

Bases Moleculares de Mecanismos de Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*

Contreras Montes Gabriela*, Medina Alulima Alexandra*, Rodríguez Ortiz Katherine*.

* Estudiante de Medicina UNSLP

** Docente de Microbiología UNSLP

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad de mucha importancia médica, debido a las altas tasas de morbi-mortalidad a nivel mundial. Una característica importante de este agente causante el *Mycobacterium tuberculosis* es la capacidad para desarrollar resistencia a fármacos de primera y segunda línea. El conocimiento de los mecanismos que propician una respuesta de defensa frente a antibióticos por parte del *Mycobacterium tuberculosis*, nos ayudan a entender mejor esta problemática.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a drogas antituberculosas por parte del *Mycobacterium tuberculosis*, es una situación alarmante en todo el mundo, debido al aumento de las cepas resistentes a antibióticos en las dos últimas décadas. La epidemia de la tuberculosis que se creía en extinción en los países desarrollados, ha sufrido un dramático revés.

Desde 1991, la OMS (Organización Mundial Salud) estableció una terapia multidrogo, bajo la hipótesis de que la cepa resistente podía ser controlada al menos con dos antibióticos.(1,2)

El término MDR-TB (tuberculosis, multidrogo – resistente) fue usado por primera vez en un reporte del CDC (Centro para el control y prevención de Enfermedades) sobre las cepas que presentan resistencia a por lo menos dos drogas de primera línea, isoniacida y rifampicina.(2, 3)

La clasificación en dos grupos de fármacos activos frente a micobacterias se da en función a su eficacia, potencia, efecto tóxico y tolerabilidad.

Los fármacos de primera elección considerados de primera línea, son: isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina. Los de segunda línea son ácido para – aminosalicílico, etionamida,

tiosemicarbazona, cicloserina, aminoglucósidos, etc) que se usan para el tratamiento de cepas resistentes o con clínica particular (3,4, 15(5), 17(6)).

El entendimiento de los mecanismos que generan una situación de resistencia a fármacos antituberculosos, son importantes para la formación profesional del médico, porque abren el campo al desarrollo de nuevas metodologías basadas en pruebas moleculares que permitan identificar a una cepa resistente y por ende aplicar el tratamiento adecuado para el cuadro clínico particular, evitando un mal uso de las drogas que puedan derivar en una complicación a futuro.

El desarrollo de la resistencia del M. tuberculosis puede darse por una inadecuada prescripción médica, monoterapia, por la poca colaboración del paciente, o un tratamiento inconcluso. (1, 3, 4, 16(7)).

La estrategia empleada en el tratamiento de tuberculosis es el TAES (tratamiento acortado estrictamente supervisado). Se basa en un régimen terapéutico cuádruple con antibióticos de primera línea. Consiste en la administración de Isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol o estreptomycinina por un periodo de 2 meses, seguido de una

fase de tratamiento continuo de 5 meses con isoniacida y rifampicina. Este es el esquema terapéutico de 6 meses que llega a alcanzar tasas de curación superiores a 90%. Para pacientes con fracaso de tratamiento consiste en la administración de isoniacida, rifampicina y etambutol por un período de 8 meses, junto con pirazinamida durante los primeros 3 meses y estreptomycinina los primeros 2 meses (2, 16(7), 19(8)).

La presente revisión realiza una actualización sobre bases moleculares de cepas resistentes a drogas antituberculosas.

EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA A DROGAS ANTITUBERCULOSAS.

La historia de la tuberculosis cambió dramáticamente después de la introducción de la primera droga con actividad anti – micobacteriana, en 1944 donde surge la resistencia tras la monoterapia con estreptomycinina. Este hito cambio la manera de emprender la batalla contra este agente, puesto que a la par que la humanidad fue desarrollando otro tipo de drogas alternativas, donde surgieron los denominados fármacos de segunda línea, el M. tuberculosis desarrolló mecanismos de resistencia. (1, 4,12(9),13(10)).

La resistencia farmacológica de M. tuberculosis es consecuencia de

mutaciones espontáneas cromosómicas que suceden en el genoma micobacteriano. La acumulación de estas mutaciones en genes específicos propician el desarrollo de mecanismos de resistencia para un determinado antibiótico. Hasta ahora no se ha descrito un mecanismo de transmisión horizontal de material genético que codifique la resistencia a antibióticos, por lo que la resistencia tendría un carácter únicamente cromosómico (12(9), 13(10), 3, 20(11))

La resistencia intrínseca es atribuida a la inusual estructura de la pared celular que contiene ácidos micólicos, que producen una baja permeabilidad para muchos de los antibióticos como tetraciclinas, fluoroquinolonas, aminoglucosidos, etc. (15(5),9(12))

Es posible identificar a una cepa resistente a antibióticos, y además realizar el análisis de las mutaciones genéticas ocurridas en genes específicos como: *rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB* y *gyrA* en cepas de resistentes (6(13), 7(14), 8(15), 9(12), 10(16), 17(6)).

Se realiza en un medio Lowenstein Jensen, se aísla el ADN por tratamiento con bromuro de cetiltrimetilamonio. Posteriormente, se amplifica el ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) de los genes que determinan la resistencia.

Las secuencias nucleóticas son analizadas y comparadas. Se toma nota de la secuencia con mutación cromosómica y se determina la resistencia farmacológica asociada a esa variación genética.

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Isoniacida.

Es la forma hidracida del ácido isonicotínico, este trabaja inhibiendo específicamente la síntesis de los ácidos micólicos.

Uno de los primeros estudios para entender la resistencia a este fármaco, demostró que se trata en realidad de una prodroga que se activa por la enzima *katG*, que es una catalasa/peroxidasa, codificado por el gen *katG* y *inhA*, este último sintetiza al ACP reductasa dependiente de NADH (3(17), 14 (3), 15(5), 18).

Rifampicina.

La rifampicina actúa inhibiendo la síntesis de ARN mensajero, a cargo de la polimerasa.

Se genera resistencia cuando ocurre una mutación en el gen codificante *rpoB*, para la subunidad b de la ARN polimerasa, e involucran una agrupación de solo 8 a 23

aminoácidos (2, 3(17), 6(13), 14 (3), 18).

Pirazinamida.

La pirazinamida es un compuesto sintético redescubierto en la década de los 80 que ha facilitado el tratamiento antituberculoso de corta duración.

El mecanismo de acción no ha sido bien dilucidado, aunque se ha señalado la importancia de la acción de la enzima pirazinamidasa que parece tener la capacidad de disminuir el pH del medio intracelular por debajo de los límites de tolerancia de la bacteria. El mecanismo de resistencia se produce por la deficiencia en pirazinamidasa, con la subsecuente pérdida de la capacidad de activar el antibiótico por una mutación en el gen *pncA* (2, 3(17), 14 (3), 15(5)).

Estreptomicina.

La estreptomicina es un antibiótico aminoglucósido bactericida que actúa sobre los ribosomas inhibiendo la síntesis de proteínas

En la mayoría de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estreptomicina se han encontrado mutaciones en el gen *rpsL* que codifica la proteína ribosomal S12 (2, 3(17), 15(5)).

Etambutol.

El etambutol (ETB) corresponde químicamente al 2,2' (etilendiamino)-di-1-butanol y su mecanismo de acción consiste en la inhibición del arabino – galactano presente en la pared celular de la micobacteria.

Los mecanismos de resistencia tienen su base molecular en las mutaciones encontradas en la región *embB* codón 306 que provoca una disminución de la unión de etambutol a la *embB* (2, 3(17), 8(15), 11(19), 14(3), 15(5)).

Fluoroquinolonas.

Es un potente fármaco de segunda línea, destacando por ejemplo, el ofloxacino, recomendado en la TB multiresistente.

El aislamiento clínico de cepas con características de mutación en los genes *gyrA* y *gyrB*, provocan una reducción en la capacidad de las fluoroquinolonas para inactivarlas (2, 9(12), 15(5)).

Kanamicina, Capreomicina

Amikacina,

El lugar de acción de estos antibióticos es la subunidad 30S del ribosoma en la proteína ribosomal S12 y el ARNr 16S.

La resistencia es causada por mutaciones en la proteína codificada

por S12 en el gen rpsL y 16S rRNA codificada por el gen rrs codón 97. Las mutaciones en el gen rpsL inhibe la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, causando una lectura errónea del ARNm mensaje durante la traducción (2, 15(5)).

Etionamida.

Es un derivado de ácido isonicotínico, es bactericida sólo contra *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. leprae*, e inhibe el mismo sitio diana como isoniacida, el InhA de la síntesis de ácido micólicos.

Las cepas que presentan resistencia, presentan también una resistencia cruzada a la tiosemicarbazona (2, 15(5), 19(8)).

P- amino ácido salicílico.

Su mecanismo no ha sido claramente dilucidado. Se sugirió que podría competir con el ácido p-amino benzoico para dihidropteroato sintasa, una enzima necesaria en la biosíntesis de ácido fólico.

Para la resistencia, presenta mutaciones en el gen thyA, resultando en la disminución de la actividad de la enzima (19(8)).

Tabla 1. Genes mutantes responsables de la resistencia a drogas antituberculosas.

Droga	Gen mutante (proteína que produce)	Mecanismo de resistencia
Rifampicina	Rpoβ (RpoB = cadena β de RNA olicerasa)	Reduce la capacidad de la rifampicina inhibirla.
Isoniacida	KatG (KatG= catalasa – peroxidasa) inhA (InhA= ACP reductasa dependiente de NADH) ahpC (AhpC=alquil hidropéroxido reductasa) kasA (KasA= β-cetoacil ACP sintetasa) ndh (Ndh = NADH dehidrogenasa)	Reduce su capacidad de activar la prodroga INH. InhA está involucrada en la síntesis del ácido micólico, lo que reduce la vulnerabilidad de InhA al ataque por INH. Produce una sobre expresión de la enzima AhpC, el cual remueve peroxidasa necesaria para activar INH. Produce sobre expresión de Kas A enzima involucrada en la síntesis de ácido micólico y ácidos graso. Produce niveles bajos de resistencia a INH. Incrementa la razón NDAH/NAD+ que reduce el sitio activo de INH.
Pirazinamida	pncA(PncA=pirazinamidasa)	Las mutaciones de PncA producen una débil conversión de PZA a ácido pirazinoico.
Etambutol	embB (EmbB = una proteína de la membrana de la micobacteria)	Produce una disminución del etambutol a la EmbB.
Estreptomocina	rpsL (RpsL = proteína ribosomal S12) rrs (Rrs = RNA ribosomal 16S)	Disminuye la unión de la estreptomocina a la proteína ribosomal S12. Produce una disminución de la unión de la estreptomocina a la unidad ribosomal 16S.
Amikacina Kanamicina	rrs (Rrs = RNA ribosomal 16S)	Produce una disminución de la unión de la amikacina / kanamicina a la unidad ribosomal 16S.
Quinolonas	gyrA (GyrA=DNA girasa bacteriana)	Varias mutaciones de GyrA reducen la capacidad de las fluoroquinolonas para inactivarla.
Etionamida	inhA (ver arriba)	Ver arriba.

ACP: Acyl Carrier protein INH: isoniacida NADH: nicotinamida adenina dinucleotido, PZA: pirazinamida.

Mendoza Ticona A, Gotuzzo Herencia E. 2008. Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), historia y situación actual. Acta Med Per.25 (4):236-246.

Macrólidos.

La resistencia intrínseca a los macrólidos como claritromicina se ha asociado con la baja permeabilidad de la pared celular y la expresión del gen *erm37*, que codifica una enzima que metila un sitio específico en el ARNr 23S (7(14)).

MEDIDAS PARA EVITAR NUEVAS MULTIRRESISTENCIAS

Con la rápida evolución de esta batalla entre antibióticos y resistencia, se han determinado medidas básicas para evitar que se generen nuevos casos de fármaco resistencia múltiple. Partiendo de la premisa que con un control estricto de la evolución del tratamiento, podemos hacer la diferencia.

1. Recomendar tratamientos estandarizados de corta duración para los casos nuevos.
2. Recomendar el empleo de tratamientos directamente supervisados.
3. Administrar una sola tableta de medicamentos para que en el caso de que el paciente deje el tratamiento lo haga simultáneamente con todos los medicamentos.

CONCLUSIONES.

La tuberculosis constituye uno de los principales problemas de salud pública. Desde el cuadro clínico, la detección e identificación del agente

etiológico, tanto fenotípicamente como genéticamente, son importantes aspectos que abarcan el proceso del tratamiento, la vigilancia de cepas resistentes presentes en nuestro país, arrojaría resultados beneficiosos a futuro en la prevención del desarrollo de mayor multiresistencia.

La alta frecuencia de resistencia es un indicador importante del insuficiente control en el programa antituberculoso de una determinada región, y nos hace reflexionar sobre la medida de control que se debe asumir, los criterios de tratamiento, etc.

Los mecanismos de resistencia del *M. Tuberculosis*, son bastante complejos a nivel molecular, entendiéndose que una mutación en un gen específico, cambia la función del gen y desencadena respuestas que pueden llegar a modificar la estructura o función de un sitio diana de antibióticos.

Una de las medidas a tomar en cuenta viene de un nuevo concepto fitness bacteriano, el cual postula que la reducción en el uso de drogas antimicobacterianas causaría la desaparición de las cepas resistentes, debido a que toda mutación tendría un costo adverso en la fisiología de la célula mutante.

En esta batalla entre resistencia adquirida y nuevos esquemas de tratamiento, tenemos todas las de perder, sino tomamos conciencia de los factores que pueden ser determinantes al iniciar una medida farmacológica, porque a la par que se bombardea al agente con antibióticos

que en teoría funcionaban muy bien ayer o al inicio del caso nuevo, un descuido es suficiente para que el agente *M. tuberculosis* nos tome la delantera y surjan cepas multiresistentes que probablemente en un futuro nos exijan un mayor contraataque bioquímico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mendoza Ticona A, Gotuzzo Herencia E. 2008. Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), historia y situación actual. *Acta Med Per.* 25 (4):236-246.
2. Arraiz N. Bermudéz V. Uradaneta B. 2005. Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: Bases moleculares. *AVFT.* 24 (1): 12-22.
3. Y. Zhang, W. W. Yew. 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *INT. J Tuberc Lung Dis.* 13(11):1320-1330.
4. James C. Johnston, Neal C. Shahidi, Mohsen Sadatsafavi, J Mark Fitzgerald. 2009. Treatment Outcomes of Multidrug – Resistant tuberculosis: A Systematic Review and Meta – Analysis. *PLoS ONE.* 4(9):1 – 9.
5. Montoro Cardoso Ernesto. 2004. La Resistencia a multiples fármacos: una amenaza para el control de la tuberculosis. *Rev. Panam Salud Publica Am.* 16(1):68-73.
6. De la Iglesia, H. R. Morbidoni. 2006. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e Isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev. Argentina de Microbiología.* 38:97-109.
7. Araya Pamela, Velasco Maritza, Tognarelli Javier, Arias Fabiola, Leiva Tamara, Sccapatticio Angelica, Alviz Pablo, Fernandez Jorge. 2011. Detección de mutaciones asociada a cepas multidrogo resistente de *Mycobacterium tuberculosis* en Chile. *Rev. Med. Chile.* 139: 467 – 473.
8. Becerra Francisco, Galindo Alexander, Patiño H. Mauricio, Sánchez Liliana, Lorente Andrés, Portillo Patricia, Matter Salim. 2003. Secuencia de un Fragmento Amplificado del GEN *rpoB* en Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Resistentes a Rifampicina. *MEDICAS.* 17: 107 – 111.
9. Riquelme M., Martiza Velasco, Luis Rodriguez. 2008. Actualización de la resistencia a drogas antituberculosas en Chile, 2006. *Rev. Chil. Enf. Respir.* 24:60-65.
10. Hyeyoung Lee, Myoung Han – Jung, Bang Hye – Eun, Bai Gill – Han, Kim Sang – Jae, Kim Joo – Deuk. 2002. Mutations in the *embB* Locus among Korean Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to ethambutol. *Yensei Medical Journal.* 43(1):59 – 64.
11. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM. 2009. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS MED.* 6(2):132-136.

12. Chen Jun, Chen Zhifei, Li Yuanyuan, Chen Wei, Chen Xi, Chen Tian. 2012. Characterization of gyrA and gyrB mutations and fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Hubei Province, China. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 16(2):136 – 141.
13. Vasquez Michel Aneth Maria, Camacho Mirtha, Molina Orihuela Julia. 2011. Análisis bacteriológico y molecular de Mycobacterium tuberculosis rifampicina resistente aislados en siete regiones de Bolivia. BIOFARBO. 19(2):21 – 27.
14. Melean German, Vasquez Aneth, Mollinedo Perez Elvin, Rada Tarifa Ana, Almaraz Pablo Ossio, Camacho Mirtha, Sainz Jorge. 2009. Detección de mutaciones en los Genes rpoB y katG asociados a resistencia en cepas de Mycobacterium tuberculosis de Bolivia. Cuadernos del Hospital de Clinicas. 54(1):20-26.
15. Miranda Jorge, Rios Rodrigo, Clavijo Andrea, Chacon Carlos, Mattar Salim. 2006. Estudio preliminar de la susceptibilidad antimicrobiana y variabilidad genética de Mycobacterium tuberculosis en un área del Caribe colombiano. Colomb Med. 37(4):275-286.
16. Almeida Da Silva Pedro Eduardo, Palomino Juan Carlos. 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy. 66:1417-1430.
17. Brossier Florence, Veziris Nicolas, Aubry Alexandra, Jarlier Vincent, Sougakoll Wladimir. 2010. Detection by Genotype MTBDRs/ Test of Complex Mechanisms of resistance Mycobacterium tuberculosis complex isolates. Journal Of Clinical Microbiology. 48(5):1683 – 1689.
18. Rosseti Rosa M. Rosane de Moura Valim A. Nunes Silva M. 2002. Tuberculose resistente: revisao review. Rev Saude Publica. 36 (4) : 525 – 532.
19. Shen Xin, Shen Guo-Miao, Wu Jie, Gui Xiao-Hong, Li Xia, Mei Jian, DeRiemer Kathryn, Gao Qian. 2007. Association between embB codon 306 mutations and drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 51(7): 2618 – 2620.
20. Lado F. L. Garcia Ramos R. Perez del Molino M. I. Ferreiro Regueiro M. J. Maceda Vilariño Maceda. Tuñez Bastida V. 2004. Tuberculosis resistente a fármacos. Anales de Medicina Interna. 21(4):146-152.