

Infezione da SARS-CoV-2: il doppio volto di *Ianus* della nicotina. Approcci molecolari e cellulari

Leonardo Lupacchini, Carlo Tomino, Patrizia Russo

Riassunto

Introduzione: Il SARS-CoV-2 è un nuovo virus aggressivo che causa la COVID-19, una grave malattia senza un trattamento efficace. Il fumo, in particolare la nicotina, la sua componente psicotropa, è implicata nell'infezione da SARS-CoV-2. La nicotina determina la sovra-regolazione dell'espressione dell'ACE2, il recettore del SARS-CoV-2. Tuttavia, alcuni lavori considerano la nicotina come un fattore protettivo contro il SARS-CoV-2 per la sua proprietà antinfiammatoria.

Obiettivo: Esplorare l'attività molecolare/cellulare della nicotina che può aumentare la suscettibilità al SARS-Cov-2 o che può proteggere da esso.

Metodi: Le cellule HBEpC, si-mRNA- α 7-HBEpC, A549 e cellule HeLa sono trattate: (a) per 1 h o continuamente con 10⁻⁷M nicotina; (b) con 10⁻⁶ M α -Bungarotossina+nicotina per 1 h; (c) con Poli(I:C). L'espressione di α 7-nAChR e ACE2 è valutata con *western blot*, p53/phosphop53, IL-6 e TNF- α da ELISA, la vitalità cellulare con *trypan blue dye* esclusione, la proliferazione con il conteggio delle cellule, la migrazione con il saggio di migrazione cellulare e la senescenza con l'attività SA- β -Gal.

COVID-19 infection: Two-Faces *Ianus* of Nicotine. Molecular and Cellular Approaches

Leonardo Lupacchini, Carlo Tomino, Patrizia Russo

Abstract

Background: SARS-CoV-2 is a new aggressive virus causing COVID-19, a severe disease with no effective treatment. Smoking, specifically nicotine, its psychotropic component, is implicated in SARS-CoV-2 infection. Nicotine up-regulates the expression of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. Nonetheless, some works consider Nicotine as a protective factor against SARS-CoV-2 for its anti-inflammatory property.

Objective: Explore the molecular/cellular activity of nicotine that may increase the susceptibility to SARS-CoV-2 or that may protect by it.

Methods: HBEpC, si-mRNA- α 7-HBEpC, A549 and HeLa cells are treated: (a) for 1 h or continuously with 10⁻⁷M Nicotine; (b) with 10⁻⁶ M α -Bungarotoxin+Nicotine for 1 h; (c) with poly (I:C). Expression of α 7-nAChR and ACE2 is evaluated by *western blot*, p53/phosphop53, IL-6 and TNF- α by ELISA, cell viability by *trypan-blue dye* exclusion, proliferation by cell counting, migration by cell migration assay and senescence by SA- β -Gal activity.

Results: Nicotine induces up-regulation of α 7-nAChR (HBEpC>A549>HeLa) and ACE2 (HBEpC>A549, no in HeLa), cell cytotoxicity reduction, sustained cell proliferation and migration, delayed senescence, TNF- α /IL-6 release reduction.

Risultati: La nicotina induce la sovra-regolazione di $\alpha 7$ -nAChR (HBEpC>A549>HeLa) e ACE2 (HBEpC > A549, no in HeLa), riduzione della citotossicità cellulare, proliferazione e migrazione cellulare sostenuta, senescenza ritardata, riduzione del rilascio di TNF- α /IL-6.

Conclusioni: Gli effetti indotti dalla nicotina possono essere considerati negativi o positivi alla luce del suo possibile utilizzo nell'infezione da SARS-CoV-2. Anche se la sua proprietà antinfiammatoria è interessante, gli effetti collaterali indotti dalla nicotina dopo l'attivazione di $\alpha 7$ -nAChR, sono importanti. Un'attenta analisi dei rischi e dei benefici della nicotina deve essere attentamente analizzata e valutata.

Parole chiave: ACE2, proliferazione e migrazione cellulare, nicotina, citochine pro-infiammatorie, SARS-CoV-2, senescenza.

Introduzione

Recentemente, diversi autori, noi inclusi, hanno considerato la nicotina tra i fattori responsabili nell'infezione da SARS-CoV-2 [1-8]. In questi studi, i fumatori assumono nicotina, l'agente psicotropo presente nel fumo di tabacco [9], che è in grado di indurre l'espressione dell'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE2), responsabile della conversione di angiotensina (Ang), Ang I e Ang-(1-9) con successiva formazione di Ang-(1-7). ACE2 è l'unico recettore di SARS-

CoV-2 confermato sperimentalmente ed è ampiamente espresso nei tessuti umani, comprese le cellule delle vie aeree [10] e le cellule del cancro del polmone come la linea cellulare di adenocarcinoma umano A549 [11]. Le cellule A549 supportano la replica di SARS-CoV [12] e di MERS-CoV [13] e, poiché l'analisi genomica di SARS-CoV-2 è identica al 79,6% a SARS-CoV [14], si deduce che A549 potrebbe essere suscettibile, anche all'infezione da SARS-CoV-2, ma perché avvenga l'infezione completa devono essere trasfettate con ACE2 umano. La

completa comprensione dei meccanismi coinvolti nella regolazione dell'aumento dell'espressione di ACE2 polmonare per mezzo della nicotina rimane ancora sconosciuta e da investigare. Tra i meccanismi impiegati dalla nicotina, risulta un possibile ruolo dei recettori colinergici dell'acetilcolina (nAChR); infatti, tutte le cellule esprimenti ACE2, esprimono anche nAChR [15,16]. Recentemente abbiamo dimostrato [7] che la nicotina, attraverso l'attivazione di $\alpha 7$ -nAChR, aumenta il livello di espressione di ACE2 nelle cellule epiteliali bronchiali umane

Conclusions: *The effects induced by Nicotine may be considered either negative or positive on the light of its possible use in COVID-19 infection. Although its anti-inflammatory property is interesting, the side-effects induced by Nicotine after $\alpha 7$ -nAChR activation, are important. A careful analysis of the Nicotine-risks and benefits shall be carefully analyzed and evaluated.*

Keywords: *ACE2, cell proliferation and migration, nicotine, pro-inflammatory cytokines, SARS-CoV-2, Senescence.*

Introduction

Recently, different Authors, including ourselves, have implicated nicotine in SARS-CoV-2 infection [1-8]. In these studies, smoking or nicotine, the psychotropic agent present on tobacco smoking [9], are able to induce Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) expression, the enzyme responsible of Angiotensin (Ang) Ang I to Ang-(1-9) conversion with subsequent Ang-(1-7) formation. ACE2 is the only experimentally confirmed SARS-CoV-2 receptor, widely expressed in human tissues including airway cells [10] and lung cancer cells such as the human

adenocarcinoma A549 cell line [11]. A549 cells support the replication of SARS-CoV [12] as well as of MERS-CoV [13] and, since the genomic analysis of SARS-CoV-2 is 79.6% identical to SARS-CoV [14], A549 may be susceptible to SARS-CoV-2 infection, however to be effectively infected A549 cells require human ACE2 transfection. The comprehensive understanding of the mechanisms involved in the nicotine-upregulation of ACE2 pulmonary expression is still unknown. Among these, there is a possible role of nAChR, engaged by nicotine; indeed all these cells express

Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) [15,16]. We have shown [7], recently, that Nicotine, through activation of $\alpha 7$ -nAChR, increases the expression level of ACE2 in Human Bronchial Epithelial Cells (HBEpC) inducing: (i) phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236), (ii) Akt1 and phospho-Akt (Ser473 and Thr308) and (iii) phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) [7]. We observed no increase of ACE2 in $\alpha 7$ -silenced cells (si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC: no or low expression of $\alpha 7$ -nAChR proteins) or in the presence of α -Bungarotoxin (α -BTX), an $\alpha 7$ -nAChR antagonist [17]. These last obser-

(HBEpC), inducendo la trascrizione di (i) fosfo-S6 (Ser235/236) proteina ribosomica, (ii) Akt1 e fosfo-Akt (Ser473 e Thr308) e (iii) fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) [7]. Al contrario, non abbiamo osservato alcun aumento di ACE2 nelle cellule silenziate per $\alpha 7$ (si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC: nessuna o bassa espressione di proteine $\alpha 7$ -nAChR) o in presenza di α -bungarotossina (α -BTX), un'antagonista di $\alpha 7$ -nAChR [17]. Queste ultime osservazioni sono a sostegno della nozione che l'aumento di ACE2 sia specificamente mediato da $\alpha 7$ -nAChR. Anche se, molti lavori scientifici sostengono un aumento del rischio di COVID-19 nei fumatori [1-8,18], alcune pubblicazioni, spesso edite su riviste prive del controllo dei revisori, affermano che fumare tabacco o l'utilizzo diretto di nicotina possa essere un fattore protettivo contro l'infezione da SARS-CoV-2 [18]. Il nostro studio ha lo scopo di esplorare a fondo i diversi effetti biolo-

gici indotti dalla nicotina che possono essere protettivi o possono aumentare la gravità della COVID-19 (le due facce di *lanus* della nicotina).

Materiali e metodi

Culture cellulari e trattamento

Le cellule epiteliali bronchiali umane (HBEpC) sono state ottenute da Cell Applications Inc. (www.cellapplications.com/product n. 502K-05a) e coltivate in mezzo di crescita epiteliale bronchiale/tracheale completo (www.cellapplications.com/product) [7]. si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC sono state ottenute come precedentemente descritto [7]. Le cellule A549 ATCC® CCL-185® e le cellule HeLa ATCC® CCL-2® sono state ottenute da ATCC (www.atcc.org/products/all/CCL-185 o www.atcc.org/products/all/CCL-2) e mantenute in RPMI1640/siero fetale di vitello scomplementato (www.thermofisher.com). Tutti i tipi cellulari sono stati trattati alla concentrazio-

ne di $7,5 \times 10^4$ cellule/cm² di cellule semi-confluenti: (a) per 1 ora con nicotina zero o $1,0 \times 10^{-7}$ M (Sigma – Aldrich, Milano, Italia) disciolta in soluzione salina e nel mezzo; (b) con α -bungarotossina $1,0 \times 10^{-6}$ M (α -BTX, Sigma – Aldrich, Milano, Italia) disciolta in soluzione salina, in presenza continua di nicotina a zero o $1,0 \times 10^{-7}$ M; (c) trattato con poly (I:C)-LMW (InvivoGen, San Diego, USA) a una concentrazione di 20 μ g/ml; (d) trattato in modo continuo con nicotina per passaggi aggiuntivi, 1 passaggio ogni 48 ore per un totale di 16 passaggi, in alcuni esperimenti la nicotina era presente per 24 passaggi (rilevazione dell'attività SA- β -Gal).

Rivelamento per western blot

Le cellule sono state lisate utilizzando un tampone di lisi completo (Roche) in presenza di un cocktail di inibitori delle proteasi (PIC, Complete-M, Roche). Concentrazione proteica determinata tramite test

vations strongly support the notion that the increase of ACE2 is specifically mediated by $\alpha 7$ -nAChR. Although, many works sustain an increased risk of COVID-19 in smokers [1-8,18] some works, often published on non-peer-reviewed journals, state that smoking or nicotine may be a protective factor against SARS-CoV-2 infection [18]. Our study is aimed to deeply explore the different biological effects induced by nicotine that may be protective or may increase the severity of COVID-19 (the two *lanus* faces of nicotine).

Materials and Methods

Cells and treatment

Human Bronchial Epithelial Cells (HBEpC) were obtained from Cell Applications Inc. (www.cellapplications.com/product no. 502K-05a) and cultured in complete Bronchi-

al/Tracheal Epithelial Cell Growth Medium (www.cellapplications.com/product) as described previously [7]. si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC were obtained as described previously [7]. Human adenocarcinoma A549 ATCC® CCL-185® and human cervical carcinoma HeLa ATCC® CCL-2® were obtained from ATCC® (www.atcc.org/products/all/CCL-185 or www.atcc.org/products/all/CCL-2) and maintained in RPMI1640/heat-inactivated 10% Fetal calf serum (<https://www.thermofisher.com>). $7,5 \times 10^4$ cells/cm² semi-confluent cells were treated: (a) for 1 h with zero or 1.0×10^{-7} M nicotine (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) dissolved in saline in complete medium; (b) with 1.0×10^{-6} M α -Bungarotoxin (α -BTX, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) dissolved in saline, in the continuous presence of nicotine at zero or 1.0×10^{-7} M for 1 h; (c) treated with poly (I:C)-LMW (InvivoGen, San Diego, USA)

at a concentration of 20 μ g/ml, as reported in the result section; (d) treated continuously with nicotine for additional passages, 1 passage every 48h for a total of 16 passages. In some experiment nicotine was added for 24 passages (SA- β -gal activity detection).

Western Blot Detection

Cells were lysed using complete lysis buffer (Roche) plus protease inhibitor cocktail (PIC, Complete-M, Roche). The protein concentration was determined using the BCA protein assay (Roche). After mixing with Laemmli's buffer, samples were subjected to SDS-PAGE and Western blotting. For immunodetection, the following antibodies were used: anti-ACE2 (E-11): sc-390851 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA), anti- $\alpha 7$ -nAChR NBP1-52375 (Novus Biological, Cambridge UK), anti- β -actin catalog number: A3853

proteico BCA (Pierce). Dopo, i campioni lisati sono stati miscelati con Laemmli buffer, e sono stati sottoposti a SDS-PAGE, *Western blotting* e immuno-detenzione mediante ibridazione con i seguenti anticorpi: anti-ACE2 (E-11): (sc-390851 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA), anti- $\alpha 7$ -nAChR (Novus Biological, Cambridge UK), anti- β -actina (Sigma-Aldrich). Rilevazione delle proteine note tramite anticorpi secondari anti-Mouse o anti-Rabbit marcati con perossidasi di rafano (Pierce). L'analisi densitometrica ha quantificato i livelli relativi di espressione proteica ed è stata eseguita dopo acquisizioni con Amersham Image Quant800 (EG Healthcare), con il software ImageQuant TL.

Analisi di p53, fosfo-p53, IL-6 e TNF- α

Il kit ELISA *sandwich multi-target* dell'apoptosi PathScan® (tecnologia di segnalazione cellulare) è stato utilizzato per rilevare p53 e fosfo-

p53, gli esperimenti sono stati condotti secondo protocollo del produttore. Anti-IL-6 umana (Kit Elisa ab46027) e anti-TNF- α umana (Kit Elisa ab181421) acquistati da Abcam (Biotech, Scienze della vita, Cambridge, Regno Unito), esperimenti condotti secondo protocollo del produttore.

Migrazione cellulare

Test di migrazione cellulare a 24 pozzetti (CytoSelect® 8 μ m, formato fluorometrico) ottenuto da Cell Biolabs [numero di catalogo CBA-101-C (San Diego, USA)], esperimenti condotti secondo protocollo del produttore.

Senescenza cellulare

Kit per test di senescenza cellulare a 96 pozzetti (attività SA- β -Gal, formato fluorometrico) ottenuto da Cell Biolabs [numero di catalogo CBA-231 (San Diego, USA)] esperimenti condotti secondo protocollo del produttore.

(Sigma-Aldrich Italia). Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies catalog: 711-035-152 (Jackson, Cambridge, UK) and an enhanced chemiluminescence kit (Western blot detection reagent, GE Healthcare UK Limited) were used for the detection of recognized proteins. Densitometric analysis for quantification of the relative level of protein expression was performed using Amersham Image Quant800 (EG Healthcare) with software ImageQuant TL.

Evaluation of p53, IL-6 and TNF- α PathScan® apoptosis multi-target sandwich ELISA kit (Cell signaling technology) was used to detect p53 and phospho-p53 (pP53) and experiments were performed according to the manufacture's protocol. Human IL-6 Elisa Kit ab46027 and Human TNF- α Elisa Kit ab181421 were purchased by

Abcam (Biotech, Life sciences, Cambridge, UK) and experiments were performed according to the manufacture's protocol.

Cell Migration

CytoSelect® 24-Well Cell Migration Assay (8 μ m, Fluorometric format) was obtained by Cell Biolabs [catalog number CBA-101-C (San Diego, USA)] and experiments were performed according to the manufacture's protocol.

Cellular Senescence

96-Well Cellular Senescence Assay Kit (SA- β -gal Activity, Fluorometric Format) was obtained by Cell Biolabs [catalog number CBA-231 (San Diego, USA)] and experiments were performed according to the manufacture's protocol.

Statistical Analysis

Data were managed and analyzed using GraphPad Prism 8.1® (Graph-

Analisi statistica

Dati gestiti e analizzati utilizzando GraphPad Prism 8.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA); test t utilizzato per valutare la significatività statistica. Dati descritti come media \pm DS (deviazione standard). Tutti gli esperimenti erano eseguiti almeno in doppio in triplicato.

Considerato un valore $p > 0,05$ non statisticamente significativo.

Risultati

La concentrazione di nicotina utilizzata in tutti gli esperimenti è 1×10^{-7} M, considerato che la concentrazione media del picco ematico di nicotina dopo aver fumato una sigaretta è $3,1 \times 10^{-7}$ M (si veda **Box 1**). Tutti gli esperimenti in vitro sono stati condotti con questa concentrazione di nicotina che mima l'esposizione umana.

In Box 1 sono riportate la terminologia e le spiegazioni per compren-

Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA); t test was used to evaluate statistical significance. Data were described as mean \pm SD (standard deviation). All experiments were performed at least twice in triplicate. A p-value $>$ of 0.05 was considered as statistically not significant (NS).

Results

The nicotine concentration used in all experiments is 1×10^{-7} M, since the average human blood peak of nicotine, after having smoking one cigarette, is 3.1×10^{-7} M (see **Box 1**). Thus, all *in vitro* experiments were performed at nicotine concentration that mimics human exposure. Box 1 reports terminologies and explanations to understand the significance of all the experiments.

Box 1 Terminologia e chiarimenti.**Box 1** Terminology and Explanation.

A549 ATCC® CCL-185®	La linea di cellule tumorali A549, derivata da un carcinoma a cellule alveolari umane, è propagata in vitro (più di 1.000 generazioni di cellule). Queste cellule hanno un cariotipo umano e sembrano derivate da una singola cellula madre. Le cellule con 64 (22%), 65 e 67 conteggi di cromosomi si sono verificate anche a frequenze relativamente alte. La maggior parte delle cellule aveva due cromosomi X e due Y. Tutte le cellule A549 esaminate al microscopio elettronico a livello di passaggio sia precoce che tardivo contengono corpi di inclusione citoplasmatica multilamellare tipici di quelli che si trovano nelle cellule epiteliali alveolari di tipo II del polmone. Questa linea fu iniziata nel 1972 da Giard e coll. attraverso la coltura espianata di tessuto carcinomatoso polmonare da un maschio caucasico di 58 anni [19].	The A549 tumor-cell line, initiated from a human alveolar cell carcinoma, has been continuously propagated in vitro for more than 3 years (more than 1,000 cell generations). These cells have a human karyotype and appear to have been derived from a single parent cell. Cells with 64 (22%), 65, and 67 chromosome counts also occurred at relatively high frequencies. Most cells had two X and two Y chromosomes. All A549 cells examined by electron microscopy at both early and late passage levels contain multilamellar cytoplasmic inclusion bodies typical of those found in type II alveolar epithelial cells of the lung. This line was initiated in 1972 by Giard et al. through explant culture of lung carcinomatous tissue from a 58-year-old Caucasian male [19].
Sito allosterico Allosteric site	È un sito di legame sulla superficie di un enzima diverso dal sito attivo. Mediante inibizione non competitiva, il legame dell'inibitore a un sito allosterico inibisce l'attività dell'enzima. In un enzima allosterico, il legame di una molecola regolatrice con il sito allosterico modifica la forma complessiva dell'enzima, consentendo al substrato di legarsi al sito attivo o impedendo il legame del substrato.	A binding site on the surface of an enzyme other than the active site. In noncompetitive inhibition, binding of the inhibitor to an allosteric site inhibits the activity of the enzyme. In an allosteric enzyme, the binding of a regulatory molecule to the allosteric site changes the overall shape of the enzyme, either enabling the substrate to bind to the active site or preventing the binding of the substrate.
ATCC	American Type Culture Collection (ATCC) è un'organizzazione no-profit fondata nel 1925. È l'organizzazione globale principale di risorse e di materiali biologici la cui missione si concentra sull'acquisizione, autenticazione, produzione, conservazione, sviluppo e distribuzione di microrganismi di riferimento standard, linee cellulari e altri materiali.	American Type Culture Collection (ATCC) is a no-profit organization established in 1925 is the premier global biological materials resource and standards organization whose mission focuses on the acquisition, authentication, production, preservation, development, and distribution of standard reference microorganisms, cell lines, and other materials.
Colture cellulari Cell culture	Rappresentano modelli di crescita di cellule da animale o essere umano o pianta in un ambiente artificiale e controllato. Le cellule vengono rimosse direttamente dall'organismo e disaggregate prima della coltivazione o da una linea cellulare o un ceppo cellulare precedentemente stabilito. Le condizioni di crescita in coltura dipendono dal tipo cellulare; tuttavia, ogni coltura deve essere seminata in una piastra adatta in cui viene versato un substrato o mezzo che fornisce i nutrienti (come aminoacidi, carboidrati, vitamine, minerali), fattori di crescita o ormoni essenziali per la coltura delle cellule. Anche i gas (O ₂ , CO ₂), l'ambiente fisico-chimico (pH, pressione osmotica, temperatura) svolgono un ruolo importante per regolare la corretta crescita cellulare in un ambiente artificiale. È un importante strumento coerente e riproducibile in biologia molecolare e cellulare. Aiuta a studiare l'omeostasi cellulare normale, la biochimica cellulare, il metabolismo, la mutagenesi, le malattie e gli effetti composti. È un sistema modello per malattie e screening di farmaci.	Cell culture is the growth of cells from an animal or human or plant in an artificial, controlled environment. Cells are removed either from the organism directly and disaggregated before cultivation or from a cell line or cell strain that has previously been established. Certain culture conditions depend on the cell type; however, each culture must consist of a suitable vessel with a substrate or medium that supplies the nutrients (such as amino acids, carbohydrates, vitamins, minerals), growth factors or essential hormones for culturing cells. Gases (O ₂ , CO ₂), physicochemical environment (pH, osmotic pressure, temperature) also play an important role to regulate the proper cell growth in an artificial environment. Is a major consistent and reproducible tool in molecular and cellular biology. Helps to study normal cell homeostasis, cell biochemistry, metabolism, mutagenesis, diseases, and compound effects. Is a model system for diseases and drug screening.

Migrazione cellulare <i>Cell migration</i>	È il movimento diretto di una singola cellula o di un gruppo di cellule in risposta a segnali chimici e/o meccanici. È un processo cellulare fondamentale che si verifica per tutta la vita, a partire dallo sviluppo embrionale fino alla morte, e talvolta può contribuire agli stati patogeni nella malattia. Negli organismi adulti, la migrazione cellulare avviene durante processi cellulari vitali come il rinnovamento e la riparazione dei tessuti, in cui le cellule vecchie o danneggiate vengono sostituite dalla migrazione di cellule di nuova formazione dagli strati di tessuto sottostanti. Tali eventi sono essenziali per mantenere l'integrità dei tessuti e l'omeostasi. La migrazione cellulare svolge anche un ruolo nel mediare le risposte immunitarie durante le infezioni, in cui le cellule fagocitiche come i neutrofili che circolano nel flusso sanguigno migrano verso i tessuti infetti e distruggono i patogeni invasori.	Cell migration is the directed movement of a single cell or a group of cells in response to chemical and/or mechanical signals. It is a fundamental cellular process that occurs throughout life, starting during embryonic development and continuing until death, and at times it can contribute to pathogenic states in disease. In adult organisms, cell migration occurs during vital cellular processes such as tissue renewal and repair, wherein old or damaged cells are replaced by the migration of newly formed cells from the underlying tissue layers. Such events are essential to maintain tissue integrity and homeostasis. Cell migration also plays a role in mediating immune responses during infections, in which phagocytic cells such as neutrophils circulating in the bloodstream migrate to the infected tissues and destroy the invading pathogens.
Senescenza cellulare <i>Cellular senescence</i>	La senescenza cellulare è un processo in cui le cellule smettono di dividersi e sperimentano alterazioni fenotipiche uniche (cioè cambiamenti della cromatina e del secretoma, attivazione di geni oncosoppressori). Hayflick e Moorhead hanno usato il termine "senescenza" per designare il fenomeno dell'arresto irreversibile della crescita cellulare di cellule umane normali dopo diversi passaggi seriali in coltura [20]. La senescenza cellulare fisiologica comprende: soppressione tumorale, sviluppo embrionale, rimarginazione delle ferite, riparazione dei tessuti e invecchiamento. Le cellule senescenti mostrano un aumento delle dimensioni delle cellule, espressione associata alla senescenza dell'attività della β -galattosidasi e alterati pattern genici di espressione.	Cellular senescence is a process in which cells stop to divide and experiencing unique phenotypic alterations (i.e., chromatin and secretome changes, tumor-suppressor activation) Hayflick and Moorhead used the term "senescence" to designate the phenomenon of irreversible cell growth arrest of human normal cells after serial passaging in culture [20]. Actually, the physiological cellular senescence includes: tumor suppression, embryonic development, wound healing, tissue repair, and ageing. Senescent cells display increase of cell size, senescence-associated expression of β -galactosidase activity, and altered patterns of gene expression.
HeLa ATCC® CCL-2®	È una linea cellulare immortale considerata la linea cellulare umana più antica e più comunemente usata. La linea derivava da cellule tumorali della cervice dell'utero prelevate l'8 febbraio 1951 da Henrietta Lacks, afroamericana di 31 anni e madre di cinque figli, morta di cancro il 4 ottobre 1951. Sono aneuploidi al 100% con un numero cromosomico modale = 82; intervallo da 70 a 164.	HeLa is an immortal cell line considered the oldest and most commonly used human cell line. The line was derived from cervical cancer cells taken on February 8, 1951, from Henrietta Lacks, a 31-year-old African-American mother of five children, who die of cancer on October 4, 1951. HeLa are 100% aneuploidy with a modal chromosome number = 82; range = 70 to 164.
Cellule dell'epitelio bronchiale umano <i>Human bronchial epithelial cells</i>	"HBEpC" furono ottenute da Cell Applications Inc. (www.cellapplications.com/product no. 502K-05a). Caratterizzazione: morfologia coerente con l'origine epiteliale e positiva per il marcatore di cellule epiteliali citocheratina 18.	Human Bronchial Epithelial Cells "HBEpC" were obtained from Cell Applications Inc. (www.cellapplications.com/product no. 502K-05a). Characterization: Morphology consistent with epithelial origin, and positive for epithelial cell marker cytokeratin 18.
RAW 264.7	Cellule simili a monociti/macrofagi, originate da una linea cellulare derivata da topo BALB/c infettata con il virus della leucemia di Abelson.	Monocyte/macrophage-like cells, a cell line derived from infected with Abelson's leukemia virus.
Recettore nicotinico <i>Nicotinic receptor</i>	nAChR appartiene alla super-famiglia dei recettori del canale ionico Cys-loop costituiti da nove subunità α (da $\alpha 2$ a $\alpha 10$) e tre subunità β (da $\beta 2$ a $\beta 4$) attivate dal ligando fisiologico ACh o dal ligando non fisiologico nicotina. Sono necessarie almeno due subunità α in ciascun pentamero nAChR per legare il ligando poiché il sito di legame è localizzato all'interno di una scanalatura tra i domini extracellulari formati da una subunità α e una subunità adiacente. La nicotina si lega con elevata affinità a $\alpha 4\beta 2$ -nAChR con un $K_i = 1$ nM inducendo uno stato desensibilizzato che a sua volta riduce l'attività funzionale di $\alpha 4\beta 2$ -nAChR [21] e con bassa affinità si lega al recettore $\alpha 7$ con $K_i = 1600$ nM [22].	nAChR pertain to the super-family of Cys-loop ion channel receptors consisting of nine α (from $\alpha 2$ to $\alpha 10$) and three β subunits (from $\beta 2$ to $\beta 4$) activated by the physiological ligand ACh or by the non-physiological ligand nicotine. At least two α subunits are needed in each nAChR pentamer to bind the ligand since the binding site is localized inside a groove between the extracellular domains formed by an α subunit and an adjacent subunit. Nicotine binds with high affinity to the $\alpha 4\beta 2$ -nAChR with a $K_i = 1$ nM inducing a desensitized state that in turn reduces functional activity of the $\alpha 4\beta 2$ -nAChR [21], and with low affinity binding to the $\alpha 7$ receptor with $K_i = 1600$ nM [22].

Siti ortosterici Orthosteric sites	I siti ortosterici sulle proteine sono formati tipicamente da siti interagenti non contigui nello spazio tridimensionale in cui l'interazione di legame composto di un ligando biologico è mediata da interazioni sinergiche multiple dei suoi gruppi funzionali costituenti. Attraverso queste interazioni multiple, i ligandi stabilizzano sia il sito di legame del ligando sia la struttura secondaria locale.	Orthosteric sites on proteins are formed typically from noncontiguous interacting sites in three-dimensional space where the composite binding interaction of a biological ligand is mediated by multiple synergistic interactions of its constituent functional groups. Through these multiple interactions, ligands stabilize both the ligand binding site and the local secondary structure.
Poly (I:C)	L'acido polinosinico-policitidico, poly (I:C), è un analogo sintetico dell'RNA a doppio filamento (dsRNA), un modello molecolare associato a infezione virale. Il poly (I:C) è strutturalmente simile al dsRNA, presente in alcuni virus, ed è quindi comunemente usato per modellare le azioni del dsRNA extracellulare. Poly (I:C) imita l'infezione virale e induce risposte immunitarie antivirali promuovendo la produzione di interferone di tipo I e citochine infiammatorie come TNF e IL6.	Polyinosinic-polycytidylic acid, poly (I:C), is a synthetic analog of double-stranded RNA (dsRNA), a molecular pattern associated with viral infection. Poly (I:C) is structurally similar to dsRNA, present in some viruses, and is therefore commonly used to model the actions of extracellular dsRNA. Poly (I:C) mimics viral infection and induces antiviral immune responses by promoting the production of both Type I Interferon and inflammatory cytokines such as TNF and IL6.
Citochine pro-infiammatorie Proinflammatory cytokines	Le citochine pro-infiammatorie sono prodotte prevalentemente dai macrofagi attivati e sono coinvolte nella sovra-regolazione delle reazioni infiammatorie. Interleuchine IL-1 β , IL-6 e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) sono le tipiche citochine pro-infiammatorie. La produzione di citochine pro-infiammatorie è un prerequisito per iniziare il processo antinfettivo, la loro produzione è aumentata durante una grave infiammazione e può contribuire a conseguenze deleterie. La capacità di IL-1 e TNF- α di indurre mediatori infiammatori contribuisce alle loro proprietà pro-infiammatorie. L'eccessiva produzione cronica di citochine infiammatorie contribuisce a malattie infiammatorie, che sono state collegate a diverse malattie, come l'aterosclerosi e il cancro. Anche la disregolazione è stata collegata alla depressione e ad altre malattie neurologiche. Un equilibrio tra citochine pro-infiammatorie e antinfiammatorie è necessario mantenere lo stato di salute.	Proinflammatory cytokines are produced predominantly by activated macrophages and are involved in the up-regulation of inflammatory reactions. Interleukins IL-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are the typical proinflammatory cytokines. The production of pro-inflammatory cytokines is a prerequisite for initiating the anti-infectious process, whereas their exacerbated production during severe inflammation may contribute to deleterious consequences. The capacity of IL-1 and TNF- α to induce inflammatory mediators contributes to their pro-inflammatory properties. Excessive chronic production of inflammatory cytokines contributes to inflammatory diseases, that have been linked to different diseases, such as atherosclerosis and cancer. Dysregulation has also been linked to depression and other neurological diseases. A balance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines is necessary to maintain health.
Senescenza associata alla β-galattosidasi Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal)	L'attività β -galattosidasi associata a senescenza (β -SA-gal), rilevabile a pH 6.0, consente l'identificazione di cellule senescenti in coltura. Il dosaggio di β -SA-gal è utile per esaminare se condizioni diverse, per esempio stress o droghe, possano indurre o inibire l'induzione della senescenza cellulare [23].	Senescence-associated β -galactosidase (β -SA-gal) activity, detectable at pH 6.0, permits the identification of senescent cells in culture and mammalian tissues. The β -SA-gal assay is useful to exam whether different conditions i.e., stress or drugs may induce or inhibit the induction of senescent cells [23].
si-mRNA-α7-H-BEPC	Il silenziamento genico è la regolazione dell'espressione genica in una cellula per prevenire l'espressione di un certo gene. HBEPC al 4° passaggio, nella fase di crescita, sono state piastrate ad una densità di 1×10^6 cell/mL e incubati a 37° C fino al 60-80% di confluenza. α 7-nAChR siRNA (0,1 μ g) sono stati diluiti in 100 μ l di siRNA. Per esaminare il silenziamento dell'espressione della proteina del recettore è stata utilizzata la tecnica del <i>Western blot</i> in diversi punti temporali dopo la trasfezione. Il clone che non esprimeva α 7-nAChR è stato usato negli esperimenti successivi.	Gene silencing is the regulation of gene expression in a cell to prevent the expression of a certain gene. HBEPC at 4th passage, in the exponential growth phase, were plated at a density of 1×10^6 cells/mL and incubated at 37°C until 60-80% confluence. α 7-nAChR siRNA (0.1 μ g) were diluted in 100 μ l of siRNA. To look at the silencing of the receptor protein expression Western blot was used at different time points after transfection. The clone that did not express α 7-nAChR was used in the subsequent experiments

Contenuto di nicotina nel fumo Smoking nicotine content

Tabacco di sigaretta (contenente circa 1-2% di nicotina) = 1-2 g / 100 g. Peso corporeo medio (peso corporeo): kg = 68 kg. Pertanto, una sigaretta media eroga all'incirca 10-30 µg kg⁻¹, causando in genere 10-50 ng ml⁻¹ livelli plasmatici di picco. Queste concentrazioni possono essere convertite in molarità dividendo per MW; per esempio, livello ematico in nanogrammi per millilitro diviso per nicotina in nanogrammi per nanomole = nanomole / millilitro o (50 ng ml⁻¹) / (162 ng nmole⁻¹) = 0,309 nmol ml⁻¹ = 0,31 µM. L'aumento medio di nicotina dopo aver fumato una sigaretta nei fumatori senza astinenza durante il giorno di studio è di circa 10,9 ng ml⁻¹ (0,067 µM) [24]. Nello sputo indotto a un soggetto immediatamente dopo aver fumato un'intera sigaretta (cioè entro 5 minuti), il livello di nicotina è di 33,6±5,5 µM [25].

Cigarette tobacco (containing approximately 1-2% nicotine) = 1-2 g/100 g. Average human body weight (Bwt): kg = 68 kg. Therefore, an average cigarette delivers roughly 10-30 µg kg⁻¹, typically resulting in 10-50 ng ml⁻¹ peak plasma levels. These concentrations can be converted to molarity by dividing by MW; e.g., blood level in nanogram per milliliter divided by nicotine in nanograms per nanomole = nanomole/milliliter or (50 ng ml⁻¹) / (162 ng nmole⁻¹) = 0.309 nmol ml⁻¹=0.31 µM. The mean nicotine boost after smoking a cigarette in smokers without smoking abstinence on the study day is approximately 10.9 ng ml⁻¹ (0.067 µM) [24]. In an induced sputum obtained by a subject immediately (i.e., within 5 min) after he/she smoked one full cigarette, the level of nicotine is 33.6±5.5 µM [25].

Western blotting

Western blot (o *immunoblot*, o *western blotting*) è una tecnica analitica ampiamente utilizzata per rilevare proteine specifiche in un campione di omogenato di tessuto o estratto cellulare. In breve, il campione viene sottoposto a denaturazione proteica, seguito da elettroforesi su gel. Viene creato un anticorpo sintetico o di origine animale (noto come anticorpo primario) che riconosce e si lega a una specifica proteina bersaglio. La membrana per elettroforesi viene lavata in una soluzione contenente l'anticorpo primario, prima di lavare via l'anticorpo in eccesso. Viene aggiunto un anticorpo secondario che riconosce e si lega all'anticorpo primario. L'anticorpo secondario viene visualizzato attraverso vari metodi come colorazione, immunofluorescenza e radioattività, consentendo il rilevamento indiretto della specifica proteina bersaglio. Per rendere le proteine accessibili al rilevamento da anticorpi, vengono spostate dall'interno del gel su una membrana di nitrocellulosa (NC) o polivinilidene difluoruro (PVDF). Il metodo più comunemente usato per trasferire le proteine si chiama *electroblotting*. L'*electroblotting* utilizza una corrente elettrica per trascinare le proteine caricate negativamente dal gel verso l'anodo caricato positivamente e nella membrana PVDF o NC. Le proteine si muovono dall'interno del gel sulla membrana mantenendo l'organizzazione all'interno del gel. Un vecchio metodo di trasferimento prevede di posizionare una membrana sopra il gel e una pila di carte da filtro sopra di essa. L'intera pila viene inserita in una soluzione tampone che sposta la carta per azione capillare, portando con sé le proteine. In pratica questo metodo non è comunemente usato a causa del lungo tempo di procedura. Come risultato di entrambi i processi di trasferimento, le proteine vengono esposte su un sottile strato di membrana per essere rilevate. Entrambe le varietà di membrana sono scelte per le loro proprietà non specifiche di legame alle proteine (cioè lega tutte le proteine allo stesso modo). Il legame con le proteine si basa sulle interazioni idrofobiche e sulle interazioni cariche tra la membrana e la proteina. Le membrane di nitrocellulosa sono più economiche del PVDF, ma sono molto più fragili e non possono resistere a test ripetuti.

The western blot (or immunoblot, or western blotting) is a widely used analytical technique to detect specific proteins in a sample of tissue homogenate or cellular extract. In brief, the sample undergoes protein denaturation, followed by gel electrophoresis. A synthetic or animal-derived antibody (known as the primary antibody) is created that recognizes and binds to a specific target protein. The electrophoresis membrane is washed in a solution containing the primary antibody, before excess antibody is washed off. A secondary antibody is added which recognizes and binds to the primary antibody. The secondary antibody is visualized through various methods such as staining, immunofluorescence, and radioactivity, allowing indirect detection of the specific target protein. To make the proteins accessible to antibody detection, they are moved from within the gel onto a membrane made of nitrocellulose (NC) or polyvinylidene difluoride (PVDF). The most commonly used method for transferring the proteins is called *electroblotting*. *Electroblotting* uses an electric current to pull the negatively charged proteins from the gel towards the positively charged anode, and into the PVDF or NC membrane. The proteins move from within the gel into the membrane while maintaining the organization they had within the gel. An older method of transfer involves placing a membrane on top of the gel, and a stack of filter papers on top of that. The entire stack is placed in a buffer solution which moves up the paper by capillary action, bringing the proteins with it. In practice this method is not commonly used due to the lengthy procedure time.

As a result of either transfer process, the proteins are exposed on a thin membrane layer for detection. Both varieties of membrane are chosen for their non-specific protein binding properties (i.e., binds all proteins equally well). Protein binding is based upon hydrophobic interactions, as well as charged interactions between the membrane and protein. Nitrocellulose membranes are cheaper than PVDF, but are far more fragile and cannot withstand repeated problings.

dere il significato di tutti gli esperimenti.

In accordo con i dati in letteratura [26-33], gli esperimenti da noi svolti hanno indicato che in cellule HBEpC, A549 e HeLa i livelli di $\alpha 7$ -nAChR sono espressi differenzialmente in particolare HBEpC > A549 > HeLa. La stimolazione con nicotina a 1×10^{-7} M per 1 ora o per 16 passaggi (esposizione continua, un passaggio ogni 48 ore) ha determinato un aumento della quantità di $\alpha 7$ -nAChR in entrambe le linee cellulari polmonari ($p < 0,001$), mentre non abbiamo osservato una variazione nelle cellule HeLa (si veda **Tabella 1**). La quantità di ACE2, espressa sia in A549 che in HBEpC, ma non nelle cellule HeLa, aumenta in modo significativo ($p < 0,001$) dopo il trattamento con nicotina sia nelle cellule A549 che nelle HBEpC e non nelle cellule HeLa. La nicotina 1×10^{-7} M nell'HBEpC o in si-RNA- $\alpha 7$ -HBEpC non induce effetto citotossico cellulare,

ma aumenta in modo significativo la proliferazione cellulare solo di cellule HBEpC ($p = 0,0043$; Tabella 1). La nicotina riduce la concentrazione di p53 e di fosfo-p53 ($p = 0,0388$; Tabella 1). Le HBEpC sono cellule "normali" (cioè derivanti dall'epitelio superficiale dei bronchi umani) e di conseguenza hanno una durata limitata in coltura cellulare *in vitro*. Il compimento della senescenza è correlato all'aumentata attività della β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -Gal) [34]. In condizioni normali HBEpC *in vitro* smettono di crescere e dividersi, mentre le HBEpC trattate con nicotina mantengono la capacità di dividersi e crescere. Nell'esecuzione della senescenza in accordo con i dati della crescita cellulare, i livelli di SA- β -Gal iniziano ad aumentare all'ottavo passaggio ed è massimo al 24° passaggio ($p < 0,001$; Tabella 1), in modo tempo dipendente. In presenza di nicotina i livelli di SA- β -Gal iniziano ad aumentare al 16°

passaggio, in modo inferiore rispetto alle cellule non trattate ($p < 0,001$), e al 24° la sua quantità è inferiore del 28,56% rispetto alle cellule non trattate ($p < 0,001$; Tabella 1).

Le cellule HBEpC mostrano capacità di migrare, se pur in misura inferiore rispetto alle cellule HeLa (cellule neoplastiche). Le HBEpC se esposte a nicotina per 24 ore nel mezzo di crescita aumentano significativamente la loro capacità di migrazione (+ 74,6%; $p < 0,001$). L'effetto è strettamente dipendente da $\alpha 7$ -nAChR, poiché si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC hanno perso la capacità di migrare (Tabella 1).

Per studiare gli effetti della nicotina sul rilascio di citochine, l'infiammazione è stata indotta dal poly (I:C), ne consegue che la nicotina riduce la quantità di IL-6 e TNF- α ($p < 0,001$). Nessuna riduzione di entrambe le due citochine è stata osservata in si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC o in presenza di α -BTX (Tabella 1).

In agreement with literature data [26-33] our experiments show that HBEpC, A549 and HeLa cells express $\alpha 7$ -nAChR in the following order HBEpC > A549 > HeLa. Nicotine at 1×10^{-7} M for 1 h or for 16 passages (continuous exposure, one passage every 48h) increases the protein levels of $\alpha 7$ -nAChR in both the two lung cells ($p < 0.001$), but no in the HeLa cells (see **Table 1**). ACE2 amount, expressed both in A549 and HBEpC but no in HeLa cells, increases significantly ($p < 0.001$) after nicotine treatment both in A549 and HBEpC cells and no in HeLa cells.

Nicotine 1×10^{-7} M in the HBEpC or in si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC does not induce cellular cytotoxic effect but significantly increases cell proliferation of only wild type cells ($p = 0.0043$; Table 1).

Nicotine treatment in HBEpC decreases the amount of p53 and

phospho-p53 proteins ($p = 0.0388$; Table 1).

HBEpC are unaffected cells (i.e., derive from the surface epithelium of normal human bronchi) consequently are characterized by a finite lifetime in cell culture. The execution of senescence is correlated with the increased activity of the SA- β -Gal [34]. In HBEpC SA- β -Gal level starts to increase at the 8th passage and is maximum at 24th passage, in a time dependent manner ($p < 0.001$; Table 1). In the presence of nicotine, SA- β -Gal level starts to increase at the 16th passage, although in a lesser way than in untreated cells ($p < 0.001$), and at 24th passage its amount is only 28.56% lesser than in untreated cells ($p < 0.001$; Table 1).

HBEpC have the ability to migrate, although in a lesser way than neoplastic cells. Nicotine exposure for 24h in complete Bronchial/Tracheal

Epithelial Cell Growth Medium significantly ($p < 0.001$) increases their migration ability (+74.6%). The effect is strictly dependent on $\alpha 7$ -nAChR, since si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC are not able to migrate (Table 1).

To investigate the effects of nicotine on cytokines release, inflammation was induced by poly (I:C). Nicotine decreases the amount of IL-6 or TNF- α induced by poly (I:C) ($p < 0.001$). No reduction of both two cytokines is observed in si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC or in the presence of α -BTX (Table 1).

Discussion

Nicotine enhances the expression of $\alpha 7$ -nAChR in the following order: HBEpC > A549 but no in HeLa cells. These data are in agreement with previous ones that found the expression and the nicotine up-regulation of $\alpha 7$ -nAChR in non-neuronal epithelial cells and in cancer cells

Discussione

La nicotina aumenta l'espressione di $\alpha 7$ -nAChR nel seguente ordine: HBEpC > A549, ma non nelle cellule HeLa. Questi dati sono in accordo con quelli precedenti in cui è stata osservata l'espressione e la sovra-regolazione di $\alpha 7$ -nAChR da parte della nicotina in cellule epiteliali non neuronali e in cellule tumorali [26-33]. La sovra-regolazione causata dalla nicotina di $\alpha 7$ -nAChR è correlata positivamente all'aumen-

tata espressione di ACE2, l'unico recettore per SARS-CoV-2 riconosciuto [10,18]. Le cellule HeLa, che non esprimono ACE2, non sono infettate da SARS-CoV-2 [18], a sostegno dell'idea che ACE2 sia il principale "recettore" di SARS-CoV-2. Pertanto, è possibile speculare che maggiore è il numero di ACE2 (dopo il trattamento con nicotina) e più particelle virali di SARS-CoV-2 possono entrare nelle cellule.

Numerosi studi suggeriscono che ACE2 è sotto-regolato nell'invec-

chiamento [35]. Qui, segnaliamo che la nicotina riduce la velocità di senescenza in HBEpC suggerendo un meccanismo aggiuntivo mediante il quale i livelli di ACE2 possono aumentare dopo lo stimolo della nicotina. Pertanto, l'aumento di ACE2 è presente anche dopo 16-24 passaggi in presenza di nicotina quando le cellule non trattate sono per lo più morte.

Prove crescenti supportano il concetto che la malattia COVID-19 possa essere considerata una sindrome

Tabella 1 / Table 1

	Linee cellulari / Cell lines			
	HBEpC	A549	HeLa	si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC
$\alpha 7$ -nAChR [A.U.] ¹	1,78 ± 0,70	1,31 ± 0,04	1,105 ± 0,11	0,0
ACE2 [A.U.] ¹	1,61 ± 0,30	1,32 ± 0,31	0,0	0,0
Vitalità cellulare ² Cell viability ²	+11,85%	–	–	+2,6%
Proliferazione cellulare ³ Cell proliferation ³	+125,94%	–	–	-4,12%
Migrazione cellulare Cell migration	+74,42%	–	–	+6,45%
p53 ⁴	-25%	–	–	–
fosfo-p53 ⁴	-43,24%	–	–	–
SA- β -Gal 8 pg ⁵	-33,7%	–	–	–
SA- β -Gal 16 pg ⁵	-55,55%	–	–	–
SA- β -Gal 24 pg ⁵	-28,56%	–	–	–
TNF- α ⁶	-37,3%	–	–	0,0
IL-6 ⁶	-29,3%	–	–	-2,42%

Abbreviazioni = A.U. arbitrary unit normalizzati verso actina. Il valore basale è assunto pari a Zero; SA- β -Gal: SA- β -Gal: Senescence-associated β -galactosidase; Pg: passaggio cellulare.

¹ Trattamento con nicotina 1×10^{-7} per 1h. Analizzati tramite western blotting.

² L'effetto di nicotina 1×10^{-7} osservato trattando le cellule HBEpC e si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC per 1h.

³ La proliferazione cellulare è stata osservata esponendo HBEpC e si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC a nicotina per 96h.

⁴ Trattamento con nicotina 1×10^{-7} per 1h. Analizzati tramite TEST ELISA.

⁵ Trattamento continuo con nicotina 1×10^{-7} e analisi dopo 16 passaggi. Analizzati tramite TEST ELISA.

⁶ Trattamento delle cellule HBEpC e si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC con nicotina 1×10^{-7} data 10 min prima del trattamento con poly (I:C) 20 μ g/ml. Analizzati tramite TEST ELISA.

Abbreviations = A.U. arbitrary unit normalized to actin. The baseline value is assumed to be zero; SA- β -Gal: Senescence-associated β -galactosidase; Pg: cell passage.

¹ Nicotine treatment 1×10^{-7} for 1h. Analyzed by western blotting.

² Nicotine effect 1×10^{-7} observed by treating HBEpC e si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC cells for 1h.

³ Cell proliferation was observed exposing HBEpC and si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC to nicotine for 96h.

⁴ Treatment with nicotine 1×10^{-7} for 1h. Analyzed by TEST ELISA.

⁵ Treatment continuous with nicotine 1×10^{-7} and analyzed after 16 passage. Analyzed by TEST ELISA.

⁶ Cell Treatment HBEpC and si-mRNA- $\alpha 7$ -HBEpC with nicotine 1×10^{-7} every 10 min before of treatment with poly (I:C) 20 μ g/ml. Analyzed by TEST ELISA.

da citochine caratterizzata da una sovrapproduzione di citochine pro-infiammatorie precoci come TNF- α , IL-6 e IL-1 β la cosiddetta “tempesta di citochine” [36-38]. I dati di letteratura riportano che la nicotina riduce il rilascio di TNF- α e IL-6 dopo stimolazione cellulare con LPS [37,40] o con poly (I:C) nelle cellule tumorali del topo [41]. Abbiamo indotto la produzione di citochine, per la prima volta in cellule umane non affette, cioè HBEpC, utilizzando poly (I:C). La nicotina riduce la quantità di TNF- α e IL-6 in queste cellule. Quando α 7-nAChR viene silenziato o inibito da α -BTX, la sotto-regolazione delle due citochine non viene osservata suggerendo un coinvolgimento specifico di α 7-nAChR. Comunque la nicotina riduce solo parzialmente l'ammontare di TNF- α (-37,33%) e di IL-6 (-29,3%). Questi dati suggeriscono che la riduzione delle citochine per mezzo della nicotina non è così forte e pone la questione del suo uso nel

controllare al “tempesta di citochine”.

L'esistenza di un meccanismo neurale che inibisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie chiamato “via anti-infiammatoria colinergica” è ora ben accettata [42,43]. La via antinfiammatoria colinergica richiede l'attività del nervo vago (sistema parasimpatico) e α 7-nAChR. La via antinfiammatoria colinergica protegge il corpo durante l'infezione e il danno tissutale, indebolendo il rilascio di citochine infiammatorie. Questo sistema funziona anche nei polmoni e diversi studi su modelli murini mostrano che l'attivazione di α 7-nAChR da parte dei suoi agonisti (ACh o nicotina) attenua il danno polmonare, mentre la vagotomia e il deficit di α 7-nAChR peggiorano il danno polmonare acuto [44]. La nicotina può modulare la gravità della malattia COVID-19 attraverso questo percorso, inibendo l'iperinfiammazione. Sebbene prendere di mira la “tempesta di citochine”

nei pazienti COVID-19 sia un approccio attraente, l'uso della nicotina pone serie domande da risolvere prima del suo utilizzo in terapia. In questo contesto è importante ricordare che la nicotina induce neoangiogenesi, a basse concentrazioni ($< 10^{-8}$ M) che inducono proliferazione, e ad alte concentrazioni ($> 10^{-6}$ M) induce citotossicità [26]. A sua volta questa proprietà della nicotina può essere importante non solo nella neo-angiogenesi tumorale, ma anche nell'aterogenesi e nella disfunzione vascolare. Dati recenti ottenuti dall'esame *post mortem* di pazienti COVID-19 indicano, come patologia primaria, il danno alveolare diffuso, con virus localizzato negli pneumociti e nell'epitelio tracheale, ma anche micro-trombi [45] associati a evidenze che riportano uno scenario più complesso in COVID-19, compreso un coinvolgimento vascolare e un ampio spettro di patologie associate [46]. È importante sottolineare che la presen-

[26-33]. The nicotine up-regulation of α 7-nAChR is positively correlated with the increased expression of ACE2, the only recognized receptor of SARS-CoV-2 [10,18]. HeLa cells, that do not express ACE2, are not infected by SARS-CoV-2 [18], supporting the notion that ACE2 is the principal “receptor” of SARS-CoV-2. Thus, it is possible to speculate that more ACE2 are present (i.e., after nicotine treatment) and more virus particles of SARS-CoV-2 may enter inside the cells.

Numerous studies suggest that ACE2 is downregulated in aging [35]. Here, we report that nicotine decreases the senescence speed in HBEpC suggesting an additional mechanism by which ACE2 levels may increase after nicotine stimulus. Thus, ACE2 increase is also present after 16-24 passages in the presence of nicotine when the non-treated cells are mostly dead.

Increasing evidences support the concept that COVID-19 disease may be considered a cytokine syndrome characterized by an overproduction of early pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β the so called “cytokine storm” [36-38]. Literature data report that nicotine reduces the release of TNF- α and IL-6 after cell stimulation with LPS [39,40] or with poly (I:C) in mouse cancer cells [41]. We induced cytokines production, for the first time in human unaffected cells, i.e., HBEpC, using poly (I:C). Nicotine reduces the amount of TNF- α and IL-6 in these cells. When α 7-nAChR is silenced or inhibited by α -BTX the down-regulation of the two cytokines is not observed suggesting a specific involvement of α 7-nAChR. However, nicotine reduces only partially the amount of TNF- α (-37,33%) and IL-6 (-29,3%). These data suggest that

the reduction of cytokines by nicotine is not very strong and raise the question of its use to control the “cytokine storm”.

The existence of a neural mechanism inhibiting pro-inflammatory cytokine release called “cholinergic anti-inflammatory pathway” is now well accepted [42,43]. The cholinergic anti-inflammatory pathway requires the vagus nerve activity (parasympathetic system) and α 7-nAChR. The cholinergic anti-inflammatory pathway protects the body during infection and tissue injury weakening the release of inflammatory cytokines. This system is working also in the lungs and different studies in mouse model show that activation of α 7-nAChR by its agonists (ACh or nicotine) attenuates lung injury, whereas vagotomy and deficiency of α 7-nAChR worsen acute lung injury [44]. Nicotine may modulate COVID-19 disease severity

za di trombi piastrine-fibrina nei piccoli vasi arteriosi, compatibile con la coagulopatia, sembra essere comune nei pazienti con COVID-19 [47]. Inoltre, i polmoni dei pazienti con COVID-19 mostrano caratteristiche vascolari distintive e l'analisi istologica dei vasi polmonari mostra trombosi diffusa con micro-angiopatia, micro-trombi capillari alveolari e una quantità di nuovi vasi, formati, prevalentemente, attraverso un meccanismo di angiogenesi intussusceptive (un nuovo vaso sanguigno viene creato dividendo in due un vaso sanguigno esistente) [48]. La nicotina è in grado di aumentare l'angiogenesi [26] così come le coagulopatie (la nicotina altera le proprietà di formazione di coaguli della trombina sul fibrinogeno [49]) suggerendo che la sua somministrazione può aumentare la gravità di queste patologie nei pazienti COVID-19.

È incomprensibile il motivo per cui diversi Stati compreso quello italiano, abbiano scoraggiato l'uso del-

la pratica dell'autopsia nei decessi COVID-19 [50]. Il mondo e l'Italia hanno vissuto l'incredibile situazione di avere, purtroppo, migliaia di morti ma un numero bassissimo di autopsie.

Conclusioni

Alla luce di tutti i dati qui presentati gli effetti della nicotina appaiono dannosi rispetto all'infezione e alla progressione del COVID-19. I risultati ottenuti dall'esame *post mortem* supportano fortemente un ruolo negativo della nicotina (neo-angiogenesi, coagulopatie). Pertanto, se la nicotina appare come uno *Ianus* bifronte la faccia negativa è così forte da non raccomandarne l'uso nella prevenzione (assolutamente no) o nel trattamento del COVID-19 (Figura 1). Infine, i nostri dati preliminari dimostrano che cellule A549 trattate con nicotina hanno un effetto citopatico di gran lunga superiore alle cellule non trattate dopo

infezione con SARS-CoV-2 [51].

La nicotina oggi viene chiamata in soccorso nell'infezione COVID-19, analogamente a quanto avveniva nell'antica Roma quando, in tempo di guerra, si tenevano aperte entrambe le porte del tempio di *Ianus Geminus* affinché il dio potesse entrare in soccorso dell'esercito romano. Tuttavia, è altresì auspicabile che le porte del tempio rimangano ben chiuse come accadde durante il regno dell'Imperatore *Gaius Iulius Caesar Octavianus Augustus* (16 gennaio 27 a.C., 19 agosto 14 d.C.). A tal proposito riportiamo quanto segue: "Secondo la leggenda, il primo tempio dedicato a *Ianus Geminus*, voluto dal re *Numa Pompilio*, era un passaggio coperto da arco, chiuso da porte sui due lati, come rappresentato su monete coniate da *Nerone* nel 66 d.C. All'interno, vi era la statua del dio bifronte. Queste porte restavano chiuse in tempo di pace e aperte in tempo

through this pathway, inhibiting hyperinflammation. Although, targeting "cytokines storm" in COVID-19 patients is an attractive approach, the use of nicotine poses serious questions to be solved before its use in therapy. In this context is important to remind that nicotine induces neo-angiogenesis, with low concentrations ($<10^{-8}$ M) inducing proliferation, and at high concentrations ($>10^{-6}$ M) cytotoxicity [26]. In turn this property of nicotine may be important not only in tumor neo-angiogenesis, but in atherogenesis and vascular dysfunction. Recent data obtained by *post-mortem* examination of COVID-19 patients indicate, as primary pathology, diffuse alveolar damage, with virus located in the pneumocytes and tracheal epithelium but also microthrombi [45] joined by findings that report a more complex scenario in COVID-19, including a vascular

involvement and a wide spectrum of associated pathologies [46]. Importantly, the presence of platelet-fibrin thrombi in small arterial vessels, consistent with coagulopathy, appears to be common in patients with COVID-19 [47]. Moreover, the lungs from patients with Covid-19 show distinctive vascular features, and the histologic analysis of pulmonary vessels shows widespread thrombosis with microangiopathy, alveolar capillary micro-thrombi and an amount of new vessel, formed, predominantly, through a mechanism of intussusceptive angiogenesis (a new blood vessel is created by splitting of an existing blood vessel in two) [48]. Nicotine is able to increase the angiogenesis [26] as well as the coagulopathies (nicotine alters the clot-forming properties of thrombin on fibrinogen [49]) suggesting that its administration may increase the

severity of these pathologies in COVID-19 patients.

It is incomprehensible why different governments, including Italian Government, discouraged the use of autopsy practice in COVID-19 deaths [50]. The world and Italy experienced the incredible situation of having, unfortunately, thousands of deaths but a very low number of autopsies.

Conclusions

On the light of all the data presented here the effects of nicotine appear detrimental versus COVID-19 infection and progression. The findings obtained by the *post-mortem* examination strongly support a negative role of nicotine (neo-angiogenesis, coagulopathies). Thus, if nicotine appears as *Ianus* with two faces the negative is strongly enough to not recommend its use in the prevention (absolutely not)

di guerra, per permettere al dio di accorrere in aiuto dei soldati romani". Inoltre, Virgilio racconta nell'Eneide I, 294-296: "Dirae ferro et compagibus artis claudentur Belli portae/Furor impius intus saeva sedens super arma" [con duri chiavistelli di ferro saranno chiuse le porte della Guerra/l'empio Furore all'interno, seduto sulle armi crudeli].

[*Tabaccologia* 2020; 4:9-23]

Leonardo Lupacchini

Dipartimento di Scienze neurologiche e riabilitative, Unità di Neurobiologia Molecolare e Cellulare, IRCCS San Raffaele

Carlo Tomino

Direzione Scientifica, IRCCS San Raffaele

Patrizia Russo

Unità di Epidemiologia Clinica e Molecolare, IRCCS San Raffaele Pisana

Dipartimento di Scienze Umane e Promozione della Qualità della Vita, Università San Raffaele, Roma

Corresponding author:

Carlo Tomino

Direzione Scientifica,
IRCCS San Raffaele Pisana
via di Val Cannuta, 247
I-00166 Roma, Italia

✉ carlo.tomino@sanraffaele.it

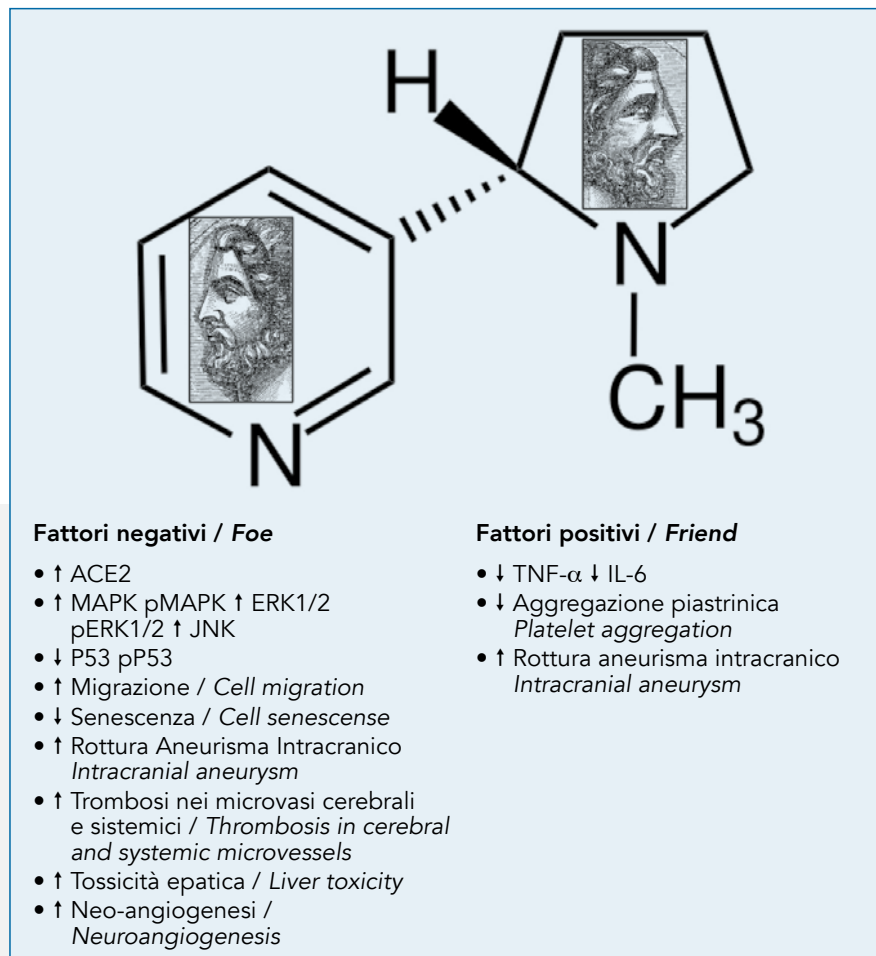


Figura 1 *Ianus*: i due volti della nicotina.

Figure 1 *Ianus*: Two-faces of nicotine.

or in the treatment of COVID-19 (Figure 1).

We have preliminary data showing that nicotine enhances SARS-CoV-2 cytopathic effect in human lung adenocarcinoma A549 cells [51]. Nicotine today is called to the rescue in the COVID-19 infection, similarly, when, in ancient Rome in

wartime, both doors of the temple of *Ianus Geminus* were kept open in order for the god to come to the rescue of the army Roman. However, it is also desired that the doors of the temple remain tightly closed as it happened during the reign of Emperor *Gaius Iulius Caesar Oc-*

► **Disclosure:** gli autori dichiarano l'assenza di conflitto d'interessi.

► **Fondi:** questa ricerca è sostenuta dai fondi del Ministero della Sanità ("Ricerca Corrente" a PR) 2020, Roma, Italia.

► **Ringraziamenti:** un ringraziamento speciale va alla dottoressa Giulia Prinzi, Dipartimento di Salute Mentale, ASL3, Roma, per il prezioso aiuto che ci ha offerto.

tavianus Augustus (January 16th 27 BC, August 19th 14 AD). In this regard, we report the following: "According to legend, the first temple dedicated to *Ianus Geminus*, commissioned by King *Numa Pompilius*, the second of the seven kings of Rome, was a covered by an archway, closed by doors on both sides, as represented on silvers coined by *Nero* in 66 AD. Inside, there was the statue of the two-faced god. These doors remained closed in time of peace and open in time of war, to allow the god to come to the aid of the Roman soldiers". Moreover, Virgil recounts in *Aeneid* I, 294-296: "Dirae ferro et compagibus artis claudentur Belli portae/Furor impius intus saeva sedens super arma..." [The dreadful gates whence issueth war, shall with close-jointed steel be barred impregnably; and prisoned there the heaven-offending Fury, throned on swords].

Bibliografia

- Berlin I, Thomas D, Le Faou AL, Cornuz J. COVID-19 and smoking. *Nicotine Tob Res* 2020;ntaa059.
- Brake SJ, Barnsley K, Lu W, McAlinden KD, Eapen MS, Sohal SS. Smoking upregulates angiotensin-converting enzyme-2 receptor: a potential adhesion site for novel coronavirus SARS-CoV-2 (Covid-19). *J Clin Med* 2020;9:841.
- Cai G, Bosse Y, Xiao F, Kheradmand F, Amos CI. Tobacco smoking increases the lung gene expression of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med* 2020; 201:1557-9.
- Leung JM, Yang CX, Sin DD. COVID-19 and nicotine as a mediator of ACE-2. *Eur Respir J* 2020; 55:2001261.
- Li G, He X, Zhang L, Ran Q, Wang J, Xiong A et al. Assessing ACE2 expression patterns in lung tissues in the pathogenesis of COVID-19. *J Autoimmun* 2020;112:102463.
- Olds JL, Kabbani N. Is nicotine exposure linked to cardiopulmonary vulnerability to COVID-19 in the general population? *FEBS J* 2020;287:3651-5.
- Russo P, Bonassi S, Giacconi R, Malavolta M, Tomino C, Maggi F. COVID-19 and smoking: is nicotine the hidden link? *Eur Respir J* 2020;55:2001116.
- Leung JM, Sin DD. Smoking, ACE-2, and COVID-19: ongoing controversies. *Eur Respir J* 2020;56:2001759.
- Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 2016;3:760-73.
- Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J* 2020;39:e105114.
- Cheng Q, Zhou L, Zhou J, Wan H, Li Q, Feng Y. ACE2 overexpression inhibits acquired platinum resistance-induced tumor angiogenesis in NSCLC. *Oncol Rep* 2016;36:1403-10.
- Yen YT, Liao F, Hsiao CH, Kao CL, Chen YC, Wu-Hsieh BA. Modeling the early events of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vitro. *J Virol* 2006;80:2684-93.
- Zheng Y, Shang J, Yang Y, Liu C, Wan Y, Geng Q, et al. Lysosomal proteases are a determinant of coronavirus tropism. *J Virol* 2018;92:e01504-18.
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579: 265-9.
- Paleari L, Cesario A, Fini M, Russo P. $\alpha 7$ -Nicotinic receptor antagonists at the beginning of a clinical era for NSCLC and Mesothelioma? *Drug Discovery Today* 2009;14:822-36.
- Nastrucci C, Russo P. $\alpha 7$ nAChR in airway respiratory epithelial cells. *Curr Drug Targets* 2012;13:666-70.
- Wang YY, Liu Y, Ni XY, Bai ZH, Chen QY, Zhang Y, et al. Nicotine promotes cell proliferation and induces resistance to cisplatin by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated activation in Raw264.7 and E14 cells. *Oncol Rep* 2014; 31:1480-8.
- Lupacchini L, Tomino C, Russo P. Infezione da COVID-19: il doppio volto di Ianus della Nicotina: approcci molecolari e cellulari. *Tabaccologia* 2020;3:31-9.
- Giard DJ, Aaronson SA, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1417-23.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.
- Dwoskin LP, Smith AM, Wooters TE, Zhang Z, Crooks PA, Bardo MT. Nicotinic receptor-based therapeutics and candidates for smoking cessation. *Biochem Pharmacol* 2009;78:732-43.
- Daly JW. Nicotinic Agonists, Antagonists, and Modulators From Natural Sources. *Cell Mol Neurobiol* 2005;25:513-52.
- Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 2009;4:1798-806.
- Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;190:269-319.
- Clunes LA, Bridges A, Alexis N, Tarran R. In vivo versus in vitro airway surface liquid nicotine levels
- Cardinale A, Nastrucci C, Cesario A, Russo P. Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Crit Rev Toxicol* 2012;42:68-89.
- Zoli M, Pucci S, Vilella A, Gotti C. Neuronal and Extran neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol* 2018;16:338-349.
- Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol* 2000;393:279-94.
- Paleari L, Grozio A, Cesario A, Russo P. The cholinergic system and cancer. *Semin Cancer Biol* 2008;18:211-7.
- Liu Y, Qian J, Sun Z, Zhangsun D, Luo S. Cervical cancer correlates with the differential expression of nicotinic acetylcholine receptors and reveals therapeutic targets. *Mar Drugs* 2019;17:256.
- Maouche K, Medjber K, Zahm JM, Delavoie F, Terryn C, Coraux C, et al. Contribution of $\alpha 7$ nicotinic receptor to airway epithelium dysfunction under nicotine exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 4099-104.
- Maouche K, Polette M, Jolly T, Medjber K, Cloez-Tayarani I, Changeux JP, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. *Am J Pathol* 2009;175:1868-82.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008;154:1558-71.
- Lim IK, Won Hong K, Kwak IH, Yoon G, Park SC. Cytoplasmic retention of p-Erk1/2 and nuclear accumulation of actin proteins during cellular senescence in human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 2020;119:113-30.
- Jia G, Aroor AR, Jia C, Sowers JR. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019;1865:1802-9.
- Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir Med* 2020;8:e46-7.

37. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395:1033-4.
38. Vaninov N, In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat Rev Immunol* 2020;20:1.
39. Li Q, Zhou XD, Kolosov VP, Perelman JM. Nicotine reduces TNF-alpha expression through a $\alpha 7nAChR/MyD88/NF-kB$ pathway in HBE16 airway epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2011;27:605-12.
40. Wittebole X, Hahm S, Coyle SM, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF. Nicotine exposure alters in vivo human responses to endotoxin. *Clin Exp Immunol* 2007;147:28-34.
41. Cui WY, Zhao S, Polanowska-Grabowska R, Wang J, Wie J, Dash B, et al. Identification and characterization of poly(I:C)-induced molecular responses attenuated by nicotine in mouse macrophages. *Mol Pharmacol* 2013;83:61-72.
42. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458-62.
43. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci* 2017;20:156-66.
44. Yamada M, Ichinose M. The cholinergic anti-inflammatory pathway: an innovative treatment strategy for respiratory diseases and their comorbidities. *Curr Opin Pharmacol* 2018;40:18-25.
45. Bradley BT, Maioli H, Johnston R, Chaudhry I, Fink SL, Xu H, et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet* 2020;396: 320-32.
46. Calabrese F, Pezzuto F, Fortarezza F, Hofman P, Kern I, Panizo A, et al. Online ahead of print. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch* 2020;477: 359-72.
47. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Online ahead of print. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2020;20: 1135-40.
48. Ackermann M, Verleden SE, Kuehne IM, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19 *N Engl J Med* 2020;383:120-8.
49. Singh JM, Singh MD. Alkaloids of tobacco and blood coagulation: effect of nicotine on thrombin and fibrinogen. *Clin Toxicol* 1975;8:43-52.
50. Italian Ministry of Health. Emergency indications related to the COVID-19 epidemic concerning the funeral sector, cemetery, and cremation. Circular of general direction of health prevention n. 15280, 02/05/2020.
51. Russo P. Expert view smoking, nicotine and COVID-19 myths and facts. What is the evidence. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2020, Vienna 7-9 September 2020.

UNA MANO PER UNA GRANDE CAUSA



Codice Fiscale SITAB: 96403700584



Come Società Italiana di Tabaccologia, con il nostro organo ufficiale, *Tabaccologia/Tobaccology*, lavoriamo da oltre 20 anni con un obiettivo preciso: fornire aggiornamento scientifico in un campo dove l'aggiornamento non c'era prima. Abbiamo arricchito il panorama scientifico italiano con studi originali, documentazione, informazioni e discussioni sulla patologia dominante del nostro tempo, la dipendenza da tabacco. Lavorando per il bene comune, senza nulla pretendere. Questa è la nostra mission. Ora tocca anche a te dare una mano. L'attribuzione del 5 per mille attraverso una firma non ti costerà nulla, e darà più ossigeno ai polmoni degli italiani.