



## Tuberculosis is not an illness of the past

**Title in Spanish:** *La tuberculosis no es una enfermedad del pasado*

Carmen Avendaño<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

**ABSTRACT:** The search for a cure for tuberculosis throughout history has been menaced by the increasing number of people with HIV and the continuous appearance of antituberculosis drug resistance. The development of diagnosis procedures, vaccines and drugs is updated in this review, emphasizing the methods to overcome resistances, the mechanisms of drugs action, and the best known or more vulnerable targets.

**RESUMEN:** La búsqueda de una cura para la tuberculosis a lo largo de la historia se ha visto amenazada por la explosión del número de enfermos de VIH y la aparición continuada de resistencias a los fármacos antituberculosos. En esta revisión se comenta el desarrollo de distintos métodos de diagnóstico, vacunas y fármacos, haciendo énfasis en los modos de superar las resistencias, los mecanismos de acción de los fármacos, y las dianas más conocidas o más vulnerables.

\*Corresponding Author: [avendano@farm.ucm.es](mailto:avendano@farm.ucm.es)

Received: July 20, 2015 Accepted: October 27, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 4 (2015), pp. 338-356

Language of Manuscript: Spanish

### 1. LA BÚSQUEDA DE UNA CURA PARA LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias, fundamentalmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) o bacilo de Koch. Éste se caracteriza por poseer una cubierta cérea, formada fundamentalmente por ácidos micólicos, que lo protege de los agentes externos (Figura 1).

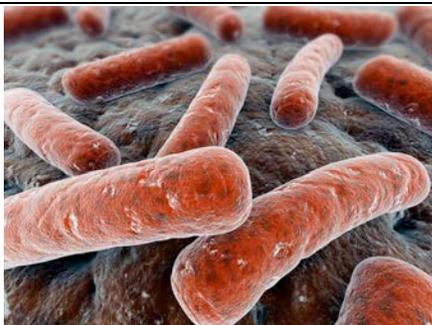


Figura 1. Aspecto exterior de *M. tuberculosis*.

Al complejo *Mycobacterium tuberculosis* pertenecen también *M. africanum* que produce la tuberculosis humana en África, *M. microti* que produce la tuberculosis en ratas silvestres, *M. canetti* capaz también de producir tuberculosis en humanos y *M. bovis* que infecta al ganado bovino y a distintos animales domésticos y silvestres, infectando al hombre a través de la ingestión de productos crudos contaminados como la leche o por inhalación (1). A estas especies se suman al menos otras sesenta micobacterias oportunistas, no tuberculosas, capaces de causar enfermedades en humanos (2).

El término tuberculosis (TB) se acuñó por primera vez por Johann Schönlein en 1839 para referirse a aquellos casos de tisis (TB pulmonar) en los que se observaban tubérculos, pequeños tumores duros que se forman cuando el sistema inmune construye una pared alrededor de la bacteria en los pulmones. La TB pulmonar puede diseminarse de los pulmones a los riñones, la columna vertebral y el cerebro, y se transmite generalmente por inhalación o ingestión de gotas infectadas. La infección de otros órganos puede producirse por distintas vías de transmisión y ofrecer diversos cuadros clínicos. Esta enfermedad ha hecho estragos desde tiempos prehistóricos, evidenciándose la presencia de lesiones en huesos humanos del Neolítico incluso en América (3). Se estima que el mayor porcentaje de población afectada transcurrió en los últimos años del siglo XVIII y a lo largo del XIX.

La tuberculosis se conoció con los nombres de consunción o tisis desde que Hipócrates (460-370 a. J.C) y la escuela de Kos establecieron este concepto para un proceso morboso causado por la supuración de úlceras pulmonares y caracterizado por caquexia progresiva, tos, hemoptisis, etc. Este cuadro englobaba realmente a todas las infecciones pleuropulmonares cronicadas. Los hipocráticos pensaban que la naturaleza dispone de recursos curativos, y el médico sólo debe evitar todo lo que pueda entorpecer esta acción. Por ello, la ausencia de excesos (incluidos los sexuales), el reposo prolongado, y una alimentación equilibrada, se consideraban fundamentales. La intervención activa incluía la práctica de sangrías para descongestionar de sangre pútrida el pulmón enfermo, la toraconcentesis con lancetas para drenar el líquido situado entre la pleura y la pared torácica,

la aplicación de cataplasmas, la inhalación de vapores de sandácara (una resina obtenida del enebro y otras coníferas), la instilación de vino aguada en la tráquea para provocar accesos de tos, etc.

En el siglo II d.J.C., Galeno intuyó que la tisis era contagiosa (Aristóteles lo supuso con anterioridad) y comprendió que el reposo del pulmón afectado era esencial para su curación, recomendando la administración de mezclas de plantas con propiedades balsámicas o sedantes de la tos. Los viajes por mar y la estancia en climas secos se consideraban muy beneficiosos. Durante la Edad Media, se inició la "cura por el toque real", un privilegio que se siguió practicando hasta comienzos del siglo XIX y que dispensaban algunos reyes para curar ciertas enfermedades sobre todo la escrófula, la forma más frecuente de infección extra-pulmonar de la tuberculosis diseminada por vía linfática que cuando coloniza los ganglios cervicales provoca unas úlceras características o "escrófulas". En esta práctica el rey imponía las manos sobre el enfermo diciendo: "El rey te toca y Dios te cura". En los primitivos hospicios-hospitales se daba gran valor a la administración de leche mezclada con sal y miel, mientras que los árabes recomendaban la infusión azucarada de pétalos de rosas.

En el Renacimiento se utilizaron toda clase de plantas balsámicas y expectorantes entre las que se incluía la pulmonaria, recomendada por Paracelso por su semejanza con la forma de un pulmón. En el siglo XVI, Jerónimo Fracastoro intuyó que la tisis y otras enfermedades se contagiaban por la acción de gérmenes que penetraban en el organismo con la respiración, y posteriormente se absorbían y transportaban por la sangre hasta las vísceras. En los siglos XVI y XVII, el azufre, el arsénico y los mercuriales, así como todo tipo de plantas procedentes del Nuevo Mundo (como la quina, el té, el cacao y el tabaco), se utilizaron sin ningún resultado práctico, pero en el siglo XVIII se redactaron en algunas ciudades de España e Italia normas profilácticas como las ordenanzas reales promulgadas por Fernando VI en 1751, que incluían la declaración obligatoria de los casos, el aislamiento de los enfermos, y la enajenación y quema de los objetos personales de los fallecidos. En el resto de Europa eran pocos los que creían que la tisis era una enfermedad contagiosa, por lo que estas ordenanzas se derogaron tras las conquistas napoleónicas. Por estas fechas, la tisis se conoció como plaga blanca por la palidez de los pacientes, y como enfermedad de los artistas por el aspecto etéreo y pálido del enfermo, que representaba la renuncia de lo mundano que caracterizó al romanticismo.

La demostración de que la tuberculosis era inoculable, realizada por el médico francés Villemin en 1865, y el aislamiento y cultivo de los bacilos responsables de la enfermedad por R. Koch entre los años 1880 y 1882 (4), hicieron posible que se catalogara definitivamente como enfermedad infecto-contagiosa, se desvaneciera la leyenda romántica en torno a ella, se asociara su propagación a la pobreza e insalubridad que caracterizaban a las ciudades europeas y norteamericanas de esa época, y se sentaran las

bases de la lucha antituberculosa. La importancia de esta lucha se refleja en la abundante literatura que trata de la búsqueda de una cura para la tuberculosis (5).

A pesar de estos avances se siguieron utilizando medicamentos de lo más diverso e ineficaz, como el arsénico, el tanino, el yodo, las inhalaciones de alquitrán, la creosota, e incluso el alcohol, poniéndose de moda largas estancias en ciudades como Roma o Venecia porque se consideraba a la malaria (habitual en dichas ciudades) una enfermedad antagonica de la tisis.

Los centros para curas de reposo, descritos magistralmente en la novela de Thomas Mann "La Montaña Mágica", se multiplicaron a partir de los años 1860 y fueron la mejor alternativa al tratamiento hasta el advenimiento de la quimioterapia, sobre todo en las fases iniciales de la enfermedad. Los buenos resultados que producían se atribuyen hoy a que la nutrición equilibrada y la exposición gradual a la luz solar colaboraban a restablecer los niveles de vitamina D, esencial para la función de los macrófagos, mientras que el reposo en cama junto al ejercicio moderado favorecían la perfusión pulmonar en las áreas cavitadas (6).

En 1890 Koch propuso la administración por vía inyectable de un derivado purificado de antígenos de *M. tuberculosis* al que se denominó tuberculina, que perseguía acelerar la respuesta inmune activando la formación de anticuerpos específicos y reforzar las defensas normales del organismo atacado mediante la intensificación de la respuesta inflamatoria en las lesiones tuberculosas. Esta "vacunación activa" se generalizó en Europa y Estados Unidos, donde se utilizaron gran variedad de preparados y de pautas de administración. Aunque estos tratamientos demostraron finalmente ser ineficaces contra la enfermedad, fueron útiles para el diagnóstico de la TB latente mediante el test de Mantoux. La tuberculina también ha inspirado algunas inmunoterapias, como la inoculación de *Mycobacterium vaccae*, una especie no patogénica de la familia de las *Mycobacteriaceae* que viven naturalmente en el suelo (7), y la vacuna RUTI<sup>®</sup> (8).

Hacia 1930 la tuberculosis pulmonar se había convertido en una enfermedad quirúrgica debido al incesante desarrollo de nuevas técnicas, comenzando por la práctica de neumotórax terapéuticos. El italiano Carlo Forlanini, basándose en estudios previos de Toussaint que demostraban la buena evolución de las lesiones tuberculosas cuando se producía un neumotórax espontáneo, practicó en 1888 el primero de estos neumotórax mediante la punción con una aguja de la cavidad pleural y la introducción de nitrógeno. En la misma época, el cirujano norteamericano J. B. Murphy realizaba experiencias similares, utilizando un grueso trócar que introducía por una incisión en la cavidad torácica. El colapso pulmonar favorecía los procesos de cicatrización de una manera más evidente que todos los procedimientos anteriormente ensayados, y la colapsoterapia adquirió rápidamente una gran importancia. En 1907, Friedrich practicó las primeras toracoplastias con extensas resecciones costales que alteraban la estructura

torácica y producían una mortalidad elevada, pero después se comprobó que se obtenían buenos resultados con toracoplastias parciales menos agresivas.

En 1920 el microbiólogo A. Calmette y su ayudante, el veterinario C. Guerin, consiguieron una especie bacilar de origen bovino y de escasa virulencia capaz de desarrollar cierto grado de inmunidad activa frente a la tuberculosis (ver el apartado 3). La vacuna BCG que desarrollaron fue la gran esperanza para muchos; sin embargo, pese a su amplia difusión, ha pasado en la actualidad a un segundo término ante el poderoso impacto de la quimioterapia moderna, que comenzó en 1929 con el descubrimiento de la actividad antibacteriana de la penicilina por A. Fleming.

Las aproximaciones quimioterápicas empezaron a generalizarse en los años 1920 con la administración de sales de oro, que se utilizaron hasta la llegada de la estreptomycinina en 1945. Debido a que parte de los pacientes tuberculosos pueden curarse espontáneamente, incluso aquellos con frotis de esputo positivos al microscopio, la eficacia de los tratamientos antituberculosos fue difícil de determinar antes del establecimiento de los ensayos clínicos controlados. Esto explica que se utilizaran durante varios años algunas sales de oro antes de que se demostrara su ineficacia (9).

En 1942 se descubrió que ciertas sulfonamidas, especialmente promizol, eran capaces de matar micobacterias (10) y en 1952, tres compañías farmacéuticas: Bayer en Alemania y Hoffman La Roche y Squibb en los Estados Unidos, descubrieron la actividad “milagrosa” en el tratamiento de la tuberculosis de la isoniazida (INH), un fármaco que ya se conocía en 1912. Desgraciadamente, como ocurre con todos los antituberculosos, pronto se desarrollaron resistencias. Igual ocurrió con la estreptomycinina (SM), un antibiótico aislado por Selman A. Waksman de cultivos del hongo *Streptomyces griseus*, activo pero tóxico para el nervio auditivo. Si se administraba en solitario, muchos enfermos reactivaban sus lesiones al cabo de pocos meses de aparente curación debido a la habilidad que posee *Mtb* para desarrollar cepas mutantes resistentes a la acción de este antibiótico. Afortunadamente, la administración conjunta de SM y ácido *para*-aminosalicílico (PAS, aislado en 1944) (11) minimizó este problema (12), y finalmente se estableció como el mejor tratamiento una terapia triple que incluía también INH. La mayor desventaja de esta terapia triple era su larga duración, necesaria para poder asegurar la esterilización de todos los reservorios bacilares y la no recurrencia de la infección. En este aspecto se llegó a un consenso de 18 meses continuados de tratamiento, aunque muchos médicos opinaron que al menos debería durar 2 años o incluso toda la vida (13).

Paralelamente, durante la década de los años 50 se fueron descubriendo algunos fármacos activos frente a *Mtb*, aunque ninguno superó la eficacia de la combinación INH, SM y PAS. Entre ellos se encuentran pirazinamida (PZA), viomicina, cicloserina, terizidona, kanamicina (a partir de la cual se desarrolló amikacina), capreomicina,

etionamida y protionamida. En 1961 se introdujo etambutol (EMB), aunque su eficacia se vio comprometida por su gran toxicidad óptica (14).

En 1957 se aisló de una muestra de suelo la bacteria *Streptomyces mediterranei* (ahora denominada *Amycolatopsis mediterranei*), que producía varios compuestos con actividad antibacteriana denominados rifamicinas. Un derivado semisintético de rifamicina S denominado rifampicina (RMP), obtenido en 1966 por Pietro Sensi, demostró una extraordinaria actividad por vía oral contra todas las poblaciones de *Mtb* y se incluyó por la OMS entre los 5 fármacos esenciales en la tuberculosis. Esta actividad se complementa con la de la pirazinamida (PZA), específica contra los bacilos intracelulares. Así surgieron las pautas cortas de quimioterapia que duran seis meses.

El prolífico desarrollo de las fluoroquinolonas comenzó en 1962 cuando Leshner y colaboradores descubrieron accidentalmente que el ácido nalidíxico, un producto secundario en la síntesis del antimalárico cloroquina, tenía actividad antibacteriana (15). Desarrolladas para el tratamiento de otras infecciones, las fluoroquinolonas se introdujeron después en el tratamiento de tuberculosis resistentes (16).

## 2. LA EXPLOSIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA TUBERCULOSIS

Debido a que la existencia de un sistema inmune eficaz en el huésped es crucial en la erradicación de las formas latentes en las que el bacilo evade o atenúa la inmunidad, la tuberculosis es un gran problema en los enfermos de SIDA. Hacia 1990, la devastadora interacción entre ambas infecciones causó una explosión de la incidencia de la tuberculosis en todo el mundo, acompañada de la rápida aparición de nuevas resistencias. En el año 2008 por ejemplo, enfermaron 11,5 millones de personas de las que murieron 1,9 millones. Un tercio de la población mundial presenta actualmente infección tuberculosa latente (ITL), y esta situación puede afectar también a las terapias que inhiben la respuesta inmune. Por ejemplo, se ha demostrado que el uso de terapias biológicas en el tratamiento de la artritis reumatoide aumenta la incidencia de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, por lo que es importante realizar un estudio previo al inicio del tratamiento para identificar a los pacientes con tuberculosis latente y disminuir el riesgo de reactivación de la enfermedad (17).

Hoy existen cepas de *Mtb* resistentes a múltiples fármacos (MDR-TB), especialmente a los fármacos de primera línea más efectivos como isoniazida y rifampicina, y cepas extensamente resistentes a fármacos (XDR) que representan un 95% de los casos de MDR-TB y son insensibles a rifampicina, isoniazida, fluoroquinolonas y, al menos, a uno de los fármacos inyectables amikacina, kanamicina y capreomicina. El espectacular incremento de las resistencias a fármacos ha puesto de manifiesto que no se puede bajar la guardia y que, para poder afrontar con garantías el reto de la lucha contra la tuberculosis en el

Tuberculosis is not an illness of the past

siglo XXI, es necesario un mayor esfuerzo económico destinado a la investigación de nuevos fármacos y de vacunas por parte de los países desarrollados. En el caso de Europa, el 85% de todos los nuevos casos de tuberculosis y las tasas más altas de MDR-TB se dan en Armenia, Azerbaiyán, Bielorrusia, Bulgaria, Estonia, Georgia, Kazajistán, Kirguistán, Letonia, Lituania, República de Moldavia, Rumanía, Federación de Rusia, Tayikistán, Turkmenistán, Turquía, Ucrania y Uzbekistán. La “Nueva Estrategia Final Mundial contra la Tuberculosis” y el “Plan de Acción Consolidado del Defensor Europeo” han manifestado recientemente que esta situación requiere innovaciones para un diagnóstico rápido y el acceso a nuevos tratamientos antituberculosos seguros y eficientes.

La OMS estimó que en 2013 se contagiaron 9.000.000 de personas, entre ellas 360.000 europeos (unos 1.000 cada día), y que 1,5 millones murieron a causa de la enfermedad. De estas muertes, más del 95% tuvieron lugar en países de ingresos bajos o medianos y 38.000 se produjeron en Europa. Datos semejantes se publicaron en 2014, por lo que la OMS aprobó en mayo de ese año una ambiciosa estrategia que abarca un periodo de 20 años (2016-2035) en la que se fijan objetivos y se perfilan distintas medidas para poner fin a esta epidemia. Así pues, aunque el número de enfermos tuberculosos va disminuyendo lentamente a nivel mundial, la tuberculosis no es una enfermedad del pasado.

### 3. DIAGNÓSTICO

La técnica habitual para el diagnóstico de la infección tuberculosa latente (ITL) es la prueba de la tuberculina (PT), llamada también test de Mantoux (18). Tras la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD), esta prueba pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad previo del organismo frente a dicha sustancia (en Europa se utiliza el derivado PPD RT23). El principal inconveniente de esta prueba radica en que las proteínas utilizadas no son específicas de *M. tuberculosis*, sino que están compartidas con otras micobacterias no tuberculosas y por *M. bovis*, hecho que disminuye su especificidad.

En los últimos años se han investigado y aprobado nuevos métodos diagnósticos basados en la cuantificación in vitro de la respuesta inmune celular, los llamados *interferon gamma release assays* (IGRA), que detectan la liberación en sangre de interferón gamma en respuesta a antígenos tuberculosos específicos y pueden complementar la PT. Esta detección se realiza por ensayos inmunoenzimáticos o determinando el número de manchas que representan la huella de un linfocito T individual secretor de interferón. La FDA aprobó el año 2001 *QuantiFERON-TB*, que detecta la liberación de interferón gamma en respuesta a PPD. El año 2004 aprobó *QuantiFERON-TB Gold*, más específica porque utiliza como antígenos péptidos sintéticos que simulan antígenos codificados por *M. tuberculosis* y ausentes en *M. bovis* BCG y en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas. En 2007 aprobó

*QuantiFERON-TB Gold In Tube* (QFT-GIT, Cellestis®), que incorpora un antígeno micobacteriano adicional. *T-SPOT.TB* (ImmuneDiagnostics®) es otra prueba diagnóstica desarrollada en Gran Bretaña (19). El diagnóstico de la tuberculosis es todavía inadecuado, especialmente en los pacientes con HIV, por lo que se siguen desarrollando nuevas tecnologías (20).

Para el seguimiento de la tuberculosis pulmonar suelen analizarse los cambios de apariencia que se observan en el pulmón por rayos X y la presencia de bacterias en las flemas, mientras que la sospecha de una infección de TB extrapulmonar se confirma generalmente con tomografía computerizada, resonancia magnética de imagen, análisis de sangre y orina, punción lumbar, o biopsia.

### 4. VACUNAS

En la década de los años 1880, Louis Pasteur descubrió que la virulencia de un microbio vivo podía atenuarse para producir vacunas, empezando por el cólera y siguiendo con la rabia y el ántrax. En 1908 se utilizaron estas técnicas para crear una vacuna contra la tuberculosis. Albert Calmette y Camille Guérin, tras observar que el crecimiento de *Mycobacterium bovis* en bilis de buey disminuía su virulencia, comprobaron que 230 pases seriados de un único aislado clínico eran suficientes para que los bacilos perdieran su capacidad de producir una tuberculosis fatal en diversos animales. Estos bacilos atenuados, a los que hoy se sabe que les faltan más de cien genes, inducían un infección limitada y una resistencia parcial a la reinfección con *M. tuberculosis* y *M. bovis* virulentos. La vacuna se denominó primeramente Bacille Bilie (de bilis) Calmette et Guérin, después Bacille Calmette Guérin, y finalmente vacuna BCG. A partir de 1921 comenzó a administrarse a bebés y niños, a los que protegía aparentemente con pocos efectos secundarios. A finales de 1929 y comienzos de 1930 ocurrió un grave accidente en Lubeck (Alemania), donde se administraron por error *Mtb* virulentos a más de 200 bebés. De ellos murieron 72 y la mayor parte de los restantes desarrolló tuberculosis, pero BCG superó este error y ha sido la vacuna más utilizada hasta el momento en todo el mundo. En España se administra una única dosis a los recién nacidos, cuando resulta más eficaz.

Aunque la vacuna BCG es todavía la única disponible para la tuberculosis, la inmunidad inducida que produce no evita que se pueda establecer la infección del bacilo tuberculoso, aunque sí la retrasa, y no es posible potenciar esta protección con una segunda dosis. Estos inconvenientes justifican el hecho de que desde hace más de 20 años se investiguen diferentes vacunas (21). Según Mangtani, la evaluación de cualquier nueva vacuna para la tuberculosis debe tener en cuenta que, lo mismo que ocurre con la vacuna BCG, una infección previa puede enmascarar o bloquear sus efectos (22). Hoy se sabe que los manósidos de fosfatidil-miinositol (PIM), que son muy abundantes en el bacilo Calmette Guérin y en la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, son agonistas de los receptores TLR2 (*Toll-like receptor 2*) implicados en la

respuesta inmune innata, activando a los macrófagos para que segreguen TNF- $\alpha$  (23).

Más de una docena de nuevas vacunas para la tuberculosis se han estudiado clínicamente o han entrado en ensayos clínicos (24). Entre ellas se encuentra MVA85A (*modified vaccinia Ankara 85A*), que utiliza virus vacuna modificados genéticamente y produce una inmunidad más prolongada que la vacuna BCG, aunque algunos resultados clínicos han sido bastante desalentadores (25). La vacuna MTBVAC (*Mycobacterium tuberculosis vaccine*) es una cepa viva atenuada a partir de un aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa Mt103). En esta cepa se han deletado por técnicas de ingeniería genética dos genes esenciales para la virulencia de la bacteria: el gen *phoP* y el gen *fadD26*, por lo que estas mutaciones cumplen con los requisitos esenciales que tiene que tener una vacuna viva para que sea segura en humanos. En los ensayos preclínicos en ratones y cobayas, MTBVAC demostró la misma seguridad y los mismos perfiles de distribución que la vacuna clásica BCG, confirmando una mayor protección frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Su descubridor, el Prof. Carlos Martín Montañés (responsable del Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza), consiguió ayudas estatales y privadas con las que se patentó MTBVAC en el año 2007, y posteriormente se consiguió una inversión adicional de 1.000.000 € a fin de desarrollar la tecnología necesaria para generar la vacuna. En el año 2009, la empresa CZ Veterinaria se interesó por el proyecto, lo cofinanció y creó la filial Biofabri para producir la vacuna si ésta llegaba a aprobarse. Tras comenzar los ensayos clínicos de seguridad en adultos (Fase 1) se preveía que pronto pudieran comenzarse los ensayos de seguridad en recién nacidos (26), pero estas perspectivas se vieron afectadas por los recortes de financiación realizados para salir de la crisis económica actual y, por el momento, su desarrollo requiere encontrar otras fuentes de financiación. En una situación semejante se encuentra otra potencial vacuna española para la tuberculosis, denominada RUTI<sup>®</sup>, que comentaremos seguidamente.

Además de estudiar vacunas preventivas más eficaces que BCG se desarrollan vacunas inmunoterapéuticas para ser administradas a individuos que padezcan TB activa en combinación con fármacos antituberculosos, a fin de acortar la duración de los tratamientos y reducir la recurrencia de la enfermedad.

Uno de los grandes problemas de la tuberculosis es el enorme reservorio existente de *Mtb*. Actualmente se calcula que alrededor de 2.000.000.000 de personas tienen una infección latente y que esta cifra se incrementará en un 50% el año 2020. Según la llamada “hipótesis dinámica” *Mtb* no está “dormido”, sino en lucha constante con el sistema inmune del huésped, de forma que el 10% de estas personas acabará finalmente desarrollando la enfermedad debido a una reacción inflamatoria muy intensa que incrementa el tamaño de las lesiones. Como ya hemos comentado, el problema es especialmente importante en

personas infectadas por VIH, para las que la OMS recomienda que reciban un ciclo de nueve meses de tratamiento preventivo con isoniazida. Estas personas no sólo tienen problemas para mantener la adhesión a un ciclo de tratamiento tan prolongado, sino que también pueden sufrir toxicidades hepáticas sobre todo si están tratadas simultáneamente con fármacos antivirales. Por ello, sería preferible una terapia preventiva de menor duración.

La vacuna RUTI<sup>®</sup>, cuya fórmula se patentó en 1998 por microbiólogos del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, conocido como Can Ruti, está basada en fragmentos de células de *M. tuberculosis* cultivados en condiciones de estrés. Induciendo una respuesta equilibrada de tipo Th1/Th2/Th3 contra antígenos de bacilos en estado latente, esta vacuna permite evitar la inmunodepresión en el hospedador infectado y tratado con una pauta de quimioterapia corta. Tras demostrar su eficacia en modelos experimentales con ratones, se iniciaron los ensayos clínicos en colaboración con Archivel Farma, una *spin off* creada en el año 2000 (27). En el año 2011 esta vacuna superó los ensayos realizados en Sudáfrica con 98 personas afectadas por tuberculosis y sida, pero su desarrollo se detuvo en 2011 por razones económicas. El equipo investigador trata en la actualidad de comercializar el probiótico Nyaditum Resae<sup>®</sup> (NR), basado en el cultivo de la nueva especie *Mycobacterium manresensis* descubierta en el río Cardener (28). Desarrollado por la *spin-off* Manremyc con investigadores de la Unidad Experimental contra la Tuberculosis (UTE) del Instituto Germans Trias i Pujol (IGTP) dentro de la UAB, este preparado actúa modulando el sistema inmune del huésped, “educándolo” para que no considere al bacilo como un peligro sino como un alimento. Por ser un probiótico, NR no está sujeto a las estrictas regulaciones de los fármacos y ya está disponible en el mercado.

Según los expertos, el desarrollo de vacunas contra la TB es un proceso tan complicado y dilatado en el tiempo que ningún país o institución podrían afrontarlo en solitario. Organizaciones como *Stop TB Partnership*, *Tuberculosis Vaccine Initiative*, o *AERAS Global TB Vaccine Foundation*, promueven la investigación de nuevas vacunas seguras y eficaces. Algunas de ellas tiene como base células enteras de micobacterias, mientras que otras contienen antígenos de *Mtb* expresados como proteínas recombinantes formuladas con adyuvantes o presentados en vectores virales. El principal problema encontrado hasta el momento es que los datos inmunológicos de los estudios preclínicos no suelen concordar con los resultados clínicos por la falta de modelos adecuados y por la necesidad de desarrollar biomarcadores que permitan evaluar su eficacia. La ausencia de éstos dificulta muchísimo la selección en una fase temprana y la evaluación clínica acelerada de los candidatos a nuevas vacunas. A pesar de las dificultades, se espera que las nuevas vacunas para prevenir la infección, la enfermedad o su recurrencia, contribuyan en

Tuberculosis is not an illness of the past

gran medida a la eliminación de la tuberculosis en el año 2050.

## 5. FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Actualmente, los fármacos antituberculosos (normalmente expresados con 3 letras o con una sola letra) se clasifican por su eficacia y potencia en 5 grupos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en su aplicación clínica. Los de 1ª línea (grupo 1), donde se encuentran los fármacos orales isoniazida (H/INH), rifampicina (rifampina en EEUU) (R/RMP), pirazinamida (Z/PZA), etambutol (E/EMB), rifapentina (P/RPT) y rifabutina (RFB), se recomiendan en las infecciones de *Mtb* no resistentes combinando 4 de ellos, generalmente rifampicina, etambutol, pirazinamida, e isoniazida durante

2 meses, seguido de un tratamiento adicional con rifampicina e isoniazida durante otros 4 meses (Figura 2).

El tratamiento de la MDR-TB es más complejo y requiere generalmente el uso de más de cuatro fármacos de 2ª línea (grupos 2, 3 y 4) durante unos 20 meses, con frecuencia fluoroquinolonas, amikacina, kanamicina y capreomicina (29). Estos fármacos suelen ser más tóxicos y mucho más caros que los de 1ª línea (30). En el grupo 2 se encuentran los antibióticos aminoglicósidos estreptomycin (S/STM), kanamicina (KM) y amikacina (AMK) y los polipéptidos capreomicina (CM) y viomicina (VIM), todos ellos inyectables (Figura 3).

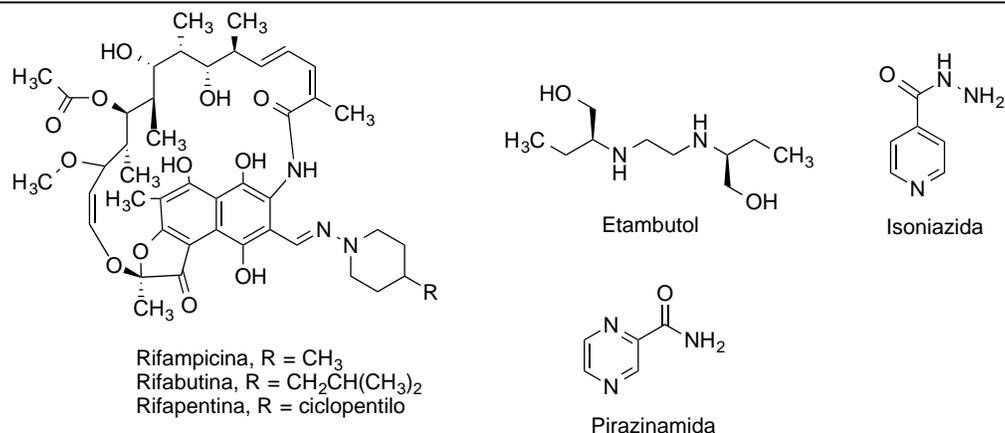


Figura 2. Antituberculosos del grupo 1.

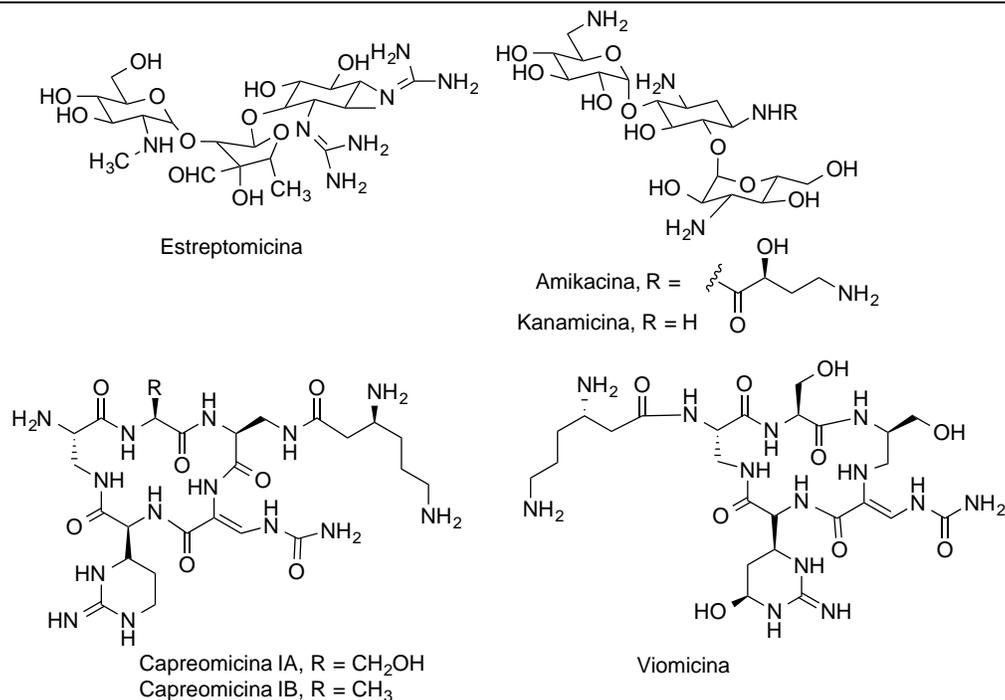


Figura 3. Antituberculosos del grupo 2.

En el grupo 3 se encuadran las fluoroquinolonas orales o inyectables ciprofloxacino (CFX), levofloxacino (LFX),

moxifloxacino (MFX), ofloxacino (OFX) y gatifloxacino (GFX) (Figura 4).

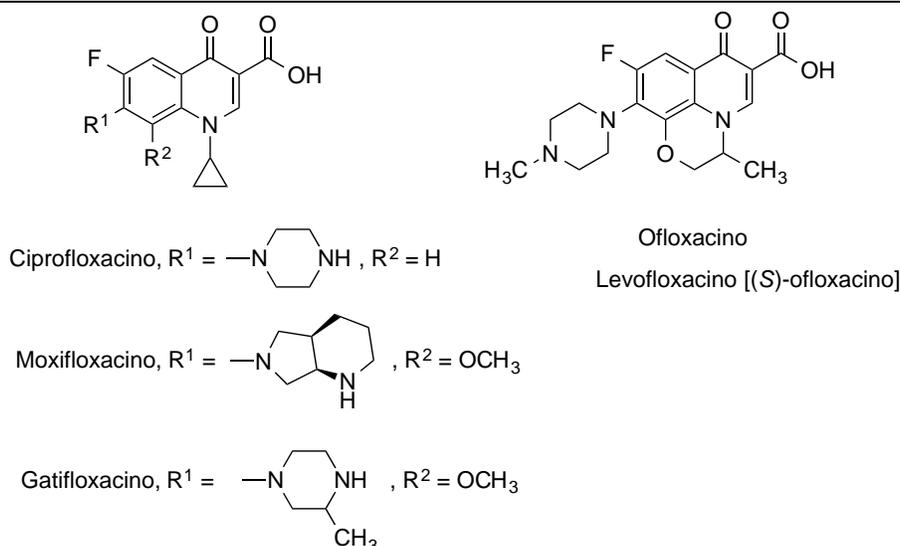


Figura 4. Antituberculosos del grupo 3.

En el grupo 4 se incluyen ácido *p*-aminosalicílico (PAS), cicloserina (CS), terizidona (TRD), etionamida (ETH), protionamida (PTO), tioacetazona (THZ) y linezolida (LZD), todos ellos fármacos orales (Figura 5).

Linezolida (Zyvox<sup>®</sup>) fue el primer antibiótico sintético de acción sistémica. Comercializado por Pfizer, inhibe la síntesis proteica al fijarse al sitio P (23s) de la subunidad ribosomal 50s. Terizidona (Terizidex<sup>®</sup>) es un análogo de cicloserina (31).

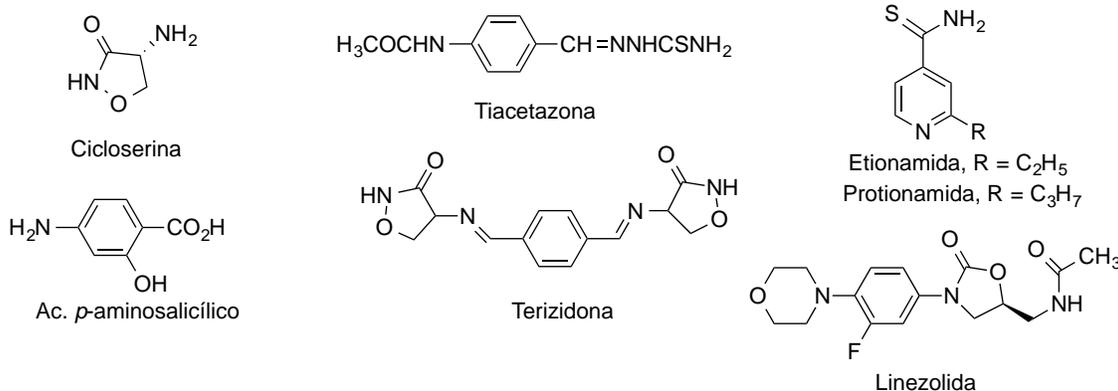


Figura 5. Antituberculosos del grupo 4.

En la 3ª línea, o grupo 5, se encuentran fármacos cuya eficacia como antituberculosos no está clara (32). Aquí se incluyen clofazimina (CFZ, Lamprene<sup>®</sup>, Figura 6), una iminofenazina utilizada en combinación con rifampicina en el tratamiento de la lepra que se investiga también para MDR-TB en combinación con otros antituberculosos: amoxicilina más ácido clavulánico (AMX/CLV), imipenemo más cilastatina (IPM/CLN), y claritromicina (CLR) (33). El tratamiento con IPM/CLN se emplea en XDR-TB, aunque su uso está limitado en principio por el precio y porque los pacientes requieren una inyección por vía intravenosa dos veces al día. En ciertos tratamientos se insertan portacaths para este propósito.

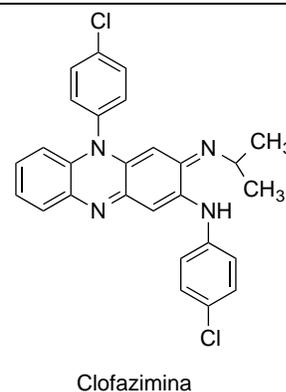


Figura 6. Estructura de clofazimina.

Tuberculosis is not an illness of the past

El 20º Comité de Expertos de la OMS añadió nuevas aplicaciones y nuevos fármacos a la Lista de Medicinas Esenciales (*List of Essential Medicines*) que afecta a la tuberculosis. La rifapentina se recomienda como preventivo en infecciones latentes (*Latent TB Infections*, LTBI), mientras que para las infecciones resistentes

MDR-TB y XDR-TB (*extensively drug-resistant TB*) se recomiendan linezolid y terizidona, que ya se utilizaban *off-label* en las formas severas de resistencia, y fármacos de aprobación reciente, como bedaquilina (BDQ) y delamanida (DLM, Figura 7) (34).

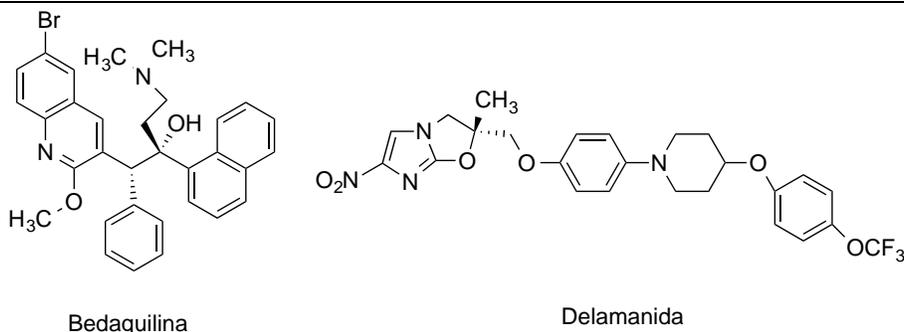


Figura 7. Estructura de bedaquilina y delamanida.

Bedaquilina (BDQ, TMC207, R207910, Sirturo®) se descubrió en el año 2005 en la empresa farmacéutica Tibotec, y se desarrolló en la empresa Janssen Pharmaceutica, siendo aprobada por la FDA en diciembre del año 2012 tras 40 años en que no se aprobaba ningún fármaco antituberculoso (35). Se seleccionó como un candidato a fármaco antituberculoso entre varios derivados de diarilquinolina por su capacidad para inhibir la sintasa de ATP micobacteriana (ver el Apartado 7) y por su actividad frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* susceptibles y resistentes (36). Su aprobación acelerada suscitó cierta controversia porque se utilizó como criterio, en vez de la disminución de la letalidad, su capacidad para convertir el cultivo de esputo de los pacientes de positivo para *Mtb* en negativo. El precio de 6 meses de tratamiento fluctúa entre 900 y 3.000 \$, por lo que este fármaco ha sido inasequible para un gran número de enfermos, aunque la organización *Stop TB Partnership* anunció que había empezado a distribuirlo a través de su programa *Global Drug Facility*. Desgraciadamente, ya han aparecido algunas cepas resistentes a bedaquilina (37), y por sus posibles efectos adversos debe prescribirse y vigilarse por expertos (38).

Delamanida (DLM, OPC-67683, Deltyba®) es un derivado de dihidro-nitroimidazooxazol desarrollado por la

empresa japonesa Otsuka que se aprobó en 2014 por la agencia japonesa del medicamento (*Japan's Pharmaceuticals Medical Devices Agency*) y por la agencia europea (EMA). Hasta el momento se comercializa en pocos países, pero se espera su registro en muchos más a lo largo de los años 2016 y 2017 (39). Delamanida se tolera generalmente bien, pero produce una prolongación del potencial de acción en el miocardio (intervalo QT del electrocardiograma). Este efecto secundario puede ser importante si el fármaco se asocia a otros antituberculosos que también lo producen, como es el caso de las fluoroquinolonas (40).

La asociación Médicos sin Fronteras está trabajando para asegurar que BDQ y DLM se incluyan en el año 2016 en los tratamientos de rutina en 25 países en que la tuberculosis es endémica.

Pretomanida (PA-824), un profármaco con mecanismo de acción complejo (41), y TBA-354 (42), que se desarrolla por la *Global Alliance for TB Drug Development* en colaboración con las universidades de Auckland e Illinois-Chicago (43), son análogos de delamanida derivados de dihidro-nitroimidazooxazina que han entrado en ensayos clínicos (Figura 8).

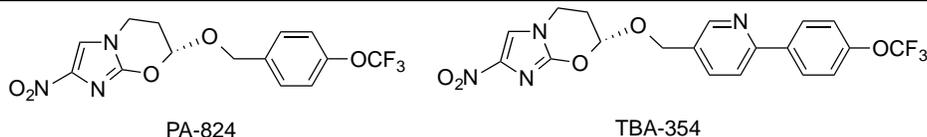


Figura 8. Estructura de PA-824 y de TBA-354.

Entre otros compuestos que han despertado el interés como antituberculosos y han entrado en ensayos clínicos (44) mencionaremos también al derivado de etilendiamina SQ109, que posee una potente actividad en MDR-TB y se desarrolla por la empresa Sequella (Figura 9). Su actividad antituberculosa se identificó por cribado de alto rendimiento de una biblioteca combinatoria de

análogos de etambutol. La FDA y la EMA le concedieron en 2007 la categoría de "fármaco huérfano" para el tratamiento de tuberculosis sensibles y resistentes, y su estudio clínico aún continúa (45). Sequella también ha identificado el compuesto SQ609 como el más activo de una serie de derivados de dipiperidina inhibidores potenciales de la pared bacteriana, aunque no se conoce

con detalle su mecanismo de acción (46). Sutezolida (PNU-100480) y AZD-5847 son derivados de linezolida. El primero es un tiomorfolinil análogo de linezolida, más eficaz en *M. tuberculosis*, que posee una eficacia

semejante a INH y RMP (47). El segundo, que desarrolla Astra Zeneca, posee acción bactericida en aislados de *M. tuberculosis* susceptible, MDR- and XDR (48).

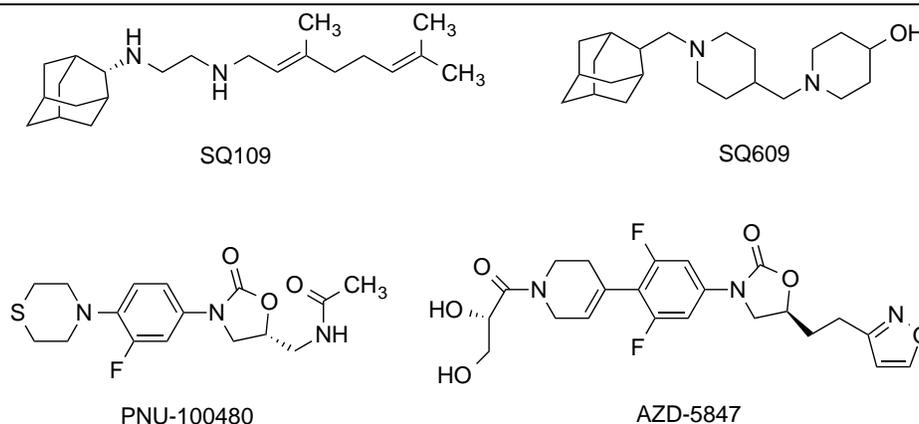


Figura 9. Estructuras de SQ109, SQ609, PNU-100480 y AZD-5847.

Muchos nuevos antituberculosos están surgiendo por cribado de alto rendimiento de grandes bibliotecas de compuestos (49). Junto a estos fármacos, dado que los mecanismos de defensa del huésped pueden conducir a una respuesta inflamatoria excesiva e ineficaz que origina la destrucción de los tejidos, se explora también el uso de algunas inmunoterapias adyuvantes.

## 6. ALGUNOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Un fármaco antituberculoso no sólo debe mostrar actividad antibacteriana sino inhibir el desarrollo de resistencias. La tragedia de la tuberculosis reside en que, habiendo transcurrido 60 años desde la introducción de una quimioterapia específica, el número de infecciones por organismos resistentes a la mayoría de los tratamientos antituberculosos ha ido en aumento (50). *M. tuberculosis* puede localizarse en cavidades pulmonares en las que el acceso de los antibióticos es difícil o éstos son desactivados en su mayoría por el bajo pH de aquellas (51). Según su localización, estos reservorios pueden o no ser atacados por los fármacos antituberculosos. Por ejemplo, isoniazida es crítica para los tratamientos tempranos porque es activa en bacilos que crecen en cavidades pulmonares aeróbicas. Pirazinamida es activa contra microorganismos intracelulares, sobre todo en el medio ácido de los macrófagos, siendo ideal para matar a los bacilos dentro de los focos de necrosis caseosa. Rifampicina, que inhibe la actividad de la ARN polimerasa bacteriana dependiente de ADN, es activa contra *M.*

*tuberculosis* de crecimiento lento e intermitente.

El mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos antituberculosos se ha descrito en los últimos 20 años y se ha empezado a entender de qué forma los microorganismos se hacen resistentes (52). Las resistencias observadas pueden deberse a mutaciones en las dianas de los fármacos o en las enzimas encargadas de su bioactivación si son profármacos (como ocurre por ejemplo en isoniazida, pirazinamida y etionamida). Para evitarlas o superarlas se utilizan combinaciones de fármacos que actúen por diversos mecanismos. A estas combinaciones se van incorporando nuevos compuestos que actúan sobre dianas ya conocidas o sobre las nuevas dianas que se van descubriendo (Figura 10).

Rifampicina tiene como diana a la polimerasa RNA, los aminoglicósidos al ribosoma bacteriano, y las fluoroquinolonas a las girasas de ADN (53). Las oxazolidinonas tienen distintos mecanismos de acción, pero se enlazan a la subunidad 23S del ribosoma bacteriano bloqueando la síntesis de proteínas. El uso continuado de linezolida, el único representante aprobado hasta el momento, produce gran toxicidad hematológica y neurológica debido a que también inhibe la síntesis mitocondrial de proteínas, haciendo necesaria una reducción de la dosis o su retirada (54). Por esa razón se necesitan nuevos fármacos de esta clase más eficaces y menos tóxicos, como es el caso de sutezolida (PNU-100480) y AZD-5847 (Figura 9).

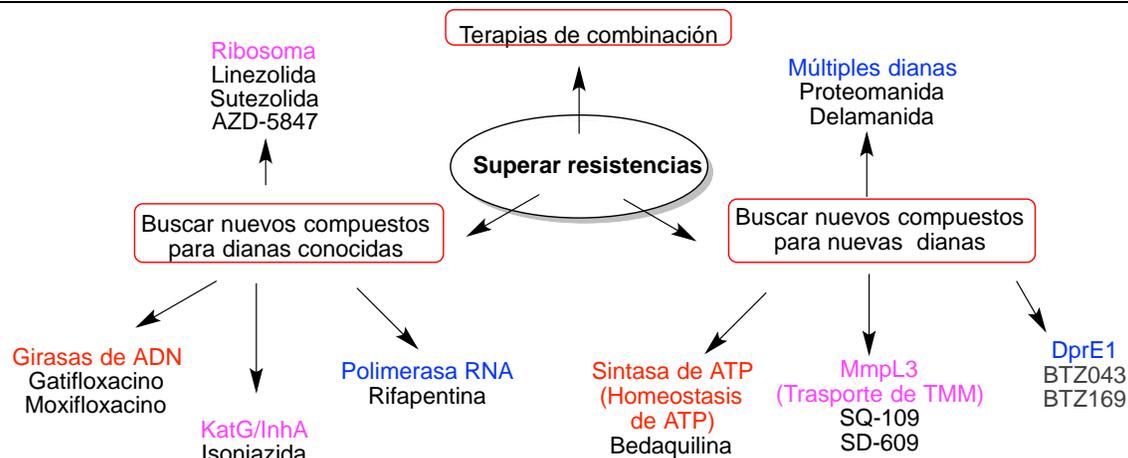


Figura 10. Ejemplos de dianas, mecanismos y fármacos antituberculosos.

Entre las enzimas implicadas en la biosíntesis de la cubierta bacteriana (55), se encuentra la enoil reductasa InhA (*Mtb enoyl-acyl-carrier-protein reductase*) (56,57) que tiene gran importancia para las micobacterias (58). Entre sus inhibidores se encuentran isoniazida, etionamida y protionamida (Figuras 2 y 5), que en realidad son profármacos. Etionamida y protionamida se bioactivan por la enzima *Mtb* EthA, una monooxigenasa de flavina (59) cuya producción está controlada por el represor de su transcripción EthR. La forma oxidada de ETH puede formar aductos con el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) inhibiendo a la enzima InhA. La isoniazida se bioactiva por la acción de la catalasa-peroxidasa *Mtb* KatG formando un hipotético radical acilo que se enlaza también a NAD<sup>+</sup>. El aducto covalente formado con el metabolito activo de isoniazida (**1**, Figura 11) es análogo de la forma reducida del cofactor (NADH), y compite con él para inhibir la enzima InhA. Desde la aparición de resistencias a isoniazida se han buscado otros inhibidores de InhA, que en su mayoría bloquean el lugar de unión de la enzima con el sustrato lipídico (60). La búsqueda de inhibidores que bloqueen la unión con el cofactor NADH fue infructuosa hasta el descubrimiento de un antibiótico producido por bacterias del suelo no patógenas denominado piridomicina (**2**, Figura 11). Se trata de un ciclodepsipéptido de 12 eslabones que no necesita bioactivarse y que, aunque no es un mimético de

NADH, inhibe la unión de este cofactor a la enzima InhA (61).

La descripción a nivel molecular del enlace entre la piridomicina y la enzima InhA no ha sido posible hasta fechas recientes porque no se había encontrado una técnica para obtener cristales del complejo InhA/NADH/piridomicina útiles para su estudio por difracción de rayos X. Este problema se ha resuelto, demostrándose que piridomicina se enlaza a dos lugares: al bolsillo de unión de InhA con su cofactor NADH y al lugar de unión con su sustrato lipídico (62). Además de su eficacia, piridomicina es un prometedor antituberculoso porque no tiene que bioactivarse como isoniazida, siendo activo frente a cepas de *M. tuberculosis* que se han hecho resistentes a través de mutaciones en el gen *katG*. Sin embargo su vida media es muy corta, y su uso terapéutico requiere en primer lugar la optimización de su farmacocinética a través de la síntesis de análogos (63). Tanto isoniazida como piridomicina inhiben la producción de ácidos micólicos, compuestos grasos presentes en la pared celular de la bacteria que la protegen de las agresiones de los fármacos tradicionales y le permiten sobrevivir a tratamientos farmacológicos de corta duración e incluso la esconden del sistema inmunológico.

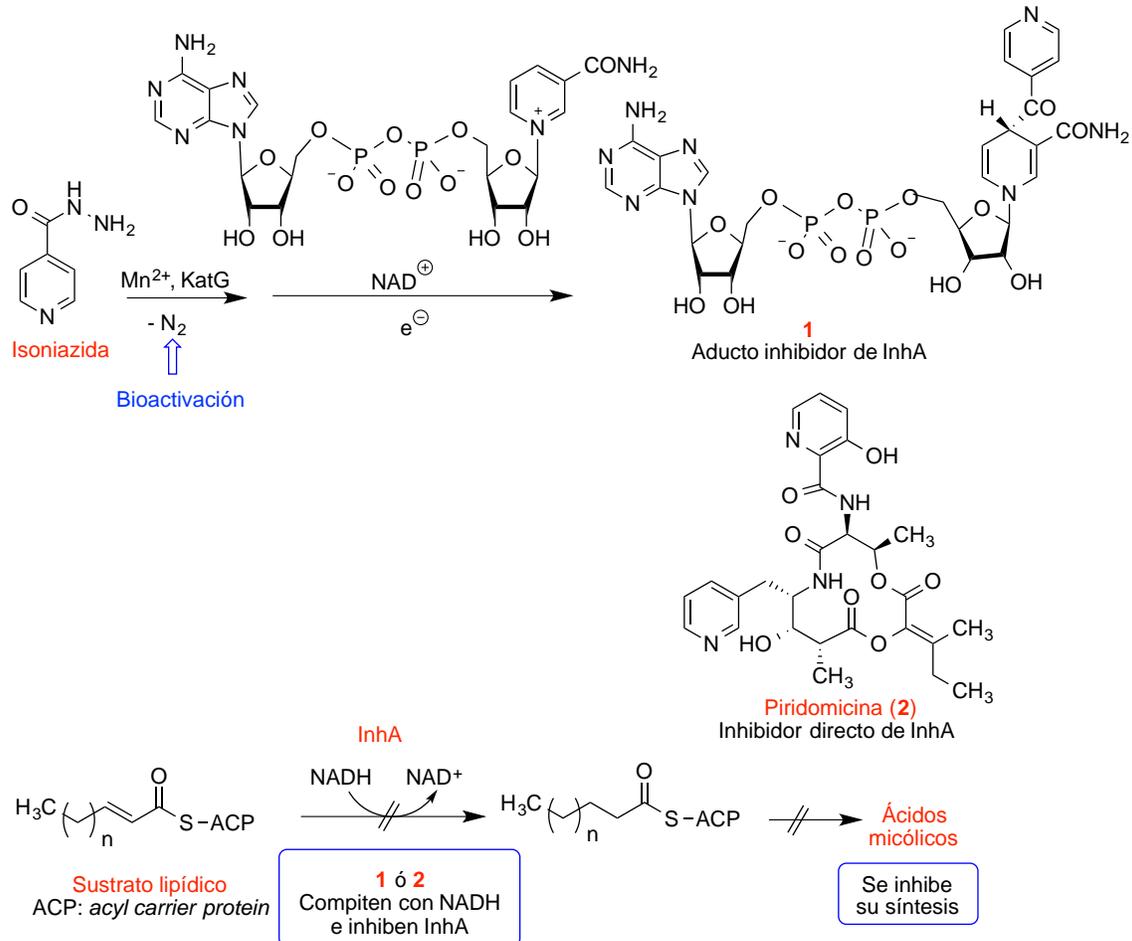


Figura 11. Inhibición de InhA por isoniazida o piridomicina.

La combinación de viejos fármacos que son eficaces pero tóxicos, como la etionamida, con inhibidores específicos de los mecanismos de resistencia desarrollados por *M. tuberculosis*, permitiría el uso de aquéllos. Estas aproximaciones terapéuticas dirigidas a potenciar la acción de antibióticos (*boosting antibiotics*) actuando sobre enzimas implicadas en el metabolismo del agente patógeno son de gran actualidad. Entre estas terapias de combinación merecen destacarse los buenos resultados de la asociación de etionamida con derivados de 1,2,4-oxadiazol como BDM31343, BDM31381 y BDM41906 (Figura 12), ya que éstos son capaces de potenciar la eficacia de dicho profármaco evitando la aparición de

resistencias a través de la inhibición de la interacción de EthR con el ADN. EthR es un represor de la transcripción de la monooxigenasa micobacteriana EthA que activa a la etionamida, por lo que permiten reducir su dosis y aumentar su índice terapéutico haciendo posible su uso como antituberculoso de primera línea (64). La toxicidad de etionamida, atribuida a los S-óxidos que origina la monooxigenasa de flavina del huésped, produce efectos secundarios como hepatitis y malestar gastrointestinal, y estos efectos dificultan la adherencia al tratamiento de los pacientes facilitando la aparición de resistencias, por lo que se utiliza sólo como tratamiento de segunda línea en TB causada por cepas MDR y XDR de *M. tuberculosis*.

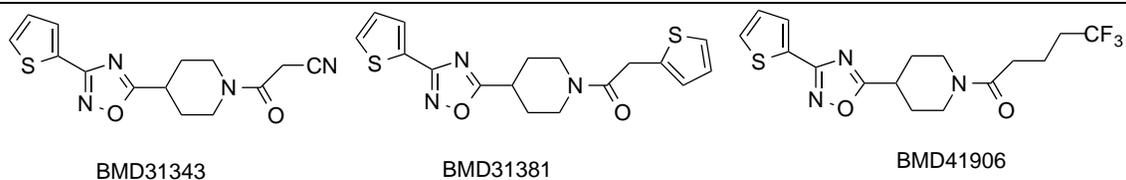


Figura 12. Estructuras de algunos inhibidores de EthR.

## 7. ESTUDIOS GENÓMICOS Y NUEVAS DIANAS

La implementación de procedimientos rápidos, sensibles y específicos para la identificación de *M.*

*tuberculosis* y sus variantes genéticas es clave para entender su virulencia y contribuir al diseño de nuevos procedimientos profilácticos o terapéuticos que permitan la erradicación de la enfermedad. El genoma de *M.*

Tuberculosis is not an illness of the past

*tuberculosis* alberga alrededor de 4.000 genes y destina una gran parte de su capacidad codificadora a la producción de enzimas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis. Este genoma codifica enzimas implicadas en la biosíntesis lipídica que son propias de plantas y de mamíferos, pero en su mayor parte son enzimas que catalizan la degradación de sus propios lípidos o de lípidos situados en las membranas celulares o vacuolares del huésped. Esta función resulta decisiva para su patogenicidad y para la obtención de energía.

Otra diferencia importante de *Mtb* a nivel genético es que codifica proteínas ricas en glicina denominadas PE y PPE, que poseen motivos Pro-Glu y Pro-Pro-Glu en el extremo N-terminal, respectivamente. El elevado grado de polimorfismo de estas proteínas sugiere que podrían ser antígenos con capacidad para interferir la respuesta inmune inhibiendo el procesamiento antigénico necesario para su presentación. Dentro de la familia PE se encuentran las proteínas PGRS, que poseen cierto paralelismo con los antígenos del virus Epstein-Barr (EBNAS) que aprovechan el sistema ubiquitina-proteasoma para regular su persistencia en huéspedes inmunocompetentes impidiendo la presentación de algunos antígenos (65).

Desde que en 1998 se publicara el genoma de la cepa H37Rv (66), se han secuenciado otras cepas aisladas de pacientes, y se ha visto que existe una correlación inversa entre el porcentaje de genoma deleciónado de cada clon y el porcentaje de pacientes infectados con dicho clon que presentan cavitación pulmonar. Es decir, la acumulación de deleciones en *M. tuberculosis* conduce a una disminución de la virulencia de la bacteria. Además, el genoma de *M. tuberculosis* es inusualmente inerte, lo que significa que se trata de un organismo relativamente joven o que, en términos evolutivos, ha experimentado recientemente un “cuello de botella”. Un estudio dirigido al estudio de 24 genes que codifican antígenos que tienen como diana al sistema inmune humano, ha confirmado que la variación en los genes estructurales de *M. tuberculosis* es despreciable (67).

Entre las nuevas dianas de fármacos antituberculosos que se están explorando, la enzima decaprenilfosforil- $\beta$ -D-ribofuranosa-2'-epimerasa (DprE1) está emergiendo como una de las más vulnerables, y entre sus inhibidores se encuentran las benzotiazinonas BTZ043 y BTZ169 (Figura 13), que producen el bloqueo de la biosíntesis de arabinosida, componentes vitales de las paredes de las micobacterias (68).

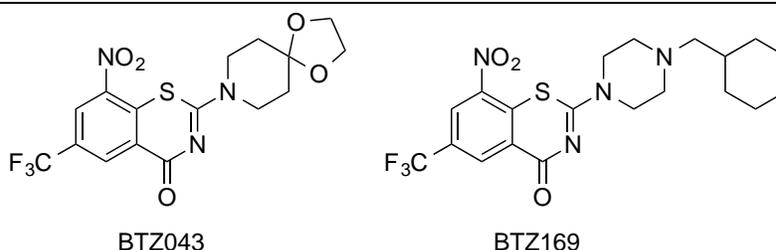
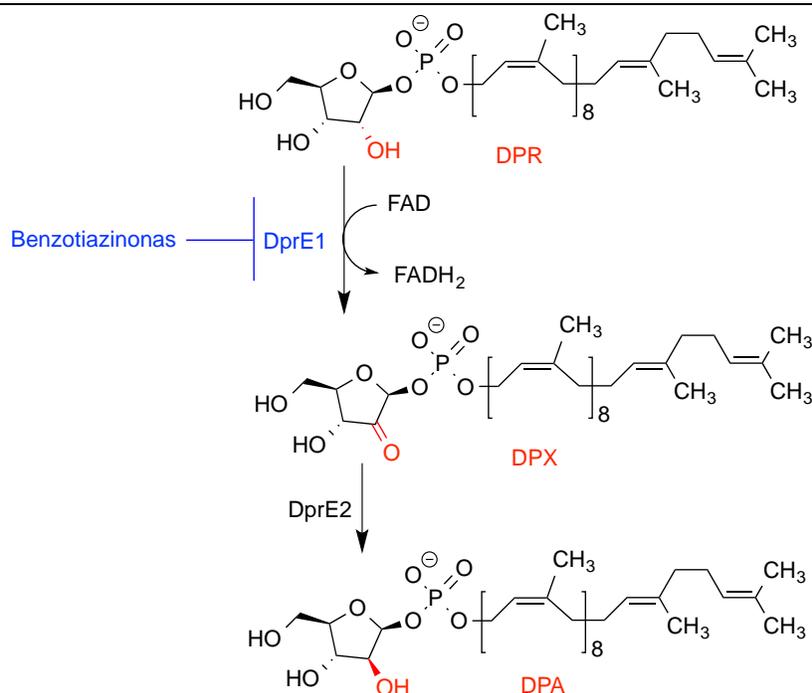


Figura 13. Ejemplos de benzotiazinonas con actividad antituberculosa.

La enzima DprE1 cataliza el primer paso de la epimerización del grupo 2'-hidroxilo de decaprenilfosforil- $\beta$ -D-ribofuranosa (DPR), esencial para la biosíntesis de la

pared bacteriana, a través de un proceso dependiente de flavina adenina dinucleótido (FAD, Figura 14).



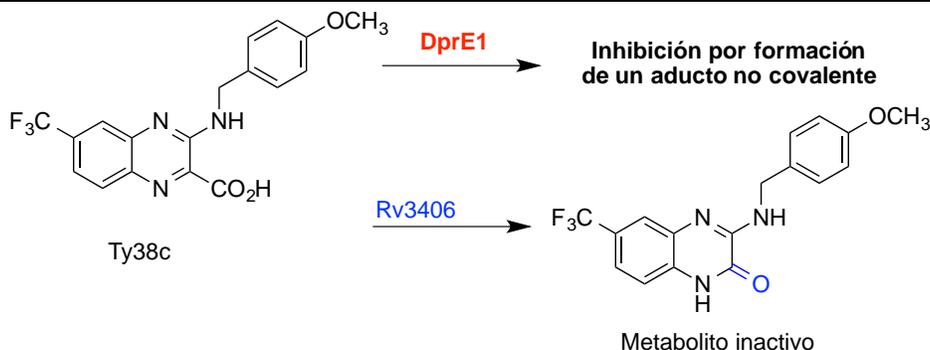
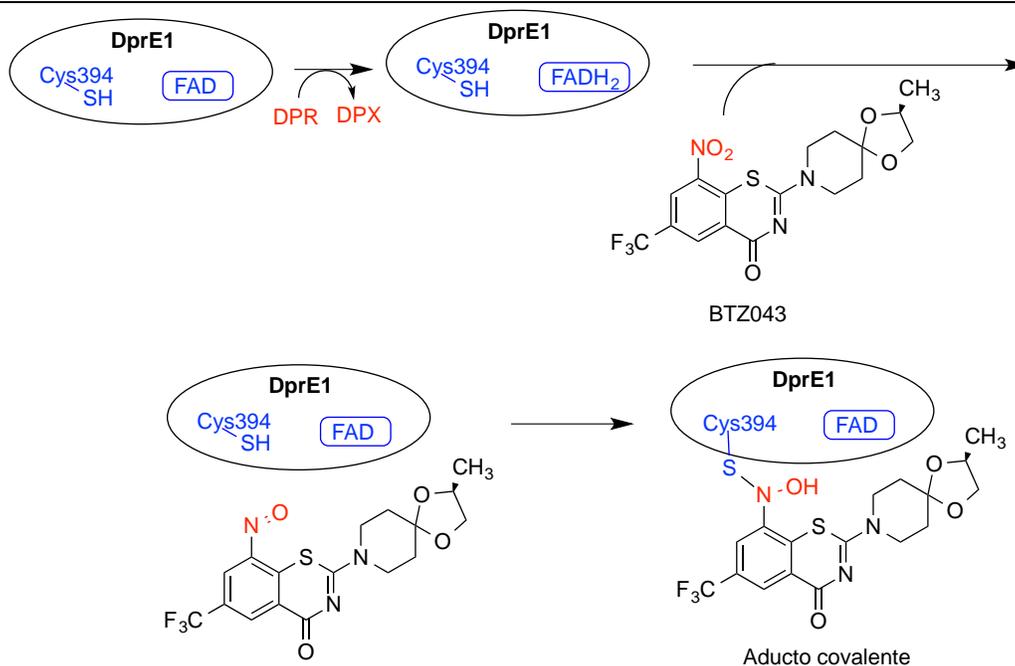
**Figura 14. Inhibidores de la reacción catalizada por la enzima DprE1.**

La benzotiazinona BTZ043, y supuestamente sus análogos, inhiben covalentemente esta enzima a través de la formación de un aducto con el residuo de cisteína de su centro activo Cys394 de tipo hemimercaptal (Figura 15).

El compuesto BTZ169, fruto de varios años de trabajo dirigido en gran parte a optimizar las propiedades farmacocinéticas de las benzotiazinonas, se mostró muy eficaz en combinación con bedaquilina y pirazinamida para el tratamiento de la tuberculosis utilizando un modelo de ratón, por lo que se han iniciado los ensayos clínicos con dicha combinación (69). Su desarrollo está en manos de la *spin-off Innovative Medicines for Tuberculosis (iM4TB)*, que cuenta con la ayuda económica de la

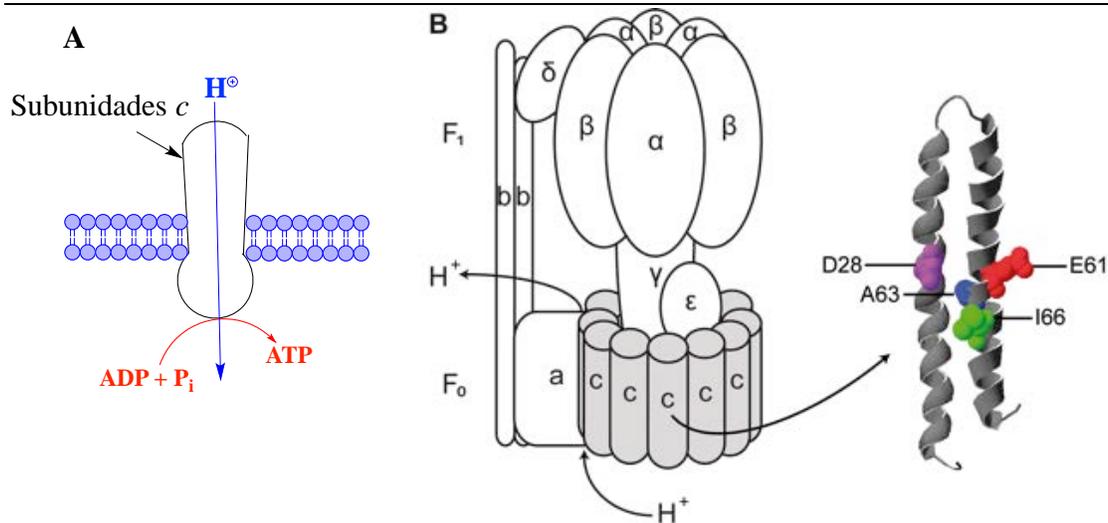
Fundación *Bill & Melinda Gates* y del Consorcio *More Medicines for Tuberculosis* dentro del Séptimo programa Marco de la UE.

Otro inhibidor de la enzima DprE1 es Ty38c, descubierto en el cribado fenotípico de una biblioteca de derivados de quinoxalina y actualmente candidato para su estudio clínico. Este compuesto es un bactericida activo intracelularmente que, según ha demostrado la difracción de rayos X, es un inhibidor no covalente y no competitivo de dicha enzima (70). Ty38c se inactiva a través de una descarboxilación catalizada por la dioxigenasa Rv3406 (Figura 16).



Otras nuevas dianas de fármacos antituberculosos son enzimas implicadas en la homeostasis de adenosina trifosfato (ATP) como reservorio de energía (71). El desarrollo de sus inhibidores se basó en el conocimiento de que las formas latentes o hipóxicas de *Mbt* tienen menores niveles de ATP. Entre estos compuestos destaca el fármaco aprobado por la FDA bedaquilina (BDQ, Figura 7), que inhibe la sintasa de ATP a pH ácido y neutro. La sintasa de ATP tiene un papel esencial en el metabolismo energético y está situada en las membranas celulares de

bacterias, plantas y animales. Su principal función es la síntesis del ATP a partir del correspondiente difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi), utilizando para ello la diferencia del potencial electroquímico de protones que se genera en la respiración o en la fotosíntesis (Figura 17). BDQ mimetiza residuos de esta bomba iónica que son esenciales en la transferencia de protones, bloqueando subunidades *c* durante la catálisis (72).



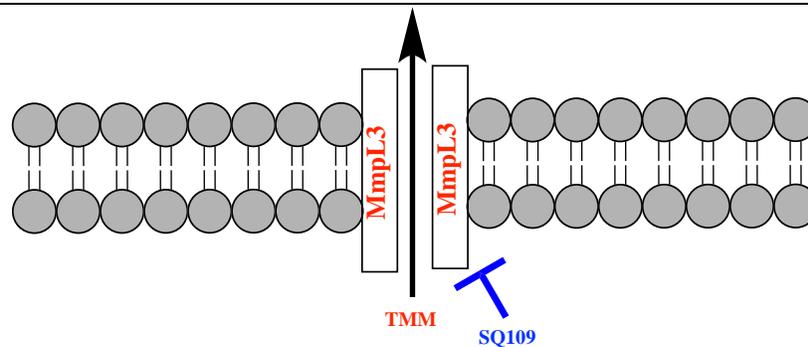
**Figura 17. A: Representación esquemática de la función de la sintasa de ATP. B: Estructura polimérica de la sintasa de ATP y representación de la subunidad *c* de *Mycobacterium tuberculosis*.**

En esta figura, adaptada de la referencia 72a, se ha representado en rojo el residuo de ácido glutámico esencial para el transporte de protones (E61), y en distintos colores las mutaciones que afectan a su sensibilidad a bedaquilina.

Delamanida (DLM, OPC-67683, Delyba<sup>®</sup>) fue activo frente a *Mycobacterium tuberculosis* in vitro e in vivo (72), determinándose después que este nitro-dihidroimidazooxazol es un profármaco que se activa por la nitrorreductasa dependiente de deazaflavina Rv3547 e inhibe la síntesis de los ácidos metoxicimólico y

cetomicólico, componentes de la pared bacteriana, posiblemente a través de un radical intermedio.

Los derivados de etilendiamina, como SQ109 y sus análogos (Figura 9), actúan inhibiendo varias dianas. Una de ellas es la bomba de transporte MmpL3, que trasloca ácidos micólicos unidos a trehalosa (TMM) desde el citoplasma donde se sintetizan a la membrana plasmática donde se transfieren al arabinogalactano de la pared celular, o forman glicolípidos asociados a la virulencia (Figura 18) (74).

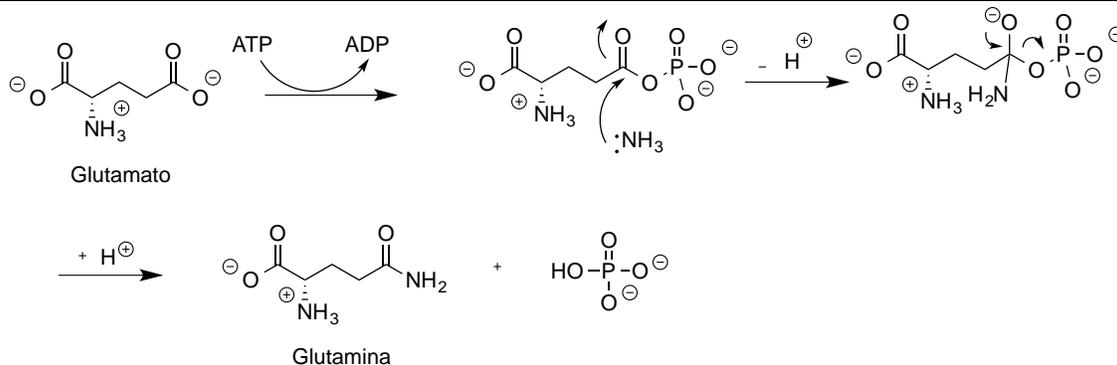


**Figura 18. Inhibición de la bomba de transporte MmpL3 por SQ109.**

También inhiben otras enzimas implicadas en la biosíntesis de menaquinona y de ATP, colapsando el gradiente de pH y de potencial de membrana que utilizan los transportadores de energía (75).

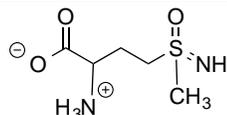
Otras dianas importantes son la pantotenato sintasa, que cataliza la síntesis del ácido pantoténico o vitamina B5 (esencial para la virulencia de *Mtb*) por condensación de

pantoato y  $\beta$ -alanina (76); la pantotenato cinasa, que fosforila al ácido pantoténico (77); y la glutamina sintetasa MtGS. Esta última está implicada en el metabolismo del nitrógeno y en la biosíntesis de la pared, y su misión es catalizar la condensación dependiente de ATP de amoniaco y L-glutamato para formar L-glutamina, ADP, fosfato y un protón (Figura 19).



**Figura 19. Mecanismo de acción de glutamina sintetasa MtGS.**

Ensayos in vivo con cobayas infectados con Mtb GS demostraron que el análogo de glutamato metionina-SR-sulfoximina (MSO, Figura 20), un inhibidor de MtGS, protege a los animales de la pérdida de peso característica de la tuberculosis y del crecimiento del bacilo en distintos órganos. MSO actúa sinérgicamente con isoniazida (78).



Metionina-SR-sulfoximina

**Figura 20. Estructura del inhibidor de MtGS metionina-SR-sulfoximina.**

## 8. REFERENCIAS

- Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2002; 148: 2919-28.
- Heifets L. Mycobacterial infections other than tuberculosis and leprosy (Infections caused by nontuberculous Mycobacteria-NTM). *Sem Resp Crit Care Med* 2004; 25: 283-96.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, *et al.* Out of Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genet* 2013; 45: 1176-82.
- Brock TD. Robert Koch, a life in medicine and bacteriology. Washington: ASM Press 1999.
- Ver por ejemplo: a) Ryan F. *Tuberculosis: The greatest story never told.* Swift Publishers Ltd 1992. b) Murphy J, Blank A. *Invincible Microbe: Tuberculosis and the Never-Ending Search for a Cure.* Harcourt Brace and Company 2015.
- a) McMurray DN. Impact of nutritional deficiencies on resistance to experimental pulmonary tuberculosis. *Nutr Rev* 1998; 56: S147-52. b) Chocano-Bedoya P, Ronnenberg AG. Vitamin D and tuberculosis. *Nutr Rev* 2009; 67: 289-93. c) Green M. Cod liver oil and tuberculosis. *BMJ* 2011; 343: d7505.
- Bruyn G, Garner P. *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for treating tuberculosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003; DOI: 10.1002/14651858.CD001166.
- a) Cardona PJ. Robert Koch tenía razón. Hacia una nueva interpretación de la terapia con tuberculina. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 385-91. b) Cardona PJ, Amat I. Origen y desarrollo de RUTI, una nueva vacuna terapéutica contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 25-32.
- Amberson J, McMahon B, Pinner M. A clinical trial of sanocrysin in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberculosis* 1931; 24: 401-35.
- Feldman WH, Hinshaw HC, Mann FC. Promizole in tuberculosis. *Am Rev Tuberculosis* 1944; 50: 418-40.
- The Therapeutic Trials Committee of the Swedish National Association against Tuberculosis. *Para-aminosalicylic acid treatment in pulmonary tuberculosis.* *Am Rev Tuberc* 1950; 61: 597-612.
- Fox W, Sutherland I. A five-year assessment of patients in a controlled trial of streptomycin, *para*-aminosalicylic acid, and streptomycin plus *para*-aminosalicylic acid, in pulmonary tuberculosis. *Q J Med* 1956; 25: 221-43.
- McDermott W. Antimicrobial therapy of pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ* 1960; 23: 427-61.
- Shepherd RG, Wilkinson RG. Antituberculous agents II. *N,N'*-diisopropylethylenediamine and analogs. *J Med Pharm Chem* 1962; 91: 823-35.
- Andriole VT. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis* 2005; 41: S113-S119.
- Tsakamura M, Nakamura E, Yoshii S, Amano H. Therapeutic effect of a new antibacterial substance ofloxacin (DL8280) on pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 352-6.
- Singh J, Cameron Ch, Noorbaloochi S, *et al.* Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2015; 386: 258-65.
- Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, *et al.* Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-95.

19. Arias, M. Avances en el diagnóstico de la infección tuberculosa. *Arch Bronconeumol* 2011; 47: 521-30.
20. a) Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection-an update. *Ann Intern Med* 2008; 149: 177-84. b) Dorman SE. New Diagnostic Tests for Tuberculosis: Bench, Bedside, and Beyond. *Clin Infect Dis* 2010; 50: S173-S177.
21. a) Kaufmann SHD, Lange Ch, Rao M, *et al.* Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies. A state of the art review. *Lancet Resp Med* 2014; 2: 301-20. b) Asensio JG, Aguiló N, Martín-Montañés C. Nuevas vacunas contra la tuberculosis. *Investigación y Ciencia* 2014; 38-46.
22. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, *et al.* Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* 2013; doi: 10.1093/cid/cit790.
23. Guilleron M, Quesniaux VFJ, Puzo G. Acylation State of the Phosphatidylinositol Hexamannosides from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Its Implication in Toll-like Receptor Response. *J Biol Chem* 2003; 278: 29880-89.
24. Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go?. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002607.
25. a) McShane H, Pathan AA, Sander CR, *et al.* Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG primed and naturally acquired anti-microbial immunity in humans. *Nat Med* 2004; 10: 1240-44. b) Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, *et al.* Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 2013; 381: 1021-28.
26. Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, *et al.* Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 2013; 31: 4867-73.
27. Vilaplana C, Montané E, Pinto S, *et al.* Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine* 2010; 28: 1106-16.
28. Sponsor: Manresana de Micobacteriologia SL. Safety and Immunogenicity of Nyaditum Resae® Probiotic to Protect From Tuberculosis. *ClinicalTrials.gov* 2014; Identifier: NCT02076139.
29. a) Green KD, Garneau-Tsodikova S. Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go? *Front Microbiol* 2013; 4: 208. b) Chung-Delgado K, Guillén-Bravo S, Revilla-Montag A, Bernabe-Ortiz A. Mortality among MDR-TB cases: comparison with drug-susceptible tuberculosis and associated factors. *PLoS One* 2015; 10: e0119332.
30. Dalton T, Cegielski P, Akksilp S, Asencios L, *et al.* Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: A prospective cohort study. *Lancet* 2012; 380: 1406-17.
31. Hwang TJ, Wares DF, Jafarov A, *et al.* Safety of cycloserine and terizidone for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Internat J Tuberculosis and Lung Disease* 2013; 17: 1257-66.
32. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 388-404.
33. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med* 2013; 368: 745-55.
34. Ver la web: [http://www.who.int/medicines/areas/quality assurance](http://www.who.int/medicines/areas/quality_assurance).
35. a) Mahajan R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *Int J Appl Basic Med Res* 2013; 3: 1-2. b) Avorn J. Approval of a tuberculosis drug based on a paradoxical surrogate measure. *JAMA* 2013; 309: 1349-50.
36. Guillemont JI, Meyer C, Poncelet A, Bourdrez X, Andries K. Diarylquinolines, synthesis pathways and quantitative structure-activity relationship studies leading to the discovery of TMC207. *Future Med Chem* 2011; 3: 1345-60.
37. Segala E, Sougakof W, Nevejans-Chauffour A, Jarlier V, Petrella S. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: new insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-ring structure. *Antimicrobial Agents Chemother* 2012; 56: 2326-34.
38. Lessem EM, Bernardo J, C, DH. Informed use of bedaquiline for tuberculosis. *Lancet* 2015; 385: 1724.
39. a) Xavier AS, Lakshmanan M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *J Pharmacol Pharmacother* 2014; 5: 222-4. b) Lewis JM, Sloan DJ. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Ther Clin Risk Manag* 2015; 11: 779-91.
40. Szumowski JD, Lynch JB. Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 677-82.
41. a) Manjunatha U, Boshoff IMH, Barry CE. The mechanism of action of PA-824. *Commun Integr Biol* 2009; 2: 215-18. b) Diacon AH, Dawson R, Hanekom M, *et al.* Early Bactericidal Activity and Pharmacokinetics of PA-824 in Smear-Positive Tuberculosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3402-07.
42. Upton AM, Cho S, Yang TJ, *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of the Nitroimidazole TBA-354 against *M. tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 136-44.
43. Ver: <http://www.newtbdugs.org/project.php?id=48#sthash.HvBZAUWr.dpuf>.

44. Ma Z, Lienhardt C, McIlleron H, Nunn AJ, Wang X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*. 2010; 375: 2100-9.
45. Sacksteder KA, Protopopova M, Barry CE, Andries K, Nacy CA. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol* 2012; 7: 823-37.
46. Bogatcheva E, Hanrahan C, Nikonenko B, *et al.* Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 5353-57.
47. Alffenaar JWC, van der Laan T, Simons S, *et al.* Susceptibility of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to a potentially less toxic derivate of linezolid, PNU-100480. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1287-89.
48. Phase 2a EBA Trial of AZD5847. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01516203*.
49. Ananthan S, Faaleolea ER, Goldman RC, *et al.* High-throughput screening for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis* 2009; 89: 334-53.
50. Dye C. Tuberculosis 2000-2010: control, but not elimination. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: S146-S152.
51. a) Elliott AM, Berning SE, Iseman MD, Peloquin CA. Failure of drug penetration and acquisition of drug resistance in chronic tuberculous empyema. *Tuber Lung Dis* 1995; 76: 463-467. b) Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 908-14.
52. Gillespie SH. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 267-74.
53. a) Dinakaran M, Senthilkumar P, Yogeewari P, *et al.* Novel ofloxacin derivatives: synthesis, antimycobacterial and toxicological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18, 1229-36. b) Chopra S, Matsuyama K, Tran T, *et al.* Evaluation of gyrase B as a drug target in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012, 67: 415-21. c) Shirude PS, Madhavapeddi P, Tucker JA, *et al.* Aminopyrazinamides: novel and specific GyrB inhibitors that kill replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* 2013; 8: 519-23. d) Karkare S, Chung TT, Collin F, *et al.* The naphthoquinone diospyrin is an inhibitor of DNA gyrase with a novel mechanism of action. *J Biol Chem* 2013; 288: 5149-56.
54. McKee EE, Ferguson M, Bentley AT, Marks TA. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2042-49.
55. Ver por ejemplo: a) Makarov V, Manina G, Mikusova K, *et al.* Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science* 2009; 324: 801-4. b) Pasca MR, Degiacomi G, Ribeiro AL, *et al.* Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in four European hospitals are uniformly susceptible to benzothiazinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1616-18.
56. a) Boechat N, Ferreira VF, Ferreira SB, De Lourdes GFM, *et al.* Novel 1,2,3-triazole derivatives for use against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) strain. *J Med Chem* 2011; 54, 5988-99. b) Lamichhane G. Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs, *Trends Mol Med* 2011, 17: 25-33.
57. Ver por ejemplo: a) Sullivan TJ, Truglio JJ, Boyne ME, *et al.* High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* 2006; 1: 43-53. b) Vilcheze C, Baughn AD, Tufariello J, *et al.* Novel inhibitors of InhA efficiently kill *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and anaerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3889-98. c) Kinjo T, Koseki Y, Kobayashi M, *et al.* Identification of compounds with potential antibacterial activity against *Mycobacterium* through structure-based drug screening. *J Chem Inf Model* 2013; 53: 1200-12.
58. Parikh SL, Xiao G, Tonge PJ. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry* 2000; 39: 7645-50.
59. Wang F, Langley R, Gulten G, *et al.* Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J Exp Med* 2007; 204: 73-8.
60. a) He X, Alian A, Stroud R, Ortiz de Montellano PR. Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem* 2006; 49: 6308-23. b) Ballell L, Castro J, Fernandez R, *et al.* (Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-amine and (pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiazole-2-amine compounds. *World Intellectual Property Organization* 2010; WO2010118852 A1.
61. a) Hartkoorn RC, Sala C, Neres J, *et al.* *EMBO Mol Med* 2012; 4: 1032-42. b) Avendaño C. Hacia un nuevo fármaco antituberculoso. *Anales RANF* 2012; 78: 288-97. c) Perryman AL, Yu W, Wang X, *et al.* A Virtual Screen Discovers Novel, Fragment-Sized Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *J Chem Inf Model* 2015; 55: 645-59.
62. Hartkoorn RC, Pojer F, Read JA, Gingell H, *et al.* Pyridomycin bridges the NADH- and substrate-binding pockets of the enoyl reductase InhA. *Nature Chem Biol* 2014; 10: 96-99.
63. Ver: Altmann K-H, Horlacher O, Hartkoorn R, S (inventors). Pyridomycin based compounds exhibiting an antitubercular activity. *Patente WO2014040709 A1*, 20 Marzo de 2014.
64. a) Wolff KA, Nguyen L. Strategies for potentiation of ethionamide and folate antagonists against

- Mycobacterium tuberculosis*. Expert Rev Anti Infect Ther 2012; 10: 971-81.
65. Masucci MG. Epstein-Barr virus oncogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene* 2004; 23: 2107-15.
  66. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, *et al*. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44.
  67. Arnold C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 120-8.
  68. Riccardi G, Pasca MR, Chiarelli LR, *et al*. The DprE1 enzyme, one of the most vulnerable targets of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 8841-8.
  69. a) Neres J, Pojer F, Molteni E, *et al*. Structural basis for benzothiazinone-mediated killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med* 2012; 4:150ra121. b) Makarov V, Lechartier B, Zhang M, *et al*. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 372-83.
  70. Neres J, Hartkoorn RC, Chiarelli LR, *et al*. 2-Carboxyquinoxalines kill *Mycobacterium tuberculosis* through noncovalent inhibition of DprE1. *ACS Chem Biol* 2015; 10, 705-14.
  71. Diacon AH, Pym A, Grobusch M, *et al*. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 2009; 360: 2397-05.
  72. a) Haagsma AC, Podasca I, Koul A, *et al*. Probing the Interaction of the Diarylquinoline TMC207 with Its Target Mycobacterial ATP Synthase. *PLoS ONE* 2011; 6: e23575. b) Lu P, Villellas C, Koul A, *et al*. The ATP synthase inhibitor bedaquiline interferes with small-molecule efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *J Antibiot* 2014; 67: 835-37.
  73. Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, *et al*. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med* 2006; 3: e466.
  74. Rayasam GV. MmpL3 a potential new target for development of novel anti-tuberculosis drugs. *Expert Opin Ther Targets* 2014; 18: 247-56.
  75. Li K, Shurig-Bricio LA, Feng X, *et al*. Multitarget Drug Discovery for Tuberculosis and Other Infectious Diseases. *J Med Chem* 2014; 57, 3126-39.
  76. Yang Y, Gao P, Liu Y, *et al*. A discovery of novel *Mycobacterium tuberculosis* pantothenate synthetase inhibitors based on the molecular mechanism of actinomycin D inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 3943-46.
  77. Venkatraman J, Bhat J, Solapure SM, *et al*. (2012). Screening, identification, and characterization of mechanistically diverse inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme, pantothenate kinase (CoaA). *J Biomol Screen* 2012; 17: 293-302.
  78. a) Harth G, Clemens DL, Horwitz MA. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*-Extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sc USA* 1994; 91: 9342-46. b) Harth G, Horwitz MA. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy in vivo. *Infect Immun* 2003; 71: 456-64. c) Mowbray SL, Kathiravan MK, Pandey AA, Odell LR. Inhibition of Glutamine Synthetase: A Potential Drug Target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules* 2014; 19: 13161-76.