

CAPÍTULO 4. ANTECEDENTES

4.1 La tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad pulmonar de progresión lenta cuyo agente causal son los bacilos del género *Mycobacterium*. En especial *Mycobacterium tuberculosis* es responsable del 95% de los casos de tuberculosis humana. Una persona con la enfermedad pulmonar activa expelle gran cantidad de bacilos al toser o estornudar. Las pequeñas gotas al ser inhaladas penetran hasta los alvéolos pulmonares (Kumate *et al* 1998), donde el microorganismo se multiplica. Los macrófagos alveolares fagocitan al bacilo, mas éste previene la fusión de los lisosomas y evade la destrucción. De este modo es transportado e invade los nódulos linfáticos. Simultáneamente se inicia una respuesta inmune celular con activación de macrófagos, que al acumularse forman junto con las células epiteliales las lesiones características de la enfermedad llamadas tubérculos o cavitaciones (Murray *et al* 1992; Kumate *et al* 1998). En esta fase conocida como primaria se desarrolla la hipersensibilidad, haciéndose positiva la prueba de la tuberculina (Jensen y Wright 1993).

Generalmente la lesión evoluciona a la curación tras la caseificación y calcificación de la cavidad (Kumate *et al* 1998), pero en pacientes inmunosuprimidos y niños principalmente puede proseguir a su etapa diseminada (Jensen y Wright 1993). La infección alcanza el torrente sanguíneo provocando ya sean lesiones en ojos, huesos, cerebro, riñón, hígado o bazo (Kumate *et al* 1998) o la muerte por sepsis bacteriana. Alternativamente los bacilos pueden permanecer latentes en las cavidades, reactivándose al haber una baja en el sistema inmune para causar una tuberculosis secundaria (Jensen y Wright 1993).

La infección primaria es generalmente asintomática, llegando a observarse fiebre vespertina y síntomas de infección de vías respiratorias superiores. Una tuberculosis crónica presenta malestar general, anorexia, pérdida de peso, fiebre vespertina y tos con esputo sanguinolento (Murray *et al* 1992; Kumate *et al* 1998). Las posibles complicaciones, especialmente en los niños son: tuberculosis miliar, derrame pleural, linfadenitis periférica o tuberculosis meníngea. Las complicaciones tardías pueden ser tuberculosis ósea, de articulaciones, de piel o de tejidos blandos (Kumate *et al* 1998).

Es posible realizar el diagnóstico por distintos métodos, pero el más confiable es el aislamiento del agente etiológico de distintos fluidos corporales (en especial del esputo), su observación al microscopio mediante la tinción de Ziehl-Neelsen y su cultivo en medio de Middlebrook o Lowentsein-Jensen. Se usan también las placas de rayos X que permiten observar las cavidades en los pulmones. Una tercera opción es la prueba de sensibilidad cutánea a la tuberculina. La limitación de este método, el más sencillo, es que las personas vacunadas con el BCG (bacilo de Calmette-Guerin) darán un resultado positivo (Murray *et al* 1992).

4.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo no formador de esporas, inmóvil, no capsulado, que mide 0.5x 3 μ m. Aerobio obligado de crecimiento lento (entre tres y ocho semanas), se cultiva en medio de Lowenstein-Jensen, suplementado con almidón y yema de huevo. Se tiñe con tinción ácida rápida o de Ziehl-Nielsen y resiste la decoloración con ácidos fuertes y alcohol (Murray *et al* 1992; Jensen y Wright 1993; Kumate *et al* 1998).

Su muy particular pared celular le confiere algunas de sus características: pequeño tamaño, hidrofobicidad, tinción ácida, resistencia a algunos antibióticos (Chatterjee 1997) y resistencia al estrés oxidativo (George *et al* 1995). Dicha pared es de tipo Gram positiva pero contiene una capa adicional rica en lípidos, glicolípidos y polisacáridos (Cole *et al* 1998). La corteza de la pared celular consiste de peptidoglicano (unidades alternadas de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-glicolilmurámico) unido por enlaces fosfodiéster a cadenas de arabinogalactano. Perpendicular a ellas se encuentra una pseudo-bicapa lipídica asimétrica formada por ácidos micólicos y otros lípidos polares y no polares asociados no-covalentemente. Adicionalmente en el exterior se encuentran polisacáridos capsulares como arabinomanano, manano y glicano (Figura 1).

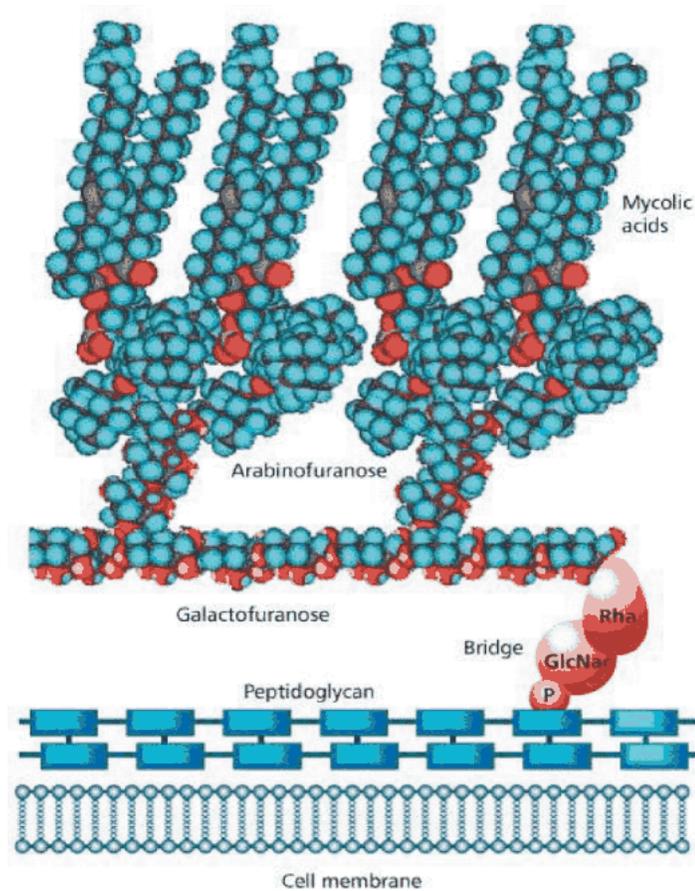


Figura 1. La pared celular de *M.tuberculosis* (Tomado de: www.nottingham.ac.uk/~pcxajs/thomas/Research/UDP/UDP.html).

Los ácidos micólicos son ácidos grasos α -alquil- ω -hidroxilados ramificados de cadena larga (de 70 a 90 carbonos) característicos de las micobacterias. Se clasifican en dos familias; la primera de ellas, los α micolatos, no contiene grupos oxigenados. Por su parte los micolatos oxigenados pueden ser cetomicolatos o metoximicolatos, encontrándose el sustituyente adyacente a una ramificación de metilo (Chatterjee 1997). En las micobacterias patógenas como *M.tuberculosis* se observan además sustituyentes de ciclopropano que le confieren resistencia *in vitro* al peróxido de hidrógeno (George *et al* 1995).

La síntesis de los ácidos micólicos se divide en cuatro etapas. La primera comprende la síntesis de ácidos grasos lineales saturados de 24-26 carbonos. En la segunda se sintetizan ácidos meromicólicos de 40-60 carbonos, que a continuación son modificados.

Finalmente, en una reacción tipo Claisen un meromicolato se condensa con un ácido graso para dar un β -oxomicolato, que se reduce para formar el ácido micólico.

La síntesis *de novo* es catalizada por el complejo multienzimático FAS (sintasa de ácidos grasos) I a partir de acetil-CoA, que genera precursores de 14-26 carbonos (Chatterjee 1997). El complejo dissociable FAS II actúa sobre sustratos unidos a una proteína acarreadora de acilo (ACP) elongándolos para generar ácidos grasos de 24-56 carbonos. Las insaturaciones son catalizadas ya sea por una β -hidroxiacil ACP deshidratasa tipo FabA o por una desaturasa que utiliza tanto oxígeno molecular como NADPH. Los grupos de ciclopropano son generados por una familia de enzimas dependientes de S-adenosil-L-metionina. Finalmente se une al complejo del antígeno 85 que lo transporta a la pared celular (Cole *et al* 1998).

La síntesis de ácidos micólicos se ha estudiado extensivamente pues es inhibida por los antimicobacterianos isoniazida y etionamida (Chatterjee 1997). Se ha demostrado la formación de un intermediario por la unión covalente de INH con NAD⁺. Este se une al sitio activo de InhA, una enoil ACP reductasa dependiente de NADH, inhibiéndola (Rozwarski *et al* 1998). KasA, una β -cetoacil ACP sintasa es la encargada de la elongación de los ácidos grasos. Mdluli y cols, demostraron que forma un complejo con AcpM e INH, inhibiéndose su función.

Estas tres enzimas (InhA, KasA y AcpM) forman parte del complejo enzimático FAS II (Cole *et al* 1998). Se cree que, junto con la alquil hidroperóxido reductasa AhpC que se sobre-expresa debido a la ausencia del gen regulador *oxyR* funcional (Sherman *et al* 1996), están involucradas en el mecanismo de toxicidad de la isoniazida. Mas mutaciones en las mismas no han podido relacionarse de manera inequívoca con un aumento en la resistencia hacia el fármaco (Slayden y Barry 2000).

4.3 La isoniazida

La isoniazida (INH), o hidracida del ácido isonicotínico es un pro-fármaco altamente específico para las micobacterias y posee actividad bactericida contra los bacilos tanto intracelulares como extracelulares en fase de crecimiento. Su absorción oral es rápida, siendo su biodisponibilidad del 90% tras 1-2 horas de su administración. Se une poco a proteínas, difundiendo con facilidad en fluidos y tejidos (Florez y Mediavilla 1992). Su

vida media plasmática varía de 1 a 3 horas dependiendo de la capacidad de acetilación hepática del paciente. Sus metabolitos se eliminan en la orina tras aproximadamente 24 horas (Mutschler *et al* 1995; WHO 1997).

Es generalmente bien tolerada, aunque en el 10% de los casos ocasiona irritación del sistema nervioso central y periférico asociado a la disminución de los niveles de vitamina B₆ disponibles; provocando mareos, cefalea, neuritis periférica y óptica, ataxia, convulsiones e incluso trastornos psicóticos. El 5% de los pacientes reportan irritación gastrointestinal, y con poca frecuencia se ha observado reacciones de hipersensibilidad, leucopenia y lesiones hepáticas severas (Florez y Mediavilla 1992; Mutschler *et al* 1995).

La isoniazida penetra al interior de la célula bacteriana por difusión pasiva. Este proceso es facilitado al ser una molécula neutra a pH fisiológico y tener tamaño pequeño, además de la presencia de una porción no polar (el anillo de piridina). Ahí es procesada, y sus metabolitos se acumulan en el interior puesto que son transformados a especies iónicas o radicales libres (Bardou 1998). Su presencia ocasiona alteraciones en la morfología del bacilo, que comienzan en los polos y se extienden a su totalidad. Se observa un aumento en la respiración y una mayor secreción de proteínas al medio (Bardou 1996). Simultáneamente se acumulan en el citoplasma ácidos grasos saturados de 24 a 26 carbonos y se inhibe la síntesis de ácidos grasos mayores a estos (Slayden y Barry 2000), mientras que la producción del complejo del antígeno 85 aumenta (Garbe *et al* 1996). Dichos efectos confirman que la INH inhibe la síntesis de ácidos micólicos, y modifica la permeabilidad y estructura de la pared celular.

La base de la terapia con antibióticos es la interacción de un fármaco con biomoléculas (generalmente enzimas) específicas del microorganismo, causando daño en él y no en el hospedero. Un ejemplo de ello son las sulfonamidas, las cuales se unen a modo de falso sustrato a una enzima de la ruta de síntesis de ácido fólico, causando su agotamiento (Figura 2) (Florez y Mediavilla 1992). A diferencia de ellas, la isoniazida es un pro-fármaco, es decir, un precursor inactivo que al ser modificado por el metabolismo de la micobacteria adquiere actividad biológica. La isoniazida debe ser activada por la enzima KatG, y tras una serie de pasos forma una especie bioactiva (cuya identidad no se conoce aún con precisión) que actúa como análogo de sustrato.

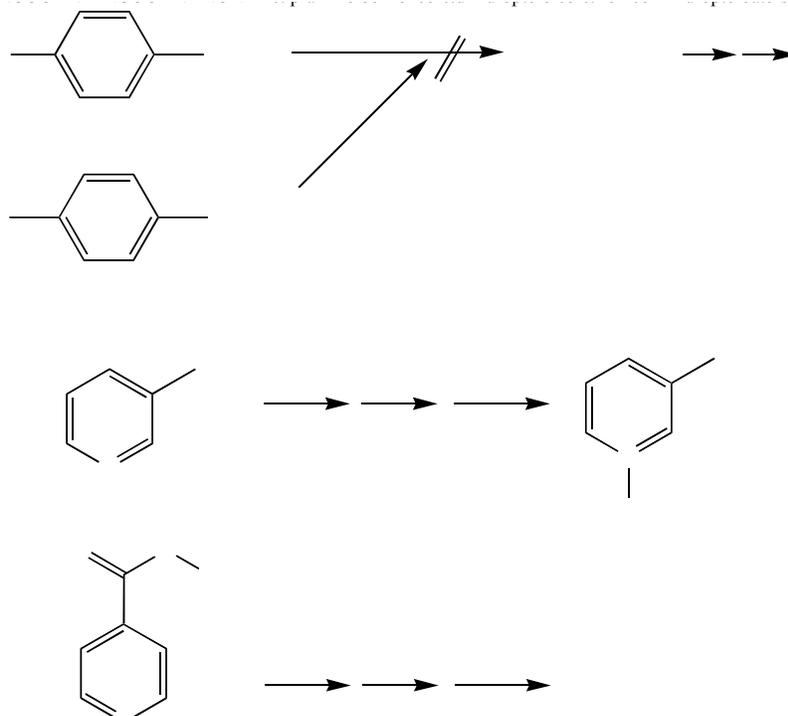


Figura 2. a) Mecanismo de acción de las sulfamidas b) Mecanismo de acción de la isoniazida (Tomado de: Florez ed, 1992)

En los cincuentas se publicó la hipótesis de Krüger-Thiemer, postulando que la INH es oxidada en el interior de la célula a ácido isonicotínico, el cuál se incorpora formando un análogo de NAD (Seydel *et al* 1976). Se han identificado el ácido isonicotínico, la isonicotinamida y la piridina-4-carboxaldehído como productos estables de la transformación de la INH por KatG *in vitro* (Johnsson y Schultz 1994), mas todos son inocuos para *M.tuberculosis* a concentraciones fisiológicas (Saint-Joanis 1999).

Se han detectado mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR) los radicales acil, acil peroxo y piridil como productos de oxidación de la isoniazida (Wengenack y Rusnak 2001). Se piensa que la forma metabólicamente activa es un intermediario de la oxidación de INH, ya sea el radical o el anión acil-isonicotínicos que reaccionan con NAD para formar un intermediario de INH-NAD que se une al sitio activo de InhA (Rozwarski *et al* 1998). Adicionalmente otros radicales libres generados pueden dañar DNA, proteínas y otras macromoléculas (Saint-Joanis 1999). Se muestra un resumen de las rutas antes mencionadas en la Figura 3.

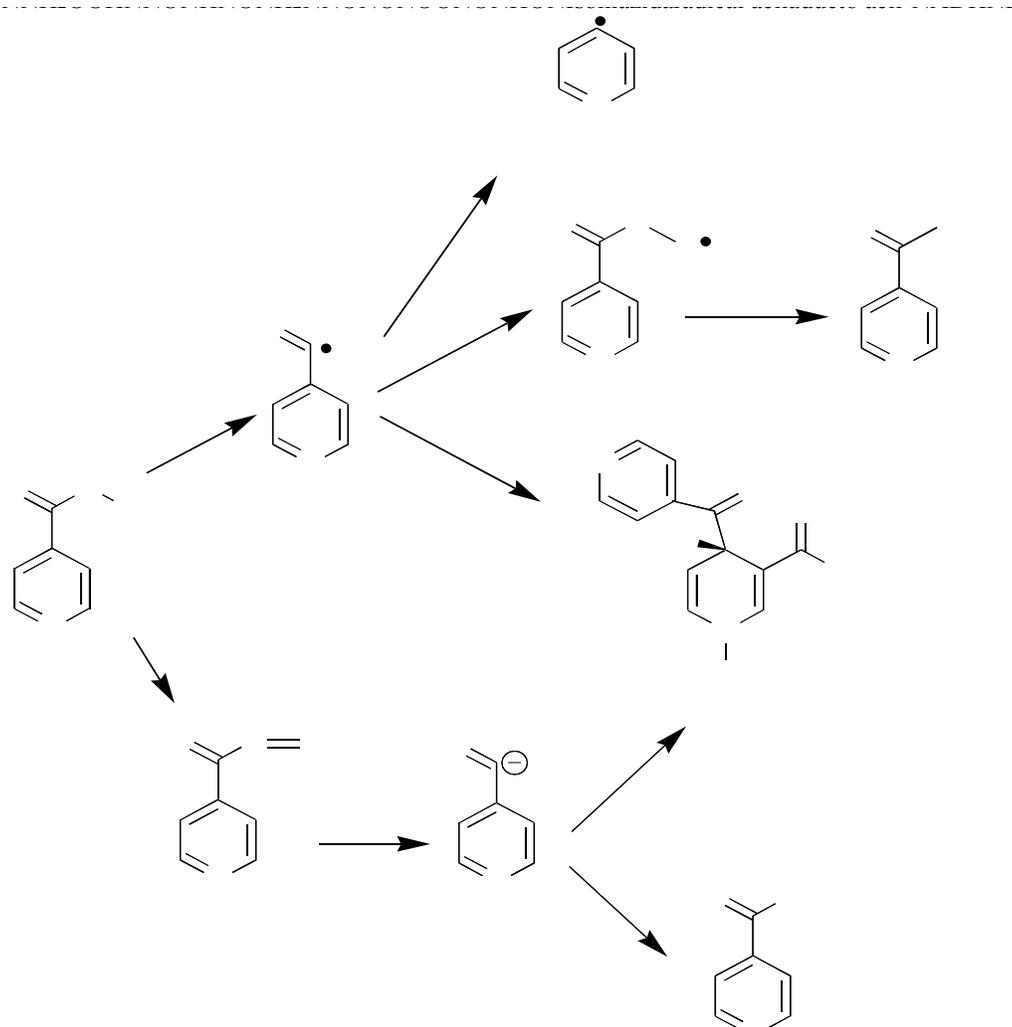


Figura 3. Posibles rutas para la formación de la especie biológicamente activa de la isoniazida mediante KatG (Johnsson y Schultz 1994; Rozwarski *et al* 1998; Wengenack y Rusnak 2001)

4.4 KatG

La relación entre la enzima KatG y la susceptibilidad de *M.tuberculosis* a la isoniazida se estableció desde los años cincuenta al observarse que algunas cepas que presentaban resistencia al fármaco también perdían la actividad de catalasa-peroxidasa. Sin embargo, la base molecular de dicha observación no se aclaró hasta muchos años después al confirmarse el papel de KatG como activador enzimático de la INH (Slayden y Barry 2000).

4.4.1 Características Generales

KatG de *M.tuberculosis* es una proteína de 80 KDa, compuesta por 740 aminoácidos y que posee una protoporfirina IX en su sitio activo (Slayden y Barry 2000; Wengenack y Rusnak 2001). Es codificada por el gen *katG* que se encuentra en una región relativamente inestable, haciéndolo susceptible a sufrir inserciones, deleciones y mutaciones sin sentido (Slayden y Barry 2000). Forma parte de la Clase I de la superfamilia de peroxidases de plantas, que incluye a la citocromo c peroxidasa de levaduras (CCP) y a las ascorbato peroxidases (APX) de eucariontes, con las que posee alta homología (Zámocky *et al* 2001). Su longitud es el doble que la de CCP debido a la duplicación del gen, y forma un dímero donde cada subunidad posee su propio grupo hemo (Couchane *et al* 2000).

4.4.2 Mecanismo molecular de activación del pro-fármaco isoniazida mediante KatG

Las catalasas y las peroxidases son oxidoreductasas con mecanismos de acción similares. Poseen un grupo hemo que se encuentra en forma férrica (Fe^{3+}) en su estado basal. En un primer paso catalizan la heterólisis del enlace O-O del peróxido de hidrógeno, formándose agua y el compuesto I (que se muestra en la figura 4), un catión radical oxiferril porfirina π , aunque el radical también puede ubicarse en un residuo proteico. En las catalasas, este compuesto es reducido por otra molécula de H_2O_2 , mientras que en las peroxidases reacciona mediante dos transferencias de un solo electrón pasando por el compuesto II para regresar a su estado basal (Zámocky *et al* 2001).

En estudios realizados con la enzima KatG de *Mycobacterium smegmatis* se observó que la isoniazida puede activarse en ausencia de H_2O_2 pero en condiciones aerobias, funcionando la hidracina como agente reductor. Se postula como la forma catalítica un análogo del compuesto III de la peroxidasa de rábano que contiene la forma oxiferrosa en el grupo hemo (Magliozzo y Marcinkeviciene 1996), intermediario que ya se ha detectado experimentalmente (Yu *et al* 2003). Dicha especie puede también formarse al reaccionar la enzima en su estado basal con un anión superóxido (Wang *et al* 1998), formado por reacción de oxígeno molecular con metales traza. Este mecanismo se observó a su vez con la enzima de *M.tuberculosis* (Wengenack *et al* 1999).

Por otra parte se ha logrado observar mediante espectroscopía Raman y EPR la formación del compuesto I al reaccionar KatG con distintos peróxidos (Couchane *et al* 2000) y se ha identificado la formación de un radical tirosil a través de un intermediario análogo al compuesto I (Couchane *et al* 2002). Existe evidencia que KatG puede activar la isoniazida tanto por un mecanismo similar a la vía clásica de las peroxididasas como por una vía alternativa que involucra al superóxido (Figura 4). Mediante estudios en la mutante S315T de KatG, Wengenack y colaboradores (1999, 2000, 2001; Bulatovic *et al* 2002) proponen que la vía de las peroxididasas no es significativa para la activación de la isoniazida *in vivo* y que la vía del superóxido correlaciona adecuadamente con la resistencia observada en dicho mutante.

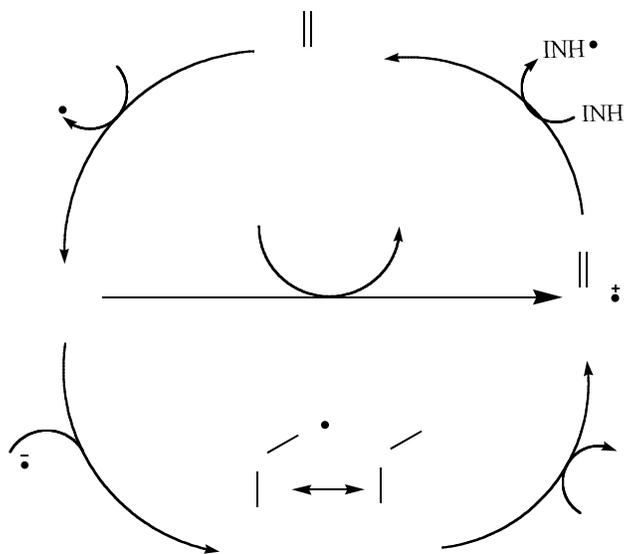


Figura 4. Posibles rutas para la activación de la isoniazida (Wengenack *et al* 1999, 2000)

4.4.3 Mutaciones relacionadas con la resistencia a isoniazida

Los cambios en la estructura de KatG causados por mutaciones genéticas pueden afectar su actividad. Por ser el activador de la isoniazida, dichos cambios se interpretan como resistencia a INH al verse disminuido su grado de activación.

Al secuenciar el gen *katG* de aislados clínicos de *M.tuberculosis* resistentes a INH se han encontrado numerosas mutaciones. Algunas de ellas son: D63E, D94A, H108Q, N138S, S140A, S160L, A172T, T180C, T262R, T275P, S315T, W328G, I335T, A350S, R463L, L587M, G629S, V710A, A717P (Heym *et al* 1995; Morris *et al* 1995; Rouse *et al* 1995; Musser *et al* 1996). Las dos mutaciones más frecuentemente encontradas son R463L y S315T. La mutación R463L es un polimorfismo, siendo las cepas que poseen leucina en dicha posición ancestros de las que tienen arginina. Algunos autores afirman que dicha mutación está relacionada con la resistencia a INH (Musser *et al* 1996), mas estudios de mutagénesis dirigida no han encontrado diferencia alguna en la actividad de esta mutante con la enzima silvestre (Saint-Joanis *et al* 1999).

La mutación S315T se encuentra en aproximadamente el 50% de los aislados clínicos. Debido a que proporciona resistencia considerable a la isoniazida y a que la enzima conserva su actividad de catalasa-peroxidasa, se ha utilizado este mutante en diversos estudios que describen el sitio activo. Se ha determinado que une eficientemente a la INH (Wengenack *et al* 1998), aunque con menor afinidad (Yu *et al* 2003); y que el potencial redox del grupo hemo es el mismo que en la proteína silvestre (WT) (Wengenack *et al* 2000). Difiere de WT en que su afinidad por el grupo hemo es menor, al igual que su afinidad por el superóxido (Yu *et al* 2003). A pesar de que la distancia entre el Fe y el N de la amida de la INH son idénticos (Todorovic *et al* 1999), el ambiente distal del Fe en S315T es distinto (Lukat-Rodgers *et al* 2000).

4.4.4 Estructura tridimensional

En las catalasas-peroxidases bacterianas se distinguen tres dominios: el N-terminal, el dominio catalítico que contiene el sitio activo y la región de unión al grupo hemo, y el dominio C-terminal. Las mutaciones en este último generalmente tienen poco o ningún efecto sobre la susceptibilidad a INH (Saint-Joanis 1999); pero se propone que interactúa

intramolecularmente con el dominio N-terminal, influenciando ya sea la estabilidad o la función de la enzima (Wilming y Johnsson 2001).

Se cuenta con numerosos datos acerca del sitio activo de la enzima KatG. Se detectó mediante EPR que el Fe del grupo hemo se encuentra como una mezcla de especies penta (5-c) y hexacoordinadas (6-c), principalmente de alto spin. Al unirse la isoniazida, el porcentaje de pentacoordinación aumenta (Wengenack *et al* 1998; Lukat-Rodgers *et al* 2000). Se sabe que en las catalasas-peroxidasas bacterianas la triada Arg-Trp-His se encuentra altamente conservada, correspondiendo a los residuos 104, 107 y 108 en la enzima de *M.tuberculosis* (MtKatG) (Zámocky *et al* 2001). Congruentemente con ello, se propone como ligando proximal al grupo hemo 6-c el imidazolato de H270; y como ligando distal el imidazol de H108 (Lukat-Rodgers *et al* 2000), lo cual se confirma en un modelo por homología de la CCP con la enzima KatG de *E.coli* (Powers *et al* 2001).

Mediante espectroscopía Raman se detectó que S315T se encuentra preferentemente en su forma 5-c. En ella no se forma un puente de hidrógeno distal a través de una molécula de agua con R104 (la forma 6-c). Se observó también que la unión de INH ocasiona un cambio en la conformación distal del sitio activo (Lukat-Rodgers *et al* 2001). La isoniazida se aproxima al grupo hemo mediante su grupo hidracina, ubicándose el N de la amida a 4Å del Fe (Todorovic *et al* 1999) y el anillo de piridina a aproximadamente a 12 Å, distancia que se conserva en S315T (Wengenack *et al* 1998).

El dominio N-terminal es el responsable de la dimerización de KatG. En él se encuentra una cisteína altamente conservada (Cys20) que forma un puente disulfuro entre las subunidades. Mediante estudios en que se mutó dicho residuo pudo demostrarse que la ruptura del puente disulfuro no afecta la dimerización, pues esta depende de la interacción entre los primeros 99 amino ácidos de cada monómero (Saint-Joanis 1999; Wilming y Johnsson 2001).

Al efectuar alineamientos múltiples de secuencias de peroxidasas de la familia I, se identificaron dos inserciones largas y una corta altamente conservadas en las KatGs. Se localizan entre las hélices A y B, D y E, y F y G. Corresponden a los residuos 87-98, 195-231 y 280-314 en MtKatG. Adicionalmente existe una tercera inserción larga entre las hélices G y H cuyo grado de conservación es mucho menor. La inserción corta puede influenciar el acceso a la triada catalítica y retardar la difusión de los sustratos a su sitio de

unión. La primera inserción larga puede controlar el acceso a la cavidad en el lado distal del grupo hemo y reorientar los residuos esenciales. La segunda es un asa situada en el lado proximal del grupo hemo, pudiendo influenciar su estructura y modular la fuerza de la coordinación del Fe con el N de la His proximal (Zámocky *et al* 2001). Al final de dicha inserción se encuentra el residuo S315, que se especula forma parte del canal de acceso del ligando. Un grupo metilo adicional podría interferir con el libre acceso del sustrato causando la resistencia observada (Saint-Joanis 1999).