



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
RESISTENTE: UN RETO ACTUAL

Autor: Alfredo Maldonado Barrueco

Tutor: María Isabel Rodríguez

Escudero Convocatoria: Junio 2018

Índice

1.	RESUMEN.....	3
2.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
	2.1 Breve reseña histórica.....	3
	2.2 Epidemiología.....	4
	2.3 Descripción del agente patógeno: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
	2.4 Inmunogenicidad: la importancia de los glucoconjugados	6
	2.5 Clínica y sintomatología	7
	2.6 Diagnóstico	8
	2.7 Tratamiento.....	9
	2.7.1 Tuberculosis multirresistente	9
	2.7.2 Tuberculosis en España	10
3	OBJETIVOS	11
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
	5.1 Mecanismo de acción y resistencias a isoniazida.....	12
	5.3 Mecanismo de acción y resistencias a rifamicinas: rifampicina	14
	5.4 Mecanismo de acción y resistencias a pirazinamida.....	15
	5.5 Mecanismo de acción y resistencias a etambutol	16
	5.6 Inhibidores de metaloproteinasas: ¿una opción de futuro?.....	16
	5.6.1 Metaloproteinasas.....	16
	5.5.2 Inhibidores de metaloproteinasas	17
6	CONCLUSIÓN.....	19
7	BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

La tuberculosis representa una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo, suponiendo más del 95% de las muertes totales en países de ingresos medios y bajos. Cabe destacar que el 40% de los fallecimientos por VIH están relacionados con la tuberculosis como factor desencadenante. Estos datos se sostienen debido a la aparición en los últimos años de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes (TB-MDR) o ultrarresistentes (TB-XDR) a los tratamientos de primera línea frente a una epidemia que se espera erradicada en 2030. Debido a la mala utilización de los medicamentos antituberculosos; ya sea por su prescripción incorrecta en casos falsos positivos, su uso inadecuado o la interrupción prematura del tratamiento se ha dado lugar a una creciente aparición de casos de cepas resistentes que pone de manifiesto la necesidad del estudio de estas resistencias así como la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas menos tóxicas. En este contexto los estudios más recientes van orientados a la futura utilización de inhibidores de metaloproteinasas como posibles dianas clínicas con el fin de mejorar los resultados de los tratamientos clásicos así como el tiempo de administración y, con ello, reducir la aparición de resistencias.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Breve reseña histórica

Términos como “tisis”, “consunción” o “plaga” han sido acuñados en el pasado para referirse a una de las enfermedades infecciosas más antiguas: la tuberculosis. Esta enfermedad, causada por una batería de bacterias pertenecientes al denominado “complejo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMTB), fue un paradigma durante la mayor parte de la historia. Dentro de este complejo de bacterias, el agente causal más conocido y considerado el más importante dentro de la tuberculosis humana lo constituye aquel que da nombre al grupo, *Mycobacterium tuberculosis* [1]. No obstante dentro de este grupo se incluyen especies y subespecies con significancia humana y veterinaria como *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium africanum* subtipo 1, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* subsp. *Caprae* comb, nov, y *Mycobacterium bovis* [1].

Históricamente, se han recogido datos sobre la tuberculosis desde la figura de Hipócrates (460-377 a.C), sin embargo, la gran revolución de esta enfermedad mortal se produciría en 1882 bajo la figura de Robert Koch cuando presentó sus estudios a la comunidad científica de la época describiendo el aislamiento, cultivo y tinción del microorganismo causante así como la reproducción de la enfermedad en animales de forma experimental [1].

Posteriormente al renacimiento esta enfermedad quedaría relegada a los sanatorios, donde se agrupaban a los enfermos que presentaban la sintomatología propia de la enfermedad [2].

2.2 Epidemiología

De acuerdo con datos de la OMS recogidos en 2017 la tuberculosis es una de las 10 principales causas de mortalidad a nivel mundial encontrándose en un 95% de los casos en países en vías de desarrollo destacando la mayoría de casos en el continente asiático. Se calcula que, aproximadamente, una cuarta parte de la población mundial presenta tuberculosis pero aún no ha enfermado ni pueden transmitir la infección.

El perfil del paciente más habitual se relaciona con individuos adultos en edad productiva; sin embargo los pacientes inmunodeprimidos, desnutridos, diabéticos o incluso fumadores son más propensos a desarrollar la enfermedad desde un estado latente previo a una forma activa. Dentro de este grupo de pacientes representan especial interés los pacientes VIH positivos los cuales presentan entre 20 y 30 veces más probabilidades de desarrollar tuberculosis activa y por ello una tasa de fallecimiento mucho mayor [3].

2.3 Descripción del agente patógeno: *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo, ligeramente curvado, con un tamaño entre 0,2-0,7 x 1-10 micras (μm) que no presenta cápsula ni esporas. Aunque presenta la estructura propia de microorganismos Gram positivos (+) las micobacterias prácticamente no se tiñen con Gram, por ello se engloban como “Gram positivos atípicos”, pues estos se tiñen con fucsina fenicada alcalina en caliente (*tinción de Ziehl Neelsen*). Esta particularidad las define como microorganismos ácido alcohol resistentes (AAR) lo cual se debe al elevado contenido lipídico de su pared celular [4]. Es un microorganismo inmóvil, aerobio estricto y de crecimiento lento. Es resistente al ácido, a los álcalis y a la

mayoría de desinfectantes. No obstante, se inactiva con formaldehído, glutaraldehído, fenol y etanol al 70%. También es resistente a la desecación y sensible a la luz solar [5].

Mycobacterium tuberculosis presenta una estructura diferente a la gran mayoría de microorganismos Gram positivos pues presenta una pared celular que puede dividirse en tres zonas. Desde el exterior hacia el interior de la bacteria su estructura presentará (Figura 1):

- La zona más externa, que lleva a cabo interacción directa con los distintos elementos que forman la respuesta inmune. La composición será muy variada destacando la presencia de *ácidos micólicos* y *glicolípidos* [6].
- Por debajo, separada por un espacio periplásmico, la composición presenta en su totalidad más de un 60% de contenido en lípidos lo que aporta al microorganismo un entorno hidrófobo idóneo para evitar reacciones de hidrólisis enzimática. Dicho entorno supone, además, una barrera frente a numerosos agentes antimicrobianos convencionales. Además del elevado contenido en lípidos se da un complejo macromolecular formado por *ácidos*, *arabinogalactano* y *peptidoglicano* (mAGP) de entre 70 y 80 carbonos, lo que refuerza el carácter lipófilo de su estructura [6].

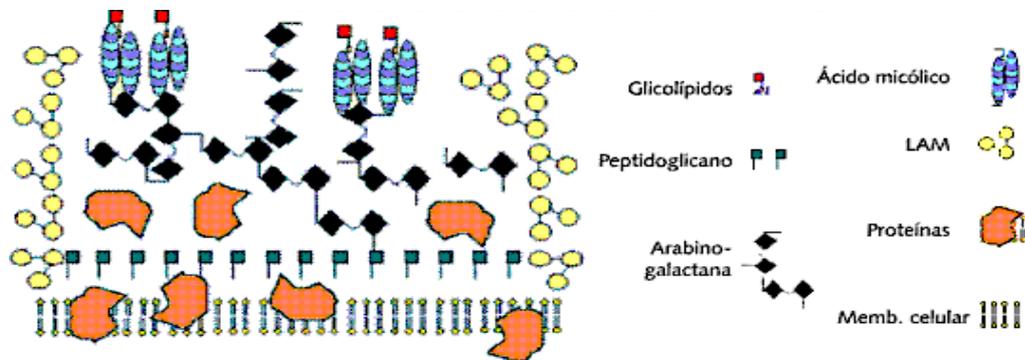


Figura 1. Representación de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

- Por último, y como capa más interna, se da la membrana celular. Aunque las características de dicha membrana son similares a las de cualquier microorganismo Gram positivo cabe destacar que en las micobacterias los derivados de fosfolípidos se presentan altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el *lipoarabinomano*, de especial relevancia en la patogénesis de la tuberculosis [6].

2.4 Inmunogenicidad: la importancia de los glucoconjugados

Para hablar de la inmunogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis* es necesario destacar la presencia de cuatro azúcares: *trehalosa*, *manosa*, *arabinosa* y *galactosa*

Trehalosa

La trehalosa, formada por residuos de α -D-glucopiranosil (1-1)- α -glucopiranosil, constituye un antígeno común en una gran variedad de moléculas y se divide en dos grandes grupos:

- Micolatos de trehalosa: unión de la trehalosa con un ácido micólico. Cuando estos micolatos se encuentran acetilados constituyen el denominado “*factor cuerda*”. Este factor, en condiciones normales, estimula la NADasa en el hospedador lo que provoca la disminución de los niveles de NAD. Al disminuir su nivel, el rendimiento de la cadena respiratoria se ve afectado provocando incluso la muerte mitocondrial. Además, la naturaleza química de estos micolatos está relacionada con el proceso fisiopatológico más común de la tuberculosis, la formación de granulomas [6].
- Sulfolípidos de trehalosa: en este caso los grupos micólicos se encuentran sulfatados. Su principal acción es la actuación como evasinas facilitando a la bacteria la evasión de los macrófagos y, por tanto, impidiendo su destrucción en el interior. Además se unen a los *receptores scavenger* (implicados en procesos de eliminación de compuestos celulares previo marcaje), lo que favorece la entrada de la bacteria a las células del hospedador [6].

Los glucolípidos con trehalosas acetiladas son muy frecuentes en la zona más externa clasificándose en *fenoglicolípidos* (PGL) presentes en las cepas patógenas, *glicopeptidolípidos* (GLP) relacionados con la supervivencia intracelular y *lipooligosacáridos* (LOS) con variaciones que presentan valor taxonómico [6].

Arabinosa y galactosa

El disacárido arabinogalactano (AG) es un antígeno frecuente en distintas moléculas de bacterias relacionadas taxonómicamente. Este disacárido es necesario para la formación del peptidoglucano (PG) de la pared bacteriana siendo altamente inmunogénico

y de especial interés para evitar la lisis del microorganismo. El peptidoglucano está constituido por un polímero de aminoazúcares de N-acetil-glucosamina (GLcNac) unidos a residuos de ácido murámico (N-Ac-Mur). A su vez, este polímero se encuentra unido a un tetrapéptido que se repite, Ala-Glu-PM-Ala, y a moléculas de ácido micólico, dando lugar al complejo mAG. Para su biosíntesis estarán implicadas más de trece enzimas autorreguladas siendo importantes para el estudio de nuevos fármacos [6].

2.5 Clínica y sintomatología

La forma, casi exclusiva, de transmisión de la enfermedad es la vía aérea. Sin embargo, esta no es la única pues puede darse por vía cutánea, congénita o por inoculación. El proceso habitual comienza cuando el bacilo es expulsado por las secreciones respiratorias de un paciente infectado hasta un paciente sano [7]. Estadísticamente se comprobó en estudios que las microgotas que son capaces de llegar a los alveólos pulmonares pueden vehiculizar hasta 5 bacilos, suficientes para desarrollar la enfermedad [8]. Tras la infección comenzará un proceso inflamatorio por parte de los macrófagos; no obstante aproximadamente un 30% de los bacilos sobrevivirán a la acción del sistema inmune y comenzarán a multiplicarse en los ganglios linfáticos torácicos produciéndose linfadenitis. El resultado de este proceso inflamatorio es una necrosis tisular propia y única de la tuberculosis a nivel pulmonar que recibe el nombre de *foco de Ghon* o *chancro de inoculación primario de Ghon*. A la combinación del complejo de Ghon y la linfadenitis se la denomina como *complejo de Ranke* [9].

La evolución frecuente en el 95% de los casos de las lesiones pulmonares es la fibrosis y la calcificación del chancro manteniéndose los bacilos en el interior de las lesiones pulmonares y originando el estado patológico que se denomina como *tuberculosis pulmonar primaria*. No obstante en el 5% restante de los casos existe una reactivación de la enfermedad dando lugar a una forma de tuberculosis que se denomina como *tuberculosis pulmonar posprimaria* o *de reactivación*. En algunos casos, además, se producirá la formación del denominado *tuberculoma* o *granuloma* siendo este una lesión fibrosa de varios centímetros originada en casos de tuberculosis primaria en los que el foco inicial no se ha resuelto y existe riesgo de reactivación como es el caso de situaciones de inmunodepresión por enfermedades subyacentes como el VIH [10].

Respecto a la sintomatología la tos es el síntoma más frecuente y característico en los

pacientes con tuberculosis. Sin embargo, no es un síntoma patognomónico de la enfermedad. En un primer estadio esta tos suele ser una tos seca, sin esputo, que evoluciona hacia una tos productiva, mucosa e incluso con hemoptisis. Además serán frecuentes la fiebre, los sudores nocturnos o la pérdida de peso acusada. A pesar de ello no existe ningún síntoma propio y claramente diferenciador de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* [10].

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico más simple y rápido se produce con la denominada *prueba de la tuberculina* o *prueba de Mantoux* (TST) consistente en la inyección intradérmica en la zona del antebrazo de 0,1 mL del derivado proteico purificado de la tuberculina de *Mycobacterium tuberculosis* [11]. Entre 48 y 72 horas más tarde se medirá la induración formada. En función de múltiples parámetros; como si existe una vacunación previa, la presencia de enfermedades concomitantes como el VIH o bien si se trata de una primoinfección, el diámetro del halo formando será diferente (de 5 a 15 milímetros) y con ello diferenciable entre pacientes para determinar si son “positivos” o “negativos”. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad y especificidad de la prueba, hoy en día siempre debe realizarse una confirmación microbiológica o histopatológica [12].

Para ello el principal método es la tinción del esputo. La muestra se recomienda que sea recogida por la mañana y durante un mínimo de tres días consecutivos hasta seis ya que un esputo de forma aislada presenta una rentabilidad baja para el diagnóstico. En caso de que los pacientes no expectoren existe la posibilidad de obtener la muestra por broncoscopia, aspirado gástrico, o incluso por biopsia. En el caso de la presencia de tuberculomas además será útil la utilización de la punción-aspiración transtorácica [12].

Desde 2010 la OMS recomienda el uso de la prueba rápida Xpert MTB/RIF®; a través de esta es posible la detección en un plazo máximo de 2 horas la presencia de tuberculosis así como la resistencia a *rifampicina* siendo además este el único método útil y fiable para el diagnóstico de la tuberculosis pediátrica [3,13].

2.7 Tratamiento

De acuerdo con las recomendaciones de la OMS el tratamiento de primera línea resulta del grupo terapéutico J04AM correspondiente a la combinación de *rifampicina*, *isoniazida*, *pirazinamida* y *etambutol* [3]. De la combinación, los dos principales representantes utilizados serán la *isoniazida* y la *rifampicina*. Desde la OMS se recomienda la combinación de *isoniazida*, *rifampicina* y *pirazinamida* durante un periodo de tiempo de 2 meses, siempre seguida de la combinación de *isoniazida* y *rifampicina* durante 4 meses más. La introducción de *etambutol* únicamente se reservará para casos en los que se de resistencia a alguno de los tres fármacos anteriores [14].

En los casos que se producen en España la resistencia no es común y por tanto no sería necesario la utilización de *etambutol*, sin embargo en los últimos años la creciente población inmigrante ha provocado un incremento de la necesidad de utilización de un cuarto fármaco en el tratamiento de primera línea [14,17].

En caso de resistencia a tratamientos clásicos se utilizan los denominados fármacos de segunda línea que no presentan tanta especificidad frente a *Mycobacterium* tales como el *p-aminosalicilato (PAS)*, *kinamicina*, *amikacina*, *fluorquinolonas*, *capreomicina*, *etionamida* o *ciloserina*. No obstante este tipo de fármacos son limitados por su elevado precio y requieren quimioterapia durante un periodo de tiempo de hasta dos años que implica, además, un elevado riesgo de toxicidad para el paciente prestando especial complicación en las funciones hepáticas [14].

En los últimos años han aparecido otros fármacos de nueva creación como son derivados de la *rifampicina* (*rifapentina*, *rifabutina*), *bedaquilina*, *delamanida*, o *petromanida* cuya acción es mucho más eficiente y específica [15]. Sin embargo, estos no son empleados en países en vías de desarrollo.

2.7.1 Tuberculosis multirresistente

Los fármacos antituberculosos son utilizados desde hace décadas. Es por ello que en todos los países se han dado casos de cepas de *Mycobacterium* resistentes a alguno de los cuatro fármacos de primera línea ya comentados. El motivo de estas resistencias se debe a la utilización innecesaria ante casos falsos positivos (normalmente relacionados con un diagnóstico único a través de la prueba de la tuberculina), la interrupción prematura del

tratamiento, el uso de formulaciones ineficaces (utilización de un único medicamento en lugar de las combinaciones necesarias) o bien por el uso de medicamentos alterados (por ejemplo, durante las condiciones de almacenamiento) [3]. En los últimos años se ha implementado el sistema DOTS, consistente en proporcionar tratamiento individualizado y el control del correcto tratamiento principalmente en países en vías de desarrollo [3]. Dentro de las cepas resistentes, de especial interés actual, se dan dos posibles casos [16]:

- Tuberculosis multirresistente (TB-MDR, *Multi Drug Resistant*): referida a cepas que no responden al tratamiento con *isoniazida* y *rifampicina*. El tratamiento habitual en estos casos se dará con fármacos de segunda línea bajo un régimen normalizado de corta duración. En 2016 se estimaron 600.00 casos de resistencia a rifampicina de los cuales 490.000 casos presentaban TB-MDR [16].
- Tuberculosis ultrarresistente (TB-XDR, *Extensive Drug Resistant*): referida a cepas que no responden a los medicamentos de segunda línea. Representa la forma más grave de tuberculosis lo que deja a muchos pacientes sin opciones de tratamiento [16].

2.7.2 Tuberculosis en España

Los últimos datos de tuberculosis recogidos por el *Centro Nacional de Epidemiología Instituto Carlos III* en España datan del año 2014. A través de estos se pone de manifiesto como en el año 2014 se notificaron 5.018 casos de tuberculosis en España de los cuales 3.933 correspondieron a tuberculosis respiratorias representando un 85,7% casos nuevos. Sin embargo, a lo largo de los años se ha dado una evolución claramente negativa en todas las categorías de las tuberculosis con un descenso respecto

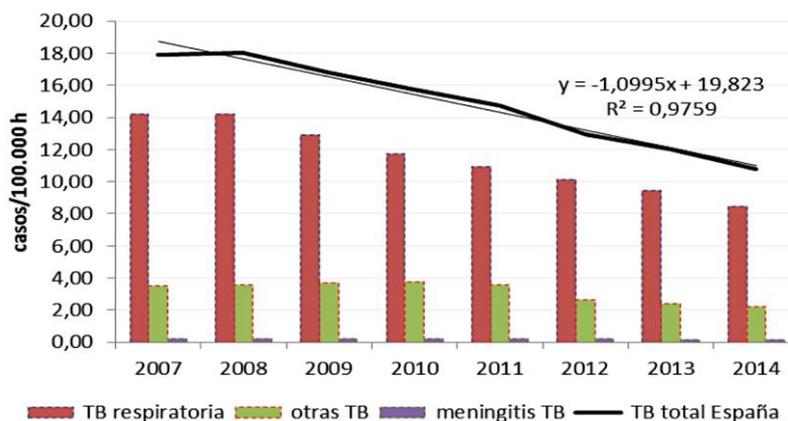


Figura 2. Evolución de las tasas de incidencia de tuberculosis en España entre 2007-2014

a 2013 del 10,5% (Figura 2). De entre todas las comunidades autónomas destacan Ceuta y Melilla por su localización dentro del territorio africano [17].

Es importante destacar el número de casos en niños siendo de 299 en menores de 15 años con una incidencia de *meningitis tuberculosa* mucho mayor en el caso del rango de edad 0-4 años. Sin embargo, en muchos casos el origen de procedencia de los padres correspondía a zonas inmigrantes como la región de Marruecos. Del mismo modo se ha observado una disminución en el caso de enfermos concomitantes de tuberculosis y VIH representando 237 casos en el año 2014. Podemos determinar por tanto que el objetivo de la OMS por el cual se pretende acabar con la epidemia de la tuberculosis en 2030 está siendo tratado adecuadamente en el territorio español [17].

Respecto a las cepas resistentes, de todos los casos positivos, treinta y cinco casos resultaron ser cepas multirresistentes (TB-MDR) y de estas treinta cinco, únicamente dos, se consideraron cepas ultrarresistentes (TB-XDR) [17].

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en realizar una revisión bibliográfica sistemática que permita conocer y exponer los distintos mecanismos de acción de los principales fármacos de primera línea frente al tratamiento de la tuberculosis primaria haciendo especial hincapié en las bases moleculares de las resistencias más habituales que se desarrollan como consecuencia de su mal uso.

El repunte de una enfermedad condenada, inicialmente, a desaparecer junto con el incremento del número de casos de tuberculosis multirresistente pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas además del ya conocido uso de los antibióticos con el fin de mejorar la antibioterapia de primera línea y evitar la utilización de tratamientos que presentan una mayor toxicidad.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada consistió en la recopilación de datos de diversos artículos procedentes de distintas fuentes como *Pubmed*, *Google académico*, *ScienceDirect*, u *OMS web site* así como de manuales pertenecientes a la biblioteca de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Las palabras claves para realizar esta búsqueda han

sido: “tuberculosis, mycobacterium, metalloproteinase inhibitors, rifampicin, e isoniazid”. Los artículos consultados han sido publicados en la última década (a excepción de los referidos a los antecedentes). El propósito es mostrar una visión actualizada de los avances conseguidos para mejorar el tratamiento de primera línea.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las metas de la OMS incluidas en los *Objetivos del Desarrollo Sostenible* adoptados en 2015 consiste en acabar para 2030 con la epidemia de tuberculosis todavía presente a día de hoy [3]. De especial interés son los casos de tuberculosis multirresistente, TB-MDR, y ultrarresistente, TB-XDR. Actualmente diez fármacos han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la tuberculosis los cuales van dirigidos a dos dianas principales: inhibición de la síntesis de la pared e inhibición de la síntesis de RNA polimerasa en micobacterias.

5.1 Mecanismo de acción y resistencias a isoniazida

La isoniazida (INH) pertenece al grupo de fármacos inhibidores de la síntesis de ácidos micólicos de *Mycobacterium*, estructura esencial para la integridad de la membrana. Dicho fármaco resulta especialmente útil en los estadios iniciales de la infección ejerciendo una acción bactericida; sin embargo esta acción se reduce mucho durante la fase latente de la infección [18]. La isoniazida como tal no presenta ninguna acción farmacológica, pues se trata de un profármaco, evitando de este modo una mayor toxicidad en el paciente. La isoniazida ejerce dos acciones frente a *Mycobacterium*. Una vez introducida en la célula por difusión pasiva se produce su activación por parte de una

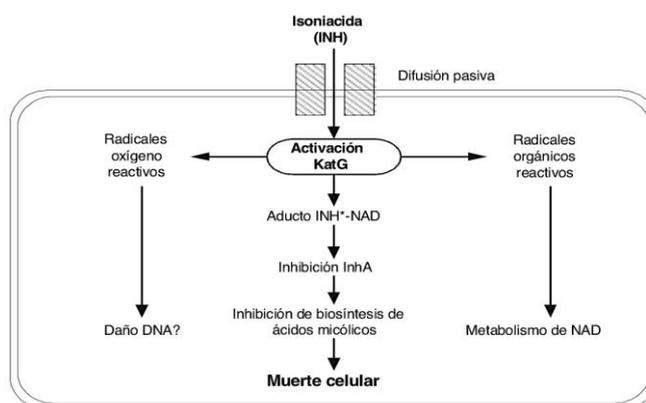


Figura 3. Mecanismos de acción de la isoniazida (INH)

enzima propia de *Mycobacterium*, la *KatG catalasa-peroxidasa*, generando el denominado radical isonicotínico (*Figura 3*).

Dicho radical presentará capacidad para unirse a una molécula de NAD covalentemente formando un aducto. Este aducto es capaz de inhibir una enzima concreta, la *FASSI enoil-ACP reductasa* (*InhA*), implicada en la síntesis de ácidos micólicos, lo que provoca la acumulación de ácidos grasos de cadena larga impidiendo la síntesis de la pared celular de *Mycobacterium* y, con ello, su muerte celular [19] (*Figura 3*).

Además, de forma secundaria, el radical isonicotínico originará la formación de los denominados intermedios reactivos de oxígeno (ROS) tales como *peróxido* o *superóxido* generando daños a nivel de los lípidos, proteínas o del DNA potenciando, junto con su principal mecanismo, la acción bactericida de la isoniazida [20].

La resistencia a isoniazida puede producirse a través de distintos mecanismos. El mecanismo más común se debe a mutaciones concretas que alteran la función final de diferentes proteínas [21]:

- **KatG**: enzima responsable de la bioactivación de la isoniazida. Es una proteína compuesta por 740 aminoácidos. Las principales mutaciones se concentran en una región que va del codón 300 al 507 siendo las más frecuentes las sustituciones de Ser 315 por Thr y Arg 463 por Leu. Representa el 42-58% de los casos clínicos de resistencia siendo por tanto la mutación más común [23].
- **Gen inhA**: gen responsable de la biosíntesis de ácidos micólicos. Esta resistencia se debe a la sustitución en la posición 94 de Ser por la Ala. Representa el 25% de los casos de resistencia clínica [21].

Ambas mutaciones representan prácticamente el 80% de los casos de resistencia a isoniazida pues afectan directamente al mecanismo principal del fármaco. No obstante, existen otros tres genes relaciones con la resistencia pero de menor interés pues su función afectará a la capacidad de detoxificación de los diferentes ROS.

- **Gen oxyR**: gen responsable de la respuesta al estrés oxidativo en *Mycobacterium*. Codifica para proteínas implicadas en la protección frente a ROS. Su inactivación

se produce de forma natural debido a múltiples alteraciones genéticas como cambios, mutaciones puntuales y deleciones [21].

- **Gen *ahpC***: codifica para la enzima *alkil hidroperoxidasa tipo C*, capaz de detoxificar peróxidos orgánicos. Presenta importancia en niveles posteriores de infección. La mutación de este gen se produce a nivel de la región promotora [22].
- **Gen *fur***: gen regulador de la captación de hierro implicado en la detoxificación de radicales de oxígeno [22].

5.3 Mecanismo de acción y resistencias a rifamicinas: *Rifampicina*

Actualmente la FDA mantiene aprobados cuatro fármacos que se engloban dentro de la categoría de las rifamicinas: *rifampicina*, *rifabutina*, *rifapentina* y *rifaximina*.

Entre los cuatro fármacos se dan únicamente pequeñas variaciones estructurales siendo el principal representante del tratamiento de la tuberculosis la *rifampicina B*. La *rifapentina* se caracterizará principalmente por tener una mayor potencia acortado los periodos de tratamiento y la *rifabutina* por presentar un menor número de interacciones con otros fármacos, lo que es de especial interés en el caso de los pacientes con VIH donde se combinan otros antirretrovirales [24].

La principal ventaja que presenta este grupo de fármacos respecto a la isoniazida es su capacidad para actuar frente a la población de *Mycobacterium* que se encuentra en estado latente en las células del huésped. Por ello, tal y como se ha comentado, los protocolos recogen la combinación necesaria de ambos fármacos como tratamiento inicial y de primera línea [24].

Este grupo de fármacos son inhibidores de la *RNA polimerasa bacteriana*, constituida por cuatro subunidades codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, de forma que se unen de forma específica a la subunidad beta de dicha enzima codificada por *rpoB*. De este modo se impide el proceso de transcripción desde el DNA celular al RNA mensajero. Al no poderse codificar las proteínas bacterianas necesarias, la bacteria muere. Al tratarse inhibidores específicos de la RNA polimerasa bacteriana no se produce afectación sobre la polimerasa de células humanas, lo que presenta una clara ventaja frente a la toxicidad.

La principal resistencia se producirá en el caso de la *rifampicina*. Dentro del gen *rpoB* se dan seis regiones altamente conservadas en las cuales se han encontrado la mayoría de las mutaciones (deleciones, inserciones y sustituciones).

Estas mutaciones se han encontrado concentradas en una pequeña región del gen *rpoB*, concretamente en un segmento que incluye los codones 507-533 [24]. Las mutaciones más frecuentes se dan en los codones para Asp 516, His 526 y Ser 531[24].

5.4 Mecanismo de acción y resistencias a pirazinamida

Al igual que la isoniazida, la pirazinamida (PZA) es un inhibidor de la síntesis de la pared de micobacterias. Su uso es especialmente importante al inicio del tratamiento por su actividad concreta frente a bacterias persistentes en los estadios iniciales. Al igual que la isoniazida, requiere un proceso de bioactivación pues se trata de un profármaco [25].

Una vez el fármaco no ionizado se ha introducido en la célula por difusión pasiva se produce su activación por una enzima concreta, la *pirazinamidasa*, codificada por el gen *pncA*. Dicha encima, dará lugar al ácido pirazinoico. Este ácido, en su forma ionizada, saldrá hacia el exterior a través de canales; sin embargo siempre que el medio externo sea ácido (lo que es complejo en los estadios más tempranos de la infección) se producirá su protonación y volverá a introducirse en la célula por difusión pasiva. De nuevo en el interior el fármaco será desprotonado de forma que se crea un ambiente ácido en el interior celular (Figura 4). Como consecuencia de la acidificación del medio, se producirá una inhibición de las funciones vitales bacterianas.

Además, al producirse un fallo en el equilibrio ácido/base la carga en las membranas se verá alterada provocando una alteración de la síntesis de proteínas y RNA [25].

La resistencia a pirazinamida se debe a interrupciones en el gen *pncA*, el cual da lugar a la pirazinamidasa de forma que la activación del antibiótico se vería afectada. Entre las más importantes se han observado sustituciones como Cys63 por Prol, Gln138 por Prol y Asp 63 por His. Además se ha observado delección de un nucleótido de guanina en posiciones 162 y 288 [21].

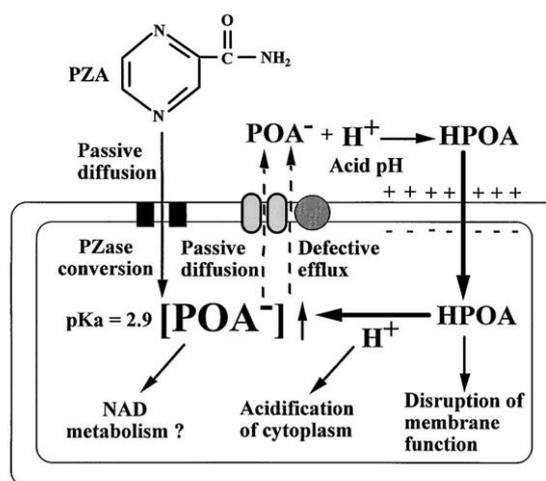


Figura 4. Mecanismo de acción de la pirazinamida (PZA)

5.5 Mecanismo de acción y resistencias a etambutol

Representa el último fármaco dentro del tratamiento de primera línea. Habitualmente sólo es utilizado en caso de que la combinación de los fármacos anteriores no de lugar a resultados positivos como consecuencia de la aparición de alguna de las resistencias explicadas. Presenta una acción bacteriostática. Aunque también inhibe la síntesis de la pared, en este caso la acción se produce sobre la *arabinosil transferasa*, enzima que está implicada en la síntesis del complejo mucolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) llevando a cabo la polimerización de la arabinosa en el arabinogalactano [26].

La resistencia a etambutol está directamente relacionada con el *operón emcCAB*, que incluye tres genes codificantes para arabinosiltransferasas. La mayoría de las alteraciones se han encontrado en el codón 306 con sustituciones de Met por Val. Sin embargo, también se han encontrado sustituciones de Phe por Val en posición 330 o de Thr por Ile en posición 630 [21].

5.6 Inhibidores de metaloproteinasas: ¿una opción de futuro?

Como ya se ha comentado, en el tratamiento de primera línea es frecuente la aparición de resistencias, especialmente frente a *rifampicina* e *isoniazida*. La combinación implica tratamientos largos, de 6 a 9 meses, lo que provoca una elevada falta de adherencia al tratamiento [3]. Hoy en día existen tratamientos de segunda línea principalmente para el caso de tuberculosis multirresistente. Sin embargo, recientes estudios publicados ponen de manifiesto la posibilidad de mejorar el tratamiento de primera línea mediante la utilización de *inhibidores de metaloproteinasas*. Las metaloproteinasas desempeñan numerosas funciones en procesos fisiológicos que implican remodelación y mantenimiento tisular; no obstante, en el caso del tratamiento de la tuberculosis, su función principal a estudiar es la degradación de la matriz extracelular (MEC), es decir, el conjunto de proteínas que permiten la adhesión celular [27].

5.6.1 Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas (MMPs) son enzimas presentes en múltiples tejidos. Pertenecen a la superfamilia de las metzincinas, puesto que en el dominio catalítico se da la presencia de un átomo de zinc. Se caracterizan porque dependen de Ca^{2+} , actúan a pH neutro, se

sintetizan como zimógenos (precursor enzimático no activo) y se almacenan en gránulos de macrófagos y neutrófilos [28].

Estas enzimas se pueden encontrar de dos formas: bien se presentan asociadas a la membrana plasmática constituyendo una proteína transmembrana con 17 dominios y un péptido señal en la zona N-terminal necesario para su desplazamiento desde el núcleo hasta la membrana o bien de forma soluble [28] (Figura 5).

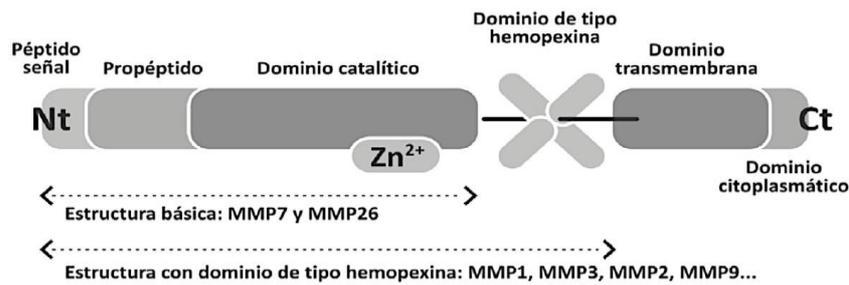


Figura 5. Estructura básica de las metaloproteinasas

En el ser humano se han descrito 24 MMPs diferentes las cuales se clasifican en distintos grupos. De todas ellas, el grupo de las metaloproteinasas que engloban las MMPs 2 y 9 son el subgrupo de las denominadas *gelatinasas*, específicas por degradar colágeno tipo IV (colágeno desnaturalizado). Bajo condiciones fisiológicas la actividad de las MMPs es regulada a nivel transcripcional por zimógenos o por inhibidores endógenos llamados inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs), de los que se han descrito únicamente cuatro en humanos [27,28].

El centro de la infección en el caso de *Mycobacterium* se da a nivel del granuloma pulmonar tal y como se ha expuesto. Este granuloma, en su curso normal, experimentará a lo largo de la infección modificaciones del tejido que permitan su expansión con alteraciones en la matriz extracelular y procesos de angiogénesis para aportar nutrientes y oxígeno al nuevo desarrollo. En todos estos procesos de remodelación y mantenimiento tisular están implicadas las metaloproteinasas [27].

5.5.2 Inhibidores de metaloproteinasas

Desde el año 2000 se ha dado lugar a publicaciones que abordan la participación de las inhibidores de metaloproteinasas asociadas al tratamiento de la tuberculosis, sin embargo, estas publicaciones presentaban resultados discordantes [29]. El estudio de *Hernandez-Pando* [30] concluía que la utilización de estos inhibidores mostraban un

incremento de la respuesta inmunitaria Th2 (respuesta antiinflamatoria) así como una formación tardía de granulomas a nivel pulmonar en modelos animales; por el contrario estudios como el de Izzo [31] concluían que la utilización de estos inhibidores daba lugar a un incremento de la deposición de colágeno y con ello se promovía la formación de granulomas en etapas tempranas de la infección (lo que contribuiría al control de la progresión de la enfermedad). Por todo ello sería necesario llevar a cabo estudios más detallados en el futuro [29].

Recientes estudios analizaron nuevamente la posibilidad de utilizar inhibidores de estas proteasas en el tratamiento contra *Mycobacterium*. Entre los inhibidores sintéticos utilizados se utilizaron *marismat*, *batimastat*, o *prinomastat*; todos ellos inhibidores de amplio espectro. El interés de estos inhibidores en el tratamiento de la tuberculosis viene dado por distintos aspectos [29].

En primer lugar se comprobó su utilización respecto a la carga bacteriana; estos estudios pusieron de manifiesto que el uso único de estos inhibidores de metaloproteinasas no presenta acción bactericida o bacteriostática por sí mismos, sin embargo, en su combinación con

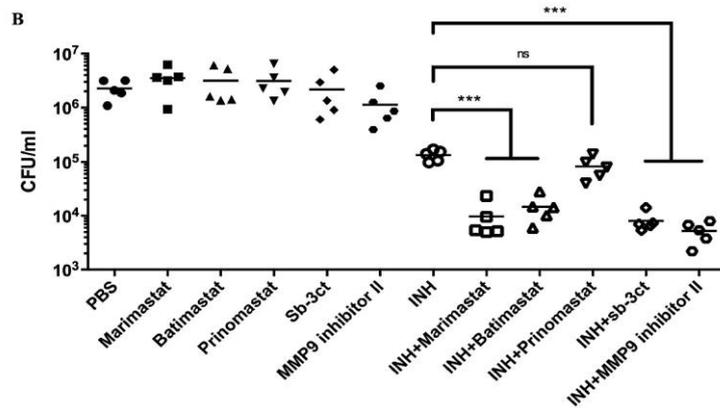


Figura 6. Relación de la CFU y las distintas combinaciones de inhibidores

fármacos de primera línea como *rifampicina* e *isoniazida* se producía una disminución de la carga bacteriana hasta 10 veces mayor que el tratamiento convencional único con los fármacos clásicos. También se comprobaron otros inhibidores mucho más específicos como *Sb-3ct* (inhibidor específico de MMP 2 y 9) y *MMP 9-inhibitor II* demostrando una disminución aún mayor de la carga bacteriana (Figura 6) [29].

En segundo lugar, se examinó la posibilidad de que los inhibidores de metaproteinasas estuviesen implicados en un incremento del número de vasos sanguíneos (angiogénesis) para lo que se estudiaron las moléculas CD31 o α -SMA debido a su presencia en células que forman el forro interior de los vasos sanguíneos. En resumen, estos estudios muestran que no se produce un incremento del número de vasos totales pero sí un incremento del

número de pericitos que rodean los vasos sanguíneos lo que implica una mayor integridad de los vasos. Este aumento de pericitos, junto con el aumento de la integridad de los vasos, podría mejorar la biodisponibilidad de los fármacos de primera línea así como su retención en el tejido infectado lo que justificaría un menor tiempo de tratamiento y con ello una disminución de las posibles resistencias para conseguir un mayor éxito terapéutico [29,32].

Actualmente estos estudios únicamente se reducen a modelos animales *in vivo* utilizando para ellos cepas de ratones infectadas. Sin embargo, estos hallazgos podrían utilizarse en la clínica a corto plazo pues la utilización de inhibidores de metaloproteinasas ya es a día de hoy empleados en la terapia antineoplásica con excelentes resultados [33].

6 CONCLUSIÓN

A pesar de ser una infección conocida desde hace siglos la tuberculosis continúa hoy en día representando una amenaza para la salud mundial, situándose incluso por encima de infecciones como el VIH. De especial interés en los últimos años ha sido la aparición de numerosas y diversas resistencias al tratamiento de primera línea en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (TB-MDR y TB-XDR) que suponen una amenaza en el control de la enfermedad originando problemas tanto a nivel de los sistemas de salud, en la economía como a nivel social.

Debido a las largas pautas posológicas que presenta el tratamiento de primera línea y la utilización errónea en la combinación de fármacos ha surgido la necesidad de llevar a cabo la búsqueda de nuevas dianas que mejoren la biodisponibilidad de estos fármacos; reduciendo la duración del tratamiento, mejorando la potencia de los antibióticos, y evitando con todo ello la aparición de resistencias y la utilización de fármacos mucho más tóxicos para el paciente y de mayor coste. En este contexto se engloban los denominados inhibidores de metaloproteinasas; futuros fármacos que podrían aportar todas estas ventajas reduciendo la carga bacteriana a nivel sistémico, mejorando la integridad de los vasos sanguíneos y favoreciendo la retención tisular de fármacos clásicos.

7 BIBLIOGRAFÍA

[1] Parra, J. C. C. (2013). Breve historia de la Tuberculosis. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica, 70(605), 145-150.

[2] Herzog H. (1998). History of tuberculosis. Respiration, 65 (1): 5-16.

[3] Organización Mundial de la Salud (Octubre 2017). Centro de prensa. Tuberculosis. Recuperado de:

<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>

- [4] Dorronsoro, I. & Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. In Anales del sistema sanitario de Navarra. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud. Vol. 30, pp. 67-85
- [5] Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal (2009). Microbiología médica 7ª ed. Madrid. MMV Elsevier, España.
- [6] Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. D. C., Garfías, Y., Sada, I., & Lascrain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 18(2), 142-153.
- [7] Golpe Gómez, A., Lado Lado, F. Cabarcos Ortiz de Barrón & Ferreiro Regueiro. (2002). Clínica de la tuberculosis. Monografía Med Integral. Servicio de Neumología y Medicina interna. 39 (5), 181-91.
- [8] Adler, R. (1996). Transmission and patogénesis of tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM, editors.
- [9] Enarson, D. Murray, J. Garay, D & editors (1996). Global epidemiology of tuberculosis. Little Brown.
- [10] Garay, S. (1996) Pulmonary tuberculosis. Little Brown
- [11] Centers for Disease Control and Prevention. (Abril 2012). American Association. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/testing/tbtesttypes.htm>
- [12] Caminero, J. A., Cayla, J. A., García-García, J. M., García-Pérez, F. J., Palacios, J. J., & Ruiz-Manzano, J. (2017). Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. Archivos de bronconeumología, 53(9), 501-509.
- [13] Denkinger, C. M., Schumacher, S. G., Boehme, C. C., Dendukuri, N., Pai, M., & Steingart, K. R. (2014). Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. European Respiratory Journal, 44(2), 435-446.
- [14] Blumber, B. et al. (2003) Fixed-Dose Combination Drugs for Tuberculosis. 63 (6):535-53.
- [15] Wallis, R. S., Maeurer, M., Mwaba, P., Chakaya, J., Rustonjee, R., Migliori, G. B., ... & Hoelscher, M. (2016). Tuberculosis-advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. The Lancet infectious diseases, 16(4), e34-e46.
- [16] Falzon, D., Schünemann, H. J., Harausz, E., González-Angulo, L., Lienhardt, C., Jaramillo, E., & Weyer, K. (2017). World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. European Respiratory Journal, 49(3), 1602308.
- [17] Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. (2014). Centro Nacional de Epidemiología Instituto Nacional de Salud Carlos III. Recuperado de: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2015/TB_Informe_2014.pdf
- [18] Timmins, G. Deretic, V. (2006). Mechanisms of action of isoniazid. Mol. Microbiol. vol. 62, nº. 5, pp. 1220-1227.
- [19] Marrakchi, H. Lanéelle, G. & A. Quémard. (2000). InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. Microbiology, vol. 146, nº 2, pp. 289-296.
- [20] Bardou, F. Raynaud, C. Ramos, M. Lanéelle, A. & G. Lanéelle. (1998). Mechanism of isoniazid uptake in Mycobacterium tuberculosis. Microbiology, vol. 144, nº 9, pp. 2539-2544.
- [21] Rivera, D. F., & Camargo, D. G. (2015). Genes del Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. Revista Médicas UIS, 28(1), 39-51.
- [22] Wengenack N, Rusnak F. (2001). Evidence for isoniazid-dependent free radical generation catalyzed by Mycobacterium tuberculosis KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T). Biochemistry. 2001;40(30):8990-6.
- [23] Abate G, Hoffner SE, Thomsen VO & Mörner H. (2001). Characterization of isoniazid-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis on the basis of phenotypic properties and mutations in katG. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 20(5):329- 33.
- [24] Zhang, Y. Shi, W. Zhang, W & D. Mitchison. (2013). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. Microbiol. Spectr., vol. 2, nº4, pp. 1-12.
- [25] Zhang, Y & Mitchison, D. (2003) The curious characteristics of pyrazinamide: A review. Int. J. Tuberc. Lung Dis., vol. 7, nº1, pp. 6-21.
- [26] Elsevier Ltd. Ethambutol. (2008). Tuberculosis (Edinb.), vol. 88, pp. 102-105.
- [27] Flores-Valdez, MA. Barba, J. (2010). Metaloproteasas de matriz y su asociación a tuberculosis. Centro de investigación y asistencia en tecnología del Estado de Jalisco. Rev Invest Clin; 62 (5): 461-465.
- [28] Hernández-Montoya, J., Pérez-Rubio, G., Pérez Ramos, J., Montaña Ramírez, M., Ramos Abraham, C., Ramírez Venegas, A., ... & Falfán-Valencia, R. (2014). Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC. Neumología y cirugía de tórax, 73(2), 128-137.
- [29] Xu, Y., Wang, L., Zimmerman, M. D., Chen, K. Y., Huang, L., Fu, D. J., ... & Dartois, V. (2018). Matrix metalloproteinase inhibitors enhance the efficacy of frontline drugs against Mycobacterium tuberculosis. PLoS pathogens, 14(4), e1006974.
- [30] Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, Rook G. (200). Treatment with BB-94, a broad spectrum inhibitor of zinc-dependent metalloproteinases, causes deviation of the cytokine profile towards type-2 in experimental pulmonary tuberculosis in Balb/c mice. Int J Exp Pathol. 81(3):199±209.
- [31] Taylor JL, Hattle JM, Dreitz SA, Troutt JM, Izzo LS, Basaraba RJ, et al. (2006). Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. Infect Immun. 74.
- [32] Rundhaug JE. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med. 9(2):267±85.
- [33] Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. J Clin Oncol. 25(12):1539±44.