Larcombe et al., 2008). Además, son también congruentes con la hipótesis planteada en esta tesis indicando que la expresión de elementos colinérgicos en vías aéreas es inducida por el bacilo durante la progresión de la infección. En contraste con los ratones no infectados, 7 días posterior a su infección con *Mtb*, el tejido pulmonar de ratones mostró células morfológicamente definidas como células epiteliales bronquiales, así como escasos macrófagos alveolares con una inmunotinción intensa para la enzima ChAT (Figura 10B). Posterior a dos semanas de infección, el epitelio de las vías respiratorias perdió la inmunotinción para la enzima ChAT. Sin embargo, macrófagos alveolares dispersos y macrófagos incluidos en granulomas tempranos infrecuentes comenzaron a exhibir una intensa inmunotinción para la enzima ChAT (Figura 10C). En este mismo periodo de la enfermedad, macrófagos alveolares e intersticiales mostraron inmunotinción intracelular para la subunidad $\alpha 7$ nAChR (Figuras 10E, F). En contraste, durante la enfermedad tardía (60 días después de la infección), diversos granulomas y particularmente parches neumónicos expresaron una intensa y generalizada inmunotinción para la enzima ChAT (Figura 10D). Similarmente, durante la misma etapa, linfocitos pulmonares y macrófagos vacuolados (espumosos) expresaron un intenso inmunomarcaje de forma generalizada para la subunidad $\alpha 7$ nAChR (Figura 10G). Estos hallazgos reflejan una expresión importante de la enzima ChAT y de la subunidad $\alpha 7$ nAChR en las etapas de mayor elevación de ACh, lo que sugiere que la ACh pulmonar estaría siendo sintetizada por la enzima ChAT y que se estaría uniendo al $\alpha 7$ nAChR. Asimismo, las micrografías demuestran que las células del sistema inmunológico pulmonares son las que mayoritariamente expresan estos elementos colinérgicos, lo cual es

congruente con la hipótesis planteada en esta tesis, en la que el sistema colinérgico modula la actividad inmunológica durante la enfermedad. Es interesante también notar que la expresión de ChAT en etapas muy tempranas de la enfermedad es muy marcada en células epiteliales bronquiales, y es probable que esto se deba a que en etapas iniciales de la enfermedad, aún no se ha generado un reclutamiento importante de células inmunológicas al pulmón.



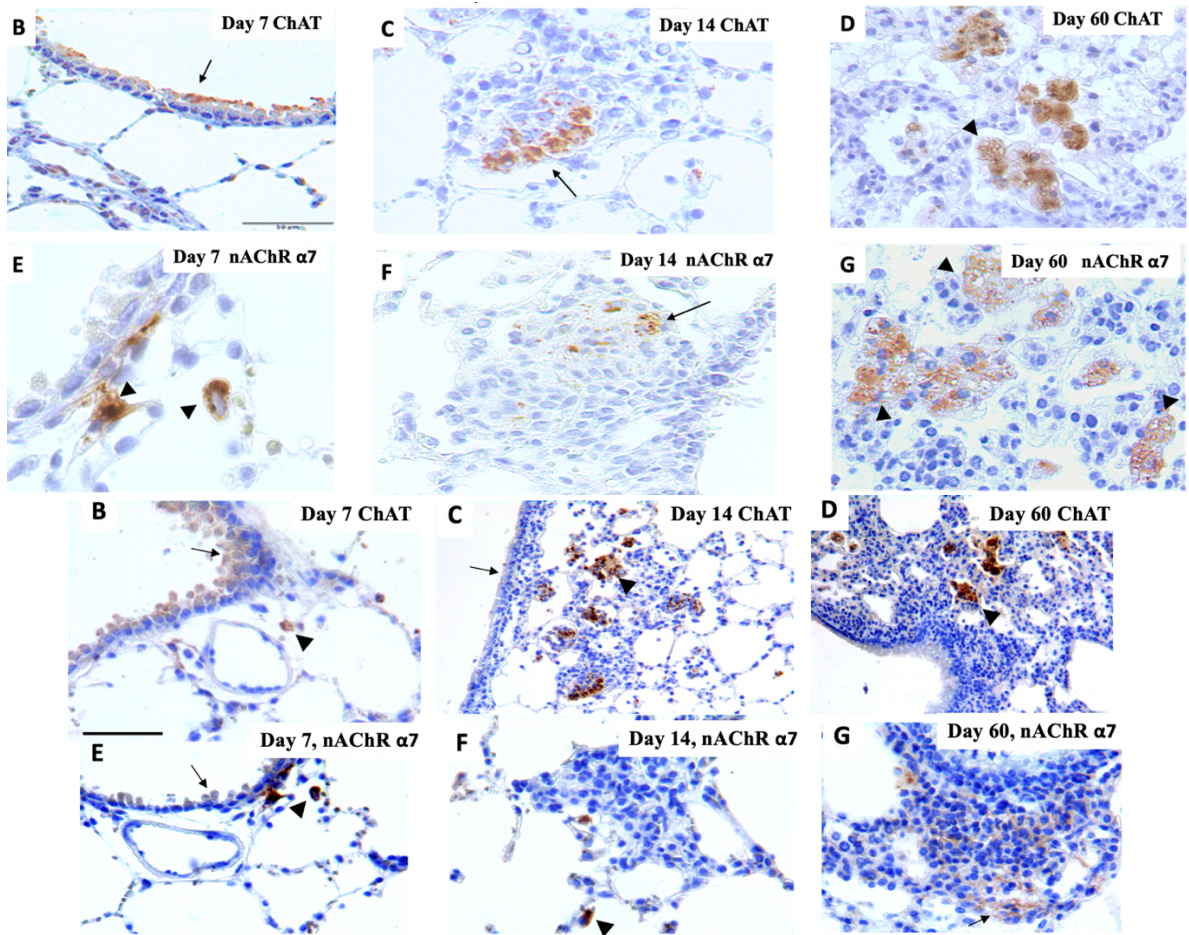


Figura 10. Cinética de expresión de acetilcolina, la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico ($\alpha 7$ nAChR) en pulmón durante el curso de la tuberculosis (TB) pulmonar. Cinética de ACh, ChAT y la subunidad $\alpha 7$ nAChR durante la TB pulmonar. Cinética de la cuantificación de ACh determinada por HPLC en pares de pulmones de ratones BALB/c infectados con la cepa H37Rv de *Mtb* (diagrama de caja y bigote de ACh) (A). Las líneas negras horizontales dentro de las cajas representan la mediana, mientras que los límites inferiores y superiores representan el percentil 25 y 75 respectivamente. Los límites superiores e inferiores se extienden correspondientemente desde la caja hacia los valores máximo y mínimo ($n = 4$ ratones por punto temporal/grupo). Se utilizó el ANOVA unidireccional con la post-prueba de Bonferroni para las comparaciones múltiples utilizando los pulmones de los ratones del día 1 como grupo de control. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). Micrografías inmunohistoquímicas representativas que detectan la enzima ChAT y la subunidad nAChR $\alpha 7$ (B-G). Las secciones representativas se muestran con un objetivo 40x; barra, 50 μm . En el día 7 después de la infección, hay una leve inmunotinción de ChAT en el epitelio bronquial (flecha) (B). Dos semanas después de la infección, los nódulos organizados constituidos por células inflamatorias que corresponden a granulomas mostraron algunas células que exhiben inmunotinción para la enzima ChAT (flecha) (C). Después de 60 días de la infección, macrófagos ocasionales con vacuolas citoplasmáticas localizadas en áreas neumónicas muestran una fuerte inmunotinción ChAT (punta de flecha) (D). Después de una semana de infección, algunos macrófagos exhiben una intensa inmunotinción (punta de flecha) de la subunidad $\alpha 7$ nAChR (E). Dos semanas después de la infección, algunas células de un granuloma

muestran una inmunotinción para la subunidad $\alpha 7$ nAChR (flecha) (F). Después de 60 días de la infección, numerosos macrófagos y linfocitos vacuolados localizados en parches neumónicos muestran inmunotinción para la subunidad $\alpha 7$ nAChR (puntas de flecha) (G).

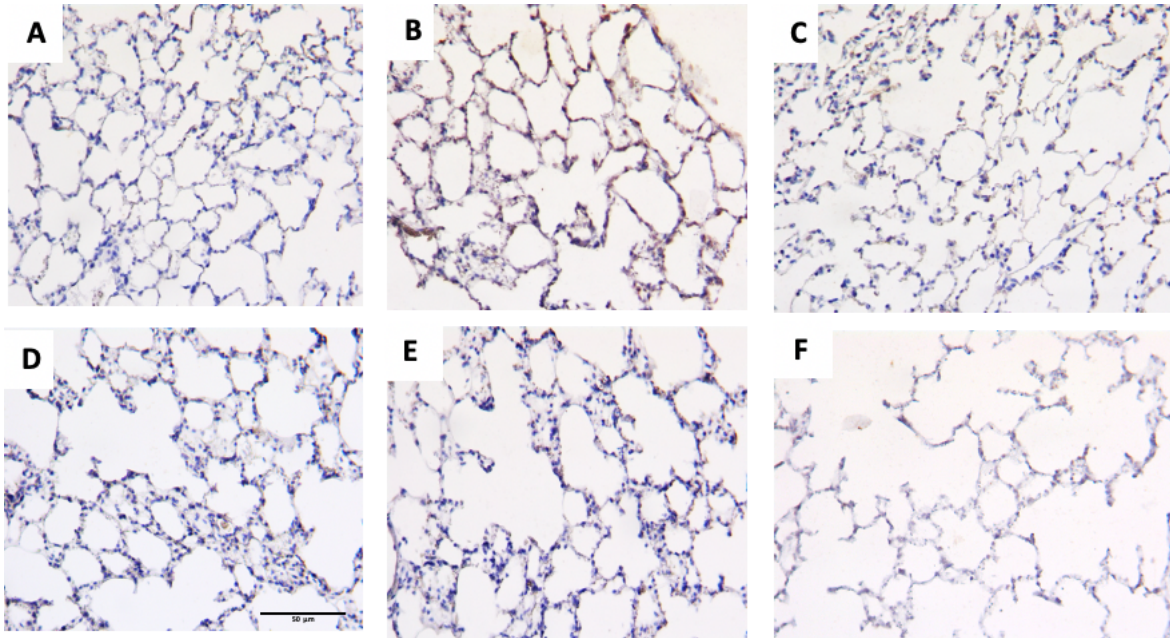


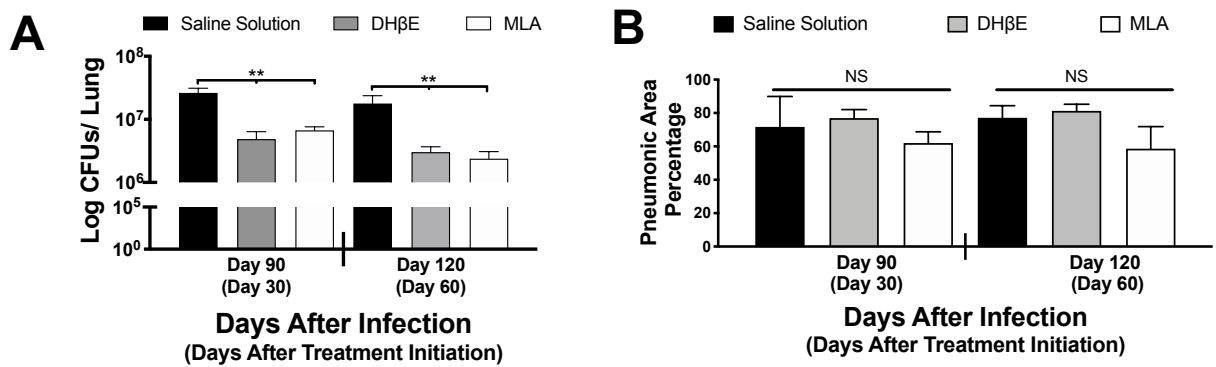
Figura 11. Cinética de expresión pulmonar de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico ($\alpha 7$ nAChR) en ratones no infectados. Micrografías de inmunohistoquímicas representativas que detectan la enzima ChAT y la subunidad nAChR $\alpha 7$ en tejido pulmonar de ratones no infectados, pareados por edad con los ratones de la cinética de infección. Las secciones representativas se muestran con un objetivo 40x; barra, 50 μm . El tejido pulmonar de ratones no infectados pareados con los ratones de la cinética 7 (A y D) 14 (B y E) y 60 (C y F) días después de la infección, no mostró inmunotinción para ChAT o para la subunidad nAChR $\alpha 7$ respectivamente.

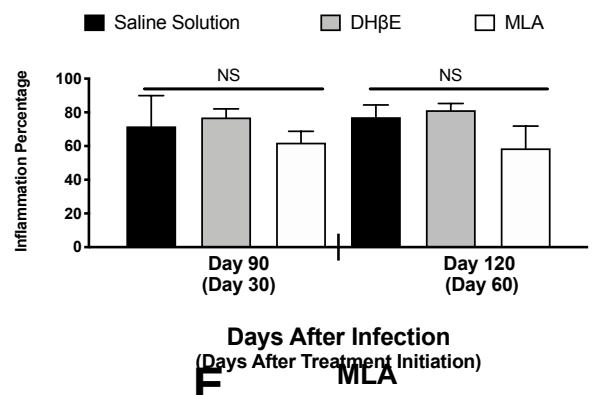
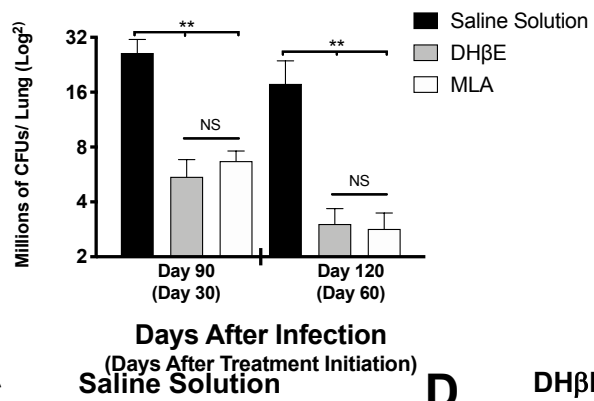
8.2.1 El Tratamiento con Antagonistas Nicotínicos Durante la Fase Progresiva del Modelo Experimental Reduce la Carga Bacilar Pulmonar pero no la Inflamación Pulmonar

Para explorar el efecto de la administración de los antagonistas de los nAChRs en la carga bacteriana e inflamación pulmonar en el modelo experimental durante la fase progresiva de la enfermedad, los antagonistas nicotínicos MLA (3 mg/kg IG, líneas verdes) y DH β E (0.19 mg/Kg IT, líneas rojas) se administraron 3 veces por semana (Lu/Mi/Vi) a partir del día 60 posinfección y se continuó el tratamiento hasta el día 120 posinfección. Se optó por administrar los antagonistas de los nAChRs durante la fase progresiva de la enfermedad debido a que como se mostró anteriormente, los elementos del sistema colinérgico alcanzaron una mayor expresión durante esta fase de la enfermedad. Desde el día 30 de tratamiento (90 posinfección), el tratamiento con los antagonistas nicotínicos resultó en una marcada disminución en la carga bacilar y esta tendencia se volvió a observar en el día 60 de tratamiento (120 posinfección). En comparación con el grupo control que sólo recibió tratamiento con el vehículo, la administración de MLA y DH β E produjo una reducción de aproximadamente un logaritmo en la carga bacilar de los pulmones de los ratones tratados (Figura 12A).

Además de la carga bacilar, como se ha mencionado previamente, uno de los puntos más sobresalientes de la TB pulmonar es el daño significativo al parénquima pulmonar generado por el sistema inmunológico (Rook & Hernandez-Pando, 1996; B. M. Saunders & Britton, 2007). Entre los efectos inmunopatológicos, se encuentran la formación de áreas neumónicas, caracterizadas por la salida de material proteínico hialino hacia la luz de los alvéolos, la cual generalmente es acompañada de infiltrado de células mononucleares y macrófagos en los espacios alveolares, así como del engrosamiento del intersticio alveolo-capilar generado por infiltrado inflamatorio (Arriaga et al., 2002). Al igual que el grupo control, la administración de MLA y DH β E resultó en la presencia de inflamación pulmonar importante y no hubo diferencias significativas en el porcentaje de inflamación pulmonar entre estos tres grupos (Figura 12B-E). Sin embargo, a pesar de que los grupos experimentales que recibieron los tres tratamientos cursaron con niveles notables de inflamación pulmonar, es probable que el influjo de células del sistema inmunológico al pulmón generado por la administración de los antagonistas nicotínicos haya sido de un perfil de diferenciación distinto al del grupo control. Esto es debido a que en los ratones que recibieron los antagonistas, pero no en los que los ratones que recibieron solución

salina, se observó una disminución importante de las UFCs pulmonares. Alternativamente, los antagonistas nicotínicos podrían haber inhibido directamente la proliferación de la bacteria y por un segundo mecanismo, favorecer el incremento de la inflamación a nivel local.





C

Days After Infection (Days After Treatment Initiation)
Saline Solution



D

DHβE



E

MLA

Figura 12. El tratamiento con antagonistas nicotínicos no reduce el porcentaje de inflamación pulmonar. La administración de antagonistas del nAChR durante la TB pulmonar tardía generada por *Mtb* H37Rv, reduce la carga bacilar pulmonar pero no la neumonía. Después de 60 días de infección con la cepa de *Mtb* H37Rv BALB/c los ratones recibieron solución salina (ratones de control, barras negras) o un antagonista de nAChR (dihidro-beta-eritroidina [DH β E] barras grises o metililcaconitina [MLA] barras blancas). Después de 30 y 60 días de iniciado el tratamiento, la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) determinó la carga de bacilos en los pulmones (A). Porcentaje de áreas neumónicas de los pulmones infectados por ratones determinado por morfometría automatizada (B). Reconstrucción automatizada de los pulmones infectados después de 60 días de tratamiento con solución salina (C), DH β E (D) o MLA (E). Los gráficos representan los datos agrupados de dos experimentos (N = 7 ratones) y los grupos individuales muestran la mediana + el rango intercuartílico en cada punto temporal. Las pruebas de significación se hicieron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con la comparación múltiple de Dunn. NS se refiere a la diferencia no significativa entre los grupos (*P < 0.05, **P < 0.01).

8.2.2 El Tratamiento con Antagonistas Nicotínicos Durante la Fase Progresiva del Modelo Experimental Incrementa la Expresión de los Transcritos Pulmonares de Moléculas Asociadas con la Respuesta Inmune Celular

Tomando en cuenta los antecedentes de la literatura científica previamente descritos, se esperaba que la administración de los antagonistas nicotínicos generara un efecto inmunomodulador que favoreciera la inducción de una respuesta inmune de tipo celular a nivel pulmonar. Para verificar si efectivamente ocurría un efecto inmunomodulador tras la administración de los antagonistas de nAChR durante la TB pulmonar, se tomaron muestras pulmonares de ratones tratados con el antagonista $\alpha 4\beta 2$, DH β E, 60 días después de la infección. En comparación con el grupo control, las transcripciones moleculares

pulmonares de las citocinas Th1 TNF- α e IFN- γ y de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), aumentaron más de dos veces, 60 días después del inicio del tratamiento (Figura 13 A-C) Además, la administración del DH β E potenció la transcripción del ARNm de IL-17A en los pulmones, aproximadamente cinco veces (P <0.001) durante el mismo período de tiempo (Figura 13D). Con esto se comprobó que el antagonismo de los nAChRs a nivel pulmonar si generaba un efecto inmunomodulador, respecto a la transcripción de moléculas asociadas con la inducción de la respuesta inmune de tipo celular.

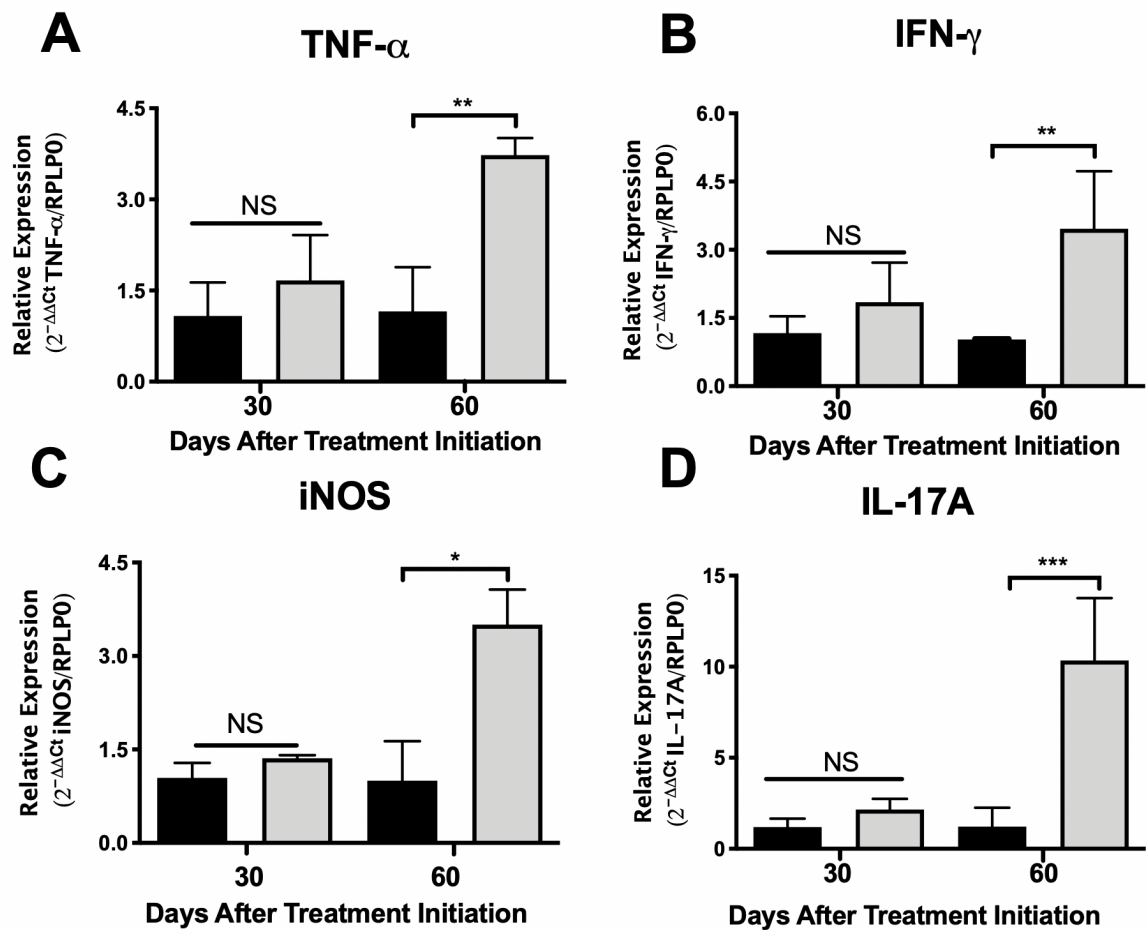


Figura 13. La administración de dihidro-beta-eritroidina (DH β E) durante la fase progresiva de la tuberculosis (TB) pulmonar experimental aumenta la transcripción

de los mediadores proinflamatorios pulmonares. Después de 60 días de infección con la cepa H37Rv de *Mtb*, se trató a grupos de ratones BALB/c con solución salina (ratones control, barras negras) o DH β E, un antagonista del nAChR, barras grises. Después de 90 y 120 días de infección, se cuantificó la expresión génica indicada de las moléculas proinflamatorias TNF- α (**A**), IFN- γ (**B**), iNOS (**C**), e IL-17A (**D**) en los pulmones mediante RT-PCR. Los gráficos representan los datos agrupados de dos experimentos (N = 7 ratones) y los grupos individuales muestran la media + el rango intercuartílico en cada punto temporal. Las pruebas de significación se hicieron usando la prueba de Kruskal-Wallis con la comparación múltiple de Dunn. NS se refiere a una diferencia no significativa entre los grupos (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

8.2.3 Efectos en la Sobrevida Posterior a la Administración de Antagonistas Nicotínicos Durante la Progresión de la Tuberculosis Pulmonar.

En el modelo experimental aproximadamente a partir de los 60 días de infección, en la etapa avanzada de la fase progresiva de la enfermedad, los cambios inmunopatológicos incluyendo la neumonía y fibrosis extensa, llevan a la muerte de un porcentaje importante de los animales. Dado que los antagonistas nicotínicos administrados disminuyeron la cantidad de bacterias pulmonares en el modelo animal, se realizó el análisis de la sobrevida para determinar si la disminución de la cuenta bacilar tenía un impacto en ella. La administración de los antagonistas de los nAChRs no tuvo un impacto significativo en la sobrevida de los animales (Figura 14). Esto no resulta sorprendente, ya que previamente se mostró como la administración de ambos antagonistas tampoco alteró el porcentaje de inflamación e incluso se mostró que el tratamiento con DH β E incrementó la transcripción de moléculas proinflamatorias a nivel pulmonar. Este incremento en moléculas y células inflamatorias a nivel pulmonar es probablemente responsable de la disminución de las UFCs pulmonares pero también del ligero incremento en la mortalidad de estos ratones, comparado con el tratamiento control.

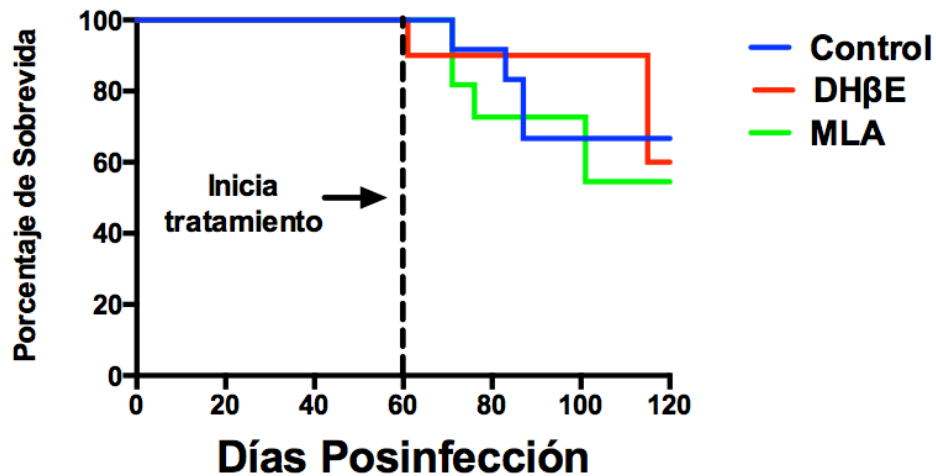


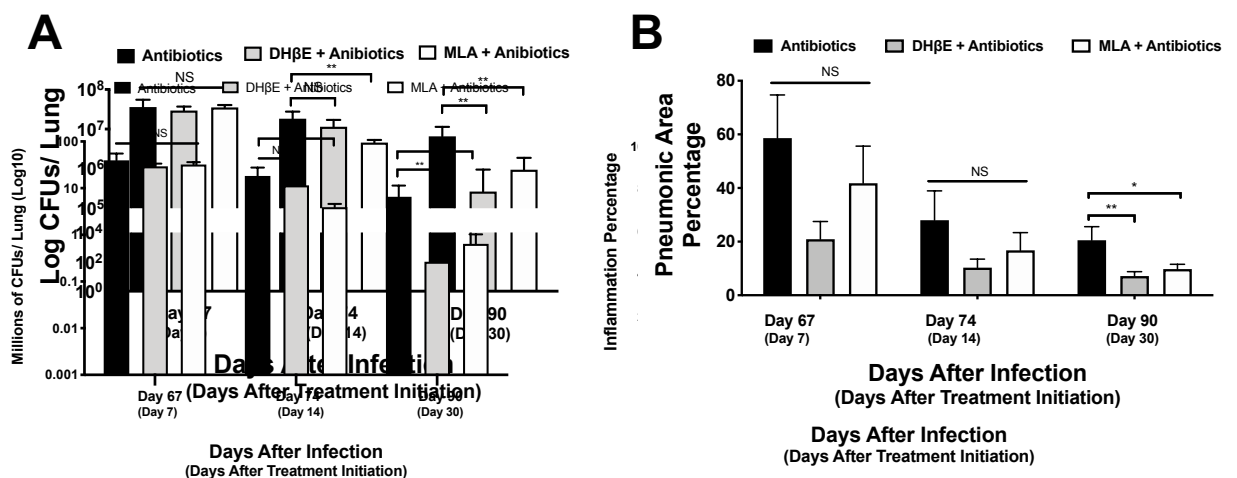
Figura 14. El tratamiento con antagonistas nicotínicos durante la fase progresiva de la enfermedad no afecta la supervivencia en el modelo experimental. Las curvas de supervivencia de los ratones a los que se les administró los antagonistas de los nAChRs mostraron una supervivencia del 60% y 56% respectivamente. Los controles (líneas azules) recibieron solución salina inyectable empleando el mismo esquema de administración utilizado para los antagonistas de los nAChRs, los cuales mostraron una supervivencia del 66%. Los resultados representan el promedio de 2 experimentos en los cuales se ocuparon 4 ratones por grupo. No se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los tres grupos. $P = 0.8274$, Prueba de Mantel-Cox. $P = 0.8651$ Prueba de Logrank. $P = 1.01$ Prueba de Gehan-Breslow.

8.2.4 Efecto de la Administración de Antagonistas de los Receptores Nicotínicos en Conjunto con la Antibióticoterapia Sobre la Carga Bacilar y la Neumonía Durante la Fase Progresiva de la Enfermedad

Para determinar si los antagonistas de nAChR podrían ser útiles para acortar la duración de la quimioterapia de segunda línea y además reducir el porcentaje de inflamación pulmonar, se inició el tratamiento con antibióticos de segunda línea (empleando un esquema recomendado por la OMS consistente en la administración conjunta de amikacina,

etionamida, moxifloxacino y pirazinamida) solo o en combinación con MLA y DHβE, 60 días después de que los ratones habían sido infectados intratraquealmente con una cepa multidrogoresistente. Es importante recordar el antecedente mencionado previamente que describe una alta incidencia de falla terapéutica con tratamientos antifímicos convencionales en cepas multidrogoresistentes subrayando la importante necesidad de terapia sinérgica. Además, uno de los objetivos ideales de la terapia adyuvante al tratamiento con antibióticos es la modulación del daño generado por el propio sistema inmune, el cual se evaluó midiendo la extensión de áreas neumónicas según se detalló en el diseño experimental. Después de 14 días de tratamiento con MLA y antibióticos, se observó una red

ucción en la carga bacilar pulmonar en comparación con el grupo que solo recibió antibióticos ($P < 0.01$, Figura 15A). Además, después de 90 días, el tratamiento combinado con antagonistas de nAChR y antibióticos produjo una reducción significativa en la carga bacilar aún mayor en comparación con los ratones que recibieron solo antibióticos ($P < 0.01$, Figura 15A) y además redujo la inflamación pulmonar (Figura 15B-E). Finalmente, la sobrevivencia de los ratones en los tres grupos fue del 100%, por lo que la administración de los antagonistas nicotínicos no incrementó la mortalidad. Esto es congruente con el hecho de que tanto las UFCs como el porcentaje de inflamación disminuyeron con el uso de antagonistas de los nAChRs.



C Antibiotics **D** DH β E + Antibiotics **E** MLA + Antibiotics

Figura 15. La administración de los antagonistas nicotínicos sinergiza con la terapia de antibióticos y acelera la reducción en la carga bacilar y la neumonía. Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFCs) pulmonares en ratones BALB/c, después de 7, 14, 30 y 60 días de haber iniciado el tratamiento indicado tras 60 días de infección con una cepa MDR (**A**). Porcentaje de la superficie pulmonar afectada por la neumonía determinada por morfometría automatizada. Los gráficos representan los datos agrupados de dos experimentos (N = 6 ratones) y los grupos individuales muestran la mediana + el rango intercuartílico en cada punto temporal. Las pruebas de significación se hicieron usando la prueba de Kruskal-Wallis con la comparación múltiple de Dunn (**B**). NS se refiere a una diferencia no significativa entre los grupos (*P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001). El panel inferior (C-E) muestra micrografías de baja potencia de los pulmones después de 90 días del tratamiento indicado.

Apartado II:

Dinámica de Expresión y Manipulación del Sistema
Colinérgico en Macrófagos Expuestos a
Mycobacterium tuberculosis

8.4.1 Producción de Acetilcolina (ACh) por Macrófagos Expuestos a Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de Diferente Virulencia

Los macrófagos pulmonares tienden a ser las primeras células del sistema inmunológico en entrar en contacto con la bacteria y desempeñan un papel clave en la progresión de la enfermedad. Además, como se observó en el análisis por inmunohistoquímica, durante la infección *in vivo* estas células mostraron una expresión importante de elementos colinérgicos. Por lo tanto, para comprobar si *Mtb* es capaz de inducir la producción de ACh durante la infección de macrófagos pulmonares y determinar si el rango de producción está asociado con la virulencia de la bacteria, se sometió a macrófagos alveolares murinos de ratones BALB/c pertenecientes a línea celular MH-S a un ensayo de multiplicación de infección (MOI) con distintas cepas de *Mtb* y a la posterior medición de ACh en los sobrenadantes celulares macrofágicos empleando un ensayo colorimétrico (Figura 16A). Durante el ensayo se detectó ACh en sobrenadantes celulares de macrófagos infectados con cepas virulentas (H37Rv y 5186), pero no en los que fueron infectados con cepas avirulentas o inactivadas por calor. Estos resultados sugieren que la producción de ACh durante la infección de macrófagos por *Mtb* podría ser un mecanismo de virulencia de la bacteria, por lo que solo está presente durante la infección con cepas virulentas. Además, este efecto se pierde tras la inactivación de la bacteria, por lo que requiere que la bacteria se encuentre viva.

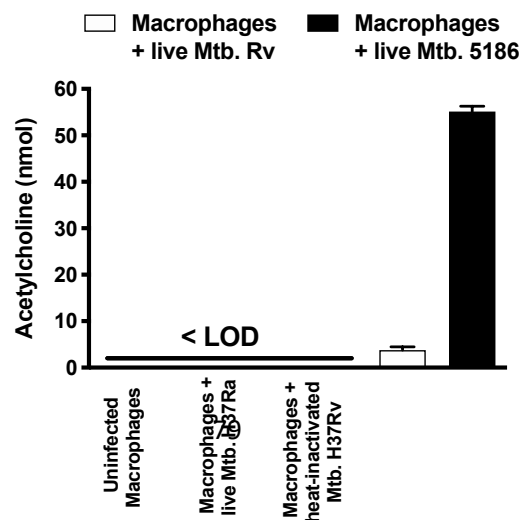


Figura 16. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) induce la producción de diversas concentraciones de acetilcolina (ACh) durante la infección de macrófagos alveolares murinos de la línea celular MH-S. Se muestran las concentraciones de ACh detectadas empleando un ensayo colorimétrico en sobrenadantes de células MH-S expuestas a distintas condiciones experimentales. Se registraron concentraciones de ACh por debajo del límite de detección (<LOD) en los sobrenadantes de células MH-S no infectadas y en aquellas infectadas con una cepa de *Mtb* no virulenta (H37Ra) o inactivada por calor. Por el contrario, la infección con cepas virulentas de *Mtb* (H37Rv y 5186) no inactivadas generó concentraciones detectables de ACh en los sobrenadantes de las células MH-S. Los datos se expresan como la media \pm SEM de tres pozos y son representativos de dos experimentos independientes que emplearon una infección con 3×10^5 UFC de *Mtb* ANOVA $P < 0.001$. El límite de detección de ACh para el ensayo fue de 3 nmol.

8.4.2 Expresión de la Subunidad Alfa-7 del Receptor Nicotínico ($\alpha 7$ nAChR) y Efecto de la Administración de Distintas Concentraciones de Acetilcolina Sobre la Producción del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) en Macrófagos Expuestos a *Mycobacterium tuberculosis*

Como se ha comentado previamente el $\alpha 7$ nAChR es el subtipo de los receptores nicotínicos mayormente estudiado en la modulación funcional en macrófagos y otras células inmunológicas. Para conocer el efecto que podría estar desempeñando la ACh a través del receptor $\alpha 7$ nAChR en macrófagos durante diferentes fases de la enfermedad, se decidió medir la expresión de la subunidad $\alpha 7$ nAChR en distintos perfiles de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica. Se empleó la técnica de citometría de flujo para determinar la intensidad media de fluorescencia (MFI) para la subunidad $\alpha 7$ nAChR, la cual fue significativamente mayor ($p < .05$) en macrófagos del subtipo M1 comparada con los del subtipo M2c. Más aún, la MFI fue significativamente mayor ($p < .001$ y $.05$) en ambos subtipos de macrófagos (M1 y M2c respectivamente) comparada con macrófagos del subtipo M2a (Figura 1).

En una segunda etapa experimental, se tomaron macrófagos previamente diferenciados hacia el subtipo M1, los cuales contaban con una mayor expresión de la subunidad $\alpha 7$ nAChR de acuerdo a lo que se había medido previamente. Se tomaron 4×10^4 células y se expusieron a 10^8 UFCs de *Mtb* irradiada de la cepa H37Rv (MOI 1:5). Posteriormente, a estas células se les administraron dosis progresivas (10^{-7} a 10^{-5} molar) de cloruro de ACh y se determinó la presencia de TNF- α en sus sobrenadantes por medio de ELISA. Los macrófagos expuestos a la menor concentración de ACh (10^{-7} molar) mostraron una disminución significativa ($p < .05$) en la producción de TNF- α en sus sobrenadantes comparados con el grupo que no estuvo expuesto a ACh. Más aún, los macrófagos expuestos a concentraciones mayores de ACh (10^{-6} y 10^{-5} molar) mostraron una mayor disminución ($p < .01$) en la producción de TNF- α en sus sobrenadantes comparados con el grupo que no estuvo expuesto a ACh. En comparación, los macrófagos no expuestos a *Mtb*, no mostraron concentraciones detectables de TNF- α y tampoco fueron afectados por la administración de ACh (Figura 17B). Estos hallazgos son congruentes con la hipótesis aquí planteada, la cual sugiere que la ACh podría estar ejerciendo efectos inmunomoduladores en la TB pulmonar experimental.

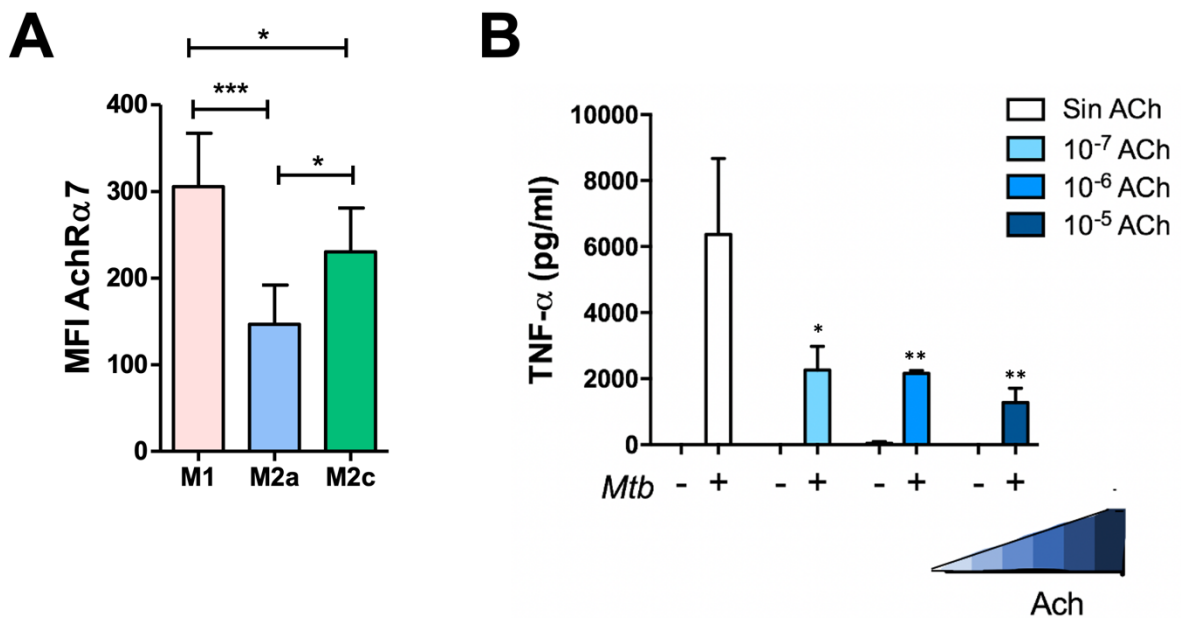


Figura 17. La subunidad alfa-7 del receptor nicotínico ($\alpha 7$ nAChR) es expresada de forma diferencial por distintos subtipos de macrófagos y la concentración de acetilcolina (ACh) administrada a macrófagos del subtipo M1 expuestos a *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es proporcional a la inhibición en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La detección de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para la subunidad $\alpha 7$ nAChR empleando citometría de flujo en

macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humanos, fue significativamente mayor en macrófagos del subtipo M1 comparada con los del subtipo M2c. Además, fue significativamente mayor en ambos subtipos de macrófagos comparada con los del subtipo M2a (**A**). Macrófagos humanos del subtipo M1 derivados de monocitos de sangre periférica expuestos a 10^8 UFCs de *Mtb* irradiada de la cepa H37Rv (MOI 1:5) mostraron una disminución proporcional en la producción de TNF- α en sus sobrenadantes tras la administración de dosis progresivas (10^{-7} a 10^{-5} molar) de cloruro de ACh (**B**). Los datos se expresan como la media \pm SEM de tres pozos y son representativos de dos experimentos independientes que emplearon 3×10^5 UFC de *Mtb* ANOVA $P < .001$. Se muestra la comparación múltiple de Bonferroni (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$).

Apartado III:

Dinámica de Producción De Acetilcolina (ACh)
y de la Variación en el Crecimiento Posterior a la
Administración de Compuestos Colinérgicos, en
Mycobacterium tuberculosis (Mtb)

8.5.1 Producción de Acetilcolina (ACh) por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) Durante Diversas Fases de Crecimiento

La detección de ACh en tejido pulmonar y en células infectadas combinada con la ausencia de detección en tejido pulmonar y en células no infectadas, plantea tres posibles escenarios: 1) la micobacteria es capaz de inducir la producción de ACh en células del hospedero tras su infección 2) la micobacteria cuenta con la capacidad de sintetizar ACh sin necesidad de las células del hospedero 3) la micobacteria es capaz de sintetizar ACh por su cuenta y además puede inducir la producción de ACh en células del hospedero tras su infección. Por lo tanto, para determinar si *Mtb* es capaz de producir ACh sin tener que inducir la producción de la molécula en células del hospedero, se tomaron sobrenadantes y lisados bacterianos de la cepa *Mtb* H37Rv después de 2, 10 y 18 días de iniciación de cultivo, correspondientes a las fases de crecimiento rezagado, logarítmico y estacionario respectivamente para la posterior detección de ACh empleando un ensayo colorimétrico. Se detectó ACh en sobrenadantes (35 nM) sólo durante la fase de crecimiento rezagado de *Mtb* y en lisados de *Mtb* durante las tres fases de su crecimiento, aunque se observó un predominio durante la fase logarítmica (10 nM) (Figura 18). De tal forma, el bacilo de la TB parece contar con la capacidad de producir ACh por sí sola y además lo hace de forma diferencial durante distintas fases de su crecimiento. Importantemente, la variación encontrada en sobrenadantes y lisados de la bacteria, sugiere que esta puede ser secretada o empleada por la micobacteria y posiblemente actúe como un factor autócrino o parácrino de crecimiento.

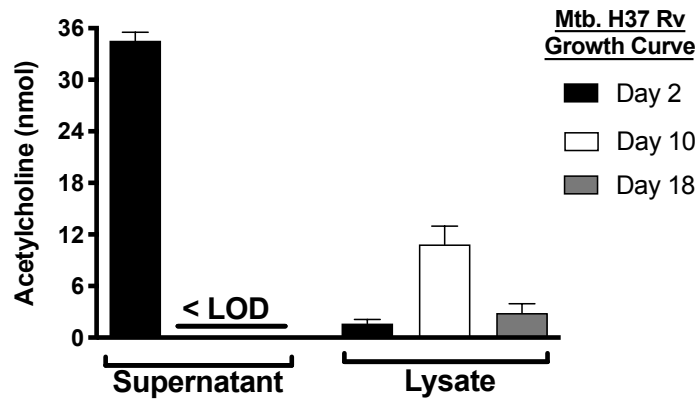


Figura 18. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) produce diferentes concentraciones de acetilcolina (ACh) durante su curva de crecimiento. Se detectaron concentraciones nanomolares de ACh en los sobrenadantes de *Mtb* exclusivamente durante la fase de crecimiento rezagado. En los lisados bacterianos se detectaron concentraciones nanomolares durante las tres fases de crecimiento, pero predominaron la concentraciones de la fase logarítmica (día 10). Los datos se expresan como la media \pm SEM de tres pozos y son representativos de dos experimentos independientes que emplearon 3×10^5 UFC de *Mtb* ANOVA $P < 0,001$. El límite de detección de ACh para el ensayo fue de 3 nmol.

8.5.2 Efecto de la Administración de Acetilcolina (ACh) y de Antagonistas Nicotínicos sobre el Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)

Debido a los resultados previamente mostrados, se intentó verificar si la ACh podría actuar como un factor de crecimiento para la micobacteria y si los antagonistas nicotínicos podrían actuar inhibiendo directamente el crecimiento de la misma. Para determinar el efecto del agonismo y antagonismo colinérgico en el crecimiento bacteriano se realizó la incubación de *Mtb* con diversas concentraciones de ACh o con antagonistas de los nAChR por siete días y se evaluó el crecimiento micobacteriano indirectamente mediante un ensayo colorimétrico. La reacción colorimétrica llevada a cabo consistió en la reducción del

compuesto MTT-Tetrazolio (reactivo de Owen) de forma irreversible a formazán por bacterias metabólicamente activas. El incremento en la producción de formazán correlacionó directamente con el incremento en las mediciones colorimétricas y con el número de bacterias vivas. El crecimiento bacteriano posteriormente fue corroborado mediante el recuento de las UFCs en medio 7H10.

Las administraciones de concentraciones nanomolares y micromolares de ACh generaron un incremento en la densidad óptica ($P < 0.01$ y $P < 0.05$ respectivamente, Figura 5A), así como en los conteos de UFCs (Figura 5B). Este resultado es consistente, con el hallazgo anterior que sugería que la ACh podía funcionar como un factor de crecimiento micobacteriano. Por el contrario, la adición de concentraciones incrementales de antagonistas de los nAChR redujo tanto la densidad óptica (Figura 5C) como el conteo de las UFCs (Figura 5D). Los efectos opuestos generados por la administración de antagonistas de los nAChR en el crecimiento micobacteriano en comparación con la administración de ACh, insinúan que al igual que en células, la ACh y estos antagonistas podrían estar actuando como agonistas y antagonistas respectivamente en la bacteria.

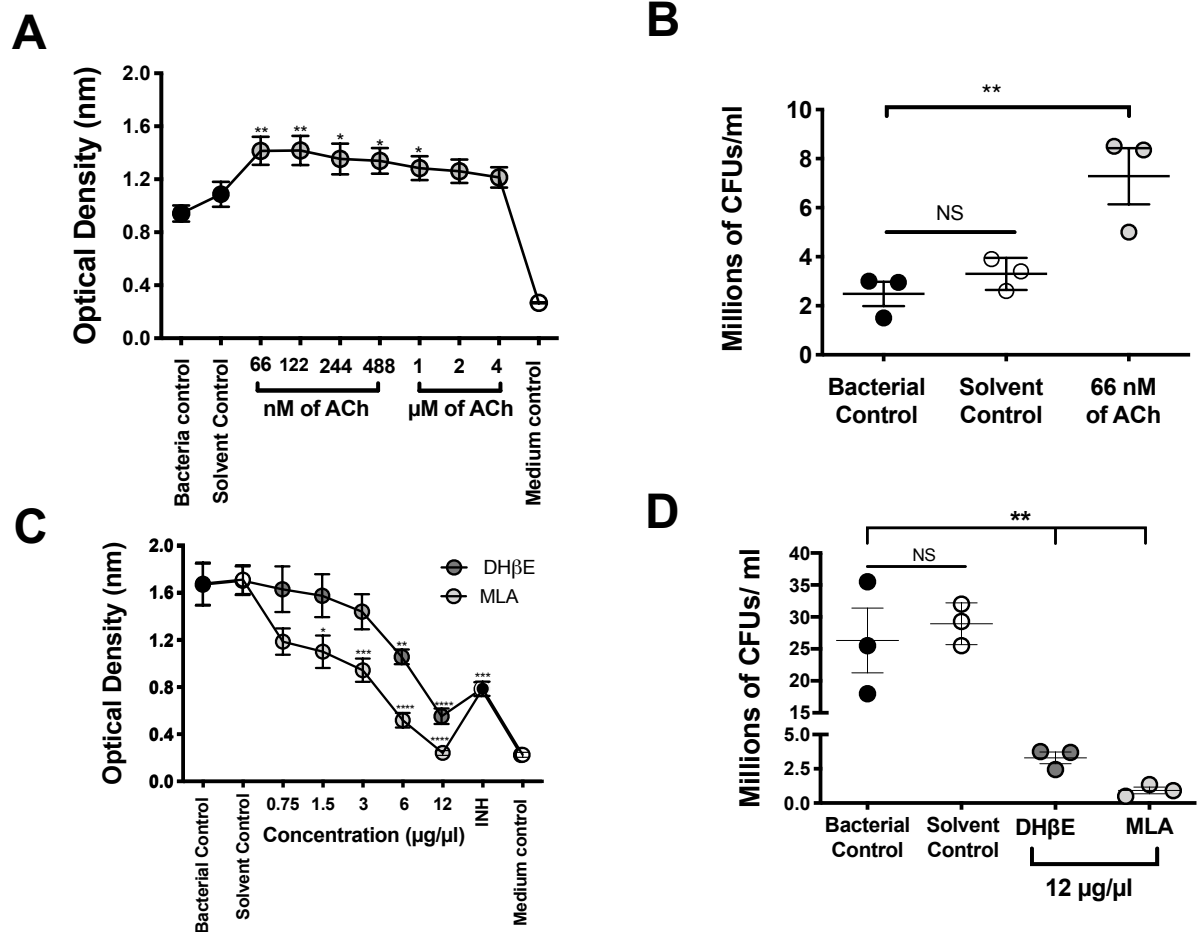


Figura 19. El crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es estimulado por la administración de ACh y revertido por la administración de antagonistas nicotínicos.

La densidad óptica sirvió como sustituto de la cantidad de bacterias vivas después de la adición del reactivo de Owen y confirmada con el recuento de UFCs. La densidad óptica de 3×10^5 UFC de la cepa H37Rv de *Mtb* en cultivo líquido aumenta tras la incubación con concentraciones nanomolares y micromolares de ACh (círculos grises). Las bacterias expuestas a concentraciones nM y a concentraciones de $1 \mu\text{M}$ de ACh mostraron un incremento significativo en la densidad óptica en comparación con los controles bacterianos y de disolventes (**A**). El aumento en la carga de UFCs de las bacterias incubadas con la concentración de ACh que presentó la mayor densidad óptica (66 nM) en el ensayo colorimétrico, en comparación con los controles bacterianos y de disolvente fue confirmado mediante la determinación y recuento de UFCs (**B**). Por el contrario, la incubación de 6×10^5 UFCs de la cepa H37Rv de *Mtb* después de la adición de concentraciones incrementales de antagonistas de nAChR (círculos grises) redujo su densidad óptica (**C**) y la carga de UFCs (**D**) en comparación con los controles bacterianos y de disolventes. Los datos se expresan como la media \pm SEM de tres pozos y son representativos de tres experimentos independientes. ANOVA $P < 0,001$. Se muestra la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni empleando los valores del control bacteriano (círculos negros), el cual no estuvo expuesto a ningún compuesto, con las bacterias expuestas al control de disolvente (solución salina), a isoniacida (INH), así como a diferentes concentraciones de ACh (**A**) o de antagonistas nicotínicos (**B**) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). NS se refiere a una diferencia no significativa entre los grupos.

9. Discusión y conclusiones

La acetilcolina (ACh) ha sido clasificada como un neurotransmisor clásico, a pesar de que se identificó por primera vez en el bazo, un órgano inmune (I. Wessler et al., 1999). Actualmente, la síntesis de ACh ha sido detectada tanto en células neuronales como en células no neuronales, y estas pueden liberarla de forma rápida o lenta respectivamente (Fujii et al., 2017a; Pavlov et al., 2018). La ACh ha sido denominada el "citotransmisor universal" en referencia a su extensa expresión (Ignaz Wessler et al., 2003) y casi todas las células pulmonares y de las vías respiratorias tienen la capacidad de sintetizarla, así como los receptores o enzimas con los que interactúa. De hecho, una infinidad de acciones en vías respiratorias se encuentran reguladas por este neuroquímico, a través de su interacción con los receptores muscarínicos y nicotínicos (mAChRs y nAChRs). Entre estas acciones se encuentran por ejemplo: la regulación del crecimiento de células epiteliales bronquiales, la inducción de la secreción mucosa por células caliciformes y la regulación de la barrera superficial mucosa, entre muchas otras (Racké & Matthiesen, 2004; Reinheimer et al., 1998).

En enfermedades pulmonares crónicas, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), suele ocurrir una potenciación en la expresión colinérgica pulmonar que da lugar a procesos patológicos como la hipersecreción de moco y la fibrosis (Kummer & Lips, 2006; Reinheimer et al., 1998). Asimismo, la ACh regula procesos inmunológicos como la producción de citocinas, la quimiotaxis y la fagocitosis. Más aún, la disfunción colinérgica influye sobre la patogénesis durante diversas infecciones respiratorias, afectando procesos de regulación tisular en vías aéreas por medio de la inflamación (Islas Weinstein & Pando, 2020). Aunque no se ha demostrado previamente una alteración del sistema colinérgico en el pulmón durante la TB pulmonar avanzada, en esta etapa se observan manifestaciones patológicas similares a las que se producen en la EPOC (Chakrabarti, Calverley, & Davies, 2007). Sin embargo, hasta esta tesis no se había estudiado la presencia de este sistema durante la inmunopatogénesis de la TB pulmonar *in vivo* y en su agente causal *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

Larcombe et al, demostraron que el tono colinérgico basal está completamente ausente en ratones BALB/c (Larcombe et al., 2008). No obstante, empleando un modelo de TB en ratones BALB/c caracterizado (Hernández-Pando, Orozco, Sampieri, Pavón, et al., 1996), hemos demostrado por primera vez que la potenciación del sistema colinérgico no neuronal del pulmón ocurre durante la TB pulmonar experimental. En nuestro modelo experimental, hemos observado concentraciones de ACh pulmonar en el rango milimolar, durante el curso completo de la infección. El aumento en las concentraciones de ACh en los pulmones y otros órganos secundarios a la exposición intracelular a patógenos se ha descrito previamente (Jacoby, Xiao, Lee, Chan-Li, & Fryer, 1998; Shi et al., 2014). Por ejemplo, el virus *parainfluenza* logra potenciar las concentraciones de ACh pulmonar a través de la degradación del ARNm y la escisión de los residuos de ácido siálico del mAChR2 que regula de forma inhibitoria tanto la secreción neuronal (Jacoby et al., 1998) como la secreción no neuronal de ACh (Bjur, Danielson, Alfredson, & Forsgren, 2008; Jacoby et al., 1998). A pesar de que nosotros no medimos la expresión de mAChR2, informes anteriores sugieren que *Mtb* es capaz de alterar la expresión de otros receptores acoplados a proteína G durante el curso de la infección (Alaridah et al., 2017). Alternativamente, se ha reportado que citocinas como TNF- α e IFN- γ inducidas tras la

administración de LPS (Shi et al., 2014) y también en nuestro modelo, pueden incrementar la disponibilidad de ACh a través de mecanismos como la inhibición de la acetilcolinesterasa, la enzima degradante de ACh (Jacoby et al., 1998; Shi et al., 2014). Finalmente, alteraciones neurohormonales descritas en nuestro modelo (Barrios-Payán et al., 2016; Bini et al., 2014; R Hernandez-Pando, 1998; Zetter et al., 2019) también podrían ser responsables de potenciar las concentraciones de ACh no neuronal en los pulmones durante el curso de la infección. Esto podría ocurrir a través de mecanismos reportados como la inhibición de transportadores de cationes orgánicos por hormonas esteroideas y noradrenalina (Ignaz Wessler et al., 2003), así como por la estimulación de los receptores β_2 adrenérgicos o de colecistoquinina (Reardon et al., 2013); los cuales están presentes en las vías aéreas de mamíferos (Barnes, 1984; Barrios-Payán et al., 2016). Sin embargo, una limitación de nuestros resultados, es que el modelo experimental empleado tiene parámetros restrictivos incluyendo la cepa, edad y sexo de los ratones, mismos que pueden influenciar la expresión colinérgica y por lo tanto nuestros resultados podrían no ser representativos de la dinámica colinérgica que ocurre en la TB pulmonar en humanos. Sin embargo, el hecho de que las concentraciones de ACh pulmonar varíen de forma importante durante la progresión de la enfermedad, sugiere que el sistema colinérgico pulmonar podría llevar a cabo diferentes funciones durante fase temprana y progresiva de la TB pulmonar.

Las células inmunitarias tienen la capacidad de sintetizar, liberar y responder a moléculas clasificadas clásicamente como neurotransmisores (Pavlov et al., 2018). De hecho, los linfocitos T CD4⁺ son importantes fuentes celulares de ACh (Koichiro Kawashima et al., 2015), aunque casi todas las células en vías aéreas expresan enzimas sintetizadoras de ACh (Lips et al., 2007; I. Wessler & Kirkpatrick, 2008). En esta tesis, hemos documentado el incremento en la expresión de ChAT, la principal enzima sintetizadora de ACh en tejidos periféricos y células no neuronales (Koichiro Kawashima et al., 2015; Ignaz Wessler et al., 2003) durante la TB pulmonar experimental. La potenciación de ChAT durante etapas tempranas de la enfermedad se produce en las células epiteliales pulmonares, que se sabe que están directamente desprovistas de ACh neuronal (Racké & Matthiesen, 2004). Mientras que durante la enfermedad avanzada, la regulación

de ChAT ocurre en mayor medida en células inmunitarias, particularmente en linfocitos y macrófagos. Además, nuestros resultados *in vivo* e *in vitro* sugieren que la infección de *Mtb* induce la producción de ACh. Curiosamente, cuando se comparan los niveles de ACh detectados durante la infección de macrófagos de la línea celular MH-S con la cepa estándar de *Mtb* H37Rv (Marquina-Castillo et al., 2009), la detección de ACh se potenció o anuló cuando la infección se llevó a cabo con la cepa hipervirulenta de *Mtb* 5186 (Marquina-Castillo et al., 2009) o la cepa hipovirulenta de *Mtb* H37Ra (López-Hernández et al., 2018) respectivamente. Esto sugeriría que el grado de virulencia de la cepa de micobacterias se correlaciona con los niveles de producción de ACh inducidos durante la infección. Además, la inactivación por calor de la cepa H37Rv también anuló la detección de ACh, lo que sugiere que la producción de ACh requiere bacterias intactas. Por lo tanto, es plausible que los bacilos hayan producido la ACh medida o, alternativamente, hayan inducido la producción de ACh por las células MH-S durante la infección. Por lo tanto, *Mtb* avirulenta o inactivada por calor podría carecer de la maquinaria bioquímica para producir ACh o inducir la producción de ACh por parte de las células MH-S durante su infección.

La inducción de ChAT a través de la estimulación de los receptores de células T (Vijayaraghavan et al., 2013) y de los receptores tipo Toll (Shi et al., 2014; Tracey, 2002) ha sido demostrada en varios tipos de células inmunes, incluyendo células T, macrófagos y células dendríticas (Fujii et al., 2017a; Koichiro Kawashima et al., 2015; Reardon et al., 2013). Además, también se ha sugerido la inducción de ChAT en las células inmunes mediante la estimulación de los receptores neurohormonales (Reardon et al., 2013). Este último punto es especialmente relevante, ya que se han descrito varias alteraciones neurohormonales en nuestro modelo de ratón experimental (Barrios-Payán et al., 2016; Bini et al., 2014; R Hernandez-Pando, 1998; Zetter et al., 2019). Es importante señalar que no pudimos diferenciar experimentalmente la fuente de producción de ACh durante la infección y, por lo tanto, no podemos concluir si la ACh fue producida por las micobacterias, por las células del hospedero durante su infección, o bien por ambas.

Los receptores colinérgicos se expresan en diversas células inmunitarias, entre las cuales se incluyen macrófagos, monocitos y linfocitos (Fujii et al., 2017a; Koichiro Kawashima et al., 2015; Pavlov et al., 2018). Los leucocitos expresan todos los subtipos de

nAChRs y estos ayudan a desencadenar mecanismos en estas células que son diferentes de aquellos desencadenados en células neuronales. En lugar de formar compuertas activadas por voltaje, los nAChRs en leucocitos liberan reservas de calcio intracelulares después de secuestrar cadenas intracelulares de receptores vecinos que permiten modificar las actividades de segundos mensajeros, factores de transcripción y enzimas (de Jonge et al., 2005; Fujii et al., 2017a; Koichiro Kawashima et al., 2015; Nizri et al., 2009; Nordman, Muldoon, Clark, Damaj, & Kabbani, 2014; Takahashi et al., 2006). La activación de los receptores nAChR puede alterar la producción de citocinas en macrófagos alveolares (Kummer & Krasteva-Christ, 2014). Además, la nicotina afecta la respuesta migratoria de las subpoblaciones de leucocitos (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) hacia los pulmones y vías aéreas (Razani-Boroujerdi et al., 2004). Esto podría explicar la creciente susceptibilidad de fumadores o de leucocitos cultivados expuestos a nicotina, a la infección por una larga lista de patógenos incluyendo: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cryptococcus neoformans* (Giebelen et al., 2009; Lafargue et al., 2012; Matsunaga et al., 2001; Razani-Boroujerdi et al., 2004; Richter et al., 2018; Yamaguchi, Friedman, & Yamamoto, 2003). El $\alpha 7$ nAChR es quizás el receptor nicotínico mayormente estudiado en la regulación de la respuesta inmune (Pavlov et al., 2018; Tracey, 2002). Sin embargo, la estimulación de otros nAChRs como el $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 9$ o $\alpha 10$ también puede alterar la respuesta inmune (Koval et al., 2011; Nordman et al., 2014).

Una limitación de nuestro estudio es que solo registramos la expresión de la subunidad $\alpha 7$ nAChR durante la enfermedad, pero no la de otras subunidades nAChR como las del $\alpha 4\beta 2$ nAChR. Anteriormente, Matsunaga et al demostraron la expresión de transcritos para la subunidades del nAChR $\alpha 4\beta 2$, pero no para las del $\alpha 7$ nAChR empleando RT-PCR y una línea celular de macrófagos alveolares denominada MH-S proveniente de ratones BALB/c no infectados. En conformidad con los hallazgos de Matsunaga, nosotros no observamos la expresión de la subunidad $\alpha 7$ del nAChR en macrófagos alveolares en ratones sanos (Matsunaga et al., 2001). Sin embargo, tras la infección por *Mtb*, macrófagos alveolares con apariencia espumosa y linfocitos pulmonares

presentes en parches neumónicos mostraron abundante expresión intracelular y membranaral de la subunidad $\alpha 7$ del nAChR durante la enfermedad avanzada.

La expresión de la subunidad nicotínica $\alpha 7$ en leucocitos durante la progresión de la enfermedad, sugiere la posibilidad de que la bacteria podría inducir el $\alpha 7$ nAChR en estas células para modular sus funciones inmunológicas y en el caso de los macrófagos espumosos establecer su ciclo de replicación dentro de ellas. El mecanismo a través del cual podría estar ejerciendo la inducción del $\alpha 7$ nAChR, podría ser a través de la interacción entre un receptor leucocítico y un producto derivado de los bacilos infectantes. Por ejemplo, en la infección por VIH, la proteína gp-120 y su interacción con un receptor leucocítico generó la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 7$ nAChR en macrófagos y la potenciación paradójica de la respuesta inflamatoria (Delgado-Vélez et al., 2015). Un mecanismo alternativo, podría ser la inducción del $\alpha 7$ nAChR, a través de la estimulación exacerbada de receptores esteroideos leucocitarios (I. Wessler & Kirkpatrick, 2008). De forma relevante, en el modelo de TB pulmonar experimental aquí reportado, se ha documentado previamente la producción exacerbada de esteroides (Bini et al., 2014; R Hernandez-Pando, 1998). Sin embargo, esta serie de mecanismos hipotéticos no han sido demostrados, por lo que forman parte de las perspectivas de este trabajo.

Como se ha mencionado previamente, los macrófagos son células clave en la TB pulmonar y se clasifican bajo dos fenotipos básicos: macrófagos clásicamente activados o M1 y macrófagos alternativamente activados o M2, dependiendo de su morfología, funciones, factores inductores y efectores. Los macrófagos M1 son activados principalmente a través del interferón (IFN)- γ y vías de señalización, como la del transductor de señales y el activador de la transcripción 1 (STAT1). Además, producen moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, al igual que óxido nítrico a través de la enzima iNOS y poseen una alta expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. En el modelo experimental empleado aquí, los macrófagos clásicamente activados prevalecen en la fase temprana de la enfermedad y confieren protección contra el bacilo, mientras que los macrófagos alternativamente activados con morfología vacuolada

prevalecen en la enfermedad avanzada y están asociados con la progresión de la misma (Ríos-Barrera et al., 2006).

El fenotipo alternativo de macrófagos se ha subdividido a su vez en los subtipos M2a, M2b, M2c y M2d (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Los macrófagos M2a son importantes en la reparación de tejidos y son activados por la IL-4 y la IL-13 y cuentan con una producción incrementada de la arginasa-1, el receptor de manosa MRc1 (CD206) y el TGF- β (Mantovani et al., 2004). Los macrófagos M2c, también conocidos como macrófagos inactivos, son inducidos por los glucocorticoides y las citocinas IL-10 y TGF- β . A su vez, estas células son capaces de secretar IL-10 y TGF- β y son altamente eficaces en fagocitar células apoptóticas. En la TB pulmonar humana, el subtipo M1 de macrófagos típicamente se observa en la enfermedad temprana, el subtipo M2a tiende a predominar en las etapas intermedias, mientras que el subtipo M2c prevalece en etapas avanzadas de la enfermedad (Lugo-Villarino, Vérollet, Maridonneau-Parini, & Neyrolles, 2011). Aquí demostramos que macrófagos humanos del subtipo M1 derivados de monocitos de sangre periférica poseen una mayor expresión de la subunidad $\alpha 7$ nAChR en comparación con sus pares del subtipo M2a o M2c. Esto es congruente con un mayor efecto inmunomodulador generado por el $\alpha 7$ nAChR en macrófagos M1, ya que se ha visto que la estimulación por nicotina puede inducir el fenotipo alternativo en los macrófagos (Wongtrakool et al., 2012). Es probable que la potenciación pulmonar de ACh durante la enfermedad favorezca la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo alternativo. Importantemente, también demostramos que en los macrófagos M1 la estimulación por ACh, disminuyó la producción del TNF- α , una citocina clave protectora en la enfermedad (O'Garra, A Redford, 2013). Por lo tanto, además de favorecer la polarización macrófágica, la ACh pulmonar podría estar modulando el microambiente de productos inmunológicos locales (Kahnert et al., 2006).

La expresión de diferentes subunidades nicotínicas en células inmunológicas durante diversas infecciones respiratorias, ha generado especulación en cuanto a la participación de diferentes nAChRs en la modulación inmunológica durante la misma (Bai et al., 2017; López-Hernández et al., 2018; Valdez-Miramontes et al., 2020). Por ejemplo, en un modelo de *Haemophilus influenza*, la administración de agonistas generales de los

nAChRs, pero no de agonistas selectivos para el nAChR $\alpha 7$, generó efectos inmunomoduladores (Matsunaga et al., 2001). Por el contrario, un estudio *ex vivo* de *Mtb* se encontró que las subunidades $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ nAChR resultan cruciales en la respuesta de contención de proliferación bacteriana intracelular, al modular de forma directa el proceso de autofagia en los macrófagos y la producción de TGF- β e IL-10 por linfocitos T-reguladores (Bai et al., 2017). Mientras que el $\alpha 7$ nAChR tiene una baja afinidad por la ACh y es rápidamente insensible, el $\alpha 4\beta 2$ nAChR posee una alta afinidad por la ACh y se desensibiliza lentamente (Cordero-Erausquin, Marubio, Klink, & Changeux, 2000). En nuestro modelo, la administración tanto de antagonistas del $\alpha 4\beta 2$, como del $\alpha 7$ nAChR en ratones infectados con *Mtb* drogosensible, disminuyó la carga de UFCs pulmonares, pero no la inflamación pulmonar. Esto sugiere que la contención de la respuesta inmune generada por la potenciación tanto del $\alpha 4\beta 2$ como del $\alpha 7$ nAChR en células inmunológicas pulmonares podría disminuir la inflamación pulmonar excesiva, pero al mismo tiempo, alterar la respuesta inmune protectora y contribuir a la progresión de la enfermedad.

Las citocinas Th1, como el TNF- α y el IFN- γ , se han considerado clásicamente como correlatos de protección durante la TB pulmonar avanzada (Keane, Shurtleff, & Kornfeld, 2002). Además, la producción de especies reactivas de oxígeno dentro del fagosoma representa un mecanismo crucial de erradicación de *Mtb* y está regulada principalmente por la enzima iNOS, que a su vez está regulada por citocinas Th1 (Fenton & Vermeulen, 1996). Con estos antecedentes y con el objetivo de determinar las consecuencias funcionales de la manipulación colinérgica, decidimos tratar con el agonista sintético del $\alpha 4\beta 2$ nAChR, DH β E, que anteriormente, se ha descrito que potencia la respuesta inmune celular (Camarasa, Ros, Pubill, & Escubedo, 2010; Islas Weinstein & Pando, 2020). De forma conclusiva, se observó una transcripción pulmonar potenciada de iNOS, TNF- α e IFN- γ después de la administración del DH β E. La regulación de las citocinas Th1 y las especies reactivas de oxígeno mediante la estimulación del nAChR se ha descrito de hecho en varios modelos (de Jonge et al., 2005; Matsunaga et al., 2001; Nordman et al., 2014; Takahashi et al., 2006; Tsoyi et al., 2011). Sin embargo, esta es la primera vez que se informa en un modelo *in vivo* de TB. Además, la administración de

DH β E potenció la transcripción de citocinas Th17 en nuestro modelo. La respuesta Th17 se ha asociado como un correlato de protección en la TB pulmonar y está característicamente representada por la citocina IL-17A (Shen & Chen, 2018b). Es importante destacar que la regulación de la respuesta Th17 por nAChRs se ha descrito previamente en modelos animales (Nizri et al., 2009). Además, en un reporte reciente, la estimulación de nAChRs posterior a la infección de macrófagos humanos derivados de monocitos por *Mtb* disminuyó la producción de citocinas Th1 como a Th17 (IL-6, IL-8 y TNF- α) (Valdez-Miramontes et al., 2020). Mientras que en un modelo de infección de TB *ex vivo*, la estimulación de nAChR potenció las citocinas Th2 y T reguladores, que comúnmente se oponen y neutralizan las respuestas protectoras Th1 y Th17 (Bai et al., 2017). En resumen, el antagonismo del receptor nicotínico α 4 β 2 parece contrarrestar las alteraciones inmune generada durante la TB pulmonar avanzada.

En esta tesis se ha proporcionado evidencia demostrando que el sistema colinérgico no neuronal se encuentra potenciado en los pulmones durante la progresión de la TB experimental. En nuestro modelo experimental, varios neuroquímicos, sus enzimas y receptores presentan gran variabilidad en sus concentraciones durante el curso de la enfermedad (Barrios-Payán et al., 2016; Bini et al., 2014; Zetter et al., 2019). Aquí se han documentado diferentes cinéticas de expresión de elementos colinérgicos (ACh, ChAT y el α 7 nAChR) durante la progresión de la TB pulmonar y hemos demostrado por inmunohistoquímica que la intensidad y el número de células positivas para elementos colinérgicos en el pulmón incrementó a medida que avanzó la enfermedad, correlacionándose con la extensión de la neumonía lo que sugiere que este fenómeno podría estar relacionado con la progresión de la misma. En la etapa inicial de la enfermedad (primeros 3 días después de la infección), registramos las concentraciones pulmonares más bajas de ACh y observamos la expresión de ChAT y del α 7 nAChR en células epiteliales bronquiales y macrófagos alveolares, respectivamente. Esto sugiere que aunque las concentraciones de ACh aún no se potencian de forma significativa en el pulmón durante los días iniciales de la infección, el sistema colinérgico comienza a expresarse a nivel local en los primeros respondedores celulares, en quienes podría desempeñar un papel inmunorregulador (López-Hernández et al., 2018). Sin embargo, durante la enfermedad

temprana (días 7 y 14 después de la infección), las concentraciones de ACh incrementan de forma significativa y la enzima ChAT comienza a expresarse en macrófagos y linfocitos presentes en granulomas nacientes. Por el contrario, en este período de tiempo, el $\alpha 7$ nAChR parece estar subexpresado. Por lo tanto, es probable que durante esta fase, se encuentren potenciados de forma transitoria otros receptores colinérgicos, por ejemplo, ciertos subtipos de mAChRs que permiten el desarrollo de respuestas inmunitarias celulares protectoras (Kummer & Krasteva-Christ, 2014; Lips et al., 2007).

Más adelante, hacia el final de la fase temprana del modelo experimental (21 y 28 días después de la infección), cuando las respuestas inmunitarias adaptativas Th1 y Th17 y los macrófagos M1 contienen bacilos dentro de los granulomas (Hernández-Pando, Orozco, Sampieri, Pavon, et al., 1996), se observa una regulación a la baja en la expresión pulmonar de ACh. La disminución en la actividad colinérgica en esta etapa podría ser generada por el hospedero para favorecer el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa protectora. Por el contrario, durante la enfermedad tardía (a partir de los 60 días después de la infección), cuando las respuestas Th2 y T reguladoras facilitan la replicación de los bacilos y sobreviene la neumonía pulmonar (Hernández-Pando, Orozco, Sampieri, Pavon, et al., 1996), existe una regulación positiva notable de ACh, ChAT y $\alpha 7$ nAChR en las células inmunitarias pulmonares. Es probable que el hospedero induzca la potenciación colinérgica durante la enfermedad avanzada para regular a la baja la respuesta inmune celular y de esta forma, evitar lesionar el parénquima pulmonar intentando mantener la homeostasis tisular pulmonar. Paradójicamente, esta estrategia termina favoreciendo la replicación del bacilo y conlleva de forma contraproducente al deterioro paulatino de la respuesta protectora inmunológica y a la inducción de inmunopatología pulmonar que resulta en la ulterior progresión de la enfermedad y en la muerte de los animales. Por lo tanto, se ha sustentado la afirmación que en la patogénesis de esta enfermedad existe un importante componente neuroinmunoendócrino (Barrios-Payán et al., 2016; Bini et al., 2014; Zetter et al., 2019). Sin embargo, son necesarios más experimentos ya que no ha sido posible dejar claro aún si esta respuesta fisiológica es “aprovechada” y alterada por la micobacteria, o bien, si la propia bacteria es capaz de producir ACh durante la infección y provocar la desregulación del sistema inmune para favorecer la progresión de la infección.

La variabilidad observada en las concentraciones de ACh podría ser inducida tanto por el huésped o la bacteria, ya que ambos compiten por regular la respuesta inmunitaria. Sin embargo, es complicado determinar este cuestionamiento experimentalmente. Tampoco ha quedado claro cuál o cuáles son los mecanismos que intervienen en la disminución en la carga bacilar al bloquear los nAChRs *in vivo*. Finalmente, otra limitación de nuestro estudio es que no medimos el efecto de MLA sobre las citocinas Th1 y Th17 o el efecto de los antagonistas de los nAChR sobre las citocinas de linfocitos Th2 y T reguladores.

Actualmente, la TB sensible a fármacos se puede curar mediante una terapia combinada. Sin embargo, el régimen terapéutico requiere de la ingesta promedio de cuatro antibióticos durante al menos seis meses, lo que resulta en importantes complicaciones de adherencia. Además, un metaanálisis reciente concluyó que los pacientes que estaban tomando antibioticoterapia de primera línea para la TB tenían un riesgo significativo de desarrollar recurrencia de la enfermedad, así como resistencia a múltiples fármacos (Pasipanodya & Gumbo, 2013). El año pasado, aproximadamente medio millón de casos y más de doscientas mil muertes se atribuyeron a MDR-TB (Global Tuberculosis Report, 2020). Los casos de TB-MDR requieren tratamiento con terapia de segunda línea, que es significativamente más cara, tóxica y menos efectiva que la terapia de primera línea (Suárez et al., 2002). En esta tesis se demostró que la administración combinada de antibióticos de segunda línea con antagonistas de los nAChR, acelera la reducción tanto de la carga de UFC pulmonar como de la inflamación. Por tanto, la administración de antagonistas nicotínicos podría reducir potencialmente la duración del tratamiento con antibióticos, un objetivo propuesto por la OMS (Global Tuberculosis Report, 2020).

Interesantemente, el sistema colinérgico es filogenéticamente antiguo y sus componentes han sido reportados en organismos vertebrados e invertebrados, incluidos insectos, plantas, hongos e incluso bacterias (Horiuchi, Kimura, Kato, Fujii, & Seki, 2003; I. Wessler & Kirkpatrick, 2008). La ACh pertenece a un enorme grupo de neuroquímicos reguladores que se han mantenido en la evolución desde hace más de 500 millones de años (Kochman, 2013). Las bacterias patógenas como *E. coli* y *S. aureus* son capaces de sintetizar ACh utilizando una enzima no caracterizada (Horiuchi et al., 2003). Además, microorganismos como *T. kodakaraensis*, una arqueobacteria, pueden sintetizar ACh a

través de la actividad de ChAT (Yamada et al., 2005). La estimulación colinérgica se ha implicado en funciones bacterianas como la motilidad (Horiuchi et al., 2003) y en la regulación del crecimiento en plantas y células de mamíferos (Faust & Doetsch, 1971; Horiuchi et al., 2003; Klapproth et al., 1997). En esta tesis demostramos que *Mtb* es capaz de producir ACh *in vitro* e informamos que la adición de ACh potencia el crecimiento de *Mtb*. En nuestro modelo de ratón, la producción de ACh probablemente se origina tanto en células no neuronales como en bacterias ubicadas dentro del pulmón. Importantemente, las mayores cantidades de ACh en los sobrenadantes de *Mtb* se encontraron durante su fase de crecimiento desfasado, lo que sugiere que durante su crecimiento inicial, *Mtb* podría secretar ACh como un factor de crecimiento autócrino o parácrino. Por el contrario, las mayores cantidades de ACh en lisados de *Mtb* se encontraron durante la subsiguiente fase de crecimiento exponencial. Esto es coherente con su papel como factor de crecimiento, ya que esta fase se asocia con el mayor crecimiento bacteriano y la absorción bacteriana o la producción interna de un factor de crecimiento se esperaría que ocurriera en esta etapa (Monod, 1949). De hecho, ya se han aislado otros factores de crecimiento secretados por *Mtb* que son activos en concentraciones muy bajas y que regulan su virulencia (Mukamolova et al., 2002; Rosser, Stover, Pareek, & Mukamolova, 2017). Por lo tanto, la existencia de otros factores de crecimiento secretados producidos por la *Mtb* que pudieran influir en su virulencia continúa siendo una posibilidad viable.

Los resultados mostrados con respecto a la mayor transformación del formazán por las micobacterias cuando estas fueron tratadas con ACh sustenta aún más la posibilidad de que exista algún tipo de receptor ancestral en *Mtb*. Estudios anteriores confirmaron el aumento del crecimiento del *Mtb* cuando se expuso al medio suplementado con nicotina (Kotian, & Col, 1983), lo que insinuaría que los efectos potenciadores y obstaculizadores de los antagonistas ACh y nAChR, respectivamente, sobre el crecimiento del *Mtb* que hemos demostrado podrían deberse a su interacción con una bacteria ancestral nAChR. De hecho, dos miembros ancestrales del nAChR de la familia del canal de iones pentamérico ligado y cerrado (pLGIC) ya han sido descritos en otras bacterias, la proteína homóloga de *Gloeobacter violaceus* (GLIC) y *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) (Zimmermann & Dutzler, 2011). El análisis filogenético predictivo encontró genes pLGIC bacterianos en muchos

taxones y, lo que es más importante, estaban presentes en varios patógenos bacterianos. Estos receptores pentaméricos median la transducción de la señal quimioeléctrica y están constituidos por subunidades homólogas y un dominio extracelular con cinco sitios de unión agonista. A pesar de la homología en la secuencia y la estructura, existe una divergencia filogenética significativa entre los receptores pentaméricos procariotas y eucariotas y sus propiedades y forma de funcionamiento en las bacterias siguen sin estar claras (Jaiteh, Taly, & Hélin, 2016). Sin embargo, una importante limitación, es que no hemos expuesto el mecanismo a través del cual la ACh podría favorecer el crecimiento de las micobacterias. Igualmente, sería interesante analizar, si la exposición de la micobacteria a ACh pueda provocar cambios en su fenotipo, que puedan influir en su virulencia.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la regulación positiva colinérgica durante la TB pulmonar favorece la infección por *Mtb* no solamente al alterar la respuesta inmunitaria protectora, sino también al favorecer la proliferación bacteriana. Los resultados encontrados sugieren que la ACh tiene efectos inmunomoduladores en el pulmón durante la TB activa, que, si bien son necesarios para mantener el equilibrio en la respuesta hacia *Mtb*, de forma elevada y sostenida produce efectos deletéreos en la enfermedad. Contrariamente, la administración de antagonistas nicotínicos resultó en una menor carga bacilar en los pulmones de ratones tratados. Sin embargo, es interesante que el antagonismo nicotínico es una especie de “espada de dos filos” que por un lado reduce las UFCs de *Mtb* en pulmón, pero que por el otro lado incrementa la respuesta inflamatoria de forma substancial. Queda claro que las vías de comunicación neuroinmunoendócrina pueden contribuir a la patogénesis de esta enfermedad y de esta forma transforme de mecanismos de protección, a mecanismos patogénicos. Los experimentos descritos en esta tesis pretenden ser una primera aproximación a los efectos patogénicos *in vivo* de ACh en la TB pulmonar. Por lo tanto, investigaciones adicionales deben explorar los mecanismos que favorecen la regulación positiva de los elementos colinérgicos discutidos aquí, así como el papel de otros factores colinérgicos durante la progresión de la enfermedad.

11. Bibliografía

- Alaridah, N., Lutay, N., Tenland, E., Rönholm, A., Hallgren, O., Puthia, M., ... Godaly, G. (2017). Mycobacteria Manipulate G-Protein-Coupled Receptors to Increase Mucosal Rac1 Expression in the Lungs. *Journal of Innate Immunity*.
<https://doi.org/10.1159/000453454>
- Arriaga, A. K., Orozco, E. H., Aguilar, L. D., Rook, G. A. W., & Hernández Pando, R. (2002). Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical and*

- Experimental Immunology*, 128(2), 229–237. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01832.x>
- Bai, X., Stitzel, J. A., Bai, A., Zambrano, C. A., Phillips, M., Marrack, P., & Chan, E. D. (2017). Nicotine impairs macrophage control of mycobacterium tuberculosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(3), 324–333. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0270OC>
- Barnes, P. J. (1984). The third nervous system in the lung: Physiology and clinical perspectives. *Thorax*. <https://doi.org/10.1136/thx.39.8.561>
- Barrios-Payán, J., Revuelta, A., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Villanueva, E. B., Gutiérrez, M. E. H., ... Hernandez-Pando, R. (2016). The contribution of the sympathetic nervous system to the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *Journal of Neuroimmunology*, 298(July), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.07.012>
- Barrios-Payán, J., Saqui-Salces, M., Jeyanathan, M., Alcántara-Vazquez, A., Castañon-Arreola, M., Rook, G., & Hernandez-Pando, R. (2012). Extrapulmonary locations of mycobacterium tuberculosis DNA during latent infection. *Journal of Infectious Diseases*, 206(8), 1194–1205. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis381>
- Beers, W. H., & Reich, E. (1970). Structure and activity of acetylcholine. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/228917a0>
- Bello-López, J. M., León-García, G., Rojas-Bernabé, A., Fernández-Sánchez, V., García-Hernández, O., Mancilla Ramírez, J., & Ibáñez-Cervantes, G. (2019). Morbidity Trends and Risk of Tuberculosis: Mexico 2007-2017. *Canadian Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1155/2019/8295261>
- Bini, E. I., Mata Espinosa, D., Marquina Castillo, B., Barrios Payán, J., Colucci, D., Cruz, A. F., ... Hernández Pando, R. (2014). The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*, 9(4), 2–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093831>
- Biondi, M., & Zannino, L. G. (1997). Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man: A review. *Psychotherapy and Psychosomatics*. <https://doi.org/10.1159/000289101>

- Bishop, B. B. (1948). Emotional factors and tuberculosis. a critical review of the literature. *Psychosomatic Medicine*.
- Bjur, D., Danielson, P., Alfredson, H., & Forsgren, S. (2008). Presence of a non-neuronal cholinergic system and occurrence of up- and down-regulation in expression of M2 muscarinic acetylcholine receptors: New aspects of importance regarding Achilles tendon tendinosis (tendinopathy). *Cell and Tissue Research*.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0524-1>
- Bongiovanni, B., Marín-Luevano, S., D'Attilio, L., Díaz, A., Fernández, R. del V., Santucci, N., ... Bottasso, O. (2020). Evidence that changes in antimicrobial peptides during tuberculosis are related to disease severity, clinical presentation, specific therapy and levels of immune-endocrine mediators. *Cytokine*.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154913>
- Bongiovanni, B., Mata-espinoza, D., Attilio, L. D., Leon-contreras, J. C., Marquez-velasco, R., Bottasso, O., ... Luisa, M. (2015). Effect of cortisol and / or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 95(5), 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.011>
- Bottasso, O., Bay, M. L., Besedovsky, H., & Del Rey, a. (2007). The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), 166–175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01962.x>
- Bottasso, Oscar. (2018a). *Chronic Infections and the Hypothalamus- Pituitary-Adrenal Axis in the Context of Immune-Mediated Inflammation*. 7, 79–89.
<https://doi.org/10.3233/NIB-170135>
- Bottasso, Oscar. (2018b). Chronic Infections and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis in the Context of Immune-Mediated Inflammation. *Advances in Neuroimmune Biology*. <https://doi.org/10.3233/NIB-170135>
- Bouchikh, S., Stirnemann, J., Prendki, V., Porcher, R., Kesthmand, H., Morin, A. S., ... Fain, O. (2012). Treatment duration of extra-pulmonary tuberculosis: 6months or more? TB-INFO database analysis. *Revue de Medecine Interne*.
<https://doi.org/10.1016/j.revmed.2012.05.008>
- Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nature*

- Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.1>
- Camarasa, J., Ros, C., Pubill, D., & Escubedo, E. (2010). Tumour necrosis factor alpha suppression by MDMA is mediated by peripheral heteromeric nicotinic receptors. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*.
<https://doi.org/10.3109/08923970903295104>
- Cambier, C. J., O’Leary, S. M., O’Sullivan, M. P., Keane, J., & Ramakrishnan, L. (2017). Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.003>
- Camus, J. C., Pryor, M. J., Médigue, C., & Cole, S. T. (2002). Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*.
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-2967>
- Carmona, J., Cruz, A., Moreira-Teixeira, L., Sousa, C., Sousa, J., Osorio, N. S., ... Saraiva, M. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* Strains Are Differentially Recognized by TLRs with an Impact on the Immune Response. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067277>
- Chakrabarti, B., Calverley, P. M. A., & Davies, P. D. O. (2007). Tuberculosis and its incidence, special nature, and relationship with chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD*.
- Chan, E. D., Keane, J., & Iseman, M. D. (2010). Should cigarette smoke exposure be a criterion to treat latent tuberculous infection? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0861ED>
- Choreño-Parra, J. A., Weinstein, L. I., Yunis, E. J., Zúñiga, J., & Hernández-Pando, R. (2020). Thinking Outside the Box: Innate- and B Cell-Memory Responses as Novel Protective Mechanisms Against Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00226>
- Colado, A., Genoula, M., Cougoule, C., Marín Franco, J. L., Almejún, M. B., Risnik, D., ... Borge, M. (2018). Effect of the BTK inhibitor ibrutinib on macrophage- and $\gamma\delta$ T cell-mediated response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Blood Cancer Journal*.
<https://doi.org/10.1038/s41408-018-0136-x>
- Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K. E., Kato-Maeda, M., ... Gagneux, S.

- (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics*, 45(10), 1176–1182.
<https://doi.org/10.1038/ng.2744>
- Contoli, M., Marcellini, A., Caramori, G., & A. Papi. (2017). Up-Regulation of the Cholinergic System in a Model of Ex-Vivo Virus-Induced COPD Exacerbation - Role of Tiotropium Bromide. *ATS Journals*.
- Cordero-Erausquin, M., Marubio, L. M., Klink, R., & Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptor function: New perspectives from knockout mice. *Trends in Pharmacological Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01489-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01489-9)
- Cudahy, P., & Sheno, S. V. (2016). Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgraduate Medical Journal*. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133278>
- Cyktor, J. C., Carruthers, B., Kominsky, R. A., Beamer, G. L., Stromberg, P., & Turner, J. (2013). IL-10 Inhibits Mature Fibrotic Granuloma Formation during *Mycobacterium tuberculosis* Infection . *The Journal of Immunology*.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202722>
- D'Attilio, L., Santucci, N., Bongiovanni, B., Bay, M. L., & Bottasso, O. (2018). Tuberculosis, the disrupted immune-endocrine response and the potential thymic repercussion as a contributing factor to disease physiopathology. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00214>
- da Silva, C. B., Wolkmer, P., da Silva, A. S., Paim, F. C., Tonin, A. A., Castro, V. S. P., ... Lopes, S. T. A. (2012). Cholinesterases as markers of the inflammatory process in rats infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.035501-0>
- Damaj, M. I., Welch, S. P., & Martin, B. R. (1995). In vivo pharmacological effects of dihydro- β -erythroidine, a nicotinic antagonist, in mice. *Psychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/BF02245100>
- Das, R., Koo, M. S., Kim, B. H., Jacob, S. T., Subbian, S., Yao, J., ... Bucala, R. (2013). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1301128110>

- de Jonge, W. J., van der Zanden, E. P., The, F. O., Bijlsma, M. F., van Westerloo, D. J., Bennink, R. J., ... Boeckxstaens, G. E. (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1229>
- Delgado-Vélez, M., Báez-Pagán, C. A., Gerena, Y., Quesada, O., Santiago-Pérez, L. I., Capó-Vélez, C. M., ... Lasalde-Dominicci, J. A. (2015). The $\alpha 7$ -nicotinic receptor is upregulated in immune cells from HIV-seropositive women: consequences to the cholinergic anti-inflammatory response. *Clinical & Translational Immunology*, 4(12), e53. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.31>
- Delgado, B. J., & Bajaj, T. (2020). Ghon Complex. In *StatPearls*.
- Dheda, K., Booth, H., Huggett, J., Johnson, M., Zumla, A., & Rook, G. (2005). Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(7), 1201–1209. <https://doi.org/10.1086/444545>
- Díaz-Quinonez, J. A., Ramírez-Hernández, J. A., Rodríguez-Pérez, M. E., Viesca-Treviño, C., & Guzmán-Bracho, C. (2020). Del ISET al InDRE. V. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Posición estratégica global, 2012-2019. *Gaceta de México*. <https://doi.org/10.24875/gmm.m20000383>
- Díaz, A., Bongiovanni, B., D'Attilio, L., Santucci, N., Dídoli, G., Fernández, R. del V., ... Bay, M. L. (2017). The clinical recovery of tuberculosis patients undergoing specific treatment is associated with changes in the immune and neuroendocrine responses. *Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx087>
- Donald, P. R., Diacon, A. H., Lange, C., Demers, A. M., Von Groote-Biddlingmeier, F., & Nardell, E. (2018). Droplets, dust and Guinea pigs: An historical review of tuberculosis transmission research, 1878-1940. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0173>
- Drain, P. K., Bajema, K. L., Dowdy, D., Dheda, K., Naidoo, K., Schumacher, S. G., ... Sherman, D. R. (2018). Incipient and subclinical tuberculosis: A clinical review of early stages and progression of infection. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-18>

- Eduardo, C. R. C., Alejandra, T. I. G., Guadalupe, D. R. K. J., Herminia, V. R. G., Lenin, P., Enrique, B. V., ... Iván, G. P. M. (2019). Modulation of the extraneuronal cholinergic system on main innate response leukocytes. *Journal of Neuroimmunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.01.008>
- Engel, O., Akyüz, L., Da Costa Goncalves, A. C., Winek, K., Dames, C., Thielke, M., ... Meisel, A. (2015). Cholinergic Pathway Suppresses Pulmonary Innate Immunity Facilitating Pneumonia after Stroke. *Stroke*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.008989>
- Enioutina, E. Y., Myers, E. J., Tvrdik, P., Hoidal, J. R., Rogers, S. W., & Gahring, L. C. (2015). The Nicotinic Receptor Alpha7 Impacts the Mouse Lung Response to LPS through Multiple Mechanisms. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121128>
- Espinosa-Cueto, P., Magallanes-Puebla, A., Castellanos, C., & Mancilla, R. (2017). Dendritic cells that phagocytose apoptotic macrophages loaded with mycobacterial antigens activate CD8 T cells via cross-presentation. *PLoS ONE*, 12(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182126>
- Espinosa, J. V. L., Marquina-Castillo, B., Santana-Martínez, R., Zetter, M., Maldonado, P., Becerril-Villanueva, E., ... Pando, R. H. (2020). *Experimental Pulmonary Tuberculosis Without Brain Infection in Male BALB/c Mice Induces Neuroinflammation and Behavioural Abnormalities*. 1–36. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-24798/v1>
- Faust, M. A., & Doetsch, R. N. (1971). Effect of drugs that alter excitable membranes on the motility of *Rhodospirillum rubrum* and *Thiospirillum jenense*. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/m71-033>
- Fenton, M. J., & Vermeulen, M. W. (1996). Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/iai.64.3.683-690.1996>
- Fernández, R. D. V., Díaz, A., Bongiovanni, B., Gallucci, G., Bértola, D., Gardeñez, W., ... D'Attilio, L. (2020). Evidence for a More Disrupted Immune-Endocrine Relation and Cortisol Immunologic Influences in the Context of Tuberculosis and Type 2 Diabetes

- Comorbidity. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00126>
- Field, S. K. (2015). Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Great promise or disappointment? *Therapeutic Advances in Chronic Disease*.
<https://doi.org/10.1177/2040622315582325>
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., & Kawashima, K. (2017a). Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, *134*(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., & Kawashima, K. (2017b). Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>
- Fujii, T., Watanabe, Y., Fujimoto, K., & Kawashima, K. (2005). Expression of acetylcholine in lymphocytes and modulation of an independent lymphocytic cholinergic activity by immunological stimulation. In *Advances in Neuroregulation and Neuroprotection*. <https://doi.org/10.1163/15693910260698320>
- Galle-Treger, L., Suzuki, Y., Patel, N., Sankaranarayanan, I., Aron, J. L., Maazi, H., ... Akbari, O. (2016). Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates ILC2-dependent airway hyperreactivity. *Nature Communications*.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13202>
- Garcia-Aguilar, T., Espinosa-Cueto, P., Magallanes-Puebla, A., & Mancilla, R. (2016). The mannose receptor is involved in the phagocytosis of mycobacteria-induced apoptotic cells. *Journal of Immunology Research*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/3845247>
- García Jacobo, R. E., Serrano, C. J., Enciso Moreno, J. a., Gaspar Ramírez, O., Trujillo Ochoa, J. L., Uresti Rivera, E. E., ... García Hernández, M. H. (2014). Analysis of Th1, Th17 and regulatory T cells in tuberculosis case contacts. *Cellular Immunology*, *289*(1–2), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.010>
- Genoula, M., Franco, J. L. M., Dupont, M., Kviatcovsky, D., Milillo, A., Schierloh, P., ... Balboa, L. (2018). Formation of foamy macrophages by tuberculous pleural effusions is triggered by the interleukin-10/signal transducer and activator of transcription 3 axis through ACAT upregulation. *Frontiers in Immunology*, *9*(MAR).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00459>

- Giebelen, I. A. J., Leendertse, M., Florquin, S., & Van Der Poll, T. (2009). Stimulation of acetylcholine receptors impairs host defence during pneumococcal pneumonia. *European Respiratory Journal*, 33(2), 375–381.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00103408>
- GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2020. (2020). GENEVA.
- Grando, S. A., Kawashima, K., & Wessler, I. (2020). A historic perspective on the current progress in elucidation of the biologic significance of non-neuronal acetylcholine. *International Immunopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106289>
- Guirado, E., Schlesinger, L. S., & Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis: Friend or foe. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0388-2>
- Gutsmann, T. (2016). Interaction between antimicrobial peptides and mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.031>
- Hagforsen, E., Einarsson, A., Aronsson, F., Nordlind, K., & Michaëlsson, G. (2000). The distribution of choline acetyltransferase- and acetylcholinesterase- like immunoreactivity in the palmar skin of patients with palmoplantar pustulosis. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03290.x>
- Hernández-Pando, R., Orozco-Esteves, H., Maldonado, H. A., Aguilar-León, D., Vilchis-Landeros, M. M., Mata-Espinosa, D. A., ... López-Casillas, F. (2006). A combination of a transforming growth factor- β antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 144(2), 264–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03049.x>
- Hernández-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., ... Madrid, M. V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26–33.
- Hernández-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavon, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., ... Madrid, M. V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and

- pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8911136>
- Hernandez-Pando, R. (1998). Emergent immunoregulatory properties of combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *QJM*, 91(11), 755–766. <https://doi.org/10.1093/qjmed/91.11.755>
- Hernandez-Pando, Rogelio, Bornstein, Q. L., Aguilar Leon, D., Orozco, E. H., Madrigal, V. K., & Martinez Cordero, E. (2000). Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00025.x>
- Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Honour, J., Silva, P., Leyva, R., & Rook, G. A. W. (1995). Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis? *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00176.x>
- Hogan, A. B., Jewell, B. L., Sherrard-Smith, E., Vesga, J. F., Watson, O. J., Whittaker, C., ... Hallett, T. B. (2020). Potential impact of the COVID-19 pandemic on HIV, tuberculosis, and malaria in low-income and middle-income countries: a modelling study. *The Lancet Global Health*. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30288-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30288-6)
- Horiuchi, Y., Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., & Seki, M. (2003). *Evolutional study on acetylcholine expression*. 72, 1745–1756. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02478-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02478-5)
- Huang, Y., Zhao, C., & Su, X. (2019). Neuroimmune regulation of lung infection and inflammation. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcy154>
- Hughes, D. T., & Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: Communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1836>
- Hunter, R. L. (2016). Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.11.010>
- Hunter, R. L. (2018). The pathogenesis of tuberculosis: The early infiltrate of post-primary

- (adult pulmonary) tuberculosis: A distinct disease entity. *Frontiers in Immunology*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02108>
- Islas Weinstein, L., & Pando, R. H. (2020). Cholinergic Regulation During Infection. In *Acetylcholine: Biochemistry, Functions and Role in Disease*.
- Jacoby, D. B., Xiao, H. Q., Lee, N. H., Chan-Li, Y., & Fryer, A. D. (1998). Virus- and interferon-induced loss of inhibitory M2 muscarinic receptor function and gene expression in cultured airway parasympathetic neurons. *Journal of Clinical Investigation*, 102(1), 242–248. <https://doi.org/10.1172/JCI11114>
- Jaiteh, M., Taly, A., & Héning, J. (2016). Evolution of pentameric ligand-gated ion channels: Pro-loop receptors. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151934>
- Jones, C. K., Byun, N., & Bubser, M. (2012). Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.199>
- Jordan, T. S., Spencer, E. M., & Davies, P. (2010). Tuberculosis, bronchiectasis and chronic airflow obstruction. *Respirology*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01749.x>
- Kahnert, A., Seiler, P., Stein, M., Bandermann, S., Hahnke, K., Mollenkopf, H., & Kaufmann, S. H. E. (2006). Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to Mycobacterium tuberculosis. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.200535496>
- Kawashima, K., Kajiyama, K., Fujimoto, K., Oohata, H., & Suzuki, T. (1993). Presence of acetylcholine in blood and its localization in circulating mononuclear leukocytes of humans. *Biogenic Amines*.
- Kawashima, Koichiro, Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., & Horiguchi, K. (2015). International Immunopharmacology Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *International Immunopharmacology*, 29(1), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.015>
- Kawashima, Koichiro, Yoshikawa, K., Fujii, Y. X., Moriwaki, Y., & Misawa, H. (2007). Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.036>

- Keane, J., Shurtleff, B., & Kornfeld, H. (2002). TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following *Mycobacterium tuberculosis* infection inhibits bacillary growth in an IFN- γ independent manner. *Tuberculosis*.
<https://doi.org/10.1054/tube.2002.0322>
- Klapproth, H., Reinheimer, T., Metzen, J., Münch, M., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., ... Wessler, I. (1997). Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 355(4), 515–523. <https://doi.org/10.1007/PL00004977>
- Koch, A., & Mizrahi, V. (2018). *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.012>
- Kochman, K. (2013). *Neurohormones : oxytocin , vasopressin and related peptides – structure , genes , receptors , and evolution*. 283–294.
- Koval, L., Lykhmus, O., Zhmak, M., Khrushchov, A., Tsetlin, V., Magrini, E., ... Skok, M. (2011). Differential involvement of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ and $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.003>
- KUBICA, G. P., KIM, T. H., & DUNBAR, F. P. (1972). Designation of Strain H37Rv as the Neotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-22-2-99>
- Kummer, W., & Krasteva-Christ, G. (2014). Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Current Opinion in Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.03.001>
- Kummer, W., & Lips, K. S. (2006). Non-neuronal acetylcholine release and its contribution to COPD pathology. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*.
<https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2006.02.008>
- Lafargue, M., Xu, L., Carlès, M., Serve, E., Anjum, N., Iles, K. E., ... Pittet, J.-F. (2012). Stroke-induced activation of the $\alpha 7$ nicotinic receptor increases *Pseudomonas aeruginosa* lung injury. *The FASEB Journal*, 26(7), 2919–2929.
<https://doi.org/10.1096/fj.11-197384>
- Lai, Y. F., Lin, T. M., Wang, C. H., Su, P. Y., Wu, J. T., Lin, M. C., & Eng, H. L. (2016).

- Functional polymorphisms of the TLR7 and TLR8 genes contribute to Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 98(March), 125–131.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.008>
- Larcombe, A. N., Zosky, G. R., Bozanich, E. M., Turner, D. J., Hantos, Z., & Sly, P. D. (2008). Absence of cholinergic airway tone in normal BALB/c mice. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 161(3), 223–229.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.01.009>
- Lauzardo, M., & Peloquin, C. A. (2016). Tuberculosis therapy for 2016 and beyond. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1080/14656566.2016.1215428>
- Lay, G., Poquet, Y., Salek-Peyron, P., Puissegur, M. P., Botanch, C., Bon, H., ... Altare, F. (2007). Langhans giant cells from M. Tuberculosis-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *Journal of Pathology*.
<https://doi.org/10.1002/path.2092>
- Lin, P. L., & Flynn, J. A. L. (2015). CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. *Seminars in Immunopathology*. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0490-8>
- Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2010). Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903856>
- Lin, P. L., Rodgers, M., Smith, L., Bigbee, M., Myers, A., Bigbee, C., ... Flynn, J. A. L. (2009). Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00592-09>
- Lips, K. S., Lührmann, A., Tschernig, T., Stoeger, T., Alessandrini, F., Grau, V., ... Kummer, W. (2007). Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sciences*, 80(24–25), 2263–2269. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.026>
- Liu, Y., Bi, L., Chen, Y., Wang, Y., Fleming, J., Yu, Y., ... Cheng, M. (2020). Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity. In *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.10.20033795>
- López-Hernández, Y., Rivas-Santiago, C. E., López, J. A., Mendoza-Almanza, G., & Hernandez-Pando, R. (2018). Tuberculosis and cigarette smoke exposure: An update of in vitro and in vivo studies. *Experimental Lung Research*.

- <https://doi.org/10.1080/01902148.2018.1444824>
- Lowe, D. M., Redford, P. S., Wilkinson, R. J., O'Garra, A., & Martineau, A. R. (2012). Neutrophils in tuberculosis: Friend or foe? *Trends in Immunology*.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.10.003>
- Lugo-Villarino, G., Vérollet, C., Maridonneau-Parini, I., & Neyrolles, O. (2011). Macrophage polarization: Convergence point targeted by Mycobacterium tuberculosis and HIV. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00043>
- Lyte, M. (2016). Microbial Endocrinology in the Pathogenesis of Infectious Disease. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0021-2015>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Marquina-Castillo, B., García-García, L., Ponce-De-León, A., Jimenez-Corona, M. E., Bobadilla-Del Valle, M., Cano-Arellano, B., ... Hernandez-Pando, R. (2009). Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of Mycobacterium tuberculosis in a murine model. *Immunology*.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x>
- Marrero, M. B., Lucas, R., Salet, C., Hauser, T. A., Mazurov, A., Lippiello, P. M., & Bencherif, M. (2010). An $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor-Selective Agonist Reduces Weight Gain and Metabolic Changes in a Mouse Model of Diabetes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(1), 173–180.
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.154633>
- Mata-espinosa, D., Barrios-payan, J., Herna, R., & Marquina-castillo, B. (2019). A significant therapeutic effect of silymarin administered alone , or in combination with chemotherapy , in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug- resistant strains : In vitro and in vivo studies. *PLoS ONE*, 1–20.
- Matsunaga, K., Klein, T. W., Friedman, H., & Yamamoto, Y. (2001). Involvement of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Suppression of Antimicrobial Activity and Cytokine Responses of Alveolar Macrophages to Legionella pneumophila Infection by Nicotine. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6518–6524.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6518>
- Mcgrath, M., Gey van pittius, N. C., Van helden, P. D., Warren, R. M., & Warner, D. F. (2014). Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt364>
- McLean, L. P., Smith, A., Cheung, L., Urban, J. F., Sun, R., Grinchuk, V., ... Shea-Donohue, T. (2016). Type 3 muscarinic receptors contribute to intestinal mucosal homeostasis and clearance of *nippostrongylus brasiliensis* through induction of TH2 cytokines. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00461.2014>
- Mendonça, A. M. C., Kritski, A. L., Land, M. G. P., & Sant'Anna, C. C. (2016). Abandonment of Treatment for Latent Tuberculosis Infection and Socioeconomic Factors in Children and Adolescents: Rio De Janeiro, Brazil. *PloS One*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154843>
- Miggiano, R., Rizzi, M., & Ferraris, D. M. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis, infection prevention and treatment. *Pathogens*.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9050385>
- Mina-Osorio, P., Rosas-Ballina, M., Valdes-Ferrer, S. I., Al-Abed, Y., Tracey, K. J., & Diamond, B. (2012). Neural signaling in the spleen controls B-cell responses to blood-borne antigen. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*.
<https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00027>
- Miyake, S. (2012). Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*.
<https://doi.org/10.1111/j.1759-1961.2011.00023.x>
- Monin, L., & Khader, S. A. (2014). Chemokines in tuberculosis: The good, the bad and the ugly. *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.004>
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Moreira, A. L., Tsenova-Berkova, L., Wang, J., Laochumroonvorapong, P., Freeman, S., Freedman, V. H., & Kaplan, G. (1997). Effect of cytokine modulation by thalidomide

- on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*.
[https://doi.org/10.1016/S0962-8479\(97\)90015-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8479(97)90015-0)
- Mukamolova, G. V., Turapov, O. A., Young, D. I., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., & Young, M. (2002). A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03184.x>
- Nguyen, L., & Pieters, J. (2005). The Trojan horse: Survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends in Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.03.009>
- Nizri, E., Irony-Tur-Sinai, M., Lory, O., Orr-Urtreger, A., Lavi, E., & Brenner, T. (2009). Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory System by Nicotine Attenuates Neuroinflammation via Suppression of Th1 and Th17 Responses. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902212>
- Nordman, J. C., Muldoon, P., Clark, S., Damaj, M. I., & Kabbani, N. (2014). The $\alpha 4$ nicotinic receptor promotes CD4⁺ T-Cell proliferation and a helper T-cell immune response. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.113.088484>
- O'Garra, A Redford, P. (2013). The immune response and tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 475–527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>
- Oehlers, S. H., Cronan, M. R., Scott, N. R., Thomas, M. I., Okuda, K. S., Walton, E. M., ... Tobin, D. M. (2015). Interception of host angiogenic signalling limits mycobacterial growth. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13967>
- Pasipanodya, J. G., & Gumbo, T. (2013). A meta-analysis of self-administered vs directly observed therapy effect on microbiologic failure, relapse, and acquired drug resistance in tuberculosis patients. *Clinical Infectious Diseases*.
<https://doi.org/10.1093/cid/cit167>
- Pavlov, V. A., Chavan, S. S., & Tracey, K. J. (2018). Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. *Annual Review of Immunology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053158>
- Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2017). Neural regulation of immunity: Molecular

- mechanisms and clinical translation. *Nature Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nn.4477>
- Pecyna, M. B., & Hryniewiecka, A. (1988). The role of psychological factors in the etiopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Polski Tygodnik Lekarski*.
- Peña, G., Cai, B., Ramos, L., Vida, G., Deitch, E. A., & Ulloa, L. (2011). Cholinergic Regulatory Lymphocytes Re-Establish Neuromodulation of Innate Immune Responses in Sepsis. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100013>
- Perry, C., Pick, M., Podoly, E., Gilboa-Geffen, A., Zimmerman, G., Sklan, E. H., ... Soreq, H. (2007). Acetylcholinesterase/C terminal binding protein interactions modify Ikaros functions, causing T lymphopenia. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404722>
- Potter, P. E., Meek, J. L., & Neff, N. H. (1983). Acetylcholine and Choline in Neuronal Tissue Measured by HPLC with Electrochemical Detection. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb13668.x>
- Racké, K., & Matthiesen, S. (2004). The airway cholinergic system: Physiology and pharmacology. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 17(4), 181–198.
<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2004.03.001>
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 352–366. <https://doi.org/10.1038/nri3211>
- Ramappa, V., & Aithal, G. P. (2013). Hepatotoxicity Related to Anti-tuberculosis Drugs: Mechanisms and Management. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2012.12.001>
- Ramos-Espinosa, O., Islas-Weinstein, L., Peralta-Álvarez, M. P., López-Torres, M. O., & Hernández-Pando, R. (2018). The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*.
<https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1457439>
- Razani-Boroujerdi, S., Singh, S. P., Knall, C., Hahn, F. F., Peña-Philippides, J. C., Kalra, R., ... Sopori, M. L. (2004). Chronic nicotine inhibits inflammation and promotes influenza infection. *Cellular Immunology*.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2004.07.007>
- Rea, P. (2014). Introduction to the Nervous System. In *Clinical Anatomy of the Cranial*

- Nerves*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800898-0.00019-1>
- Reardon, C., Duncan, G. S., Brüstle, A., Brenner, D., Tusche, M. W., Olofsson, P. S., ... Mak, T. W. (2013). Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(4), 1410–1415. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221655110>
- Reiling, N., Hölscher, C., Fehrenbach, A., Kröger, S., Kirschning, C. J., Goyert, S., & Ehlers, S. (2002). Cutting Edge: Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3480>
- Reinheimer, T., Münch, M., Bittinger, F., Racké, K., Kirkpatrick, C. J., & Wessler, I. (1998). Glucocorticoids mediate reduction of epithelial acetylcholine content in the airways of rats and humans. *European Journal of Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00185-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00185-X)
- Rey, A. del, Mahuad, C. V., Bozza, V. V., Bogue, C., Farroni, M. A., Bay, M. L., ... Besedovsky, H. O. (2007). Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.06.005>
- Richter, K., Koch, C., Perniss, A., Wolf, P. M., Schweda, E. K. H., Wichmann, S., ... Grau, V. (2018). Phosphocholine-modified lipooligosaccharides of Haemophilus influenzae inhibit ATP-induced IL-1 β release by pulmonary epithelial cells. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23081979>
- Rinner, I., Kawashima, K., & Schauenstein, K. (1998). Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. *Journal of Neuroimmunology*. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00155-0)
- Ríos-Barrera, V. A., Campos-Peña, V., Aguilar-León, D., Lascurain Ledesma, R., Meraz-Ríos, M. A., Moreno, J., ... Hernández-Pando, R. (2006). Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: Their relationship to mycobacterial virulence. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.200535202>

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*.
- Roca, F. J., & Ramakrishnan, L. (2013). TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.022>
- Rook, G. a, & Hernandez-Pando, R. (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Review of Microbiology*, 50, 259–284. <https://doi.org/10.2105/AJPH.42.8.1011-b>
- Rosser, A., Stover, C., Pareek, M., & Mukamolova, G. V. (2017). Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in Mycobacterium tuberculosis infection. *Critical Reviews in Microbiology*.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1283485>
- Roth, J., LeRoith, D., Collier, E. S., Weaver, N. R., Watkinson, A., Cleland, C. F., & Glick, S. M. (1985). Evolutionary origins of neuropeptides, hormones, and receptors: Possible applications to immunology. *Journal of Immunology*.
- Rothchild, A. C., Stowell, B., Goyal, G., Nunes-Alves, C., Yang, Q., Papavinasasundaram, K., ... Behar, S. M. (2017). Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by T cells during mycobacterium tuberculosis infection. *MBio*.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01514-17>
- Russell, D. G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S., & Altare, F. (2009a). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*, 10(9), 943–948. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>
- Russell, D. G., Cardona, P. J., Kim, M. J., Allain, S., & Altare, F. (2009b). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>
- Saeed, R. W., Varma, S., Peng-Nemeroff, T., Sherry, B., Balakhaneh, D., Huston, J., ... Metz, C. N. (2005). Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *Journal of Experimental Medicine*.
<https://doi.org/10.1084/jem.20040463>
- Salgame, P. (2005). Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Current Opinion in Immunology*, 17(4 SPEC.

- ISS.), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.006>
- Santucci, N., D’Attilio, L., Kovalevski, L., Bozza, V., Besedovsky, H., del Rey, A., ... Bottasso, O. (2011). A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*, 6(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026363>
- Saunders, B. M., & Britton, W. J. (2007). Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 103–111. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100027>
- Saunders, M. J., & Evans, C. A. (2020). COVID-19, tuberculosis and poverty: Preventing a perfect storm. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/13993003.01348-2020>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Senghore, M., Diarra, B., Gehre, F., Otu, J., Worwui, A., Muhammad, A. K., ... Antonio, M. (2020). Evolution of Mycobacterium tuberculosis complex lineages and their role in an emerging threat of multidrug resistant tuberculosis in Bamako, Mali. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56001-0>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., ... Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Shen, H., & Chen, Z. W. (2018a). The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in M.Tuberculosis infection. *Cellular and Molecular Immunology*, 15(3), 216–225. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.128>
- Shen, H., & Chen, Z. W. (2018b). The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in M.Tuberculosis infection. *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.128>
- Shi, X., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Li, Y., & Song, L. (2014). Acetylcholine modulates the immune response in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 38(1), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.008>

- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., & Enninga, J. (2012). Phagosomal rupture by Mycobacterium tuberculosis results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002507>
- Sir, D., Sir, D., Kotian, F. M., & Col, L. (1983). *Book reviews*. 76(June), 530–531.
- Slama, K., Chiang, C. Y., Enarson, D. A., Hassmiller, K., Fanning, A., Gupta, P., & Ray, C. (2007). Tobacco and tuberculosis: A qualitative systematic review and meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.
- Slight, S. R., Rangel-Moreno, J., Gopal, R., Lin, Y., Junecko, B. A. F., Mehra, S., ... Khader, S. A. (2013). CXCR5+ T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI65728>
- Srivastava, S., & Ernst, J. D. (2013). Cutting Edge: Direct Recognition of Infected Cells by CD4 T Cells Is Required for Control of Intracellular Mycobacterium tuberculosis In Vivo . *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301236>
- Srivastava, S., Ernst, J. D., & Desvignes, L. (2014). Beyond macrophages: The diversity of mononuclear cells in tuberculosis. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/imr.12217>
- St-Pierre, S., Jiang, W., Roy, P., Champigny, C., LeBlanc, É., Morley, B. J., ... Simard, A. R. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors modulate bone marrow-derived pro-inflammatory monocyte production and survival. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150230>
- Steenken, W., Oatway, W. H., & Petroff, S. A. (1934). Biological studies of the tubercle bacillus: III. dissociation and pathogenicity of the r and s variants of tite human tubercle bacillus (H37). *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.60.4.515>
- Steenken, William. (1935). Lysis of Tubercle Bacilli in Vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.3181/00379727-33-8330P>
- Stek, C., Allwood, B., Walker, N. F., Wilkinson, R. J., Lynen, L., & Meintjes, G. (2018). The Immune Mechanisms of Lung Parenchymal Damage in Tuberculosis and the Role of Host-Directed Therapy. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02603>

- Suárez, P. G., Floyd, K., Portocarrero, J., Alarcón, E., Rapiti, E., Ramos, G., ... Espinal, M. A. (2002). Feasibility and cost-effectiveness of standardised second-line drug treatment for chronic tuberculosis patients: A national cohort study in Peru. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08830-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08830-X)
- Takahashi, H. K., Iwagaki, H., Hamano, R., Yoshino, T., Tanaka, N., & Nishibori, M. (2006). Effect of nicotine on IL-18-initiated immune response in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0406236>
- Torres-Rosas, R., Yehia, G., Peña, G., Mishra, P., Del Rocio Thompson-Bonilla, M., Moreno-Eutimio, M. A., ... Ulloa, L. (2014). Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3479>
- Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01321>
- Tsoyi, K., Jang, H. J., Kim, J. W., Chang, H. K., Lee, Y. S., Pae, H. O., ... Chang, K. C. (2011). Stimulation of Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine attenuates inflammatory response in macrophages and improves survival in experimental model of sepsis through heme oxygenase-1 induction. *Antioxidants and Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3555>
- Tufariello, J. M., Chan, J., & Flynn, J. L. (2003). Latent tuberculosis: Mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infectious Diseases*, 3(9), 578–590. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00741-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00741-2)
- Valdez-Miramontes, C. E., Trejo Martínez, L. A., Torres-Juárez, F., Rodríguez Carlos, A., Marin-Luévano, S. P., de Haro-Acosta, J. P., ... Rivas-Santiago, B. (2020). Nicotine modulates molecules of the innate immune response in epithelial cells and macrophages during infection with *M. tuberculosis*. *Clinical and Experimental Immunology*, 199(2), 230–243. <https://doi.org/10.1111/cei.13388>
- Van Crevel, R., Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2011). Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/10.1155/2011/405310>
- Vecchione, M. B., Eiras, J., Suarez, G. V., Angerami, M. T., Marquez, C., Sued, O., ... Bruttomesso, A. C. (2018). Determination of dehydroepiandrosterone and its

- biologically active oxygenated metabolites in human plasma evinces a hormonal imbalance during HIV-TB coinfection. *Scientific Reports*.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24771-8>
- Verrall, A. J., G. Netea, M., Alisjahbana, B., Hill, P. C., & van Crevel, R. (2014). Early clearance of *Mycobacterium tuberculosis*: A new frontier in prevention. *Immunology*.
<https://doi.org/10.1111/imm.12223>
- Veziris, N., Ibrahim, M., Lounis, N., Andries, K., & Jarlier, V. (2011). Sterilizing activity of second-line regimens containing TMC207 in a murine model of tuberculosis. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017556>
- Vijayaraghavan, S., Karami, A., Aeinehband, S., Behbahani, H., Grandien, A., Nilsson, B., ... Darreh-Shori, T. (2013). Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity- The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *PLoS ONE*, 8(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065936>
- Welsh, K. J., Hunter, R. L., & Actor, J. K. (2013). Trehalose 6,6'-dimycolate - A coat to regulate tuberculosis immunopathogenesis. *Tuberculosis*.
[https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(13\)70003-9](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(13)70003-9)
- Wessler, I., & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*, 154(8), 1558–1571.
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., & Racké, K. (1999). The cholinergic “pitfall”: Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03016.x>
- Wessler, Ignaz, Bender, H., Harle, P., Hohle, K. D., Kirdorf, G., Klapproth, H., ... Racke, K. (1995). Release of [3H]acetylcholine in human isolated bronchi: Effect of indomethacin on muscarinic autoinhibition. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 151(4), 1040–1046.
- Wessler, Ignaz, Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R., & Kirkpatrick, C. J. (2003). The

- non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00083-3)
- WHO. (2020). WHO | Global tuberculosis report 2019. In *World Health Organization*. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.78>
- WITTKOWER, E. D. (1953). Psychological aspects of tuberculosis. *American Review of Tuberculosis*. <https://doi.org/10.1164/art.1953.67.6.869>
- Wongtrakool, C., Grooms, K., Ping, X. Du, Rivera, H., Ward, J., Roser-Page, S., ... Gauthier, T. W. (2012). In utero nicotine exposure promotes M2 activation in neonatal mouse alveolar macrophages. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.55>
- Xu, J., Wang, B., Hu, M., Huo, F., Guo, S., Jing, W., ... Lu, Y. (2017). Primary clofazimine and bedaquiline resistance among isolates from patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00239-17>
- Yamada, T., Fujii, T., Kanai, T., Amo, T., Imanaka, T., Nishimasu, H., ... Kawashima, K. (2005). Expression of acetylcholine (ACh) and ACh-synthesizing activity in Archaea. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.01.026>
- Yamaguchi, H., Friedman, H., & Yamamoto, Y. (2003). Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in controlling *Chlamydia pneumoniae* growth in epithelial HEp-2 cells. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3645-3647.2003>
- Zetter, M., Barrios-Payán, J., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Quintanar-Stephano, A., & Hernández-Pando, R. (2019). Involvement of Vasopressin in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: A New Therapeutic Target? *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00351>
- Zhang, Y. (2004). Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. *Frontiers in Bioscience*. <https://doi.org/10.2741/1291>
- Zhao, X., Khan, N., Gan, H., Tzelepis, F., Nishimura, T., Park, S. Y., ... Remold, H. G. (2017). Bcl-x L mediates RIPK3-dependent necrosis in M. tuberculosis-infected macrophages. *Mucosal Immunology*. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.12>
- Zheng, H., Lu, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhu, G., ... Zhang, Y. (2008). Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of

Mycobacterium tuberculosis strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS ONE*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002375>

Zimmermann, I., & Dutzler, R. (2011). *Ligand Activation of the Prokaryotic Pentameric Ligand- Gated Ion Channel ELIC*. 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001101>

Zwerdling, A., Delpino, M. V., Barrionuevo, P., Cassataro, J., Pasquevich, K. A., García Samartino, C., ... Giambartolomei, G. H. (2008). Brucella lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by Brucella abortus. *Microbes and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.035>

12. Apéndices

a) Artículo Original

b) Presentaciones relevantes en congresos

12.1 Artículo Original: “The Non-Neuronal Cholinergic System Contributes to the Immunopathological Progression of Experimental Pulmonary Tuberculosis.”

Contribución en el artículo

| | |
|---|------|
| Diseño de los experimentos y preguntas de investigación | ++ |
| Ejecución de los experimentos | ++ |
| Redacción del Manuscrito | ++++ |
| Análisis de Resultados | ++++ |
| Respuesta a los revisores | ++++ |

The Cholinergic System Contributes to the Immunopathological Progression of Experimental Pulmonary Tuberculosis

Leon Islas-Weinstein¹, Brenda Marquina-Castillo¹, Dulce A. Mata¹, Jaime Chávez², Luciana Balboa³, José L. Marín Franco³, Daniel Guerrero-Romero⁴, Jorge A. Barrios-Payan^{1*}, Rogelio H. Pando^{1*}

¹Department of Experimental Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Mexico, ²Department of Bronchial Hyperreactivity, National Institute of Respiratory Diseases (Mexico), Mexico, ³Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Medicina Experimental del CONICET, Academia Nacional de Medicina, Argentina, ⁴Departamento de Matemáticas, Escuela Superior de Física y Matemáticas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico

Submitted to Journal:
Frontiers in Immunology

Specialty Section:
Molecular Innate Immunity

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
581911

Received on:
10 Jul 2020

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

This work was financed by CONACYT, through the convocation of basic science support CB-2015-01; project # 255209. LI-W is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 587041 from CONACYT. This manuscript is part of his Ph.D. thesis under the aforementioned program and university

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: The animal study was reviewed and approved by Ethical Committee of Animal Experimentation (CICUAL).

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

Data availability statement

Generated Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

In review

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

RH-P and LI-W contributed to the theoretical background and the experimental design. LI-W performed all the experiments. LI-W and D-GR performed the data analysis. JB-P performed Mtb. infections and supervised animal experiments. BM-C performed and supervised molecular biology, immunohistochemistry, and acetylcholine-colorimetric experiments. DM-S performed and supervised Mtb. culture preparations and minimum inhibitory concentration experiments. JC performed and supervised the HPLC analysis. LB and JLM-F performed and supervised the macrophage experiments. LI-W and RH-P wrote the manuscript. JB-P provided the funds.

Keywords

cholinergic, pulmonary inflammation, Mycobacterium tuberculosis (M Tuberculosis), acetylcholine (ACh), nAChR antagonism, immune response, Tuberculosis, Choline acetyltransferase (ChAT)

Abstract

Word count: 306

The cholinergic system is present in both bacteria and mammals and regulates inflammation during bacterial respiratory infections through neuronal and non-neuronal production of acetylcholine (ACh) and its receptors. However, the presence of this system during the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis (TB) in vivo and in its causative agent *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb.) has not been studied. Therefore, we used an experimental model of progressive pulmonary TB in BALB/c mice to quantify pulmonary ACh using high-performance liquid chromatography during the course of the disease. In addition, we performed immunohistochemistry in lung tissue to determine the cellular expression of cholinergic system components, and then administered nicotinic receptor (nAChR) antagonists to validate their effect on lung bacterial burden, inflammation, and pro-inflammatory cytokines. Finally, we subjected Mtb. cultures to colorimetric analysis to reveal the production of ACh and the effect of ACh and nAChR antagonists on Mtb. growth. Our results show high concentrations of ACh and expression of its synthesizing enzyme choline acetyltransferase (ChAT) during early infection in lung epithelial cells and macrophages located in lung granulomas and alveoli. During late progressive TB, lung ACh upregulation was even higher and coincided with ChAT and $\alpha 7$ nAChR subunit expression in immune cells. Moreover, the administration of nAChR antagonists increased pro-inflammatory cytokines, reduced bacillary loads and synergized with antibiotic therapy in multidrug resistant TB. Finally, in vitro studies revealed that the bacteria produces nanomolar concentrations of ACh, while administering ACh and nicotinic antagonists to Mtb. cultures induced or inhibited bacterial proliferation, respectively. These results suggest that Mtb. possesses a cholinergic system and upregulates the lung non-neuronal cholinergic system, particularly during late progressive TB. The upregulation of the cholinergic system during infection could aid both bacterial growth and immunomodulation within the lung to favor disease progression. Furthermore, the therapeutic efficacy of modulating this system suggests that it could be a target for treating the disease.

Contribution to the field

Despite the COVID epidemic, tuberculosis (TB) remains the deadliest infectious disease worldwide. The World Health Organization estimates approximately 10 million new cases of active tuberculosis per year and approximately one fourth of the world population is believed to be latently infected with TB. Patients taking antibiotic therapy for both drug-sensible and drug-resistant TB, commonly present side effects and discontinue therapy. Moreover, many aspects of the immunopathogenesis of tuberculosis are currently unknown. We believe that this manuscript is a significant contribution to the field of neuroimmunology, as we reveal for the first time that the lung's cholinergic system is potentiated during TB infection affecting the lung's immune response and disease progression. Furthermore, we also demonstrate for the first time that the infecting bacilli is capable of producing acetylcholine and that it employs it for its growth. Although our findings have been obtained using an experimental model, we suggest that this system could be a relevant therapeutic target and propose that nAChR antagonists be used as an adjunct therapy to antibiotics in multidrug-resistant disease. More importantly, we lay the groundwork for future research not only in the TB field but also for scientists and clinicians studying other respiratory infections.

Funding statement

12.2 Presentaciones relevantes del trabajo en congresos.

Presentación Oral modalidad de “Poster Blitz” (presentación corta) en el XVI Simposio de Mecanismos Colinérgicos y presentación de poster durante el congreso. 2019 Rehovot, Israel

מכון ויצמן למדע
WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE

מדע לרווחת האנושות
Science for the benefit of humanity

70

ISCM
XM

**16th International Symposium
on Cholinergic Mechanisms**
2nd MISRAHI SYMPOSIUM ON NEUROBIOLOGY

December 8-12, 2019
The David Lopatie Conference Centre
Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

Organizing Committee

| | | |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| Lili Anglister (Jerusalem), Chair | Claire Legay (Paris) | Hermona Soreq (Jerusalem) |
| John Dani (Philadelphia) | Marco Prado (London, Ontario) | Joel Sussman (Rehovot) |
| Abraham Fisher (Rehovot) | Jackie Schiller (Haifa) | Palmer Taylor (La Jolla) |
| Dan Frenkel (Tel Aviv) | Israel Silman (Rehovot) | Karl Tsism (Hong Kong) |
| Ezio Giacobini (Geneva) | | Ran Zichel (Ness Ziona) |

Presentación Oral (presentación corta) en el 5° Simposio de Acetilcolina No Neuronal y presentación de poster durante el congreso. 2019 Long Beach, EUA. Premio a mejor póster y a mejor presentación oral.





La Sociedad Mexicana de Inmunología A. C.

a través de su

Sección Estudiantil

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

León David Islas Weinstein

Por su destacada participación como ponente en modalidad ORAL y asistente del
X FORO ESTUDIANTIL SMI 2018, celebrado los días 24 y 25 de octubre de 2018 en el
Auditorio de la Secretaría Académica del Cinvestav- Zacatenco.

Dr. Rogelio Hernández Pando
Presidente

Dr. Rommel Chacón Salinas
Secretario-Tesorero



Presentación de póster en el 39 Congreso de la ESM, 2018, Dresden, Alemania.

CERTIFICATE OF ATTENDANCE



European Society of Mycobacteriology

*Dresden, Germany
July 04, 2018*

This is to certify that

León Islas Weinstein

has attended the

39th Congress European Society of Mycobacteriology

in Dresden (Germany), July 01 – 04, 2018

Daniela Maria Cirillo, MD PhD
Congress President and President of the ESM

Head of Emerging Bacterial Pathogens Unit
San Raffaele Scientific Institute
Via Olgettina 60
20132 Milano, Italy

Presentación Oral Corta, XI Congreso Internacional de Inmunología.
2016 Melbourne, Australia



Certificate of Attendance

This is to certify that

Leon Islas

participated in the

International Congress of Immunology 2016

Melbourne Convention & Exhibition Centre
Victoria, Australia

21 - 26 August 2016

Jose A Villadangos

Jose A Villadangos
President

International Congress of Immunology 2016

Presentación de póster en el XXII Congreso Nacional de Inmunología,
Zacatecas, México, 2016



SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGIA

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

LEÓN ISLAS WEINSTEIN

Por su participación en el XXII Congreso Nacional
de Inmunología, celebrado del 19 al 23 de abril en
Zacatecas de 2016

Dr. Constantino III Roberto López Macías
PRESIDENTE SMI (2014-16)

Dra. Laura Bonifaz Alfonzo
SECRETARIA-TESORERA SMI (2014-16)



Presentación Oral Corta, XI Congreso 'ImmunoColombia' de la Asociación Latinoamericana de Inmunología. 2015, Medellín, Colombia



IMMUNOCOLOMBIA 2015

11th CONGRESS OF THE LATIN AMERICAN
ASSOCIATION OF IMMUNOLOGY- ALAI
10th COLOMBIAN CONGRESS OF ALLERGY,
ASTHMA AND IMMUNOLOGY - ACAAI

Medellín, Colombia, October 13 - 16th, 2015

We hereby certify that

LEON ISLAS

Presented the abstract:

ORAL: ROLE OF THE CHOLINERGIC SYSTEM IN A MOUSE

Luis F. García
ALAI President



Ana María Segura
ACAAI President



