



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina

EFFECTO DE LAS ESTATINAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN UN MODELO “IN-VITRO”

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
M. EN C. PAOLA DEL CARMEN GUERRA DE BLAS

Director de Tesis:

Dr. José Sifuentes Osornio  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Comité Tutor:

Dra. Iris Citlali Estrada García  
Centro de Ciencias Genómicas  
Dra. Isabel Sada Ovalle  
Facultad de Medicina

Asesores:

Dr. Luis Alfredo Ponce de León  
Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle

INCMNSZ  
INCMNSZ



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.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## **Jurado Asignado**

**Presidente: Dr. Rogelio Arturo Hernández Pando**

**Secretario: Dr. José Sifuentes Osornio**

**Vocal: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón**

**Vocal: Dr. Raúl Mancilla Jiménez**

**Vocal: Dra. Leslie Chavez Galán**

Este proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio Nacional de Máxima Seguridad Biológica para el Estudio de la Tuberculosis y Enfermedades Emergentes y Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán, bajo la tutela de la Dr. José Sifuentes Osornio.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con Clave: 241754 y por la beca de Doctorado (276366) otorgada por el CONACyT

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de Becario 276366) por la beca otorgada durante los estudios de doctorado.

A mi tutor el Dr. José Sifuentes Osornio, por que ha estado conmigo a cada paso, enseñándome en cada momento y aconsejándome, porque me ha brindado oportunidades únicas para desarrollarme profesionalmente.

Al comité tutorial, la Dra. Iris Estrada García y la Dra. Isabel Sada Ovalle, por todo el conocimiento que me han transmitido, por todo su tiempo para la revisión de la tesis y sus críticas constructivas.

Al Dr. Luis Alfredo Ponce de León, jefe del laboratorio, asesor de mi tesis, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su tiempo dedicado para los tutorales, la revisión de artículos y tesis, pero sobre todo por exigirme, ya que me ha ayudado a crecer profesionalmente.

Al Dr. Pedro Torres González por su asesoría y enseñanzas en la realización de este proyecto.

A la Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle, quién más que una asesora ha sido un apoyo incondicional, una amiga, que me ha apoyado, pero también me ha regañado, y además me ha inspirado a seguir sus pasos de compromiso y pasión por la investigación.

A los integrantes del jurado por el tiempo que dedicaron en la revisión de esta tesis, las observaciones y correcciones que enriquecieron este trabajo.

A Anabel, Dámaris y Paco, compañeros que estuvieron para apoyarme y regañarme, a Barbarita quién me enseñó micobacterias, a Miriam Estibuarte y Ayleen que me apoyaron con los experimentos cuando estaba saturada de trabajo, y a todo el personal del laboratorio de Microbiología Clínica que siempre está dispuesto a enseñar.

**Dedicatoria:**

A mi esposo, por toda su paciencia y apoyo incondicional, pero no solo por eso, sino por ser mi otra mitad, el mejor compañero para compartir y hacer la mejor historia juntos.

A mis hijos, que son la más grande inspiración de mi vida.

A mi hermano, quién siempre ha sido un ejemplo para seguir y a quién siempre he admirado.

A mis padres, quienes a pesar de las diferentes circunstancias han estado a mi lado y han apoyado mis locuras y sueños incondicionalmente.

A mis suegros, quienes me han permitido formar parte de su familia, y me han ayudado a alcanzar este logro.

A Dios, porque sin Él nada de lo que soy sería, no tendría nada de lo que tengo y porque me ha ayudado a cumplir cada sueño que Él ha puesto en mí.

## Índice

Resumen.....	8
Abstract .....	9
Graphical abstract.....	10
Introducción .....	11
Marco Teórico.....	13
Inmunopatogénesis de la tuberculosis.....	13
Mecanismos de evasión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a la respuesta inmune.....	17
El papel rol del colesterol en la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	20
Efecto pleitrópico de las estatinas .....	21
Efecto de las estatinas en las enfermedades infecciosas .....	23
Efecto de las estatinas en la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	25
Tratamiento de la tuberculosis con estatinas en modelos animales .....	28
Planteamiento del problema .....	30
Justificación.....	31
Hipótesis:.....	31
Objetivo general:.....	32
Objetivos específicos: .....	32
Material y métodos.....	32
Diseño del estudio:.....	32
Lugar de estudio.....	33
Población de estudio: .....	33
Criterios de Inclusión .....	33
Criterios de Exclusión .....	33
Criterios de Eliminación.....	33
Metodología .....	33
Obtención de células mononucleares .....	34
Preparación del cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	34
Solución stock de simvastatina .....	35
Tratamiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con simvastatina y cuantificación directa de unidades formadoras de colonia (UFC) por dilución en placa. ....	35
Infección de células mononucleares con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	36
Células mononucleares infectadas con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y tratadas con simvastatina	36

Immunofenotipificación de las células mononucleares tratadas con simvastatina no infectadas e infectadas con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	37
Análisis funcional del efecto de la simvastatina sobre las células T citotóxicas, NK y NKT por cinética de degranulación .....	38
Efecto de la simvastatina sobre la producción de citocinas en células mononucleares no infectadas e infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	39
Evaluación del efecto de la simvastatina sobre la apoptosis y la autofagia en células mononucleares infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	40
Análisis estadístico .....	41
Resultados .....	42
Efecto directo de la simvastatina sobre el crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . .....	42
Efecto de la simvastatina sobre el crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en células mononucleares infectadas. ....	42
Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de las células mononucleares no infectadas .....	42
Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de las células mononucleares infectadas con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	43
Efecto de la simvastatina sobre la degranulación de linfocitos TCD8+, NK y NKT.....	44
Efecto de la simvastatina sobre la producción de citocinas en células mononucleares no infectadas e infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	44
Evaluación del efecto de la simvastatina sobre la apoptosis y autofagia en células mononucleares no infectadas e infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	45
Discusión.....	46
Perspectivas y conclusiones .....	51
Figuras:.....	52
Figura 1 .....	52
Figura 2 .....	53
Figura 3 .....	54
Figura 4 .....	55
Figura 5 .....	56
Figura 6 .....	57
Figura 7 .....	58
Figura 8 .....	59
Bibliografía .....	60
Anexo I. Figuras Suplementarias .....	67
Figura Suplementaria 1 .....	67
Figura Suplementaria 2 .....	68

Figura Suplementaria 3 .....	69
Figura Suplementaria 4 .....	70
Figura Suplementaria 5 .....	71
Figura Suplementaria 6 .....	72
Figura Suplementaria 7 .....	73
Figura Suplementaria 8 .....	74
Anexo II. Artículos publicados .....	75
Guerra-De-Blas, P.D.C., et al., Potential Effect of Statins on Mycobacterium tuberculosis Infection. Journal of Immunology Research, 2018. 2018: p. 14. ....	75
Guerra-De-Blas, P. D. C., et al., "Simvastatin Enhances the Immune Response Against Mycobacterium tuberculosis." Frontiers in Microbiology, 2019. 10(2097).....	76

## Resumen

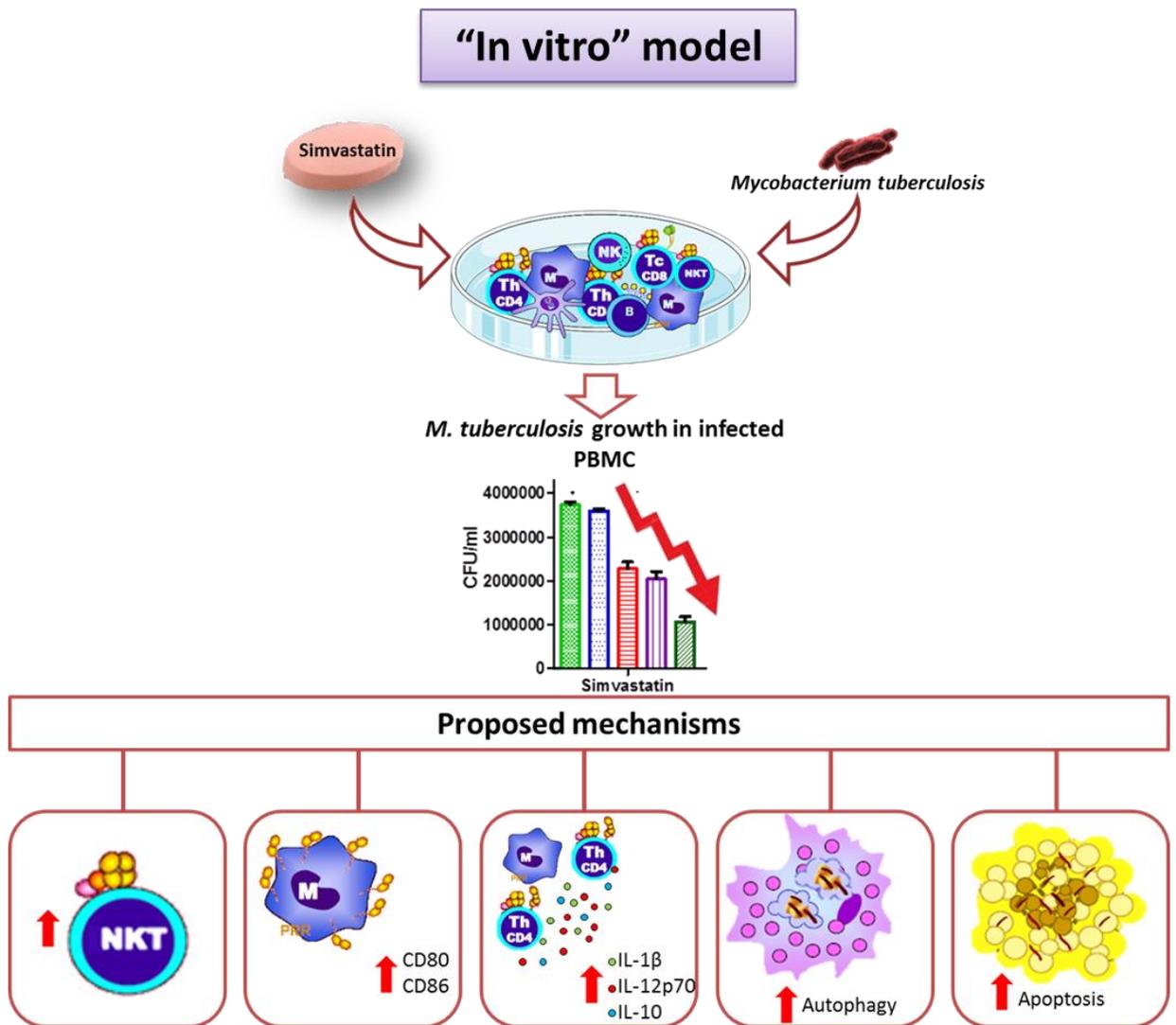
La tuberculosis es una de las diez principales causas de muerte en el mundo. El tratamiento actual se basa en una combinación de antimicrobianos administrados durante 6 meses. Es esencial encontrar agentes terapéuticos con los que se pueda acortar el tiempo de tratamiento y fortalezcan la respuesta inmune de hospedero contra *Mycobacterium tuberculosis*. Este microorganismo, necesita colesterol para infectar y sobrevivir dentro del hospedero, pero la progresión de la infección depende en gran medida, de la capacidad de la respuesta inmune para contenerla. Las estatinas son fármacos que reducen la concentración plasmática de colesterol y además tienen efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y antimicrobianos. Utilizando células mononucleares de sangre periférica (CMN) provenientes de diez sujetos sanos, infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv, analizamos el efecto de la simvastatina sobre el control de la infección en un modelo experimental *in vitro*. El tratamiento con simvastatina disminuyó el crecimiento de *M. tuberculosis* en CMN, incrementó la proporción de células NKT en cultivo, aumentó la expresión de moléculas co-estimuladoras en monocitos, promovió la secreción de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12p70 y activó los procesos de apoptosis y autofagia en monocitos, con reducción significativa de la cuenta bacteriana. También encontramos incremento en la producción de IL-10. Estos resultados muestran que la simvastatina activa mecanismos celulares que favorecen la contención de la infección por *M. tuberculosis*.

## Abstract

Tuberculosis is one of the 10 leading causes of death in the world. The current treatment is based on a combination of antimicrobials administered for six months. It is essential to find therapeutic agents with which the treatment time can be shortened and strengthen the host immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* needs cholesterol to infect and survive inside the host, but the progression of the infection depends to a large extent on the capacity of the immune response to contain the infection. Statins are drugs that reduce plasma cholesterol levels and have immunomodulatory, anti-inflammatory and antimicrobial effects. Although there is evidence that statins may contribute to the containment of *Mycobacterium tuberculosis* infection, their effects on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) involved in the immune response has not been previously described. Using PBMCs, from ten healthy subjects, that were infected with *M. tuberculosis* H37Rv, we analysed the effects of simvastatin on the treatment of infection in an in vitro experimental model. Direct quantification of *M. tuberculosis* growth in CFU/mL was performed. Phenotype and cell activation were assessed by multi-color flow cytometry. Cytokines levels were determined in culture supernatant by cytokine bead arrays. Induction of apoptosis and autophagy were evaluated by flow cytometry and confocal microscopy. Simvastatin decreased the growth of *M. tuberculosis* in CMNs, increased the proportion of NKT cells in culture, increased the expression of co-stimulatory molecules in monocytes, promoted the secretion of the cytokines IL-1 $\beta$  and IL-12p70, and activated apoptosis and autophagy in monocytes, which resulted in a significant reduction of the bacterial load. We also observed an increase in the production of IL-10. We did not observe direct antimycobacterial activity. This study provides new insights into the immune correlates that how simvastatin reduce the mycobacterial load in infected PBMCs. These results demonstrate

that simvastatin activates several immune mechanisms that favour the containment of *M. tuberculosis* infection, providing relevant evidence to consider statins as candidates for host-directed therapy. It also opens the need of future studies to define the role of anti-inflammatory mechanisms induced by statins in the therapy of tuberculosis.

## Graphical abstract



## Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canettii* y *M. pinnipedii*. De ellos, *M. tuberculosis* es el agente causal del 98% de los casos en humanos. El sitio más común de la infección es el pulmón, aunque puede afectar otros aparatos y sistemas (nódulos linfáticos, huesos, meninges, etc.) [1]. La tuberculosis es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo, es la causa principal de defunción por un agente infeccioso único y produce mayor número de muertes que el VIH / SIDA. Así en 2017, la Organización Mundial de la Salud informó que hubo 6.4 millones de casos nuevos y 1.3 millones de muertes causadas por la tuberculosis [2].

El tratamiento actual contra la tuberculosis se basa en la administración de una combinación de antimicrobianos durante seis meses, el propósito de esta estrategia es curar la enfermedad, erradicar la infección, prevenir la recaída y evitar el desarrollo de resistencia. Esta estrategia se ha utilizado durante los últimos 60 años, sin embargo, la duración prolongada del tratamiento y sus efectos adversos favorecen la mala adherencia, el fracaso y el desarrollo de resistencia. A pesar de la curación clínica, aproximadamente la mitad de los pacientes tratados tienen daño pulmonar permanente debido al exceso de inflamación causada por esta infección[3, 4]. Por todo ello, es esencial encontrar agentes terapéuticos con el potencial para acortar la duración del tratamiento y, eventualmente, con la capacidad de fortalecimiento de la respuesta inmune en contra de *M. tuberculosis*.

Las estatinas son drogas cuyo efecto primordial es reducir la concentración plasmática de colesterol. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-

metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa que cataliza la conversión de la HMG-CoA a ácido mevalónico, precursor del colesterol [5]. Además de este efecto, se han reportado diversos efectos inmunomoduladores, los cuales se han asociado con mejores resultados en el tratamiento de varias enfermedades infecciosas [6]. Algunos de estos efectos son: la modificación de la expresión de receptores que intervienen en la presentación antigénica, la activación de células del sistema inmune y la regulación en la producción de citocinas por dichas células [7].

En estudios hechos *in vitro* en células y en animales sobre la infección por *M. tuberculosis* se ha mostrado que las estatinas reducen el crecimiento de *M. tuberculosis* [8]. En particular la simvastatina aumenta el efecto bactericida de las drogas de primera línea contra la tuberculosis (isoniacida, rifampicina y pirazinamida) tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo experimental de ratones BALB/c [9].

A pesar de que existe evidencia de que las estatinas pueden contribuir a contener la infección por *M. tuberculosis*, no se ha descrito su efecto fino en las células de la respuesta inmune en dicha infección. Por lo que estudiar tal efecto es muy importante, ya que se han descrito efectos pleiotrópicos que podrían tener consecuencias sobre la respuesta inmune en el control de la infección. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la simvastatina sobre el fenotipo, la función, y el control de la infección por *M. tuberculosis* en células mononucleares (CMN) infectadas con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv en un modelo experimental *in vitro*.

## Marco Teórico

### Inmunopatogénesis de la tuberculosis

La infección por *M. tuberculosis* inicia con la inhalación de aerosoles, que contienen numerosos bacilos, producidos por un enfermo que tose. Aunque la mayoría de los bacilos inhalados quedan atrapados en las vías respiratorias superiores, algunos llegan a los alvéolos, en donde son fagocitados por células de la respuesta inmune innata (macrófagos, neutrófilos y células epiteliales alveolares)[10]. Los macrófagos son las principales células fagocíticas que tienen un papel crucial en la activación de una respuesta antimicrobiana. La fagocitosis de *M. tuberculosis* involucra la participación de receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4), Fc y manosa, entre otros [11, 12]. Después de la fagocitosis, las micobacterias pueden lisarse dentro del fagolisosoma, aunque las cepas virulentas, pero algunos bacilos pueden impedir la fusión del fagosoma con el lisosoma y sobrevivir dentro del macrófago[13, 14]. El receptor involucrado en la entrada fagocítica puede tener un impacto importante en las posibilidades de supervivencia de *M. tuberculosis* una vez dentro del macrófago; por ejemplo, la ingestión de partículas a través de los receptores Fc produce un estallido respiratorio y una respuesta inflamatoria en los macrófagos; por el contrario, la internalización a través de los receptores CR3 evita la activación de los macrófagos [15]. El reconocimiento de *M. tuberculosis* durante la respuesta inmune innata desencadena la activación celular, producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-17 e IL-23, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CXCL10) [16, 17].

Una citocina clave para limitar el crecimiento intracelular de los bacilos es el IFN- $\gamma$ , el cual activa a los macrófagos y es secretado en las etapas iniciales por las células asesinas naturales (NK), células T gamma delta y NKT (células T asesinas naturales). Las células NK lisan a

los monocitos y macrófagos infectados con *M. tuberculosis* a través de la actividad citotóxica mediada por la perforina, las granzimas y el sistema Fas-FasL [18]. Otras células que ayudan a controlar el crecimiento de *M. tuberculosis* y que contribuyen a la formación del granuloma son las iNKT (células T asesinas naturales invariantes). Las iNKT son importantes en la activación de macrófagos y células dendríticas a través de la producción de IFN- $\gamma$ , adicionalmente se ha demostrado que son capaces de matar a macrófagos infectados con *M. tuberculosis* [19]. Se ha reportado que la activación específica de las células iNKT por el ligando alfa-galactosilceramida presentado vía CD1d protege a las cepas de ratón endogámicas susceptibles a la tuberculosis [20]. Por otra parte, diversos estudios han mostrado que existe disminución en la frecuencia de células iNKT en sujetos con tuberculosis activa. Dicha disminución podría ser secundaria a la migración de células NKT al pulmón o posiblemente a que los individuos con menos células NKT son más susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* [21]. El reclutamiento de células inflamatorias conduce a la formación del granuloma temprano, compuesto por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células apoptóticas y células necróticas [22] que, si bien es capaz de limitar el crecimiento de *M. tuberculosis*, también proporciona un nicho de supervivencia desde el cual las bacterias pueden diseminarse. Diversos experimentos han sugerido que el mecanismo de apoptosis favorece de manera más efectiva la eliminación del bacilo, mientras que el mecanismo de necrosis favorece su diseminación [23]. Fratazzi et al., informaron que los macrófagos infectados que mueren por apoptosis se asocian con disminución de la viabilidad de la micobacteria, mientras que dicha disminución no se observa si los macrófagos mueren por necrosis [24]. Klingler et al, demostraron que la apoptosis de fagocitos mononucleares inducida por *M. tuberculosis* ocurre en in vitro e in vivo (pacientes con tuberculosis activa) [25].

El desarrollo de la respuesta inmune efectora por los linfocitos T requiere el procesamiento y presentación de antígenos bacterianos, a través de moléculas MHC expresadas por las células presentadoras de antígeno (APC). La presentación de antígenos a células T naive ocurre a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-clase II a los linfocitos TCD4 y clase I a los linfocitos TCD8+ [26]. El principal mecanismo efector de las células T CD4+ es la producción del IFN- $\gamma$ , el cual induce la maduración y activación de los macrófagos para controlar o eliminar el bacilo; así se ha observado como la depleción de células T CD4+ en modelos animales ocasiona reactivación de la infección y la muerte del hospedero con cargas bacterianas elevadas en el pulmón [27]. Clínicamente se ha observado que la disminución progresiva y la disfunción de las células T CD4+ en los pacientes con VIH, es uno de los factores de riesgo más importantes para desarrollar tuberculosis activa[28]. Otras funciones de las células T CD4+ es la producción directa de otras citocinas como IL-2 y TNF- $\alpha$  [29].

Los linfocitos T CD8+ también juegan un papel importante en la respuesta celular contra la micobacteria ya que son capaces de matar a las células infectadas o de eliminar directamente a los bacilos por la secreción de elementos citotóxicos como granzimas, perforina y granulicina [30, 31].

Asimismo, las células T no convencionales (células T  $\gamma\delta$ ) se activan y contribuyen a combatir la infección por *M. tuberculosis*. Por ejemplo, se ha informado una marcada expansión de las células T  $\gamma\delta$  en la sangre de pacientes con tuberculosis. Estas células contribuyen con la secreción de citocinas (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), la función efectora citotóxica y la ayuda dependiente del contacto celular [32].

Las células B actúan como CPA que pueden engullir bacilos o antígenos de *M. tuberculosis* completos y presentarlos a las células T. Recientemente, se ha descrito que las células B

modulan la respuesta inmune durante la infección por tuberculosis a través de la secreción de anticuerpos y citocinas. [33, 34].

Con la formación del granuloma, el sistema inmunológico contiene la infección primaria en casi el 90% de los pacientes, los cuales desarrollarán tuberculosis latente (definida como un estado donde el individuo está infectado pero permanece libre de manifestaciones clínicas); sin embargo, si la carga bacteriana infectante es muy grande, o el sujeto tiene VIH o bien el individuo padece alguna inmunodeficiencia primaria, la infección puede evolucionar a tuberculosis activa progresiva[35]. En los sujetos que desarrollaron tuberculosis latente, cuando aparece una condición inmunosupresora y altera la homeostasis del sistema inmune, como puede ser el caso de la coexistencia de diabetes mellitus, la administración de fármacos inmunosupresores o un estado de desnutrición, el bacilo se reactiva e inicia su replicación, los granulomas ya no logran contener la infección, los niveles de citocinas proinflamatorias aumentan y aparecen las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por lo tanto, la tuberculosis activa se define precisamente por la aparición de signos y síntomas de la enfermedad (tos crónica, esputo y / o hemoptisis) confirmada por el aislamiento de *M. tuberculosis* en los cultivos [36]. Imagen 1.



En condiciones normales, las células fagocíticas, como los neutrófilos y macrófagos y eosinófilos destruyen a los microorganismos fagocitados mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (NO<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>). Sin embargo, *M. tuberculosis* puede inhibir el reclutamiento de iNOS en el fagosoma e impedir la formación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [39]; Espinosa-Cueto et al. demostraron que la trehalosa di-O-acilada (DAT), un glicolípido de la pared celular de la micobacteria inhibe la producción de óxido nítrico y la expresión inducible de óxido nítrico sintasa en macrófagos. . Además *M. tuberculosis* secreta las enzimas metionina sulfoxido reductasa A y B que reducen el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) en moléculas no iónicas las cuales no destruyen a las micobacterias [40].

Otra forma de evasión de la respuesta inmune es la inhibición de la presentación antigénica. Los modelos *in vitro* han demostrado que los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* reducen la expresión del MHCII [41]. Datos recientes de experimentos *in vivo* demostraron que las APC infectadas con *M. tuberculosis* tienen una menor expresión de MHC-II en comparación con las APC no infectadas [42]. También se ha informado que la proteína ESAT-6 interactúa con la beta-2-microglobulina que afecta la función de la presentación antigénica a través del MHCI [43] y se ha demostrado que la presentación subóptima del antígeno contribuye a la persistencia de *M. tuberculosis in vivo* [44]. Además, la inhibición de la presentación antigénica se ha asociado con la virulencia de las cepas, ya que por ejemplo *M. tuberculosis* H37Rv tiene mayor capacidad para inhibir la presentación antigénica en comparación con H37Ra [45].

La presentación antigénica de las células dendríticas también se ve afectada en el proceso normal de maduración, el cual es esencial para la activación adecuada de la respuesta inmune mediada por linfocitos T [46], en contraparte tienen una menor expresión de integrinas, lo

que disminuye la capacidad de las células dendríticas para migrar a los ganglios linfáticos [47]. Magallanes-Puebla et al., demostraron que DAT promueve un fenotipo tolerogénico en las células dendríticas, caracterizados por una disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras, una mayor producción de IL-10 y una menor producción de IL-12[48]. Además, existe evidencia de que la infección por *M. tuberculosis* altera la presentación de los antígenos lipídicos por las moléculas CD1. El alfa-glucano de la pared de la micobacteria regula negativamente la expresión de CD1 en células presentadoras de antígeno [49, 50].

En la respuesta inmune adaptativa, Mahon et al., han demostrado que los glicolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis*, incluido el lipoarabinomano manosilado, inhiben directamente la activación de las células T CD4+ policlonales bloqueando la fosforilación de ZAP-70 [51] y al inducir la sobre-expresión de GRAIL en dichas células (receptor asociado a la inducción y mantenimiento de anergia en las células T CD4+) [52]. Saavedra et al., demostraron que la activación de los linfocitos T CD8+ también es inhibida mediante el glicolípido micobacteriano 2,3-di-O-acyl-trehalosa (DAT) ya que reduce la proliferación celular inducida por el antígeno [53].

Otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune inducido por *M. tuberculosis* es la alteración la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y la quimiocina MCP-1, que son inhibidas por los glicolípidos fenólicos presentes en la pared celular de *M. tuberculosis* [54]. *M. tuberculosis* inhibe la producción de IL-12 y se ha identificado el gen *mmA4* (gen que codifica para una metiltransferasa necesaria para introducir modificaciones distales de los ácidos micólicos que contienen oxígeno) como un *locus* clave para dicha inhibición [55]. Dae et al., demostraron que las modificaciones metoxi y ceto del TDM (trehalosa dimicolato) están implicadas en la inhibición de la producción de IL12p-40 en macrófagos. [55]. Además, se ha reportado que

la señalización inducida a través de TLR2 por *M. tuberculosis* en macrófagos induce la secreción de IL-10, suprime la IL-12 y atenúa la respuesta Th1 que es crítica para controlar la infección. [56].

La supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos del hospedero implica resistencia a la apoptosis dependiente de la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 [57]. También se ha descrito que *M. tuberculosis* ocasiona una alteración significativa de la membrana interna de las mitocondrias de los macrófagos lo cual favorece la muerte celular por necrosis, este mecanismo promueve la diseminación del patógeno y la aparición de la enfermedad [58]. *M. tuberculosis* puede evadir el mecanismo de autofagia a través la expresión ectópica de ESAT6, lo que inhibe la formación de autofagosomas en los macrófagos infectados [58] y reduce la expresión de Atg8 (proteína parecida a la ubiquitina) en células dendríticas humanas [59].

### El rol del colesterol en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*

La pared celular de *M. tuberculosis* contiene una cantidad abundante de lípidos, y una fracción relativamente grande de sus genes codifica proteínas para la síntesis de éstos. Se ha demostrado que las micobacterias pueden acumular y utilizar colesterol como fuente de carbono para la síntesis de algunos factores de virulencia como dimicocerosato de ftiocerol y sulfolípidos [60]. Se ha reportado que *M. tuberculosis* desregula el metabolismo de lípidos en el hospedero y la progresión del granuloma hasta la caseificación lo cual correlaciona con la alta expresión de los genes para el metabolismo y secuestro de lípidos [61]; Martens et al., estudiaron en un modelo de ratones apoE <sup>-/-</sup>, el efecto de la hipercolesterolemia en la infección por tuberculosis, ellos observaron que los ratones hipercolesterolémicos infectados con *M. tuberculosis* tienen una mayor carga bacilar y una patología pulmonar acentuada. En

otro estudio realizado en humanos se informó que el colesterol en la dieta se asocia con un mayor riesgo de tener tuberculosis activa de manera dosis-dependiente [62]. Se ha informado que la capacidad de *M. tuberculosis* para mantener una infección crónica, está asociada con su habilidad de adquirir colesterol del hospedero. Pandey et al., demostraron que *M. tuberculosis* puede obtener energía y compuestos de carbono a través del transportador Mce4, el cual representa el principal sistema de importación de colesterol de la bacteria [63].

El colesterol es esencial para la internalización de la micobacteria en las células del hospedero[64]. *M. tuberculosis* ingresa a las células a través de dominios ricos en colesterol y al eliminar el colesterol de la membrana celular se inhibe la fagocitosis [65, 66]. Dentro de los macrófagos, la micobacteria puede inhibir la maduración del fagosoma y con ello su capacidad hidrolítica y microbicida; el colesterol también juega un papel importante en la inhibición de la maduración del fagosoma. Por ejemplo, la acumulación de colesterol provoca la retención anormal de la proteína TACO [64] e inhibe la disociación de Rab7 de la membrana de los fagosomas [67].

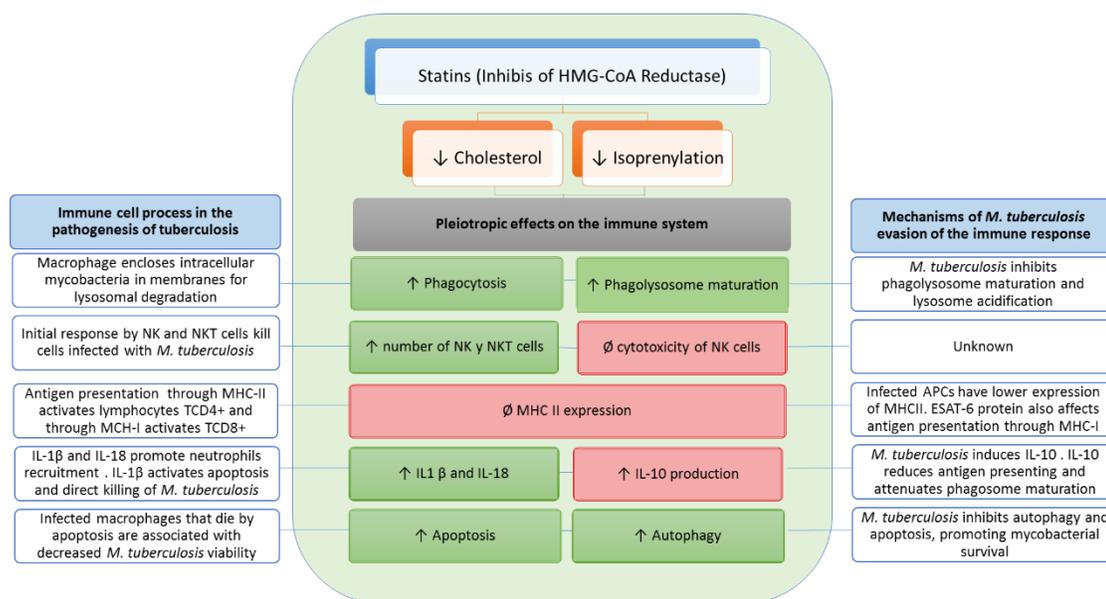
Los macrófagos espumosos de los granulomas en los pacientes con tuberculosis son reservorios ricos en nutrientes, tienen alterada su capacidad fagocítica y favorecen la persistencia de la micobacteria [68]. Un estudio muestra que la infección por *M. tuberculosis* induce la acumulación de lipoproteína de baja densidad oxidada en los macrófagos alveolares y cuando se exponen los macrófagos alveolares a lipoproteínas de baja densidad oxidadas *in vitro* se promueve la supervivencia y persistencia de los bacilos intracelulares; el mecanismo se desconoce, pero podría estar relacionado con la utilización del colesterol del hospedero como fuente de energía [69].

### Efecto pleitrópico de las estatinas

Las estatinas tienen como principal mecanismo de acción la inhibición de la enzima 3-OH-3-metil-glutaril CoA reductasa que regula la síntesis del colesterol y se han utilizado principalmente en pacientes con hipercolesterolemia. Recientemente, se han reportado efectos pleiotrópicos de las estatinas sobre el sistema inmune y algunos efectos bactericidas [70] (Imagen 2).

Se ha documentado que las estatinas tienen la capacidad de actuar como inmunomoduladores. Por ejemplo, actúan como inhibidores de la expresión de MHC-II inducida por IFN- $\gamma$  en células endoteliales primarias, en monocitos y en macrófagos humanos, lo que inhibe a su vez la activación de los linfocitos T [71]. El tratamiento de células mononucleares con fluvastatina produjo una activación leve de la caspasa-1 y secreción moderada de IL-1 $\beta$ , IL-18 e IFN- $\gamma$ . [72]. Otro estudio mostró que el tratamiento *in vitro* de las células mononucleares con atorvastatina aumenta el número de células NK y NKT en sangre venosa periférica [73]. Además, se ha reportado que el tratamiento con simvastatina e IL-2 promueve la activación de las células NK [74]. En contraste, en otros estudios se ha informado que las estatinas inhiben la citotoxicidad de las células NK [75] y la función de los receptores activadores [76]. También se ha demostrado que la terapia con simvastatina en pacientes con hipercolesterolemia durante 6 meses aumenta las células iNKT en sangre venosa periférica [77].

Otros estudios muestran que las estatinas pueden inducir apoptosis en células humanas provenientes de tumores a través de la inhibición de las vías de señalización de Ras [78, 79]. Las estatinas también promueven la autofagia a través de la activación de la vía de señalización AMPK-TOR en células provenientes de rhabdomyosarcoma [80]. El tratamiento con lovastatina aumenta la expresión de ARNm de Rab7 al disminuir la síntesis de grupos isoprenilo y se promueve la maduración fagosomal [81].



**Imagen 2. Efecto pleiotrópico de las estatinas.** Las estatinas ejercen diversos efectos sobre la respuesta inmune. Se ha reportado que las estatinas pueden activar la autofagia (en macrófagos) y la apoptosis (en células tumorales). Las estatinas aumentan el número de células NK y NKT. Las estatinas pueden inhibir la citotoxicidad de las células NK. Las estatinas inhiben la expresión de MHC-II (en CPA) y promueven la secreción discreta de IL-1 $\beta$ , IL-18 e IFN- $\gamma$  (en células mononucleares). Las estatinas aumentan los niveles séricos de IL-10. Las casillas azules muestran la función de las células inmunes en la patogénesis y los mecanismos de evasión de la respuesta inmune de *M. tuberculosis*; los cuadros verdes muestran los efectos de las estatinas que potencialmente favorecen la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*; y los cuadros rojos indican los efectos de las estatinas que podrían modular la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*.

Fuente: Guerra-De-Blas, P.D.C., et al., *Potential Effect of Statins on Mycobacterium tuberculosis Infection*. Journal of Immunology Research, 2018. 2018: p. 14.

### Efecto de las estatinas en las enfermedades infecciosas

Con respecto a su efecto antimicrobiano se ha informado que la terapia con estatinas reduce la mortalidad en pacientes con bacteriemia y falla orgánica múltiple [82]. Varios estudios

han evaluado el beneficio del uso de estatinas en la prevención o el tratamiento de la sepsis, aunque algunos resultados son contradictorios. En diferentes meta-análisis se han observado resultados prometedores ya que el tratamiento con estatinas redujo significativamente la progresión de la enfermedad y / o mortalidad asociada con sepsis [6, 83, 84].

En otros estudios se ha reportado que las estatinas ejercen un efecto lítico sobre bacterias gram positivas y gram negativas, así como sobre algunos virus y hongos [85]. La adición de atorvastatina o lovastatina reduce el crecimiento *in vitro* de *Chlamydia pneumoniae* [86] y de *Salmonella entérica* [87]. La simvastatina tuvo un efecto antimicrobiano significativo en contra de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MIC media, 15.65 µg/mL) y, en menor medida, contra *S. aureus* resistente a meticilina (MIC 31.25 µg/mL), inhibiendo la adhesión y la formación de biopelícula [88].

Se ha observado que lovastatina interfiere con la replicación del ARN del virus de la hepatitis C a través de la inhibición de la geranyl-geranilación de la proteína del hospedero [89]. Las estatinas inhiben también el ensamblaje del virión del virus del dengue por un mecanismo independiente de los niveles de colesterol [90]. Las estatinas también han mostrado un efecto antiviral sobre el citomegalovirus [91], el virus de Epstein-Barr [92] y sobre la infección por VIH [93].

Además las estatinas inhiben la formación de biopelículas por *Candida albicans* [94] y en *C. glabrata* reducen los niveles de ergosterol, inhiben su crecimiento y causan la pérdida de mtDNA [95]. Las estatinas también inhiben el crecimiento de *Aspergillus fumigatus*; y la lovastatina potencia la actividad de la caspofungina contra de *A. fumigatus* en un modelo *in vitro* [96, 97].

Es importante resaltar que la actividad de las estatinas contra algunos virus, bacterias y hongos se ha probado en estudios *in vitro*, sin embargo es necesario dilucidar si dichos efectos podrían tener algún beneficio como terapia en humanos.

### Efecto de las estatinas en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*

#### Efecto *in vitro* de las estatinas en la infección por *M. tuberculosis*

El primer estudio sobre el efecto potencial de las estatinas en la infección por *M. tuberculosis* se realizó hace 18 años por Montero et al., se observó que la fluvastatina induce la liberación de citocinas TH1 y promueve la activación de la caspasa 1; en CMN con *M. tuberculosis* y tratarlas con fluvastatina la estimulación fue sinérgica, alcanzando concentraciones hasta diez veces mayores de citocinas TH1 y caspasa1. Este resultado sugirió que las estatinas podrían potenciar la respuesta del hospedero contra *M. tuberculosis* [72]. En 2009, otro estudio informó que la lovastatina y la fluvastatina inhiben la activación de las células  $\gamma\delta$  inducida por antígenos de *M. tuberculosis* [98]; sin embargo, ninguno de estos estudios evaluó el efecto de las estatinas en el crecimiento micobacteriano, ni la influencia de estos efectos sobre la respuesta inmune del hospedero contra la infección.

En 2014, Parihar et al., [8] realizaron un modelo *in vitro* con macrófagos derivados de médula ósea murina, se expusieron a simvastatina a una concentración de 50  $\mu$ M y fueron infectados con *M. tuberculosis* a una MOI de 5. Los resultados mostraron una reducción significativa del crecimiento micobacteriano, sin efectos adversos sobre la viabilidad celular. Además, realizaron experimentos de western blot y de microscopía confocal en donde se observó que la simvastatina promueve la maduración fagosomal y la autofagia en los macrófagos infectados por *M. tuberculosis*. En otro estudio se investigó la actividad y el posible efecto aditivo del tratamiento con rifampicina (1  $\mu$ g/mL), atorvastatina (0.2  $\mu$ M - 2  $\mu$ M) y simvastatina (0.2  $\mu$ M-2  $\mu$ M) en macrófagos THP-1 infectados con *M. tuberculosis*, *M. bovis*

BCG y con *M. leprae* a una MOI 10: 1. Se observó que después de 72 horas, ambas estatinas tuvieron efecto bactericida dosis-dependiente en todas las cepas. Para *M. tuberculosis*, ambas estatinas (atorvastatina 2  $\mu\text{M}$  y simvastatina 2  $\mu\text{M}$ ), redujeron la viabilidad de las micobacterias en aproximadamente 75% y también mostraron efecto aditivo con rifampicina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de rifampicina más atorvastatina 0,2 $\mu\text{M}$  o simvastatina 0.2 $\mu\text{M}$ ). Para *M. bovis* BCG y *M. leprae* solo atorvastatina 0,2  $\mu\text{M}$  tuvo un efecto aditivo con rifampicina.

Con respecto al estudio del mecanismo implicado en la inhibición del crecimiento micobacteriano, estudiaron el efecto de la atorvastatina en macrófagos THP-1 infectados con *M. leprae* a una MOI de 10: 1; los resultados confirmaron que las estatinas promueven la maduración del fagosoma [99].

En otro estudio se investigó si las estatinas potencian el efecto bactericida de la isoniazida. El modelo *in vitro* fue con macrófagos J774, infectados con *M. tuberculosis* CDC1551 a una MOI de 10: 1 y tratadas con simvastatina 5  $\mu\text{M}$  e isoniazida 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados confirmaron que las células cultivadas en presencia de simvastatina e infectadas con *M. tuberculosis* CDC1551 tenían una menor carga bacilar intracelular el día cinco después de la infección y este efecto es aditivo cuando las células son tratadas con simvastatina e isoniazida al tercer día post infección. Al quinto día, el efecto aditivo perdió significancia estadística [100].

En 2016, Dutta et al., estudiaron la posible actividad adyuvante de simvastatina con isoniazida, rifampicina y pirazinamida. Realizaron experimentos con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv que expresa el operón *lux* y macrófagos THP-1 infectados a una MOI 1:20. Utilizaron fármacos, a concentraciones utilizadas en experimentos para reducir el 50% de las unidades relativas de luz (RLU) de la micobacteria (isoniazida 0,011  $\mu\text{M}$ , rifampicina 0,012  $\mu\text{M}$  y pirazinamida 162,5  $\mu\text{M}$ ), la concentración de simvastatina fue 0,1  $\mu\text{M}$ . Los resultados

confirmaron que la simvastatina sin antibiótico inhibe el crecimiento de micobacterias en los macrófagos THP-1 en comparación con el control sin fármacos, y el efecto de la simvastatina es equivalente a la actividad de 0.011  $\mu\text{M}$  de isoniazida. Además, la simvastatina aumentó significativamente el efecto bactericida cuando se agregaron los tres antibióticos (isoniazida, rifampicina y pirazinamida) [101]. Por otro lado, también evaluaron si la simvastatina podría afectar la acumulación intracelular de rifampicina usando LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas). Se observó que, aunque la simvastatina (0.1-1  $\mu\text{M}$ ) aumenta la actividad bactericida de la rifampicina, no altera su acumulación intracelular [101].

Skerry et al., fueron los primeros investigadores en estudiar el efecto bactericida directo de la simvastatina contra *M. tuberculosis* probada a diferentes concentraciones (0-320 $\mu\text{M}$ ). Los resultados obtenidos mostraron que la simvastatina no tuvo efecto inhibitorio, ni en la concentración más elevada (320  $\mu\text{M}$ , concentración 60 veces mayor que las utilizadas en experimentos *in vitro*) [100].

En contraparte, otro estudio evaluó también el efecto bactericida directo de las estatinas sobre *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG, mediante el método de las proporciones en agar, utilizando diferentes concentraciones de simvastatina. La MIC se definió como la concentración más baja de la estatina que inhibió más del 99% de la población bacteriana.

La simvastatina mostró una MIC de 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ [102]. Tabla 1

**Tabla 1. Efecto *In vitro* de las estatinas en la infección por *M. tuberculosis***

Autor	Tipo celular	Tratamiento	Cepa	Efecto
Montero et al.	CMN	Fluvastatina 5 µm	<i>M. tuberculosis</i> inactivada por calor H37Ra 10 µg/ml	Induce la liberación de citocinas TH1 y promueve la activación de la caspasa 1
Lu, H.Z. et al.	CMN	Lovastatina 10 µm Fluvastatina 2 µm	Antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	Inhibe la activación de las células Tγδ
Parihar et al.	CMN y MDM obtenidos de pacientes con hipercolesterolemia familiar	Simvastatina 50 µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv MOI 5	Reducción significativa del crecimiento micobacterian
Parihar et al.	MDM murinos	Simvastatina 50 µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv MOI 5	Reducción significativa del crecimiento micobacterian el tratamiento con simvastatina promueve la promueve maduración fagosomal y la autofagia
Lobato et al.	Macrófagos THP-1	Rifampicina 1 µg/ml + atorvastatina 0.2 µM	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv MOI 10 <i>M. bovis</i> BCG MOI 50	Atorvastatina disminuyó la viabilidad de las micobacter en aproximadamente 75% y mostró efecto aditivo co rifampicina
Skerry et al.	Células similares a macrófagos J774	Isoniazida 0.05 µg/ml+ 5 µM simvastatina	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551 MOI 10	El tratamiento con simvastatina potenció la actividad bactericida de la isoniazida al día 3 post-infección
Dutta et al.	Macrófagos THP-1	0.011µM isoniazida, 0.012µM rifampicina and 162.5µM pirazinamida+ 0.1 µM simvastatina	<i>M. tuberculosis</i> bioluminescente H37Rv MOI 1:20	La simvastatina aumentó significativamente el efecto bactericida de la isoniazida, rifampicina y pirazinamic

CMN: Células mononucleares  
MDM: Macrófagos derivados de monocitos

Fuente: Guerra-De-Blas, P.D.C., et al., *Potential Effect of Statins on Mycobacterium tuberculosis Infection*. Journal of Immunology Research, 2018. 2018: p. 14.

### Tratamiento de la tuberculosis con estatinas en modelos animales

Todos los estudios *in vivo* y prospectivos del efecto de las estatinas contra tuberculosis se han realizado en ratones. Tabla 2. El primer estudio se realizó en ratones C57BL/6, de 8-12 semanas de edad, tratados por vía intraperitoneal con simvastatina o rosuvastatina (20 mg/kg) o con PBS como control cada dos días durante 2 semanas; los ratones se infectaron con *M. tuberculosis* mediante exposición a aerosoles. El tratamiento con estatinas se continuó hasta 4 semanas después de la infección. Ambas estatinas mostraron una respuesta protectora en los ratones infectados, con una reducción de la carga bacilar hasta 10 veces en el bazo, hígado y pulmón, en comparación con animales control no tratados [8]. Lobato et al. investigaron el efecto de la atorvastatina, utilizando el modelo de infección de Shepard [103] en el que se

inyecta una suspensión de  $1 \times 10^4$  de *M. leprae* en los cojinetes plantares de ratones BALB/c. Después de un mes de infección, los ratones fueron tratados con atorvastatina (80 mg/kg/día) y en combinación con rifampicina (1 mg / kg) durante cinco meses. La atorvastatina se añadió al alimento diario y la rifampicina se administró por sonda gástrica cada semana. Los resultados mostraron que la atorvastatina redujo la replicación de *M. leprae* y tuvo un efecto aditivo con rifampicina. También demostraron que el tratamiento con atorvastatina o la combinación de rifampicina más atorvastatina no aumentaron el daño muscular o la hepatotoxicidad en los ratones [99].

Posteriormente, otro grupo probó si la adición de estatinas al régimen de tratamiento estándar de primera línea podría aumentar la capacidad bactericida. Ratones BALB/c de 4-6 semanas de edad fueron infectados por aerosoles con  $3.7 \log_{10}$  UFC de *M. tuberculosis* CDC1551. Se permitió que la infección progresara 6 semanas antes del inicio del tratamiento y luego se trataron los ratones por sonda gástrica con rifampicina (10 mg/kg), isoniazida (10 mg/kg) y pirazinamida (25 mg/kg), con o sin simvastatina (25 mg/kg), 5 días a la semana durante 8 semanas. Después de 4 y 8 semanas de tratamiento, el régimen estándar, en combinación con simvastatina mostró, una mayor eficacia para la eliminación de micobacterias, reduciendo el número de UFC de pulmón en  $1 \log_{10}$  adicional el día 28 y  $1.25 \log_{10}$  el día 56 [100], lo que sugiere que la simvastatina podría mejorar el tratamiento actual.

En 2016, Dutta et al., confirmaron que la terapia con simvastatina como adyuvante al tratamiento estándar, reduce el tiempo de obtención de un cultivo negativo en ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv mediante aerosoles. Además, evaluaron la tasa de recaída en ratones tratados con simvastatina (60mg/kg) durante 2.5, 3.5 y 4.5 meses. La recaída se evaluó 3 meses después de la interrupción del tratamiento. La recaída se definió como la presencia de un cultivo positivo del homogenizado de pulmón en el momento de la

evaluación. Los resultados mostraron que el tratamiento con fármacos antituberculosis más simvastatina reduce el porcentaje de recaídas un 50% en comparación al tratamiento únicamente con los fármacos antituberculosis. [101].

**Tabla 2. Tratamiento contra tuberculosis en modelos animales**

Autor	Modelo animal	Tratamiento	Cepa	Efecto
Parihar et al.	Ratones C57BL/6 (edad: 8-12 semanas)	Simvastatina o rosuvastatina (20 mg/kg) cada dos días durante 6 semanas	Exposición a dosis bajas de aerosoles con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Reducción de la carga bacilar hasta 10 veces mayor en el bazo, hígado y pulmón
Lobato et al.	Modelo de infección de Shepard (en cojinetes plantares de ratones BALB/c)	Atorvastatina (80mg/kg/día añadida en el alimento diario) sola o combinada con rifampicina (1mg/kg por sonda nasogástrica) por 5 meses	1x10 <sup>4</sup> <i>M. leprae</i> vivas en 10 µl fueron inoculadas en cada cojinete plantar	Redujo la replicación de <i>M. leprae</i> y tuvo un efecto aditivo con rifampicina. Atorvastatina o la combinación de rifampicina más atorvastatina no aumentaron el daño muscular o la hepatotoxicidad
Dutta et al.	Ratones BALB/c (edad: 4-6 semanas)	Rifampicina (10mg/kg), isoniazida (10mg/kg) and pirazinamida (25mg/kg), más simvastatina (25 mg/kg) por sonda nasogástrica, 5 días a la semana durante 8 semanas	Aerosol infection with 3.7 log <sub>10</sub> CFU of <i>M. tuberculosis</i> CDC1551	El tratamiento standard+ simvastatina potenció el efecto micobactericida y reduce la tasa de recaídas en ratones tratados por 2.5 y 3.5 meses.

Fuente: Guerra-De-Blas, P.D.C., et al., *Potential Effect of Statins on Mycobacterium tuberculosis Infection*. Journal of Immunology Research, 2018. 2018: p. 14.

### Planteamiento del problema

La tuberculosis es la principal causa infecciosa de muerte en el mundo, con 10 millones de casos y 1.3 millones de muertes registradas en 2017. La OMS estima que la tasa de éxito de tratamiento a nivel mundial es del 82%, sin embargo, en el continente americano es del 75%. Además, en el 2017 se reportaron 558 000 casos multi-resistentes (MDR) y menos de la mitad de los pacientes tratados completaron con éxito el tratamiento [2]. Estos hallazgos demuestran las deficiencias de los regímenes de tratamiento actuales y la necesidad de fármacos que acorten el tratamiento actual y/o potencien la respuesta inmune del hospedero contra la micobacteria. Las estatinas son fármacos que inhiben la síntesis de colesterol y tienen efectos pleiotrópicos en el sistema inmune que se han asociado con mejores resultados en varias enfermedades infecciosas. A pesar de que existe evidencia de que las estatinas pueden contribuir a contener la infección por *M. tuberculosis*, no se ha descrito su efecto fino

en las células de la respuesta inmune en dicha infección. Estudiar tal efecto es muy importante, ya que se han descrito efectos pleiotrópicos que podrían tener consecuencias sobre la respuesta inmune en el control de la infección.

### Justificación

La tuberculosis sigue siendo una enfermedad grave en todo el mundo, es necesario encontrar agentes terapéuticos que reduzcan la duración del tratamiento, fortalezcan la capacidad del sistema inmune para eliminar al bacilo, o disminuyan el daño tisular causado por la infección.

Las estatinas son fármacos que reducen la concentración plasmática de colesterol y además tienen efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y antimicrobianos.

En modelos *in vitro* y animales sobre la infección por *M. tuberculosis* se ha mostrado que las estatinas reducen el crecimiento de *M. tuberculosis* y ejercen diversos efectos inmunomoduladores; sin embargo, hasta el momento no existen estudios que hayan dilucidado la importancia y consecuencias de estos efectos en células mononucleares de sangre venosa periférica de humanos en la infección por *M. tuberculosis*. Este conocimiento ayudará a comprender de mejor manera los mecanismos que potencialmente pueden beneficiar o contribuir al sistema inmune para el control de la enfermedad.

### Hipótesis:

1. El tratamiento de las células mononucleares con simvastatina induce cambios fenotípicos y funcionales en linfocitos T CD4+, CD8+, NKT, en células NK y en células mieloides.
2. El tratamiento de las células mononucleares con simvastatina incrementa la capacidad de las CMN para controlar el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*.

### Objetivo general:

Evaluar el efecto de la simvastatina sobre la función, fenotipo y control de la infección por *M. tuberculosis* en células mononucleares infectadas con la cepa H37Rv en un modelo experimental *in vitro*.

### Objetivos específicos:

1. Evaluar si la simvastatina tiene un efecto directo de inhibición en el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.
2. Estudiar *in vitro* los cambios fenotípicos inducidos por la simvastatina en linfocitos T CD4+, CD8+, NKT, NK, monocitos CD14+ y monocitos CD14+CD16+.
3. Estudiar los cambios fenotípicos y funcionales de las células mononucleares cultivadas con simvastatina e infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*.
4. Estudiar la capacidad de degranulación de los linfocitos T CD8+, NKT y células NK tratadas con simvastatina y posteriormente infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv.
5. Estudiar el efecto de la simvastatina sobre la producción de citocinas en células mononucleares cultivadas con simvastatina e infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv.
6. Evaluar el efecto de la simvastatina sobre la autofagia en células mononucleares expuestas a simvastatina e infectadas con *M. tuberculosis*.
7. Evaluar el efecto de la simvastatina sobre la apoptosis en células mononucleares expuestas a simvastatina e infectadas con *M. tuberculosis*.

### Material y métodos

Diseño del estudio: estudio comparativo transversal.

**Lugar de estudio:** El estudio se realizó en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ).

**Población de estudio:** Concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos que acuden al banco de sangre del INCMNSZ.

#### Criterios de Inclusión

- Sujetos mayores de 18 años.
- Aceptación para participar mediante consentimiento informado.

#### Criterios de Exclusión

- Antecedente de uso de cualquier fármaco inmunosupresor.
- Antecedente conocido de tuberculosis activa y/o encontrarse recibiendo tratamiento antituberculosis.
- Antecedente de uso de cualquier antimicrobiano en los últimos siete días previo a la recolección de la muestra.
- Antecedente de condiciones inmunosupresoras (Infección por VIH, diabetes mellitus, cáncer o enfermedades reumatológicas).

#### Criterios de Eliminación

- Muestra inadecuada.
- Retiro del consentimiento informado.

### Metodología

Se utilizaron CMN provenientes de concentrados leucocitarios de diez sujetos sanos (7 hombres y 3 mujeres) donadores de sangre con edad promedio de 35.6 años ( $\pm$  SD) que acudieron al banco de sangre de una institución de tercer nivel de atención en la Ciudad de

México. Todos ellos firmaron consentimiento informado. Los criterios de inclusión fueron: edad mayor de 18 años, sin antecedentes de uso de fármacos inmunosupresores, sin tuberculosis activa y/o haber recibido cualquier antimicrobiano en los últimos siete días antes de la toma de muestra. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional (REF. 1628).

#### Obtención de células mononucleares

A partir de una muestra de 20 mL del concentrado leucocitario, se separaron las CMN por gradiente de densidad con Ficoll- Hypaque (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) [104]. Se contaron las células en el equipo TC-20 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que evalúa simultáneamente la viabilidad celular con el colorante azul de tripán. El paquete celular obtenido se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM y sin antibiótico.

#### Preparación del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Se cultivó *M. tuberculosis* H37Rv en medio Middlebrook 7H9+OADC (Becton Dickinson, Sparks, MA, USA) suplementado con glicerol al 0.2% y Tween 80 al 0.05%. Se incubó a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica ( $\approx$  21 días). Se cosechó la masa bacteriana por centrifugación, se hicieron alícuotas de 2 mL y se almacenaron en crioviales con medio de Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) a -70°C.

Para los experimentos de inmunofluorescencia *M. tuberculosis* H37Rv se transformó con pCherry8 (proporcionado por Addgene, Cambridge, MA, EE. UU.) mediante electroporación [105]; este plásmido expresa la proteína reportera fluorescente mCherry a partir del promotor Psmc [106]. Luego, las bacterias se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) suplementado con OADC (Becton Dickinson), Tween-80 al 0.05% (Sigma-

Aldrich) e higromicina B (Roche Life Science, Indianapolis, IN, EE. UU.). Se incubó a 37°C hasta alcanzar crecimiento en fase logarítmica ( $\approx$  21 días). Se cosechó la masa bacteriana por centrifugación, se hicieron alícuotas de 2 mL y se almacenaron en medio Middlebrook 7H9 en crioviales a -70°C.

#### Solución stock de simvastatina

Se utilizó simvastatina (Sigma-Aldrich, Oakville, Canadá) sin activar (lactona) y su forma activa o metabolito beta hidroxilado (beta-hidroxiácido o simvastatina ácida). Se probaron concentraciones de simvastatina y de simvastatina ácida de 0.1  $\mu$ M hasta 20  $\mu$ M. Se preparó una solución stock 25 mM (se pesaron 1.04 mg de simvastatina, se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) y etanol (ETOH) absoluto (V/V 30:70). Posteriormente, la solución stock se dividió en dos alícuotas de 500 $\mu$ L, una de ellas se diluyó con PBS, a concentración de 500  $\mu$ M, pH=7.4 y se esterilizó por filtración (filtro de 0.22 $\mu$ m, Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). La otra alícuota se activó por hidrólisis alcalina con NaOH 0.1 M a 50°C, durante 2 horas, luego se diluyó con PBS a concentración de 500 $\mu$ M pH=7.4 y se esterilizó por filtración (filtro de 0.22  $\mu$ m)[107, 108].

#### Tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis* con simvastatina y cuantificación directa de unidades formadoras de colonia (UFC) por dilución en placa.

A partir del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv en fase logarítmica se tomaron 2mL y se ajustó a una concentración de 0.5 de McFarland (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) con el uso del nefelómetro (Biomérieux Vitek, Hach Co, Loveland, USA) con medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson). Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL. En una placa de 24 pozos, se agregó por triplicado 1 mL con  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL de *M. tuberculosis* H37Rv y se cultivaron en presencia de simvastatina, simvastatina ácida, sin tratamiento y con vehículo (PBS con DMSO 0.024% y ETOH 0.056%). La simvastatina y la simvastatina

ácida se agregaron en las siguientes concentraciones: 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M y 20  $\mu$ M. Las placas fueron incubadas a 37°C, en atmósfera de 7.5% de CO<sub>2</sub>, durante 96 horas [109]. Para cuantificar el crecimiento de la micobacteria, se realizaron diluciones seriadas, se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L, se inocularon en placas de agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) y se incubaron a 37°C en atmósfera de 7.5% de CO<sub>2</sub>. Las placas se revisaron y se determinaron las UFC/mL a los 7, 14 y 21 días.

### *Infección de células mononucleares con *Mycobacterium tuberculosis**

Se descongeló un vial del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv en fase logarítmica, se centrifugó a 13,300 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, el paquete bacteriano se resuspendió en 1 mL de RPMI (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales (Gibco) al 1%, aminoácidos esenciales (Gibco) al 1%, piruvato de sodio (Sigma) al 1% y se transfirió a un tubo de 14 mL. Para eliminar grumos o agregados bacterianos la suspensión se pasó a través de un filtro de jeringa de 5  $\mu$ m (Millipore) y la cuenta de bacterias únicas (single cell) se hizo en una cámara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA). Se probó con índices de multiplicidad de infección (MOI) de 0.01, 0.1, 1 (número de bacterias/célula).

### *Células mononucleares infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* y tratadas con simvastatina*

En una placa de 24 pozos se adicionó 1 mL de RPMI con  $2 \times 10^6$  CMN/mL y se expusieron a concentraciones de 1, 5 y 20  $\mu$ M de simvastatina y de simvastatina ácida. Además, se incluyeron CMN no tratadas y CMN tratadas con el vehículo (PBS + DMSO 0.024% ETOH 0.056%). Se infectaron  $2 \times 10^6$  CMN/mL con un MOI de 0.01, 0.1 y 1. Las CMN fueron incubadas en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco), 2 mM de glutamina, 1% v/v de aminoácidos no esenciales, 1% v/v de aminoácidos

esenciales (Gibco), 1% v/v de piruvato de sodio (Sigma), a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 horas post- infección se evaluó la viabilidad celular con el colorante azul de tripán en el equipo TC-20 (Bio-Rad). A las 96 horas, las CMN fueron lisadas con agua destilada estéril durante 3 minutos y, luego, se hicieron diluciones seriadas y se inocularon alícuotas de 10µL en placas de agar Middelbrook 7H10 (Becton Dickinson) para la cuantificación de UFC/mL.

### Inmunofenotipificación de las células mononucleares tratadas con simvastatina no infectadas e infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*

Las CMN se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/mL y de esta suspensión se sembraron 5 mL en medio RPMI (i.e  $1 \times 10^7$ ) en cajas de cultivo celular de 25 mm<sup>2</sup> en las siguientes condiciones: 1. Simvastatina ácida 1µM (SA1µM), 2. Simvastatina ácida 20µM (SA20µM), 3. Simvastatina 1µM (S1µM), 4. Simvastatina 20µM (S20µM). Como controles se utilizaron células no tratadas con simvastatina (No Tx) en las cuales únicamente se adicionó el vehículo (PBS DMSO 0.024% ETOH0.056%) y células tratadas con forbol miristato acetato (PMA 25ng/mL) más ionomicina (I 1µg/mL)). Todas las cajas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>; después de 24 horas se evaluó el fenotipo y estado de activación de los linfocitos T cooperadores (CD4+), T citotóxicos (CD8+), NKT (CD3+Vα24-J18+), células NK (CD3-CD16CD56+) y monocitos (CD14+).

Otras cajas de cultivo se pusieron bajo las 6 condiciones previas durante 24 horas y, posteriormente, se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1. A las 24 horas post-infección se evaluó el fenotipo y estado de activación de los linfocitos T cooperadores (CD4+), T citotóxicos (CD8+), NKT (CD3+Vα24-J18+), células NK (CD3-CD16CD56+) y monocitos (CD14+) con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD25, CD56, CD69, CD80, CD86, y Vα24-J18. El panel de anticuerpos se

diseño de la siguiente manera: anti CD25-FITC, anti CD69-PE, anti CD14-PE, anti CD3-PercP, anti CD8-PeCy7, anti CD4-APC, anti CD16-APC Cy7, anti CD56-APC Cy7, anti CD80-PercP, anti CD86-PeCy7, anti CD16-APC Cy7 y anti V $\alpha$ 24-J18-APC (Biolegend, San Diego, CA, USA). Los receptores Fc $\gamma$ R se bloquearon previamente con suero AB humano al 10%. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). El punto de corte se estableció con la estrategia Fluorescence Minus One (FMO). Se inició la selección de células individuales por tamaño celular y granularidad (FSC Vs. SSC). Luego, se seleccionaron las células CD3+ y las CD3-. A partir de las CD3- se seleccionaron las células CD16+ y CD56+ para definir el grupo de las células NK. De las células CD3+ se seleccionaron las que expresaron CD4 o CD8. A su vez se sub-seleccionaron las células CD3+CD4+ y positivas para V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18, y las CD3+CD8+ V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18+ (Figura Suplementaria 1A).

Para los monocitos, nuevamente se seleccionaron las células por tamaño y granularidad. Posteriormente, se seleccionaron las células CD14+, y de éstas se seleccionaron los monocitos CD14+ (clásicos) y los CD14+CD16+ (no clásicos). Además, se analizó la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y C86) en monocitos clásicos y no clásicos. Asimismo, se evaluó la intensidad media de fluorescencia (IMF, indicador de la densidad del receptor expresada por cada célula) para la expresión de C80 y CD86 en monocitos (Figura Suplementaria 1B).

#### **Análisis funcional del efecto de la simvastatina sobre las células T citotóxicas, NK y NKT por cinética de degranulación**

La capacidad de degranulación de las células TCD8 +, NKT y NK se evaluó mediante una cinética por citometría de flujo como se ha descrito previamente[110]. En breve: se ajustaron las CMN a  $2 \times 10^6$  células/mL y se sembraron 5 mL de medio RPMI (i.e  $1 \times 10^7$ ) en cajas de

cultivo celular de 25mm<sup>2</sup> utilizando las 6 condiciones descritas previamente, se agregaron 3 µl de anti CD107a-PE, previamente titulado. Después de 1 hora de incubación, se agregó monensina 2µM (Biolegend); se tomaron alícuotas de 1x10<sup>6</sup> células a las 2 y 5 horas de incubación y se marcaron con antiperforina-FITC, anti CD107a-PE, anti CD3-PercP, Anti CD8-PeCy7, anti CD4 APC, anti CD16 APC Cy7, anti CD56 APC Cy7 y anti Vα24-J18 APC (Biolegend). También se evaluó la capacidad de degranulación en células cultivadas bajo las 6 condiciones previas e infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1. Se agregaron 3 µl de anti CD107a-PE. Después de 1 hora de incubación, se agregó monensina 2µM (Biolegend); se tomaron alícuotas de 1x10<sup>6</sup> células a las 2 y 5 horas de incubación y se marcaron con antiperforina-FITC, anti CD107a-PE, anti CD3-PercP, Anti CD8-PeCy7, anti CD4 APC, anti CD16 APC Cy7, anti CD56 APC Cy7 y anti Vα24-J18 APC (Biolegend). Todas las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). El punto de corte se estableció con la estrategia FMO.

#### Efecto de la simvastatina sobre la producción de citocinas en células mononucleares no infectadas e infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

Los niveles de citocinas se determinaron en el sobrenadante de los cultivos celulares sin infección e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1 tratados bajo las 6 condiciones descritas previamente. A las 24 horas post-tratamiento o post- infección se recolectaron los sobrenadantes y fueron almacenados en criotubos a -70°C hasta su análisis. Para la determinación de las citocinas se utilizó el kit Cytokine Bead Array-CBAs (Becton Dickinson, Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la producción de IFN-γ, TNF α, IL-1β, IL12p70, IL-17A e IL-10. Los ensayos fueron analizados en el equipo FACS Canto II (BD Biosciences).

## Evaluación del efecto de la simvastatina sobre la apoptosis y la autofagia en células mononucleares infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

Las CMN se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/mL y de esta suspensión se sembraron 5 mL en medio RPMI (i.e  $1 \times 10^7$ ) en cajas de cultivo celular de 25 mm<sup>2</sup> con las siguientes condiciones que mostraron mayor efecto en los ensayos anteriores: 1. Simvastatina ácida 20  $\mu$ M (SA20  $\mu$ M), 2. Células no tratadas en las cuales solamente se adicionó el vehículo (PBS, DMSO 0.024% ETOH 0.056%), 3. Células infectadas a una MOI de 0.1, 4. Células infectadas a una MOI de 0.1 y tratadas con simvastatina ácida 20  $\mu$ M. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Posteriormente, se evaluó la inducción de apoptosis y de autofagia en dichas células.

Para evaluar la inducción de apoptosis se utilizó el kit CV-Caspasa 3 y 7 (Enzo Life Sciences, NY, USA); el cual utiliza el reactivo CR (DEVD)<sub>2</sub> que es un sustrato no citotóxico y fluoresce después del corte de las enzimas caspasa 3 y 7 activas. Como control positivo se utilizaron CMN tratadas con etopósido 100  $\mu$ M durante 8 horas.

Para evaluar la autofagia se utilizó el kit CYTO-ID® 2.0 (Enzo Life Sciences), el cual contiene un reactivo fluorescente que marca los compartimentos autofágicos con una mínima tinción de los lisosomas[111]; como control positivo se utilizaron CMN tratadas con rapamicina 500nM durante 8 horas.

Para distinguir la inducción de autofagia en linfocitos T cooperadores, T citotóxicos, NKT, células NK, y monocitos, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti CD14 PE, anti CD3 acoplado a PercP, Anti CD8-PeCy7, anti CD4 APC, anti CD16 APC Cy7, anti CD56 APC Cy7, anti CD16 APC Cy7 y anti V $\alpha$ 24-J18 APC (Biolegend). Para establecer los puntos de corte se utilizó el FMO y, posteriormente, en cada subtipo celular se comparó el porcentaje de células que se tiñeron con CYTO-ID® con los diferentes tratamientos (células

tratadas con rapamicina como control positivo, células no tratadas, células expuestas a simvastatina 20 $\mu$ M, células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv y, por último, células infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv y tratadas con simvastatina 20 $\mu$ M). Para evaluar el efecto de la simvastatina sobre la inducción de apoptosis se siguió la misma estrategia y se comparó el porcentaje de células que se tiñeron con CR (DEVD)<sub>2</sub>. Los ensayos fueron analizados en el equipo FACS Canto II (BD Biosciences). Figura suplementaria 2.

Adicionalmente se tomaron microfotografías de un experimento en el cual se ajustaron las CMN a 2x10<sup>6</sup> células/mL y de esta suspensión se sembraron 2 mL en medio RPMI (i.e 2x10<sup>6</sup>) en una placa de 24 pozos en las siguientes condiciones 1. CMN infectadas a una MOI de 1 con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv- mCherry y 2. Células infectadas a una MOI de 1 con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv- mCherry y tratadas con simvastatina ácida 20  $\mu$ M. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Posteriormente, las células se tiñeron con el kit CYTO-ID® 2.0 (Enzo Life Sciences) y con Hoechst 33342 según las instrucciones del fabricante. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. Para adherir las células al cubreobjetos las CMN se centrifugaron a 1800 rpm por 3 minutos en la centrífuga Cytopro® Cytocentrifuge Series 2 (Puteaux, France). Las células se observaron mediante microscopia confocal de fluorescencia, usando el sistema invertido LSM 710- DUOX (Carl Zeiss AG, Germany) y las imágenes se obtuvieron a través del software ZEN 2009, versión 6.0, SP2 (Carl Zeiss AG, Germany).

### Análisis estadístico

Para comparar dos grupos de datos no paramétricos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Para la comparación entre los cuatro grupos se utilizó la prueba Kruskal-Wallis. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism v6.0 (La Jolla, CA,

USA). Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar.

## Resultados

### Efecto directo de la simvastatina sobre el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se probaron diferentes concentraciones de simvastatina de 0.1  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ . El análisis de las cinéticas de crecimiento mostró que la simvastatina independientemente de su estado de activación o de la concentración no tuvo efecto bactericida directo ( $p > 0.05$ ). (Figura 1).

### Efecto de la simvastatina sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en células mononucleares de sangre venosa periférica infectadas *in vitro*.

Se observó que la MOI óptima para la infección de las CMN fue de 0.1, ya que la MOI de 1 indujo muerte en las CMN, y un MOI menor indujo muy pocos cambios fenotípicos sobre las CMN (Figura suplementaria 3). Se observó que las CMN infectadas e incubadas durante 96 horas y tratadas con simvastatina y simvastatina ácida, redujeron la carga bacilar, en comparación con los controles y/o el vehículo, desde la concentración de 1  $\mu\text{M}$  ( $3.75 \times 10^6$  a  $6.88 \times 10^5$  UFC/mL,  $p < 0.05$ ). La disminución de la carga bacilar fue aún mayor con concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  ( $1.92 \times 10^7$  UFC/mL a  $5.35 \times 10^6$  UFC/mL,  $p < 0.001$ ) (Figura 2). El efecto de las dos formas de simvastatina resultó dosis dependiente. De acuerdo con estos resultados se decidió utilizar las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  en los experimentos posteriores.

### Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de las células mononucleares de sangre venosa periférica no infectadas

El tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de simvastatina incrementó el porcentaje de células NKT CD4 + ( $1.63\% \pm 0.70$  vs  $0.57\% \pm 0.3780$ ,  $p < 0.05$ ) y NKT CD8 + ( $1.69\% \pm 0.522$  vs  $0.52\% \pm 0.38$  p

<0.05) (Figura 3 A, B lado izquierdo). Se muestran *dot-blots* representativos del efecto de la simvastatina sobre las NKTs en la figura suplementaria 4. El tratamiento con simvastatina no afectó el porcentaje de células NK. (Figura 3C)

El tratamiento con simvastatina no aumentó el porcentaje de monocitos clásicos CD14+ ni de monocitos no-clásicos CD14+CD16+ (Figura 4 A y D, lado izquierdo). Sin embargo, el tratamiento con simvastatina incrementó en monocitos clásicos y no clásicos la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 (CD14+CD80+, 60.28%  $\pm$ 12.98 vs 23.71%  $\pm$ 11.44 p<0.05; CD14+CD16+CD80+ 30.91%  $\pm$ 8.33 vs 15.69 $\pm$ 5.68), figura 4 B y E y CD86 (CD14+CD86+ 55.64%  $\pm$ 8.44 vs 19.49%  $\pm$ 3.9; CD14+CD16+CD86+ 64.45%  $\pm$ 9.29 VS 34.73%  $\pm$ 14.52), figura 4 C Y F. Se muestran *dot-blots* representativos del efecto de la simvastatina sobre los monocitos en la figura suplementaria 5. El tratamiento con simvastatina no afectó el porcentaje de linfocitos TCD4+, TCD8+, ni su estado de activación, medido como la expresión de CD25 y/o CD69 (Figura suplementaria 6).

#### Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de las células mononucleares de sangre venosa periférica infectadas con *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

En CMN expuestas a simvastatina 20 $\mu$ M e infectadas se observó incremento del porcentaje de células NKT CD4+ (1.7 $\pm$ 0.57 vs 0.79 $\pm$ 0.33 p<0.05) y NKT CD8+ (1.79 $\pm$ 0.31 vs 0.48 $\pm$ 0.28 p<0.05) (Figura 3 A, B lado derecho). Se muestran *dot-blots* representativos del efecto de la simvastatina sobre las NKTs en la figura suplementaria 4. Asimismo, en monocitos CD14+ y C14+CD16+ no se observó cambio en la proporción de dichas células (Figura 4 A y D, lado derecho). En cambio, se incrementó la expresión de CD80 y CD86 en monocitos clásicos CD14+ (CD14+CD80+ 72.15%  $\pm$ 5.6 vs 57.31% $\pm$ 7.13; CD14+CD86+ 95.92% $\pm$ 2.9 vs 87.14 $\pm$ 3.14) (Figura 4 B y C, lado derecho). En los monocitos no clásicos la simvastatina no tuvo efecto en la expresión de CD80 y CD86 (Figura 4 E y F lado derecho).

Sin embargo, se observó que el tratamiento con simvastatina incrementó la IMF de CD80 en monocitos CD14+CD16+ (5142±1482 vs 2103±379.6 p<0.05). De igual manera, el tratamiento con simvastatina incrementó la IMF de CD86 en monocitos no clásicos (3108±745.6 vs 1476±456.5 p<0.05) (Figura 4 G y H). Se muestran *dot-blots* representativos del efecto de la simvastatina sobre los monocitos en la figura suplementaria 5.

Los linfocitos TCD4+ y los linfocitos TCD8+ tratados con simvastatina e infectados no mostraron cambios fenotípicos. En los linfocitos infectados se observó aumento de la expresión de CD25+ y CD69+; sin embargo, la simvastatina no indujo cambios adicionales, con ello se confirmó que la simvastatina no influyó en el estado de activación de los linfocitos infectados con *M. tuberculosis* (Figura Suplementaria 7).

#### Efecto de la simvastatina sobre la degranulación de linfocitos TCD8+, NK y NKT.

El tratamiento con simvastatina no mostró efecto sobre la degranulación de los linfocitos TCD8+, NK y NKT. (Figura suplementaria 8) Además, se observó que al infectar las CMN con *M. tuberculosis* se incrementó la expresión de CD107a y disminuyó la expresión de perforina en linfocitos TC8+, TCD4+, células NK y NKT, a las cinco horas, esto indica que la infección *per se* provoca la degranulación de estas células y la simvastatina no indujo cambios adicionales.

#### Efecto de la simvastatina sobre la producción de citocinas en células mononucleares no infectadas e infectadas *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis*.

El tratamiento con simvastatina no produjo cambios significativos en la secreción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL12-p70, IL-17A e IL-10 en CMN no infectadas (Figura 5 A). Sin embargo, en CMN tratadas con simvastatina e infectadas produjeron niveles más elevados de las citocinas proinflamatorias IL-12p70 en comparación con las CMN no tratadas (0.9±1.79 pg/mL vs 10.46±7.48 pg/mL p<0.05) e IL-1 $\beta$  (14.7±8.0 vs 1676±624.7 p<0.05). Observamos

que el tratamiento con simvastatina también promovió la secreción de IL-10 en CMN infectadas ( $4.2 \pm 1.911$  vs  $63.2 \pm 22.78$   $p < 0.05$ ) (Figura 5 B). En las CMN tratadas e infectadas no se observaron cambios significativos en la producción de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A.

#### Evaluación del efecto de la simvastatina sobre la apoptosis y autofagia en células mononucleares no infectadas e infectadas *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis*.

En las CMN no infectadas y tratadas con simvastatina 20 $\mu$ M se observó un aumento en el porcentaje de CMN marcadas con CR (DEVD)<sub>2</sub> en comparación con las no tratadas, sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa. Además, se observó una mayor inducción de apoptosis en CMN tratadas e infectadas en comparación con las CMN únicamente infectadas ( $37.3\% \pm 4.7$  vs  $55.1\% \pm 5.8$   $p < 0.05$ ) (Figura 5 A).

Mediante citometría de flujo se seleccionaron los linfocitos, monocitos, células NK y NKT para evaluar si este efecto ocurre en todas las células en general o afecta más a un tipo celular. Como se observa en la Figura 6 D y E, la simvastatina no indujo la vía de activación de caspasas en células NK y NKT; sin embargo, aumentó el porcentaje de linfocitos teñidos con CR (DEVD)<sub>2</sub> lo que indica mayor inducción de apoptosis (linfocitos no infectados:  $26.84\% \pm 7.86$  vs linfocitos no infectados y tratados  $42.76\% \pm 4.56$ ) (Figura 6B). En las CMN tratadas e infectadas se observó que la inducción de la apoptosis fue mayor en los linfocitos ( $50.6\% \pm 9.10$  vs  $67.3\% \pm 9.2$ ,  $p < 0.05$ ) y en monocitos ( $56.3\% \pm 13.2$  vs  $83.6\% \pm 2.6\%$ ,  $p < 0.05$ ). (Figura 6 B y C).

En CMN no infectadas y tratadas se observó aumento en la inducción de autofagia ( $27.1\% \pm 4.5$  vs  $37.6\% \pm 5.6$ ,  $p < 0.05$ ) y este efecto se mantuvo en las CMN tratadas e infectadas ( $37.36\% \pm 4.77$  vs  $55.18\% \pm 5.8$   $p < 0.05$ ) (Figura 7 A y Figura 8). En las microfotografías se muestra que en las CMN infectadas, la micobacteria se encuentra íntegra dentro de algunas

células (rojo). También se observa la inducción de autofagia independientemente de la infección, es decir no hay co-localización de los autofagosomas con la micobacteria. En las CMN infectadas y tratadas se observa mayor inducción de autofagia y la señal roja está confinada dentro de los autofagosomas (verde); además se observó pérdida de la integridad de la micobacteria (Figura 8).

Asimismo, el análisis de los resultados por subpoblaciones mostró que la inducción de autofagia fue mayor en monocitos, tanto en los no infectados y tratados ( $22.65\% \pm 2.4$  vs  $36.38\% \pm 4.72\%$ ), como en los infectados y tratados ( $56.33\% \pm 13.27$  vs  $83.63\% \pm 2.6\%$   $p < 0.05$ ). (Figura 8C).

## Discusión

En este estudio describimos el efecto de la simvastatina sobre las células mononucleares de sangre periférica en su conjunto y no de manera aislada sobre un subtipo celular específico. Confirmamos que, mediante la activación de la apoptosis y la autofagia, la simvastatina puede favorecer la eliminación del bacilo *in vitro* (Figura 2). Sin embargo, no sólo produce activación de estos mecanismos celulares, sino que es capaz de inducir *in vitro* un incremento de las células NKT, un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras sobre los monocitos (Figura 3 y 4), promover la secreción de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12p70 (Figura 5) y activar los procesos de apoptosis y autofagia en monocitos (Figura 7 y 8). Todo esto favorece la eliminación de *M. tuberculosis*.

Sin embargo, la simvastatina favorece la secreción de IL-10 (Figura 5) y activa la apoptosis de linfocitos (Figura 6), fenómenos relevantes ya que impedirían un adecuado control de la infección, y podrían atenuar el daño inducido por una respuesta inflamatoria excesiva.

Con respecto al posible efecto micobactericida de la simvastatina, Skerry et al., no observaron efectos inhibitorios usando concentraciones de hasta 320 $\mu$ M [100]. Rens et al. demostraron un efecto inhibitorio con una MIC de 100  $\mu$ g/mL (238.91 $\mu$ M)[102]. En nuestro estudio probamos simvastatina en concentraciones de 0.1 $\mu$ M a 20  $\mu$ M, sin apreciar un efecto microbicida (Figura 1). Sin embargo, se observó una menor carga bacilar (Figura 2).

Los estudios realizados sobre el efecto inhibitorio de la simvastatina en el crecimiento de la micobacteria se han realizado en macrófagos humanos y de ratón[8] o en líneas celulares similares a macrófagos (THP-1, J774)[99, 100]. En este estudio, evaluamos el efecto de la simvastatina sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en células mononucleares (CMN) de sangre venosa periférica de individuos sanos. Los resultados muestran que la simvastatina reduce significativamente y de manera dosis-dependiente el crecimiento de *M. tuberculosis* en células infectadas (Figura 2).

También analizamos el efecto de la simvastatina sobre otros tipos celulares. Se observó que la simvastatina incrementa la proporción de células NKT, (CD4+ y CD8+) (Figura 3). En pacientes con hipercolesterolemia tratados por 6 meses o más con simvastatina, se observó un incremento en las células NKT de sangre periférica [77]. Por otra parte, diversos estudios han mostrado que existe una disminución de células NKT en sujetos con tuberculosis activa [15], además en experimentos *in vitro* se ha demostrado la capacidad de las células NKT para matar macrófagos infectados por *M. tuberculosis* [112]. Por lo tanto, el aumento en la proporción de células NKT CD4+ y CD8+ se propone como uno de los mecanismos favorecedores de la respuesta inmune protectora contra la micobacteria.

Observamos que la simvastatina en concentración farmacológica (20  $\mu$ M) aumenta el porcentaje de expresión de las moléculas coestimuladoras CD80+ y CD86+ en monocitos

clásicos y no clásicos, tanto infectados como no infectados por *M. tuberculosis* (Figura 4). En este sentido, Arora et al., reportaron que la simvastatina no altera la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas [113], Atila et al., observaron que el tratamiento con simvastatina redujo la expresión de CD83 y CD86 en células dendríticas derivadas de monocitos[114], y Gruenbacher et al. reportaron aumento de la expresión de CD86 en células CD14+CD56+ tratadas con simvastatina [115]. Burns et al., reportaron que en macrófagos infectados con *S. aureus*, el tratamiento con simvastatina no altera la expresión de las proteínas coestimuladoras CD80 y CD86 [116]. Bajo nuestras condiciones experimentales el tratamiento con simvastatina de CMN infectadas con *M. tuberculosis* incrementó la expresión de CD80 y CD86 en monocitos CD14+ y en CD14+CD16+ (Figura 4). A este respecto, Bhatt et al. describieron que los ratones knock-out para B7.1 y B7.2 (genes homólogos murinos de CD80 y CD86) son más susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* y que la señalización a través de los receptores B7 es crítica para la contención de la infección dentro de los granulomas pulmonares a largo plazo, [117]. En otro estudio se analizaron células recuperadas de esputo inducido de pacientes con tuberculosis y controles, donde se observó que las células de los pacientes tuvieron menor porcentaje de expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86)[118]. La menor expresión de estas moléculas en las células de los pacientes (moléculas implicadas en la presentación del antígeno y la activación de las células T) podría disminuir el reconocimiento de células T en la infección por *M. tuberculosis*. Por consiguiente, el aumento de la expresión de dichas moléculas, inducido por la simvastatina, observado en este estudio, podría favorecer la presentación antigénica.

Las citocinas son elementos clave para la iniciación, mantenimiento y modulación de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. En este estudio observamos que, en las células

infectadas, el tratamiento con simvastatina aumento la producción de IL-1 $\beta$  e IL12p70 (Figura 5). IL-1 $\beta$  es un mediador clave de la inflamación y juega un papel importante en la resistencia del hospedero a la infección por *M. tuberculosis*. Krishnan et al. reportaron que los ratones knock-out para IL-1 $\beta$  fueron más susceptibles a la infección por *M. tuberculosis*, con una mayor carga bacteriana en los pulmones y mayor mortalidad al inicio de la infección [119]. Asimismo, la interleucina-12 p70 (heterodímero de las subunidades p35 y p40) induce la actividad bactericida de los macrófagos, la proliferación, actividad citolítica, favorece producción de IFN- $\gamma$  por las células NK y desempeña un papel central en la polarización de la diferenciación de los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) en la infección por *M. tuberculosis* [120, 121]. Por otro lado, *M. tuberculosis* inhibe la producción de IL-12p40 en macrófagos, como estrategia de evasión del sistema inmune [122]; por ello, el aumento en la producción de IL-1 $\beta$  e IL-12p70 se propone como otro mecanismo mediante el cual la simvastatina favorece la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* en células infectadas. Nuestros resultados muestran que las CMN infectadas y tratadas con simvastatina produjeron mayor cantidad de IL-10. Se ha observado que IL-10 reduce la respuesta Th1 en la infección por *M. tuberculosis* [123]. Sin embargo, es muy importante que haya una respuesta inmune equilibrada con restricción del crecimiento de la micobacteria sin producir daño excesivo, porque la mitad de los pacientes tratados, tienen daño permanente debido al exceso de inflamación causada por esta infección [3]. A pesar de que el aumento en la producción de IL-10 en nuestro estudio, los resultados en el conteo de UFC/mL muestran que el tratamiento con simvastatina favorece la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* en CMN infectadas. Entonces, el aumento en la producción de dicha citocina podría disminuir el exceso de inflamación y el daño ocasionado por la infección.

En estudios previos se ha reportado que la simvastatina tiene efectos pro-apoptóticos en células de origen tumoral y es relevante en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis* [124]. Por ello, evaluamos si el efecto de la simvastatina (20  $\mu$ M) sobre la apoptosis en CMN infectadas. Nuestros resultados mostraron que la simvastatina induce apoptosis en las CMN, principalmente en macrófagos y linfocitos (Figura 6). La apoptosis inducida en los macrófagos favorece de manera más efectiva la eliminación del bacilo, mientras que la necrosis favorece su diseminación [24]. Sin embargo, la apoptosis en los linfocitos podría ser desfavorable para el control de la infección [29]. No obstante, diversos estudios han mostrado que la respuesta protectora contra la infección por *M. tuberculosis* depende de la calidad de la misma, medida por la capacidad de las células T para ejercer funciones múltiples, más que por su magnitud [125]. Por otra parte, Dutta et al. reportaron que la terapia con estatinas acorta la duración del tratamiento antituberculosis en ratones [101], por lo que es necesario estudiar con más detalle el impacto de la inducción de la apoptosis en linfocitos y evaluar el momento indicado para iniciar el tratamiento con estatinas en el modelo experimental.

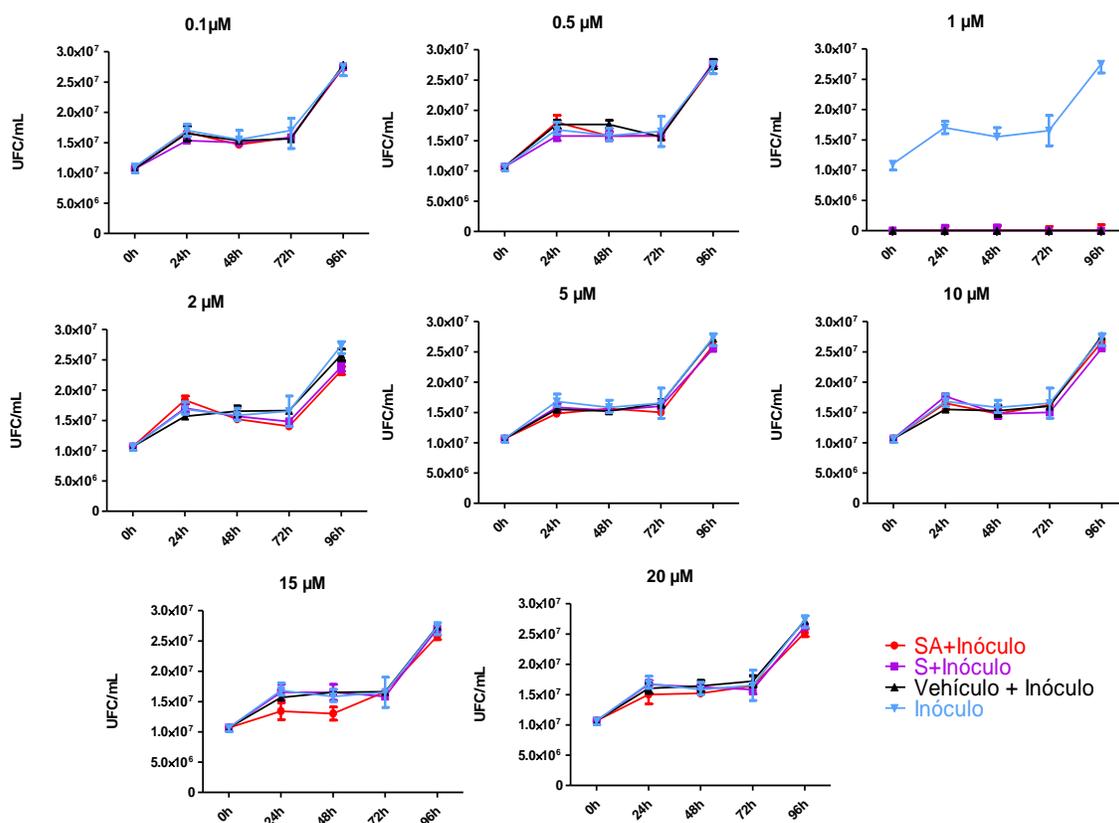
Parihar et al. [8] reportaron que la simvastatina promueve la autofagia en macrófagos infectados por *M. tuberculosis*, sin embargo, no se había analizado su efecto en otros tipos celulares y su posible implicación en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. Asimismo, nuestros resultados muestran que la inducción de autofagia ocurre preferentemente en monocitos (Figura 7), lo que favorece la eliminación del bacilo mediante la formación de autofagosomas. La inducción de la autofagia por simvastatina parece ser muy importante dado que este mecanismo contribuye en la eliminación de microorganismos intracelulares, como *M. tuberculosis*; además en modelos animales la autofagia controla la inflamación y previene el daño en el tejido [126, 127].

## Perspectivas y conclusiones

Este estudio es el primero en evaluar el efecto de la simvastatina sobre las CMN. Estos resultados son de gran importancia ya que el sistema inmune involucra interacciones complejas entre diferentes tipos celulares donde el balance entre la activación de mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorios es crucial para lograr la contención de la infección, provocando el menor daño posible, con lo que se confirma a las estatinas como candidatos para la HDT.

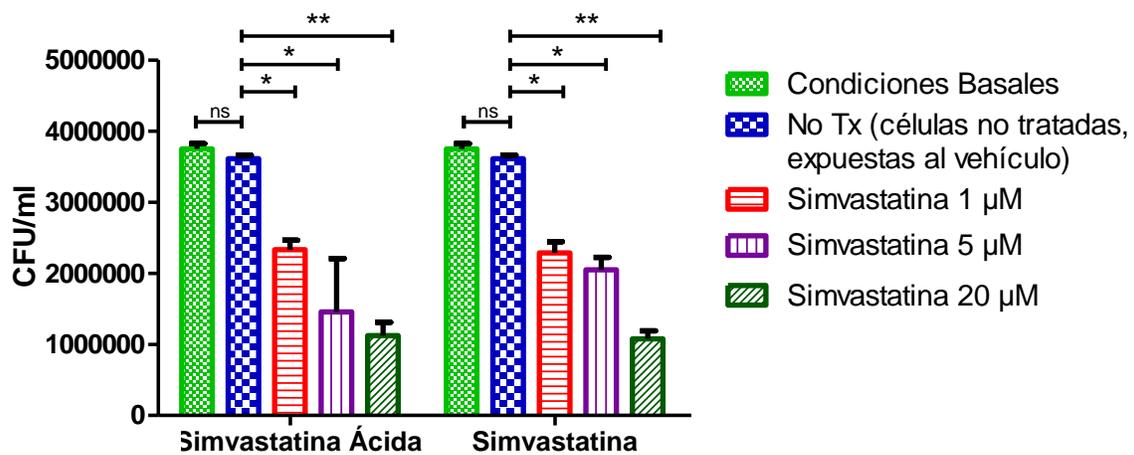
Este estudio ofrece un panorama acerca de los efectos que la simvastatina ejerce sobre las CMN y además abre la posibilidad de realizar estudios posteriores, en donde se pueda definir el papel de los mecanismos antiinflamatorios que inducen las estatinas en la infección por *M. tuberculosis* y se permita evaluar el tiempo más adecuado para el inicio del tratamiento con estas drogas. Es necesario realizar estudios *in vivo* donde se pueda evaluar si efectivamente el tratamiento con estatinas favorece la atenuación del daño tisular en la infección por *M. tuberculosis*.

Figuras:  
Figura 1



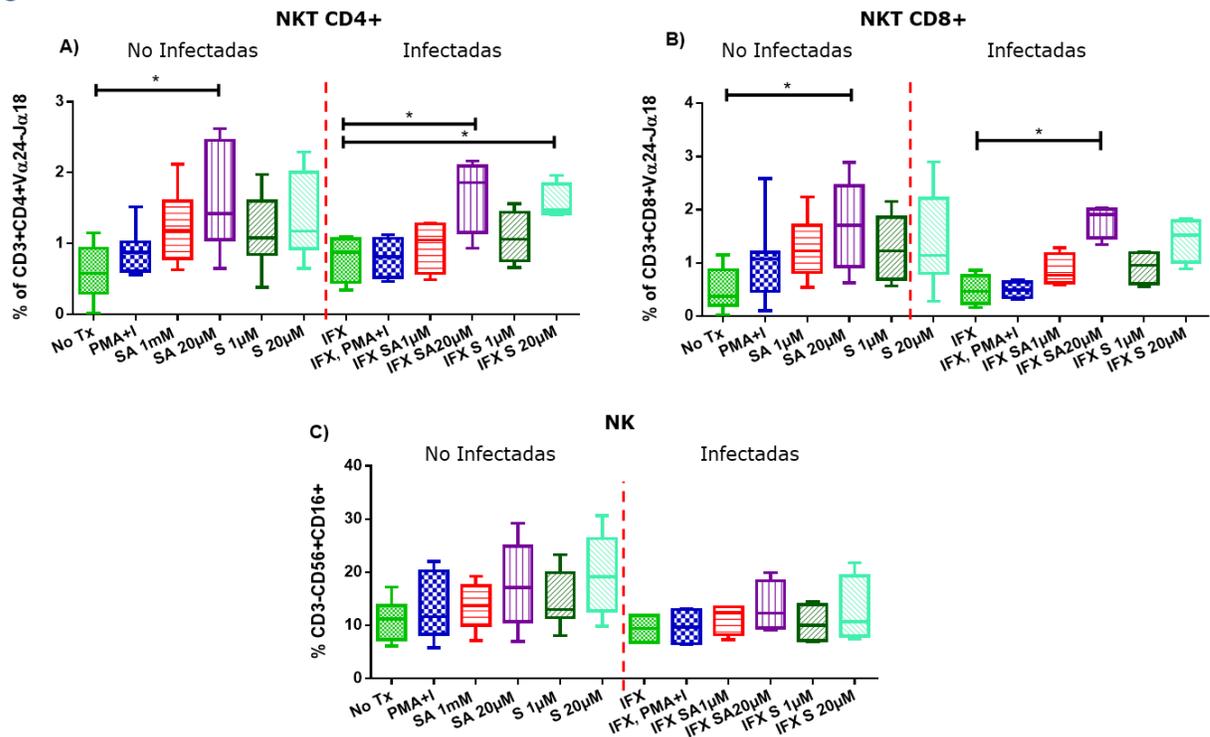
**Figura 1. Efecto de la simvastatina sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.** Se realizaron experimentos por triplicado en placa de 24 pozos, con  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de simvastatina ácida (SA, puntos rojos), simvastatina (S, cuadrados morados), vehículo (PBS con DMSO 0.024% y ETOH 0.056%, triángulos negros) y sin tratamiento/ Inóculo (triángulos azules). Las placas se incubaron a 37°C por 24, 48, 72 y 96 horas con 7.5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron diluciones seriadas del cultivo y se inocularon 10µL en agar Middlebrook 7H10 por triplicado. Las UFC se contaron a 7, 14 y 21 días de incubación. La concentración de simvastatina usada es indicada en la parte superior de cada gráfica. n=5 p <0.05 fue considerada significativa.

Figura 2



**Figura 2. Efecto de la simvastatina sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.** Las CMN fueron expuestas a concentraciones de 1, 5 y 20 µM de simvastatina ácida y de simvastatina. Se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1, se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. A las 96 horas las células fueron lisadas e inoculadas en placas de agar Middlebrook 7H10. Se contaron las UFC/mL a los 7, 14 y 21 días de incubación. Se muestran los datos del conteo final a los 21 días. Los controles fueron células sin tratamiento y células solo con el vehículo (PBS + DMSO 0.024% ETOH 0.056%). Kruskal Wallis. N = 10 \* p <0.05 \*\* p <0.01.

Figura 3



**Figura 3. Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de células NK y NKT.** Las CMN fueron incubadas bajo las siguientes condiciones: Simvastatina Acida 1µM (SA1µM), Simvastatina Acida 20µM (SA20µM), Simvastatina 1µM (S1µM) y Simvastatina 20µM (S20µM). Los controles fueron células no tratadas (NoTx) expuestas únicamente al vehículo (PBS+ DMSO 0.024% ETOH0.056%) y células tratadas con forbol miristato acetato (25 ng/mL) más ionomicina (1µg/mL) (PMA+I). Otras cajas de cultivo fueron incubadas bajo las condiciones previamente descritas durante 24 horas y, posteriormente, se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1 (IFX SA1 µM; IFX SA20 µM; IFX S1 µM; IFX 20 µM; IFX (células expuestas al vehículo e infectadas); IFX PMA + I). A las 24 horas se evaluó el fenotipo de las células NKT (A, B) y NK (C). Kruskal Wallis. N = 10 \* p < 0.05 \*\* p < 0.01.

Figura 4

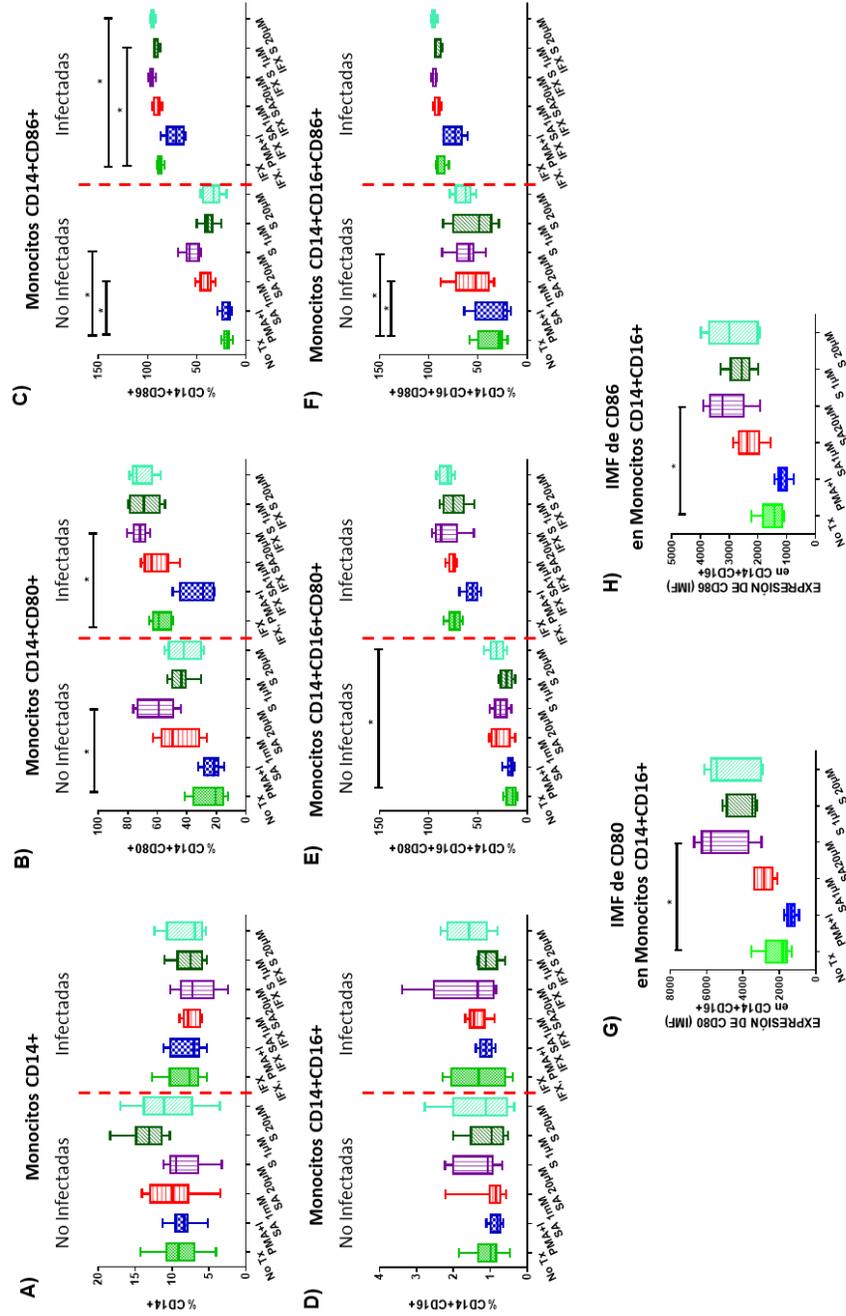
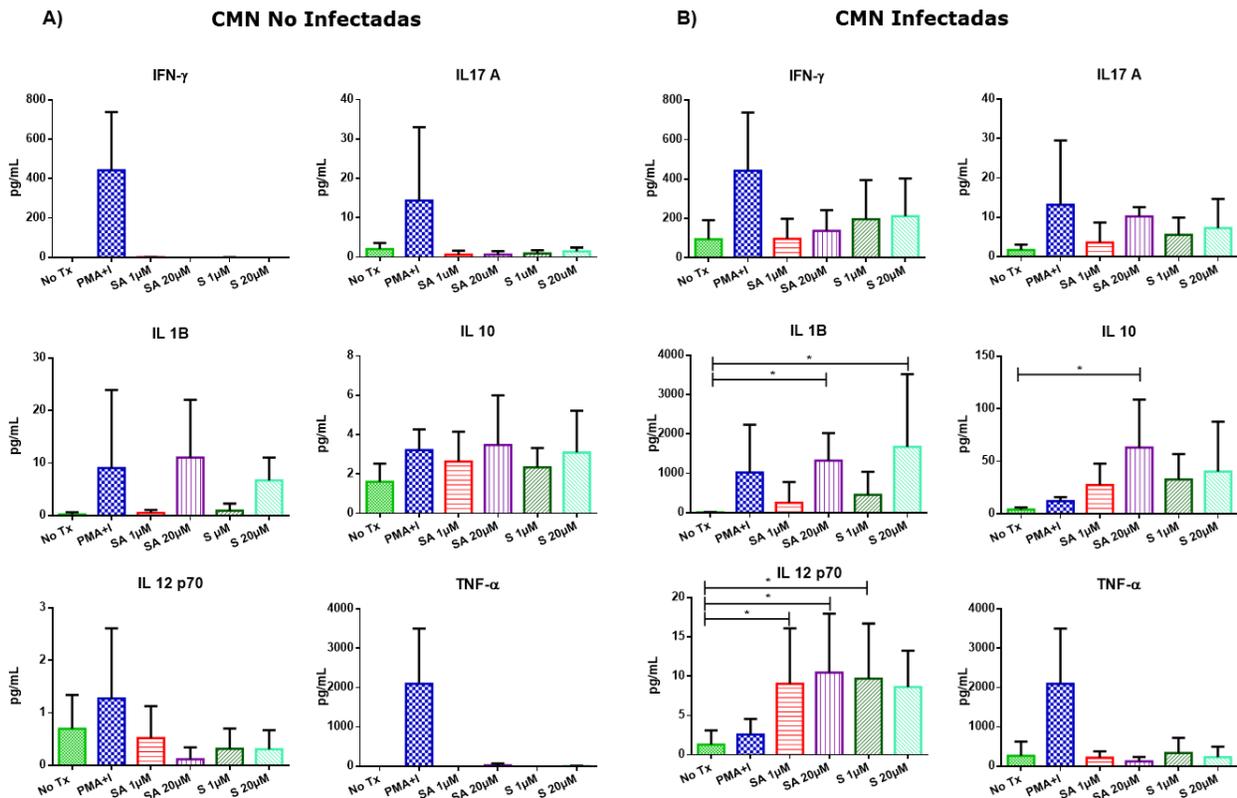


Figura 4. Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de monocitos. Las CMN fueron incubadas bajo las siguientes condiciones: Simvastatina Ácida 1μM (SA1μM), Simvastatina Ácida 20μM (SA20μM),

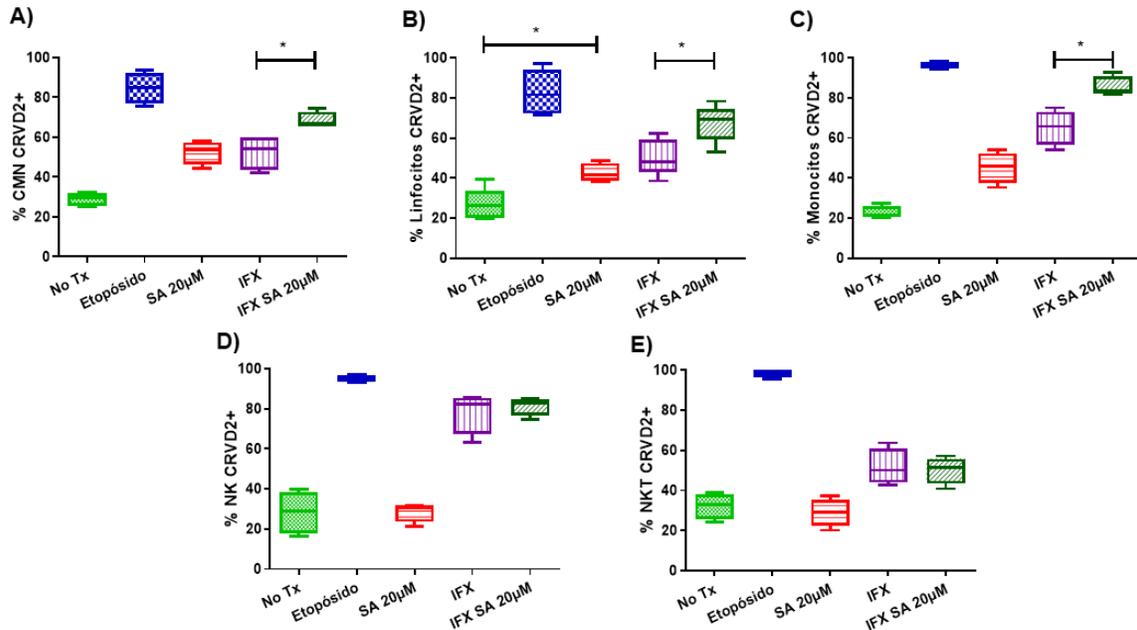
Simvastatina 1 $\mu$ M (S1 $\mu$ M) y Simvastatina 20 $\mu$ M (S20 $\mu$ M). Los controles fueron células no tratadas (NoTx) expuestas únicamente al vehículo (PBS+ DMSO 0.024% ETOH0.056%) y células tratadas con forbol miristato acetato (25 ng/mL) más ionomicina (1 $\mu$ g/mL) (PMA+I). Otras cajas de cultivo fueron incubadas bajo las condiciones previamente descritas durante 24 horas y, posteriormente, se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1 (IFX SA1  $\mu$ M; IFX SA20  $\mu$ M; IFX S1  $\mu$ M; IFX 20  $\mu$ M; IFX (células expuestas al vehículo e infectadas); IFX PMA + I). A las 24 horas se evaluó el fenotipo de los monocitos (A, D). Además, se muestra el efecto de la simvastatina sobre la expresión de CD80 (B, E y G) y de CD86 (C, F y H). Kruskal Wallis. N = 10 \* p <0.05 \*\* p <0.01.

Figura 5



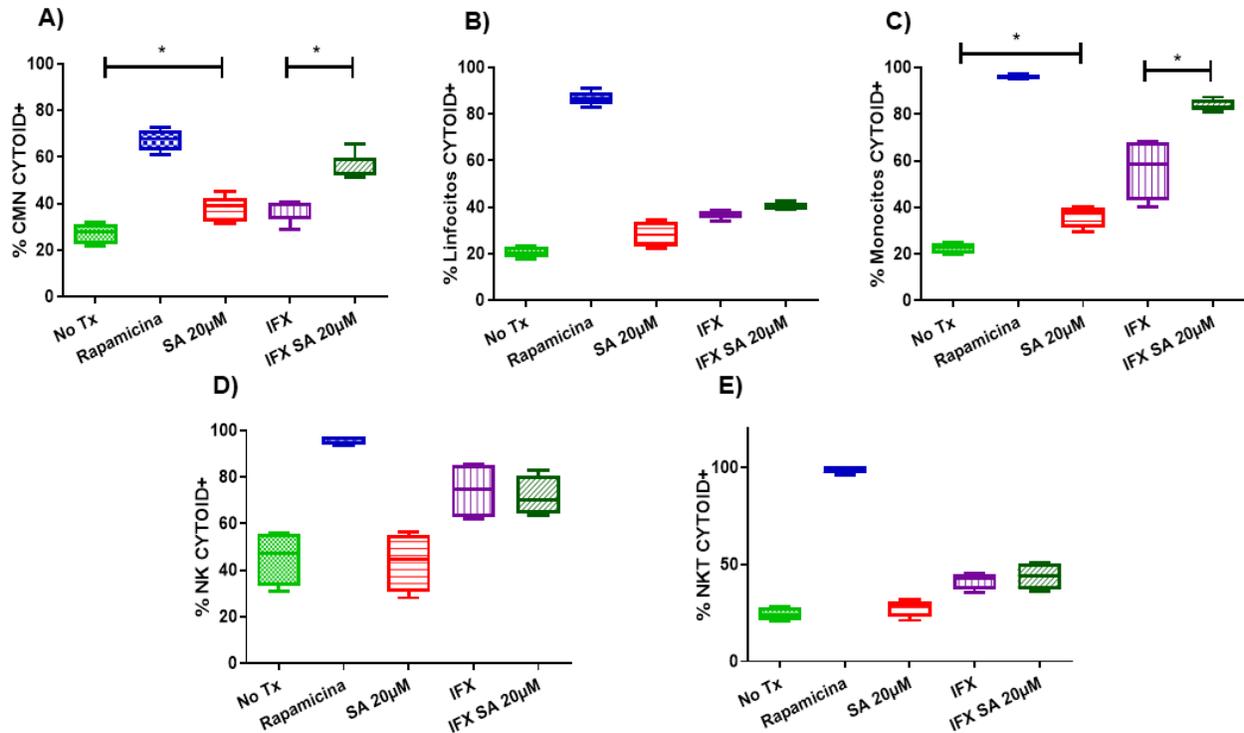
**Figura 5. Efecto de la simvastatina sobre la producción de citocinas en células mononucleares no infectadas e infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.** Se cuantificó la producción de citocinas en el sobrenadante de las CMN incubadas durante 24 horas con simvastatina ácida 1 $\mu$ M (SA1 $\mu$ M), simvastatina ácida 20 $\mu$ M (SA20 $\mu$ M), simvastatina 1 $\mu$ M (S1 $\mu$ M), simvastatina 20 $\mu$ M (S20 $\mu$ M). Como controles se utilizaron células no tratadas con simvastatina (No Tx) en las cuales únicamente se adicionó el vehículo (PBS DMSO 0.024% ETOH0.056%) y células tratadas con forbol miristato acetato (PMA 25ng/mL) más ionomicina (I 1 $\mu$ m/L)). B) Simvastatin effect on the cytokine production of infected PBMC. Otras cajas de cultivos se pusieron bajo las 6 condiciones previas durante 24 horas y, posteriormente, se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1. A las 24 horas post- infección se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la producción de citocinas. Kruskal Wallis. N=10. \*p<0.05 \*\*p<0.01

Figura 6



**Figura 6. Efecto de la simvastatina sobre la apoptosis en células mononucleares no infectadas e infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.** Se evaluó la inducción de apoptosis en CMN tratadas durante 24 horas en las siguientes condiciones: Simvastatina Ácida 20µM (SA20µM), Células no tratadas (No Tx) en las cuales solamente se adicionó el vehículo (PBS, DMSO 0.024% ETOH0.056%) (No Tx), células infectadas a una MOI de 0.1 (IFX), células infectadas a una MOI de 0.1 y tratadas con simvastatina ácida 20 µM (IFX SA 20 µM). Como control positivo para evaluar la inducción de apoptosis se utilizaron células tratadas con etopósido 100 µM durante 8 horas. A) Porcentaje de células positivas para CR(DEVD)2; B) Porcentaje de linfocitos positivos para CR(DEVD)2; C) Porcentaje de monocitos positivos para CR(DEVD)2; D) Porcentaje de NK positivas para CR(DEVD)2, y E) Porcentaje de NKT positivas para CR(DEVD)2. Kruskal Wallis. N=10. \*p<0.05 \*p<0.01.

Figura 7



**Figura 7. Efecto de la simvastatina sobre la autofagia en células mononucleares no infectadas e infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.** Se evaluó la inducción de autofagia en CMN tratadas durante 24 horas en las siguientes condiciones: simvastatina ácida 20µM (SA20µM), células no tratadas (No Tx) en las cuales solamente se adicionó el vehículo (PBS, DMSO 0.024% ETOH0.056%), células infectadas a una MOI de 0.1 (IFX), células infectadas a una MOI de 0.1 y tratadas con simvastatina ácida 20 µM (IFX SA 20 µM). Como control positivo para evaluar autofagia se utilizaron CMN tratadas con rapamicina 500nM durante 8 horas. A) Porcentaje de CMN positivas para CYTO-ID; B) Porcentaje de linfocitos positivos para CYTO-ID; C) Porcentaje de monocitos positivos para CYTO-ID; D) Porcentaje de NK positivas para CYTO-ID; E) Porcentaje de NKT positivas para CYTO-ID. Kruskal Wallis. N=10. \*p<0.05 \*p<0.01

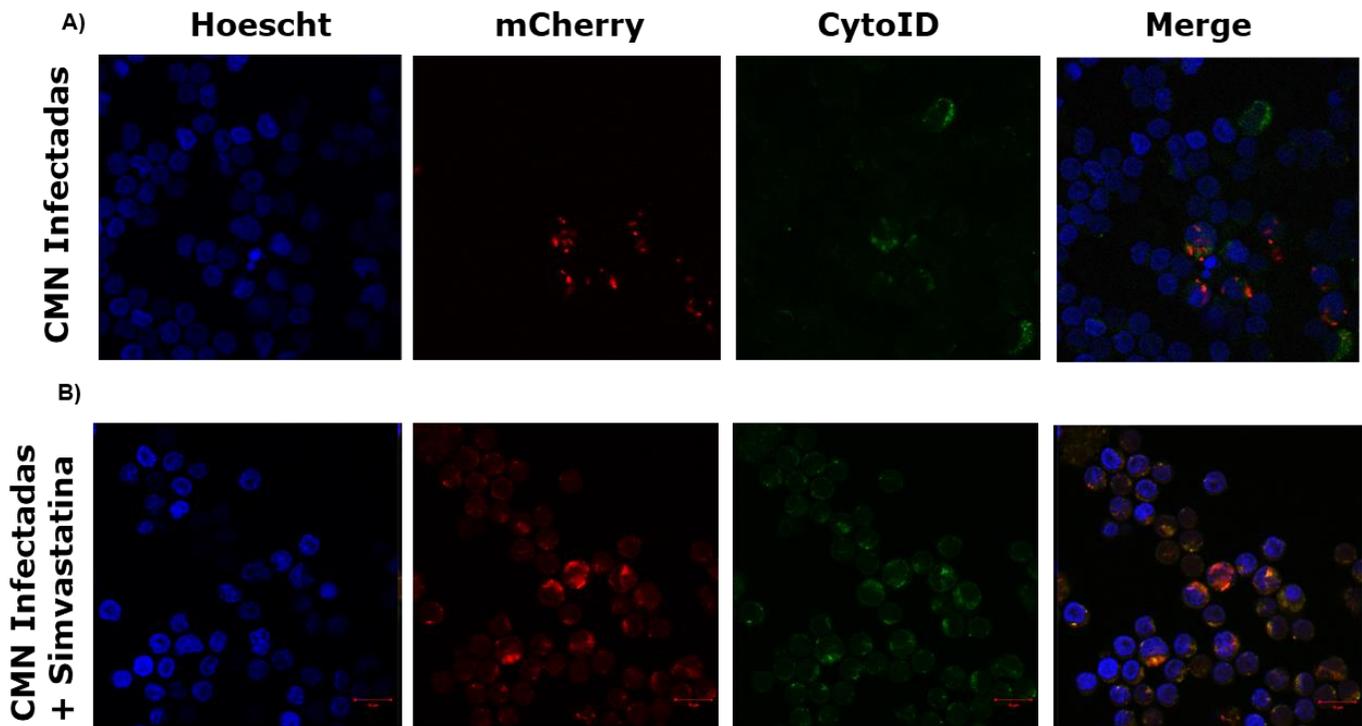


Figura 8

**Figura 8. Inducción de autofagia en células mononucleares de sangre periférica infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv- mCherry y tratadas con simvastatina.** Se sembraron  $2 \times 10^6$  CMN en una placa de 24 pozos en las siguientes condiciones 1. CMN infectadas a una MOI de 1 con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv- mCherry, 2. Células infectadas a una MOI de 1 con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv- mCherry y tratadas con simvastatina ácida  $20 \mu\text{M}$ . Las células fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Las CMN fueron teñidas con Cyto-ID y Hoechst 33342 para la detección de autofagosomas (verde) y para la visualización del núcleo (azul), respectivamente. Las células teñidas fueron analizadas mediante microscopía confocal. A) En las CMN infectadas se observa la micobacteria íntegra dentro de algunas células (rojo) y se observa la inducción de autofagia en algunas células, independientemente de la infección (verde). B) En las CMN infectadas y tratadas con simvastatina se observa la señal roja confinada dentro de los autofagosomas (verde) y pérdida de la integridad de la micobacteria. Barra de escala:  $5 \mu\text{m}$ .

## Bibliografía

1. Russell, D.G., C.E. Barry, 3rd, and J.L. Flynn, *Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us*. Science, 2010. **328**(5980): p. 852-6.
2. WHO, W.H.O., *Global Tuberculosis Report 2018*.
3. Wallis, R.S. and R. Hafner, *Advancing host-directed therapy for tuberculosis*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(4): p. 255-63.
4. Maguire, G.P., et al., *Pulmonary tuberculosis, impaired lung function, disability and quality of life in a high-burden setting*. Int J Tuberc Lung Dis, 2009. **13**(12): p. 1500-6.
5. *Lipid Modification: Cardiovascular Risk Assessment and the Modification of Blood Lipids for the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease*. 2014, London: National Clinical Guideline Centre, 2014.
6. Thomas, G., et al., *Statin therapy in critically-ill patients with severe sepsis: a review and meta-analysis of randomized clinical trials*. Minerva Anestesiol, 2015. **81**(8): p. 921-30.
7. De Loecker, I. and J.-C. Preiser, *Statins in the critically ill*. Annals of Intensive Care, 2012. **2**: p. 19-19.
8. Parihar, S.P., et al., *Statin therapy reduces the mycobacterium tuberculosis burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation*. J Infect Dis, 2014. **209**(5): p. 754-63.
9. Guerra-De-Blas, P.D.C., et al., *Potential Effect of Statins on Mycobacterium tuberculosis Infection*. Journal of Immunology Research, 2018. **2018**: p. 14.
10. Lin, P.L. and J.L. Flynn, *Understanding latent tuberculosis: a moving target*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 15-22.
11. Schlesinger, L.S., S.R. Hull, and T.M. Kaufman, *Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages*. The Journal of Immunology, 1994. **152**(8): p. 4070-4079.
12. Ernst, J.D., *Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1277-81.
13. Armstrong, J.A. and P.D. Hart, *Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival*. The Journal of experimental medicine, 1975. **142**(1): p. 1-16.
14. Pieters, J., *Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance*. Cell Host & Microbe, 2008. **3**(6): p. 399-407.
15. Caron, E. and A. Hall, *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1717-21.
16. Ottenhoff, T.H., *The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2012. **16**(11): p. 1424-32.
17. Etna, M.P., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis*. Semin Immunol, 2014. **26**(6): p. 543-51.
18. Vankayalapati, R., et al., *Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4611-7.
19. Schwander, S. and K. Dheda, *Human lung immunity against Mycobacterium tuberculosis: insights into pathogenesis and protection*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 696-707.

20. Chackerian, A., et al., *Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis*. Infect Immun, 2002. **70**(11): p. 6302-9.
21. Snyder-Cappione, J.E., et al., *Individuals with pulmonary tuberculosis have lower levels of circulating CD1d-restricted NKT cells*. J Infect Dis, 2007. **195**(9): p. 1361-4.
22. Bozzano, F., F. Marras, and A. De Maria, *Immunology of tuberculosis*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2014. **6**(1): p. e2014027.
23. Behar, S.M., et al., *Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(3): p. 279-87.
24. Fratazzi, C., et al., *Programmed cell death of Mycobacterium avium serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4320-7.
25. Klingler, K., et al., *Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes*. Infection and immunity, 1997. **65**(12): p. 5272-5278.
26. Zuniga, J., et al., *Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 193923.
27. Scanga, C.A., et al., *Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 347-58.
28. Bruchfeld, J., M. Correia-Neves, and G. Källenius, *Tuberculosis and HIV Coinfection*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2015. **5**(7): p. a017871-a017871.
29. Cooper, A.M., *Cell-mediated immune responses in tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 393-422.
30. Silva, C.L. and D.B. Lowrie, *Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3269-74.
31. Li, B.H., et al., *Effect of pretreatments on the metal-ceramic bonding strength of a Pd-Ag alloy*. J Dent, 2014. **42**(3): p. 319-28.
32. Meraviglia, S., et al., *gammadelta T cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis infection*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 587315.
33. Rao, M., et al., *B in TB: B Cells as Mediators of Clinically Relevant Immune Responses in Tuberculosis*. Clin Infect Dis, 2015. **61Suppl 3**: p. S225-34.
34. Maglione, P.J. and J. Chan, *How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis*. European journal of immunology, 2009. **39**(3): p. 676-686.
35. Scriba, T.J., A.K. Coussens, and H.A. Fletcher, *Human Immunology of Tuberculosis*. Microbiol Spectr, 2017. **5**(1).
36. O'Garra, A., et al., *The immune response in tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 475-527.
37. Via, L.E., et al., *Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13326-31.
38. Fratti, R.A., et al., *Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 631-44.
39. Davis, A.S., et al., *Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes*. PLoS Pathog, 2007. **3**(12): p. e186.
40. Lee, W.L., et al., *Mycobacterium tuberculosis expresses methionine sulphoxide reductases A and B that protect from killing by nitrite and hypochlorite*. Mol Microbiol, 2009. **71**(3): p. 583-93.

41. Hmama, Z., et al., *Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium tuberculosis is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4882-93.
42. Pecora, N.D., et al., *Mycobacterium bovis BCG decreases MHC-II expression in vivo on murine lung macrophages and dendritic cells during aerosol infection*. Cell Immunol, 2009. **254**(2): p. 94-104.
43. Sreejit, G., et al., *The ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis interacts with beta-2-microglobulin (beta2M) affecting antigen presentation function of macrophage*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004446.
44. Grace, P.S. and J.D. Ernst, *Suboptimal Antigen Presentation Contributes to Virulence of Mycobacterium tuberculosis In Vivo*. J Immunol, 2016. **196**(1): p. 357-64.
45. Singh, C.R., et al., *Processing and presentation of a mycobacterial antigen 85B epitope by murine macrophages is dependent on the phagosomal acquisition of vacuolar proton ATPase and in situ activation of cathepsin D*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3250-9.
46. Hanekom, W.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro*. J Infect Dis, 2003. **188**(2): p. 257-66.
47. Roberts, L.L. and C.M. Robinson, *Mycobacterium tuberculosis infection of human dendritic cells decreases integrin expression, adhesion and migration to chemokines*. Immunology, 2014. **141**(1): p. 39-51.
48. Magallanes-Puebla, A., et al., *Mycobacterial glycolipid Di-O-acyl trehalose promotes a tolerogenic profile in dendritic cells*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0207202.
49. Gagliardi, M.C., et al., *Cell wall-associated alpha-glucan is instrumental for Mycobacterium tuberculosis to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte*. Cell Microbiol, 2007. **9**(8): p. 2081-92.
50. Stenger, S., K.R. Niazi, and R.L. Modlin, *Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3582-8.
51. Mahon, R.N., et al., *Mycobacterium tuberculosis ManLAM inhibits T-cell-receptor signaling by interference with ZAP-70, Lck and LAT phosphorylation*. Cell Immunol, 2012. **275**(1-2): p. 98-105.
52. Sande, O.J., et al., *Mannose-Capped Lipoarabinomannan from Mycobacterium tuberculosis Induces CD4+ T Cell Anergy via GRAIL*. J Immunol, 2016. **196**(2): p. 691-702.
53. Saavedra, R., et al., *Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T-cells*. Microbes Infect, 2006. **8**(2): p. 533-40.
54. Elsaidi, H.R., et al., *Mycobacterial phenolic glycolipids with a simplified lipid aglycone modulate cytokine levels through Toll-like receptor 2*. ChemBiochem, 2013. **14**(16): p. 2153-9.
55. Dao, D.N., et al., *Mycolic acid modification by the mmaA4 gene of M. tuberculosis modulates IL-12 production*. PLoS Pathog, 2008. **4**(6): p. e1000081.
56. Richardson, E.T., et al., *Toll-like receptor 2-dependent extracellular signal-regulated kinase signaling in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages drives anti-inflammatory responses and inhibits Th1 polarization of responding T cells*. Infect Immun, 2015. **83**(6): p. 2242-54.
57. Sly, L.M., et al., *Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 430-7.
58. Chen, M., H. Gan, and H.G. Remold, *A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial*

- inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3707-16.
59. Romagnoli, A., et al., *ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells*. Autophagy, 2012. **8**(9): p. 1357-70.
  60. Abuhammad, A., *Cholesterol metabolism: a potential therapeutic target in Mycobacteria*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(14): p. 2194-2208.
  61. Kim, M.J., et al., *Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(7): p. 258-74.
  62. Soh, A.Z., et al., *Dietary Cholesterol Increases the Risk whereas PUFAs Reduce the Risk of Active Tuberculosis in Singapore Chinese*. J Nutr, 2016. **146**(5): p. 1093-100.
  63. Pandey, A.K. and C.M. Sassetti, *Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4376-80.
  64. Gatfield, J. and J. Pieters, *Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages*. Science, 2000. **288**(5471): p. 1647-50.
  65. Munoz, S., B. Rivas-Santiago, and J.A. Enciso, *Mycobacterium tuberculosis entry into mast cells through cholesterol-rich membrane microdomains*. Scand J Immunol, 2009. **70**(3): p. 256-63.
  66. Fine-Coulson, K., et al., *The role of lipid raft aggregation in the infection of type II pneumocytes by Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45028.
  67. Huynh, K.K., E. Gershenson, and S. Grinstein, *Cholesterol accumulation by macrophages impairs phagosome maturation*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35745-55.
  68. Peyron, P., et al., *Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000204.
  69. Palanisamy, G.S., et al., *Uptake and accumulation of oxidized low-density lipoprotein during Mycobacterium tuberculosis infection in guinea pigs*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34148.
  70. Hennessy, E., et al., *Is There Potential for Repurposing Statins as Novel Antimicrobials?* Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(9): p. 5111-21.
  71. Kwak, B., et al., *Statins as a newly recognized type of immunomodulator*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1399-402.
  72. Montero, M.T., et al., *Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition stimulates caspase-1 activity and Th1-cytokine release in peripheral blood mononuclear cells*. Atherosclerosis, 2000. **153**(2): p. 303-13.
  73. Sutherland, J.S., et al., *High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89**(6): p. 398-404.
  74. Gruenbacher, G., et al., *IL-2 costimulation enables statin-mediated activation of human NK cells, preferentially through a mechanism involving CD56+ dendritic cells*. Cancer Res, 2010. **70**(23): p. 9611-20.
  75. Raemer, P.C., K. Kohl, and C. Watzl, *Statins inhibit NK-cell cytotoxicity by interfering with LFA-1-mediated conjugate formation*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1456-65.
  76. Poggi, A., et al., *Selective role of mevalonate pathway in regulating perforin but not FasL and TNFalpha release in human Natural Killer cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62932.
  77. Nakou, E., et al., *Statin-induced immunomodulation alters peripheral invariant natural killer T-cell prevalence in hyperlipidemic patients*. Cardiovasc Drugs Ther, 2012. **26**(4): p. 293-9.

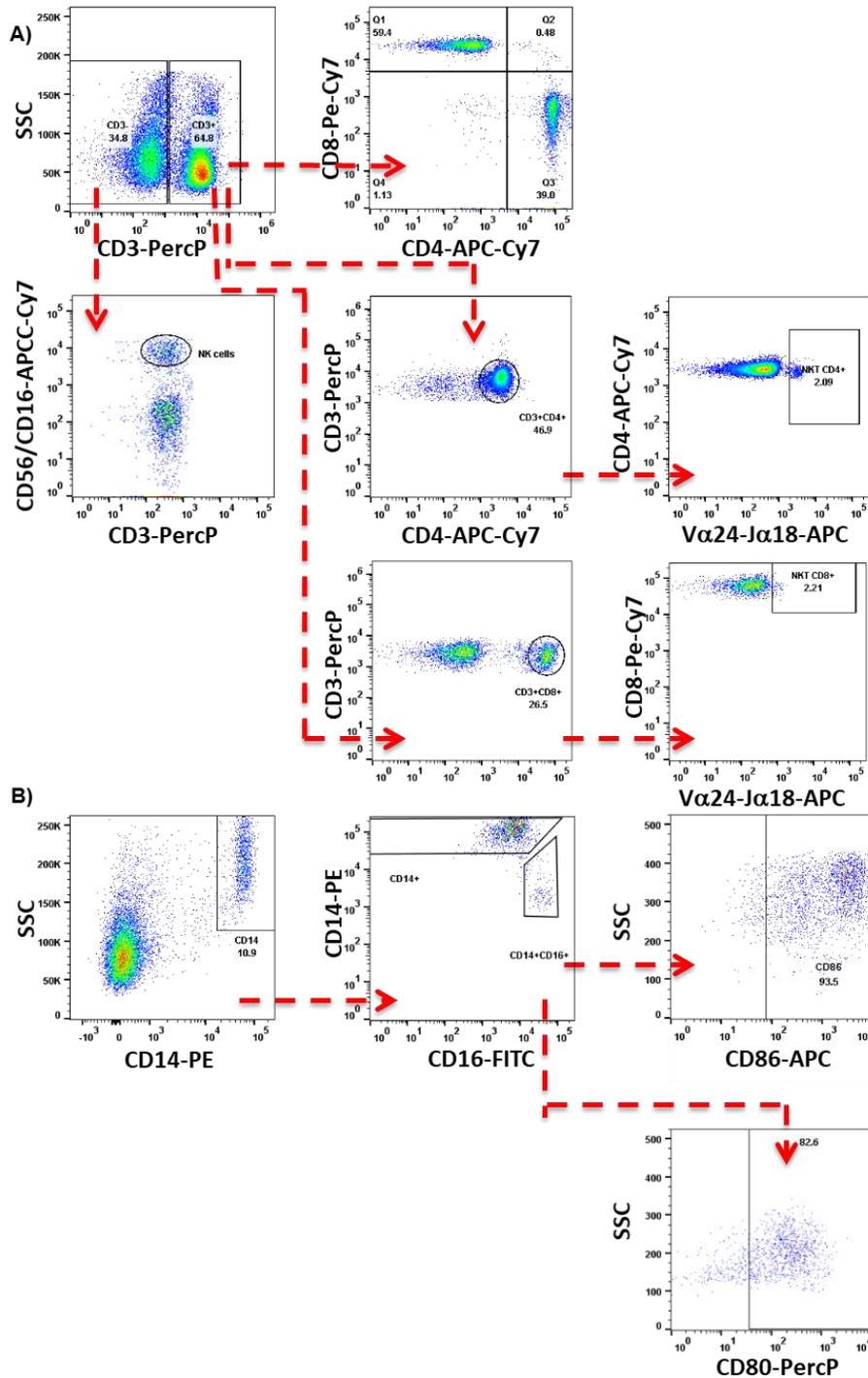
78. Fujiwara, D., et al., *Statins induce apoptosis through inhibition of Ras signaling pathways and enhancement of Bim and p27 expression in human hematopoietic tumor cells*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(10): p. 1010428317734947.
79. Jang, H.J., et al., *Statin induces apoptosis of human colon cancer cells and downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor via proapoptotic ERK activation*. *Oncol Lett*, 2016. **12**(1): p. 250-256.
80. Araki, M., M. Maeda, and K. Motojima, *Hydrophobic statins induce autophagy and cell death in human rhabdomyosarcoma cells by depleting geranylgeranyl diphosphate*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **674**(2-3): p. 95-103.
81. Laezza, C., et al., *Control of Rab5 and Rab7 expression by the isoprenoid pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **248**(3): p. 469-72.
82. Kruger, P., et al., *Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia*. *Intensive Care Med*, 2006. **32**(1): p. 75-9.
83. Wan, Y.D., et al., *Effect of statin therapy on mortality from infection and sepsis: a meta-analysis of randomized and observational studies*. *Crit Care*, 2014. **18**(2): p. R71.
84. Almog, Y., et al., *Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis*. *Circulation*, 2004. **110**(7): p. 880-5.
85. Sun, H.Y. and N. Singh, *Antimicrobial and immunomodulatory attributes of statins: relevance in solid-organ transplant recipients*. *Clin Infect Dis*, 2009. **48**(6): p. 745-55.
86. Erkkila, L., et al., *Effect of simvastatin, an established lipid-lowering drug, on pulmonary Chlamydia pneumoniae infection in mice*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(9): p. 3959-62.
87. Catron, D.M., et al., *Salmonella enterica serovar Typhimurium requires nonsterol precursors of the cholesterol biosynthetic pathway for intracellular proliferation*. *Infect Immun*, 2004. **72**(2): p. 1036-42.
88. Graziano, T.S., et al., *Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against Staphylococcus aureus Biofilm*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0128098.
89. Ye, J., et al., *Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(26): p. 15865-70.
90. Martinez-Gutierrez, M., J.E. Castellanos, and J.C. Gallego-Gomez, *Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly*. *Intervirology*, 2011. **54**(4): p. 202-16.
91. Potena, L., et al., *Hydroxymethyl-glutaryl coenzyme a reductase inhibition limits cytomegalovirus infection in human endothelial cells*. *Circulation*, 2004. **109**(4): p. 532-6.
92. Cohen, J.I., *HMG CoA reductase inhibitors (statins) to treat Epstein-Barr virus-driven lymphoma*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(9): p. 1593-8.
93. del Real, G., et al., *Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity*. *J Exp Med*, 2004. **200**(4): p. 541-7.
94. Liu, G., et al., *Simvastatin inhibits Candida albicans biofilm in vitro*. *Pediatr Res*, 2009. **66**(6): p. 600-4.
95. Westermeyer, C. and I.G. Macreadie, *Simvastatin reduces ergosterol levels, inhibits growth and causes loss of mtDNA in Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*, 2007. **7**(3): p. 436-41.
96. Natesan, S.K., et al., *Fluvastatin potentiates the activity of caspofungin against Aspergillus fumigatus in vitro*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008. **60**(4): p. 369-73.
97. Macreadie, I.G., et al., *Growth inhibition of Candida species and Aspergillus fumigatus by statins*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. **262**(1): p. 9-13.
98. Lu, H.Z. and B.Q. Li, *Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on activation of human gamma delta T cells induced by Mycobacterium tuberculosis antigens*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2009. **31**(3): p. 485-91.

99. Lobato, L.S., et al., *Statins increase rifampin mycobactericidal effect*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(10): p. 5766-74.
100. Skerry, C., et al., *Simvastatin increases the in vivo activity of the first-line tuberculosis regimen*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(9): p. 2453-7.
101. Dutta, N.K., et al., *Statin adjunctive therapy shortens the duration of TB treatment in mice*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(6): p. 1570-7.
102. Rens, C., et al., *Effects of Lipid-Lowering Drugs on Vancomycin Susceptibility of Mycobacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(10): p. 6193-9.
103. Shepard, C.C., L.L. Walker, and R. van Landingham, *Heat stability of Mycobacterium leprae immunogenicity*. Infect Immun, 1978. **22**(1): p. 87-93.
104. Boyum, A., *Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages*. Scand J Immunol, 1976. **Suppl 5**: p. 9-15.
105. Goude, R. and T. Parish, *Electroporation of Mycobacteria*, in *Mycobacteria Protocols: Second Edition*, T. Parish and A.C. Brown, Editors. 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 203-215.
106. Carroll, P., et al., *Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9823.
107. Rossi, J., et al., *Laminar shear stress prevents simvastatin-induced adhesion molecule expression in cytokine activated endothelial cells*. Eur J Pharmacol, 2010. **649**(1-3): p. 268-76.
108. Gordon, R.E., et al., *Statins Synergize with Hedgehog Pathway Inhibitors for Treatment of Medulloblastoma*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(6): p. 1375-1388.
109. Schaefer, W.B., *Studies on the inhibiting effect of carbon dioxide on the growth of two mutant strains of Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 1957. **73**(1): p. 52-5.
110. Wang, J., et al., *[Screening for cytotoxic defects with flow cytometric detection of CD107alpha on natural killer cells and cytotoxic lymphocyte cells]*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2012. **50**(5): p. 386-91.
111. Guo, S., et al., *A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications*. Autophagy, 2015. **11**(3): p. 560-572.
112. Sada-Ovalle, I., et al., *Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria*. PLoS Pathog, 2008. **4**(12): p. e1000239.
113. Arora, M., et al., *Simvastatin promotes Th2-type responses through the induction of the chitinase family member Ym1 in dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7777-82.
114. Atila, Y., et al., *Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **79**(3): p. 529-538.
115. Gruenbacher, G., et al., *CD56+ human blood dendritic cells effectively promote TH1-type gammadelta T-cell responses*. Blood, 2009. **114**(20): p. 4422-31.
116. Burns, E.M., et al., *Short term statin treatment improves survival and differentially regulates macrophage-mediated responses to Staphylococcus aureus*. Curr Pharm Biotechnol, 2013. **14**(2): p. 233-41.
117. Bhatt, K., et al., *B7 costimulation is critical for host control of chronic Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3793-800.

118. Flores-Batista, V.C., et al., *Low expression of antigen-presenting and costimulatory molecules by lung cells from tuberculosis patients*. Braz J Med Biol Res, 2007. **40**(12): p. 1671-9.
119. Krishnan, N., B.D. Robertson, and G. Thwaites, *Pathways of IL-1beta secretion by macrophages infected with clinical Mycobacterium tuberculosis strains*. Tuberculosis (Edinb), 2013. **93**(5): p. 538-47.
120. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
121. Khader, S.A., et al., *Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1805-15.
122. Dao, D.N., et al., *Mycolic Acid Modification by the mmaA4 Gene of M. tuberculosis Modulates IL-12 Production*. PLoS Pathogens, 2008. **4**(6): p. e1000081.
123. Redford, P.S., P.J. Murray, and A. O'Garra, *The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(3): p. 261-70.
124. Kamel, W.A., et al., *Simvastatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells: A Key Role of RhoA-AMPK/p38 MAPK Signaling in Antitumor Activity*. Mol Cancer Ther, 2017. **16**(1): p. 182-192.
125. Orlando, V., et al., *Human CD4 T-Cells With a Naive Phenotype Produce Multiple Cytokines During Mycobacterium Tuberculosis Infection and Correlate With Active Disease*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**: p. 1119.
126. Deretic, V., *Autophagy in tuberculosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(11): p. a018481.
127. Olive, A.J. and C.M. Sassetti, *New TB treatments hiding in plain sight*. EMBO molecular medicine, 2015. **7**(2): p. 125-126.

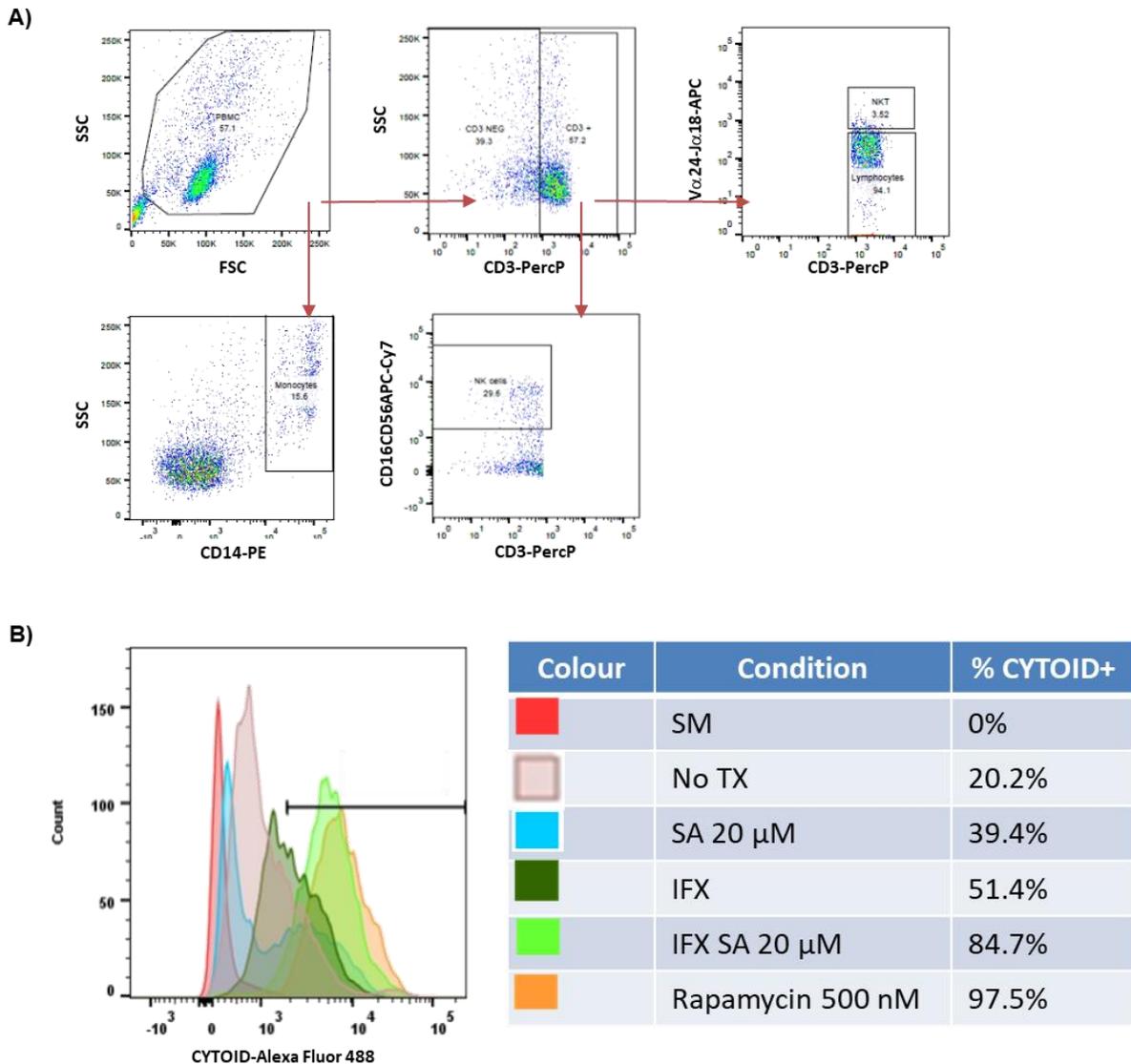
# Anexo I. Figuras Suplementarias

## Figura Suplementaria 1



**Figura Suplementaria 1. Estrategia de marcaje de las CMN mediante citometría de flujo.** Los valores de cohorte se establecieron en base a la estrategia de “fluorescencia menos uno (FMO). A. Estrategia de marcaje para linfocitos T CD4+, T CD8+ T, NK, NKT CD4+ y NKT CD8+. B. Estrategia de marcaje para monocitos CD14+ (clásicos) y monocitos CD14+ CD16+ (no clásicos).

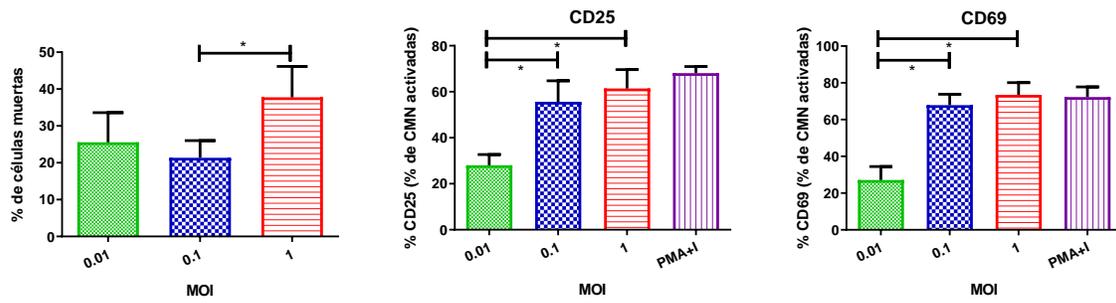
Figura Suplementaria 2



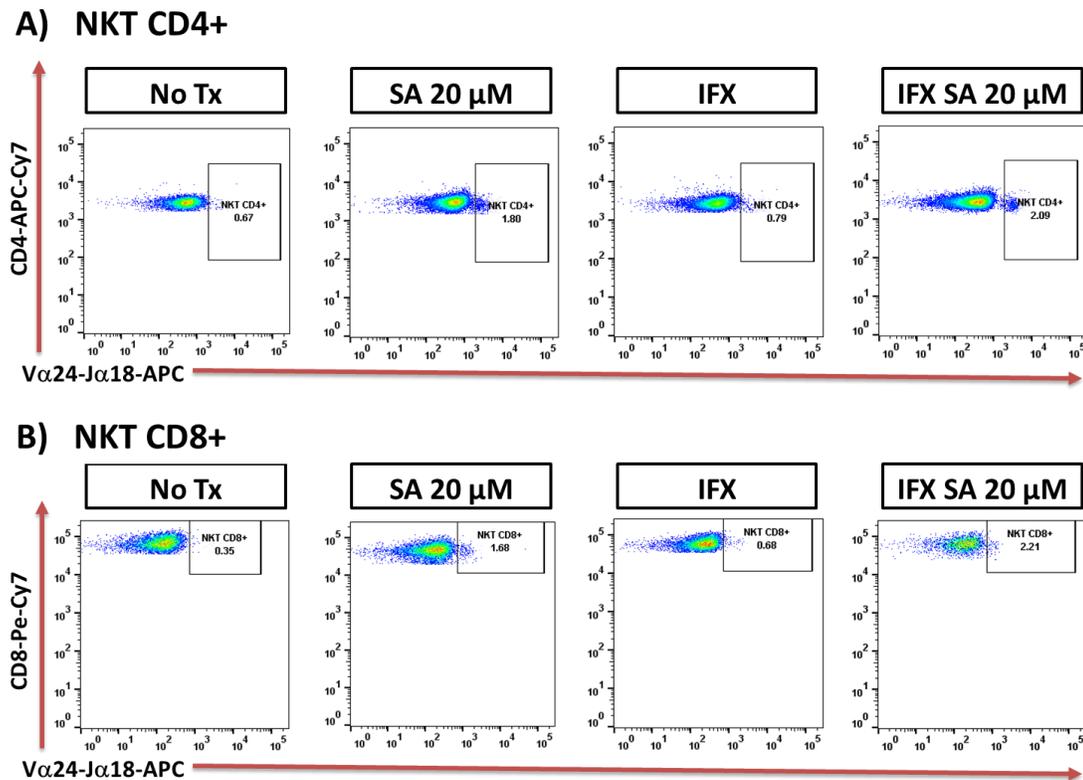
**Figura Suplementaria 2. Estrategia de marcaje de las CMN para la detección de autofagia.** Los valores de cohorte se establecieron en base a la estrategia de “fluorescencia menos uno (FMO). La inducción de autofagia se evaluó en CMN tratadas durante 24 horas con las siguientes condiciones: 1. Simvastatina ácida 20 $\mu$ M (SA20 $\mu$ M), 2. Células no tratadas en las cuales solamente se adicionó el vehículo (PBS, DMSO 0.024% ETOH0.056%), 3. Células infectadas a una MOI de 0.1, 4. Células infectadas a una MOI de 0.1 y tratadas con simvastatina ácida 20  $\mu$ M.

Como control positivo se utilizaron CMN tratadas con rapamicina 500nM durante 8 horas. Se utilizaron CMN sin marcar (SM) como control negativo. A) Estrategia de selección de linfocitos TCD4+, TCD8+, NK, NK y NKT. B) Selección de células CYTO-ID+.

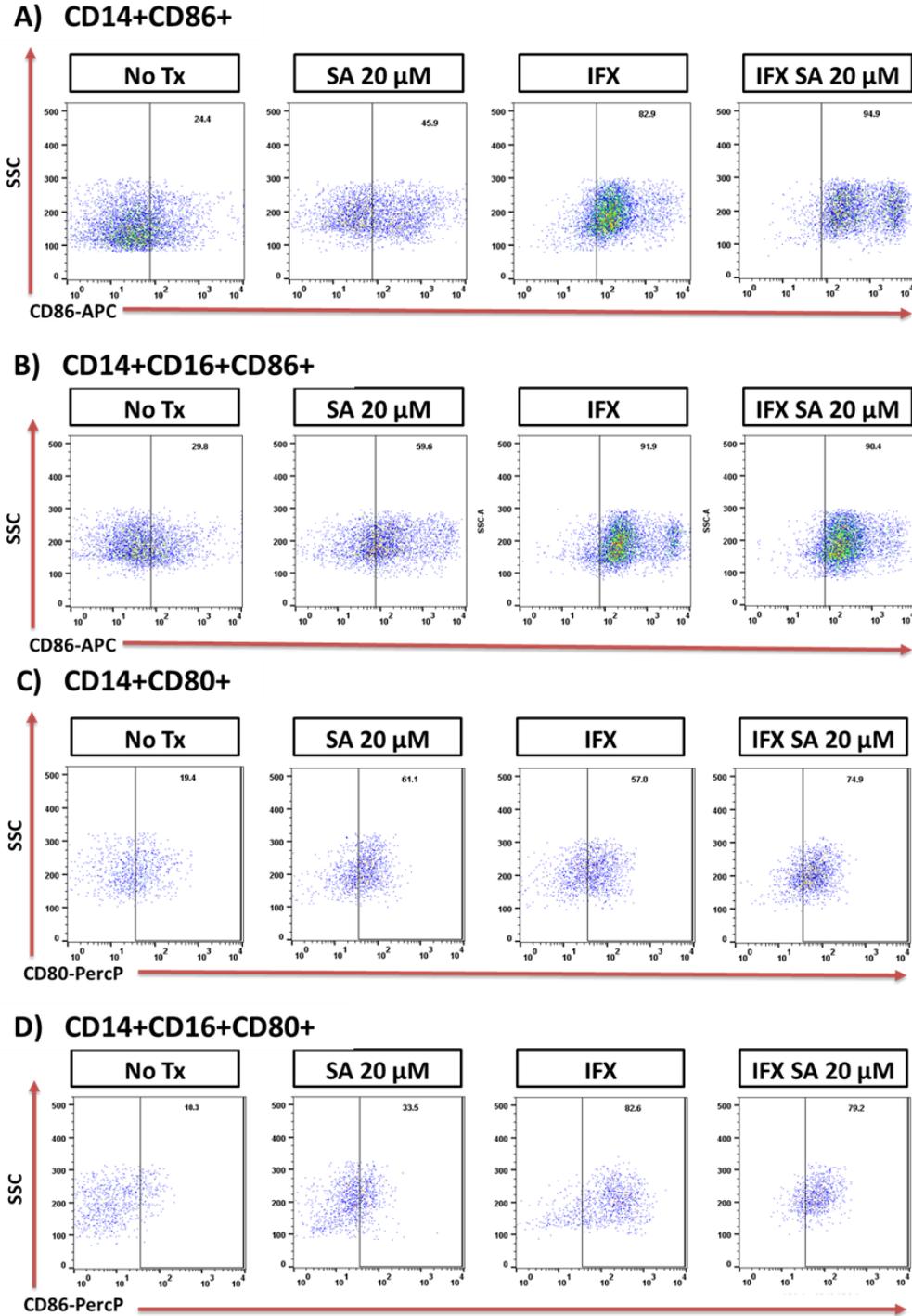
### Figura Suplementaria 3



**Figura Suplementaria 3. Viabilidad celular y estado de activación en CMM infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*.** Se sembraron  $2 \times 10^6$  CMN/mL en una placa de 24 pozos, y fueron infectadas a diferentes MOI (0.01, 0.1 y 1). Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 horas post-infección se evaluó la viabilidad celular usando tinción con azul de tripán. Los porcentajes de expresión de marcadores de activación (CD25 y CD69 se evaluaron mediante citometría de flujo, n=5. (Kruskal-Wallis, \*p < 0.05 \*p < 0.01).

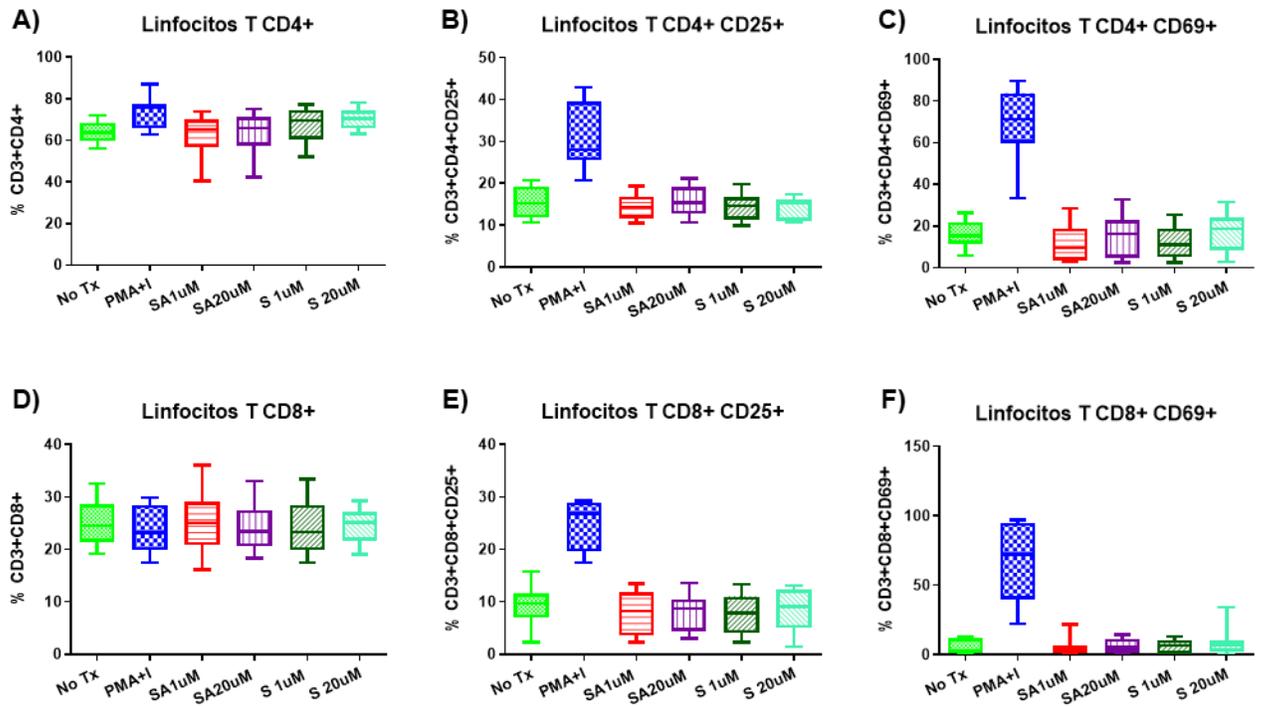


**Figura Suplementaria 4. Efecto de la simvastatina sobre las células NKTs.** Se muestran *dot-blots* representativos del efecto de la simvastatina sobre las NKTs. Los números representan el porcentaje de células NKT CD4+ y NKT CD8+ a partir de CMN incubadas bajo las siguientes condiciones: Simvastatina ácida 20  $\mu$ M (SA20 $\mu$ M), células no tratadas expuestas al vehículo (PBS +0.024% DMSO, 0.056% EtOH) (No Tx), células infectadas a una MOI de 0.1 (IFX; y células infectadas a una MOI de 0.1, tratadas con simvastatina ácida 20  $\mu$ M (IFX SA 20  $\mu$ M).

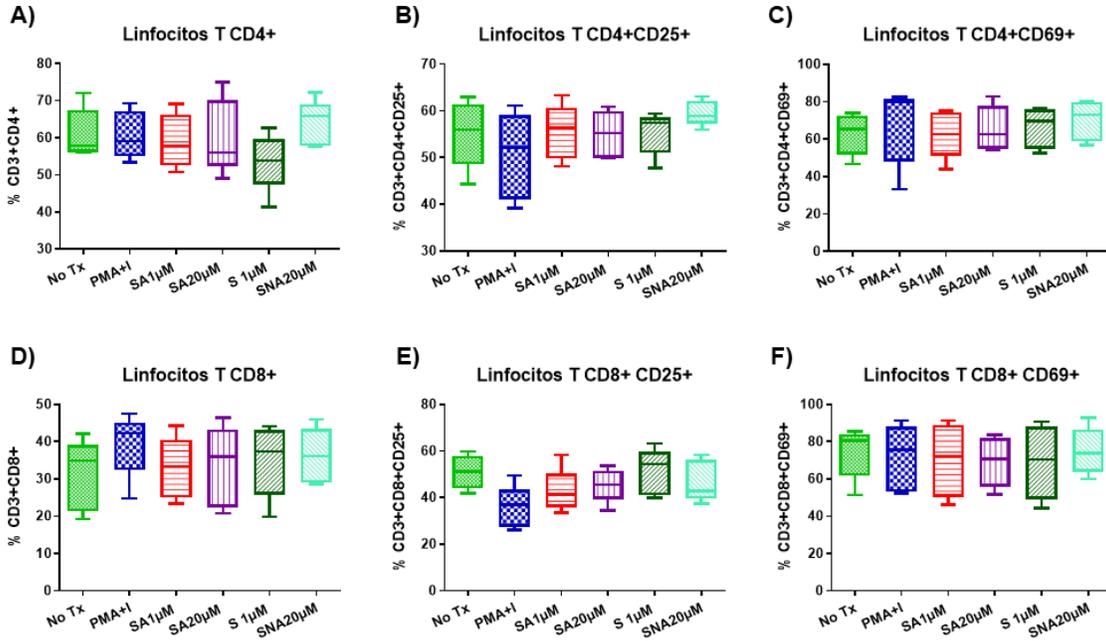


**Figura Suplementaria 5. Efecto de la simvastatina sobre la expresión de moléculas coestimuladoras en monocitos.** Se muestran dot-blots representativos del efecto de la simvastatina sobre la expresión de CD80 y CD86 + a partir de CMN incubadas bajo las siguientes condiciones: Simvastatina ácida 20  $\mu\text{M}$  (SA20 $\mu\text{M}$ ), células no tratadas expuestas al vehículo (PBS +0.024% DMSO, 0.056% EtOH) (No Tx), células infectadas a una MOI de 0.1 (IFX; y células infectadas a una MOI de 0.1, tratadas con simvastatina ácida 20  $\mu\text{M}$  (IFX SA 20  $\mu\text{M}$ ).

Figura Suplementaria 6

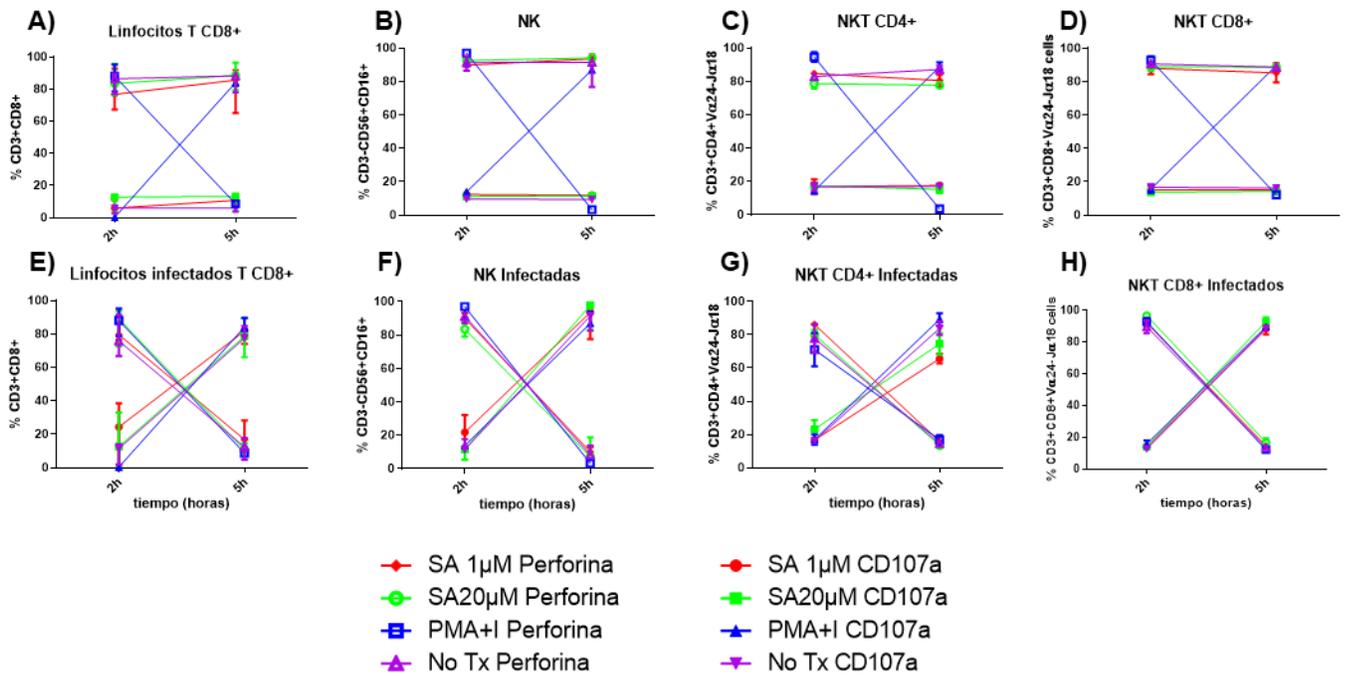


**Figura Suplementaria 6. Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de los linfocitos.** Las CMN fueron incubadas bajo las siguientes condiciones: simvastatina ácida 1 $\mu$ M (SA1 $\mu$ M), simvastatina ácida 20 $\mu$ M (SA20 $\mu$ M), simvastatina 1 $\mu$ M (S1 $\mu$ M), simvastatina 20 $\mu$ M (S20 $\mu$ M). Como controles se utilizaron células no tratadas con simvastatina (No Tx) en las cuales únicamente se adicionó el vehículo (PBS DMSO 0.024% ETOH0.056%) y células tratadas con forbol miristato acetato (PMA 25ng/mL) más ionomicina (I 1 $\mu$ /mL)). A las 24 horas se evaluó el fenotipo de los linfocitos TCD4+ (A) TCD8+ (D) y su efecto sobre los marcadores de activación CD25 (B y E) y CD69 (C y F). Kruskal Wallis. N=10. \*p<0.05 \*p<0.01.



**Figura suplementaria 7. Efecto de la simvastatina sobre el fenotipo de los linfocitos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.** Las CMN fueron incubadas durante 24 horas bajo las siguientes condiciones: simvastatina ácida 1μM (SA1μM), simvastatina ácida 20μM (SA20μM), simvastatina 1μM (S1μM), simvastatina 20μM (S20μM). Como controles se utilizaron células no tratadas con simvastatina (No Tx) en las cuales únicamente se adicionó el vehículo (PBS DMSO 0.024% ETOH0.056%) y células tratadas con forbol miristato acetato (PMA 25ng/mL) más ionomicina (I 1μ/mL). Posteriormente, se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1. A las 24 horas post- infección se evaluó el fenotipo de los linfocitos TCD4+ (A) TCD8+ (D) y su efecto sobre los marcadores de activación CD25 (B y E) y CD69 (C y F). Kruskal Wallis. N=10. \*p<0.05 \*p<0.01.

Figura Suplementaria 8



**Figura Suplementaria 8. Efecto de la simvastatina sobre la degranulación de los linfocitos T, NK y NKT.**

Se evaluó el efecto de la simvastatina sobre la degranulación en células tratadas con: simvastatina acida 1µM (SA1µM), simvastatina acida 20µM (SA20µM), simvastatina 1µM (S1µM), simvastatina 20µM (S20µM), células en las cuales únicamente se adicionó el vehículo (PBS 0.024% DMSO 0.056% ETOH) y células tratadas con forbol miristato acetato más ionomicina (PMA+I). A las 2 y 5 horas (según corresponda) se tomaron alícuotas y se evaluó la degranulación de los linfocitos TCD8+ (A), NK (B), NKT CD4+ (C), NKT CD8+ (D) en células no infectadas. También se evaluó la capacidad de degranulación en células cultivadas bajo las 6 condiciones previas e infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv a una MOI de 0.1. A las 2 y 5 horas post se evaluó la degranulación de los linfocitos TCD8+ (E), NK (F), NKT CD4+ (G), NKT CD8+ (H). Kruskal Wallis. N=5. \*p<0.05 \*p<0.01

## Anexo II. Artículos publicados

Guerra-De-Blas, P.D.C., et al., Potential Effect of Statins on Mycobacterium tuberculosis Infection. Journal of Immunology Research, 2018. 2018: p. 14.

Guerra-De-Blas, P. D. C., et al., "Simvastatin Enhances the Immune Response Against *Mycobacterium tuberculosis*." *Frontiers in Microbiology*, 2019. 10(2097).