

Nº 76
255.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**LA IMPORTANCIA DE LAS β -LACTAMASAS Y
DE SUS INHIBIDORES**

TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION MANCOMUNADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTAN

MARIA DEL ROCIO IBARRA CONTRERAS
ANA MARIA VILLAMIL AVILA

MEXICO, D.F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de Contenido

I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β-LACTAMASAS	3
1.1 Origen.	3
1.2 β -Lactamasas codificadas por plásmidos y transposones.	11
1.3 β -lactamasas codificadas por cromosomas.	15
1.4 Relación entre las β -lactamasas codificadas por cromosomas y por plásmidos.	29
1.5 β -Lactamasas recientes.	31
II. ESTRUCTURA DE LAS β-LACTAMASAS	33
2.1 Antecedentes	33
2.2 β -lactamasas serfínicas.	34
2.2.1 Clase estructural A	34
2.2.2 Clase estructural C	43
2.2.3 Clase estructural D	55
2.3 Mecanismo general de acción de las β -lactamasas serfínicas	58
2.4 Mecanismos de las β -lactamasas A y C	85
2.5 β -lactamasas no serfínicas	91
2.5.1 Clase estructural B	91
III. INTERACCION β-LACTAMASA-ANTIBIOTICO-CELULA BACTERIANA	109
3.1 Transporte y localización de las β -lactamasas.	109
3.2 Modelos Generales de Resistencia	112

Tabla de Contenido

3.2.1 Permeabilidad	117
3.2.2 PBP's	124
3.3 Interacción β -lactamasa/antibiótico in vivo	129
3.4 Mecanismo responsable de la multi-resistencia β -lactámica en las cefalosporinas cromosómicas de bacterias Gram negativas	132
3.5 Patogenicidad Indirecta	140
IV. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS β-LACTAMASAS	142
4.1 Identificación: Pruebas de sensibilidad	142
4.2 Identificación, aislamiento y purificación	146
4.3 Caracterización	151
4.4 Determinación de la actividad de las β -lactamasas	158
V. INHIBIDORES DE LAS β-LACTAMASAS	167
5.1 Antecedentes	167
5.2 Inhibidores de mayor importancia	171
5.2.1 Acido clavulánico	172
5.2.2 Sulbactam	184
5.2.3 Tazobactam	188
5.3 Otros inhibidores	190
5.4 Factores de resistencia asociados a los inhibidores	194
VI .CLASIFICACION DE LAS β-LACTAMASAS	200
6.1 Antecedentes	200

Tabla de Contenido

6.2 Clasificación general	202
6.3 Nomenclatura	204
6.4 Tablas	206
CONCLUSIONES	219
BIBLIOGRAFIA	221

INTRODUCCION

El empleo de los β -lactámicos representa más del 60% del consumo total de antibióticos a nivel mundial. Ello se debe principalmente a su alta selectividad, baja toxicidad y versatilidad; sin embargo, su eficacia quimioterápica se ha visto afectada continuamente por el desarrollo de la resistencia bacteriana.

En 1940 se reconoció a la enzima que confería resistencia a una cepa de *E. coli* frente a la penicilina, misma que recibió el nombre genérico de "penicilinas"; no obstante, este término resultó inadecuado, porque en realidad abarca a tres diferentes tipos de enzimas.

Indudablemente, entre los mecanismos de resistencia conocidos, el que involucra a la producción de β -lactamasas es el más frecuente e implica la hidrólisis catalítica del anillo β -lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y antibióticos relacionados, generando agentes inertes e ineficaces. Actualmente, la cantidad y el grado de complejidad de las β -lactamasas ha incrementado las fallas en la terapia antimicrobiana.

Tan pronto como se introduce un nuevo antibiótico a la práctica clínica, se identifica otro tipo de β -lactamasa con capacidad para neutralizar su actividad. Los intentos por superar este problema se han basado en el desarrollo de dos opciones: la producción de antibióticos no susceptibles a la acción de las β -lactamasas y la síntesis de inhibidores para este tipo de enzimas. De hecho, se han realizado intentos por inactivar a estas enzimas con sueros anti- β -lactamasa, pero los principales avances se han logrado utilizando los compuestos β -lactámicos que por sí mismos actúan como inhibidores.

El presente trabajo es una recopilación de información acerca de las β -lactamasas, cuyo fin es conocer sus características fisicoquímicas y cinéticas y las soluciones que han sido propuestas hasta ahora para contrarrestar su actividad.

OBJETIVOS

- ▣ Describir a las β -lactamasas y subrayar el lugar que ocupan dentro de los mecanismos bacterianos de resistencia.
- ▣ Mencionar la clasificación de las β -lactamasas de acuerdo a su mecanismo de acción y a sus características genéticas y fisicoquímicas.
- ▣ Mencionar a los microorganismos involucrados en el estudio de las β -lactamasas.
- ▣ Describir los principales mecanismos de acción de los inhibidores de las β -lactamasas.

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

1.1 Origen.

Existen dos tipos de enzimas, ambas de origen bacteriano, que tienen la capacidad para interactuar con los antibióticos β -lactámicos: las enzimas D-alanil-D-alanil transpeptidasas/carboxipeptidasas (abreviadas como DD-peptidasas frecuentemente) y las β -lactamasas⁵⁷.

Las DD-peptidasas se encuentran involucradas en la síntesis de la pared celular bacteriana, catalizando el rompimiento de la unión peptídica C-terminal : D-alanina-D-alanina en los precursores del peptidoglucano (fig.1.1)¹². Algunas poseen actividad de transpeptidasa, carboxipeptidasa, o ambas¹¹⁶. Son inhibidas competitivamente por los antibióticos β -lactámicos, en los cuales, el enlace amida endocéfalo es equivalente a la unión peptídica del precursor del peptidoglucano (fig. 1.2)⁵⁷.

Las β -lactamasas son las enzimas defensivas. Hidrolizan a los antibióticos, produciendo agentes biológicamente inertes⁷².

Con base en la similitud estructural entre los sustratos de las enzimas DD-peptidasas (I) y sus inhibidores, los antibióticos β -lactámicos (II) (fig.1.2), surgió una interesante hipótesis que propone que las β -lactamasas derivan de las DD-peptidasas, cuyos precursores se seleccionaron presumiblemente por la rápida hidrólisis del complejo acil-en-

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

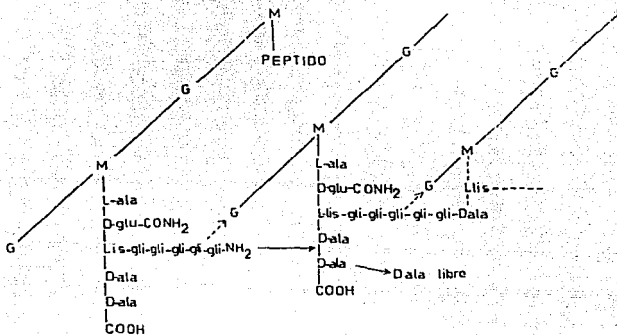


Fig.1.1
Etapa final en la formación del peptidoglucano¹².

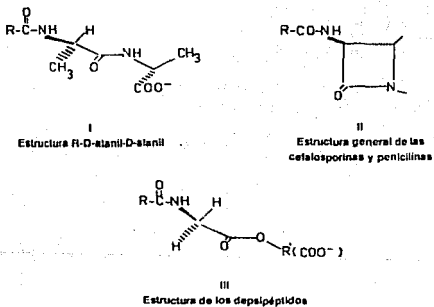


Fig.1.2
Comparación entre la estructura de los substratos de las DD-peptidasas y las β -lactamasas⁵⁷.

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

zima, para contrarrestar los efectos de los compuestos β -lactámicos que se encuentran en forma natural¹¹⁶.

Esta hipótesis se ve apoyada por la semejanza estructural y catalítica de ambos tipos de enzimas^{57, 102} tienen en común: la presencia de un sitio activo de serina, la unión con enlaces similares y la formación de un complejo acil-enzima durante el proceso de hidrólisis⁷².

En el mecanismo de ambas enzimas, se transfiere un grupo acilo ($\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$), producto del rompimiento de la unión amida (del peptidoglucano o el anillo β -lactámico, según sea el caso), al grupo hidroxilo del residuo de serina localizado en el sitio activo de la enzima (pag.59).

Una característica en común es la presencia de una cavidad oxianiónica¹⁰², estructura que estabiliza un complejo intermediario durante el proceso catalítico.

El complejo acil-enzima generalmente es muy inestable cuando se forma por la reacción entre los antibióticos β -lactámicos y las β -lactamasas; sin embargo, es muy estable cuando se forma por la reacción de los primeros con las DD-peptidasas. Por lo tanto, los antibióticos β -lactámicos son sustratos de las β -lactamasas e inhibidores de las DD-peptidasas⁷².

A las DD-peptidasas también se les denomina PBPs (proteínas que se unen a las penicilinas); éstas poseen diferentes funciones y pesos moleculares y en alguna de ellas se ha observado una actividad pobre de β -lactamasa¹.

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

En 1980, Ambler investigó la secuencia de aminoácidos alrededor del sitio activo de la D-alanina carboxipeptidasa de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis* I, y los resultados mostraron homología en la secuencia alrededor del sitio activo de las β -lactamasas de clase A; no obstante, no se contaba con los estudios suficientes para proponer un origen evolutivo común entre estos dos tipos de enzimas.

Por otro lado, se ha reportado que los complejos formados entre las DD-carboxipeptidasas y los antibióticos β -lactámicos no son estables indefinidamente y se observó que los productos resultantes de la degradación de la penicilina difieren, generalmente, de los obtenidos frente a las β -lactamasas.

Con base en lo anterior, Duez (&), en 1981⁴⁰, comparó las propiedades moleculares, inmunológicas y cinéticas de la DD-carboxipeptidasa y la β -lactamasa de *Streptomyces albus* G, encontrando grandes diferencias en sus propiedades estructurales y mecanismo de acción; esto se debe a que la β -lactamasa de *S. albus* G es una enzima sérfica mientras que su DD-carboxipeptidasa requiere Zn^{2+} para su actividad y unión con la penicilina.

A pesar de las grandes diferencias, este investigador reporta la presencia de actividad de β -lactamasa en la DD-carboxipeptidasa que, al igual que la β -lactamasa, hidroliza la penicilina a bencilpeniciloato, lo que podría suponerse una relación entre estos tipos de enzimas. No obstante, la actividad de β -lactamasa fue 5×10^6 veces menor en la DD-carboxipeptidasa, que la observada con la β -lactamasa.

Teniendo estos antecedentes, Pratt y Govardhan^{57, 116} estudiaron el comportamiento de las β -lactamasas y las DD-peptidasas, frente a los depsipéptidos (estructura III de la figura

1.2), compuestos acíclicos similares a los sustratos de las DD-peptidasas; observaron que las β -lactamasas de las clases A, B y C (ver capítulo II), eran capaces de hidrolizar y algunas de aminolizar (clase C) a dichos compuestos con una facilidad comparable a la mostrada por las DD-peptidasas, sin embargo fueron incapaces de hidrolizar a los D-alanil-D-alanil péptidos¹¹⁶.

Joris⁷⁵, reporta que la actividad de la β -lactamasa de *E. cloacae* P99 frente a dos tipos de D-alanil-D-alanil péptidos, fue 10,000 veces menor que la observada con los depsipéptidos.

Pratt y Govardhan estudiaron la aminólisis debido a que en la reacción de las DD-peptidasas con los D-alanil-D-alanil péptidos, se transfiere el grupo acilo de la serina a un receptor amino y no a una molécula de agua como en las β -lactamasas; en las DD-peptidasas aparentemente no es posible el acceso de agua al complejo acil-enzima formado con los péptidos y se ha sugerido que, de ser posible, implicaría una modificación que acabaría con su capacidad de aminólisis⁵⁷.

En general, los depsipéptidos son sustratos pobres para las β -lactamasas (en comparación con la bencilpenicilina), no obstante, existen diferencias de eficiencia catalítica entre ellas, siendo mayor en las β -lactamasas de clase C, y menor en B y A respectivamente¹¹⁶.

Uno de los factores que contribuyen posiblemente al enlace débil de las β -lactamasas con los depsipéptidos, es la mayor flexibilidad estructural de éstos en comparación con los compuestos β -lactámicos bicíclicos⁵⁷.

Pratt y Govardhan, demostraron que la reacción de las β -lactamasas con los desipéptidos, involucra el mismo sitio activo que con los compuestos β -lactámicos, e indican que una de las razones de la incapacidad de hidrólisis de las β -lactamasas frente a los DD-péptidos, es la falta de un grupo electrofílico, que se encuentra presente en las DD-peptidasas¹¹⁶; en cambio, los desipéptidos poseen una susceptibilidad al ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo de la serina de las β -lactamasas, similar a las penicilinas⁵⁷.

Estos investigadores indican que la evolución del posible precursor de las β -lactamasas, tuvo que implicar el desarrollo de un nuevo modo de acceso de la molécula de agua al complejo acil-enzima, así como una pérdida de actividad como D-alanil-D-alanil-peptidasa, paso posiblemente necesario para no interferir en la síntesis de la pared celular.

El proceso comprendió el mantenimiento o el aumento de la afinidad de la enzima precursora por los compuestos β -lactámicos por un lado y el mejoramiento del mecanismo de hidrólisis del complejo acil-enzima por el otro¹¹⁶.

De acuerdo al modelo propuesto, se esperaría que el proceso de evolución partiera desde las transpeptidasas puras, sin actividad de carboxipeptidasa o de β -lactamasa, pasando por las transpeptidasas/carboxipeptidasas con débil actividad de β -lactamasa, hacia las β -lactamasas con alguna afinidad por los sustratos acíclicos (como se observa para las enzimas de clase B y C), dando origen a las β -lactamasas puras (clase A).

No se ha reportado una actividad considerable de las β -lactamasas frente a los D-alanil-D-alanil-péptidos hasta ahora, sin embargo, Pratt y Govardhan demostraron la capacidad

de las β -lactamasas para hidrolizar compuestos acélicos análogos a éstos. Señalan a la clase C como la más eficiente, coincidiendo con el árbol genealógico propuesto por Joris (&)⁷², con base en la estructura primaria, en el cual, la clase C es la más relacionada con la DD-carboxipeptidasa de *Streptomyces* R61.

En 1988, Joris (&)⁷², estudió la homología de la secuencia de aminoácidos alrededor del sitio activo, entre las enzimas DD-peptidasas de bajo y alto peso molecular y las β -lactamasas serínicas, demostrando la existencia de siete regiones con restos de aminoácidos idénticos u homólogos que se conservan en todas las secuencias (fig.2.9).

Este investigador indica que, a pesar de que el tiempo de evolución pudo variar considerablemente, toda esta clase de enzimas que interactúan con la penicilina, parecen ser miembros de una superfamilia de enzimas serínicas (diferente a la familia de la tripsina o subtilisina, donde la histidina es el residuo esencial en el mecanismo catalítico) y de acuerdo a la distancia de evolución, esta superfamilia de enzimas pudo variar en sus secuencias, funciones y especificidad.

En la actualidad, con el advenimiento de los estudios cristalográficos se ha encontrado, con gran sorpresa, una gran similitud en la dimensión y distribución de la estructura secundaria, entre las β -lactamasas de clase A, la DD-carboxipeptidasa de *Streptomyces* y el sitio activo de algunas DD-peptidasas, no existiendo una gran homología en sus secuencias de aminoácidos; aun más, existe una mayor semejanza a nivel de estructura primaria entre la DD-carboxipeptidasa y las β -lactamasas de clase C^{34, 36, 72, 110}.

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

Cabe señalar que la similitud estructural entre un grupo de enzimas, se ha considerado como evidencia de un proceso evolutivo común, más que de una evolución convergente¹²⁰.

En cuanto a las metalo- β -lactamasas, la β -lactamasa II de *B. cereus* (clase B) y la enzima LI de *Pseudomonas maltophilia*, son las metalo- β -lactamasas mejor estudiadas en la actualidad. Ambas requieren de Zn^{2+} .

Otras enzimas que requieren Zn son las β -lactamasas de *Flavobacterium odoratum*, *Legionella gormanii* y parece que algunas cepas de *Bacteroides fragilis*¹³³.

Se ha reportado que no existe semejanza alguna entre las secuencias de aminoácidos de la metalo-carboxipeptidasa de *Streptomyces albus G* (cuya estructura tridimensional se ha determinado) y las secuencias conocidas de las metalo- β -lactamasas, observándose también una débil afinidad de la metalo-carboxipeptidasa por los antibióticos β -lactámicos.

Tampoco se encontró similitud entre la β -lactamasa II y la metalo-carboxipeptidasa a nivel de sus estructuras tridimensionales, encontrándose un alto porcentaje de alfa-hélices en la segunda¹³³, desconociéndose, por tanto, el origen evolutivo de las metalo- β -lactamasas.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar la evolución molecular de las β -lactamasas¹:

- 1) La primera propone una divergencia en el gen precursor de un ancestro común en las bacterias Gram Positivas y Gram negativas.

2) La segunda sugiere un origen más reciente para el gen precursor, ya sea en una u otra de las ramas, seguido por una transferencia inter-específica del gen a otras líneas.

Debido a la frecuente presencia de genes que codifican para las β -lactamasas en plásmidos fácilmente transmisibles y a los casos observados de incorporación cromosómica de dichos genes^{1, 94}, es más factible la segunda hipótesis, además, las investigaciones realizadas en otros sistemas enzimáticos, sugieren que este comportamiento es una característica común en la evolución bacteriana¹.

1.2 β -Lactamasas codificadas por plásmidos y transposones.

Entre las bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* es el principal patógeno productor de β -lactamasas⁹⁴. En 1960 la atención se enfocó a este microorganismo debido a que la existencia de cepas resistentes a la penicilina originaron una rápida aparición de brotes epidémicos en hospitales donde la penicilina se empleaba profusamente. En esta especie se han identificado serológicamente cuatro tipos de β -lactamasas A, B, C y D⁹⁴. De estos tipos, la forma A ha sido la más estudiada⁷⁷.

Actualmente se demostraron diferencias en la especificidad del sustrato y comportamiento en las cuatro variantes enzimáticas, siendo posible también su identificación a partir de su fenotipo.

Con el advenimiento de las penicilinas semisintéticas (ampicilina y meticilina) y las cefalosporinas, se controlaron las infecciones provocadas por cepas de *S. aureus* resistentes, ocasionando su disminución. Sin embargo, al mismo tiempo se incrementó la presen-

cin de bacterias Gram negativas resistentes a la ampicilina, en las cuales se han identificado una gran variedad de β -lactamasas que hoy en día confieren resistencia frente a las nuevas penicilinas y cefalosporinas⁶⁴.

Inicialmente se identificaron 11 tipos de β -lactamasas codificadas por plásmidos en las bacterias Gram negativas. Todas se sintetizan constitutivamente y en la mayoría de los casos se producen en una cantidad mayor que las β -lactamasas mediadas por cromosomas⁶⁴; algunas se encuentran codificadas por transposones (señaladas con un "" más adelante).

Estas enzimas se clasificaron originalmente en tres clases⁶⁴:

- 1) Enzimas de amplio espectro, que hidrolizan la bencilpenicilina y cefaloridina a niveles similares (TEM-1*, TEM-2*, SHV-1*, HMS-1).
- 2) Oxacilinasas, las cuales hidrolizan la oxacilina rápidamente (OXA-1*, OXA-2, OXA-3).
- 3) Carbenicilinasas, las cuales hidrolizan la carbenicilina (compuesto desarrollado contra pseudomonas especialmente e identificado por primera vez en este microorganismo) comprendiendo a PSE-1*, PSE-2, PSE-3, PSE-4.¹²⁰

En la actualidad, se ha identificado un gran número de β -lactamasas codificadas por plásmidos o transposones, agrupándose en más de 25 tipos con base en su perfil de sustrato, punto isoelectrico y otros criterios bioquímicos⁶⁷; algunas de estas enzimas representan un grave problema clínico, debido a que confieren resistencia frente a un

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

gran espectro de antibióticos, incluyendo a las cefalosporinas de 3a. generación^{15, 16, 78, 85, 94, 140}.

Las enzimas identificadas recientemente, derivan en general de algunos tipos ya conocidos como TEM, OXA, PSE y SHV.

Muchas de las β -lactamasas codificadas por plásmidos, se encuentran mediadas por transposones, elementos genéticos capaces de transferirse entre una gran variedad de plásmidos y entre plásmidos y cromosomas⁹⁴.

Las β -lactamasas tipo TEM-1 y TEM-2 se encuentran determinadas por los transposones *Tn 3* y *Tn 1*, respectivamente y son muy similares⁹⁴.

Las β -lactamasas tipo OXA y PSE, también son codificadas por transposones, algunos de los cuales son unidades complejas que confieren resistencia múltiple; los transposones que codifican el tipo OXA-1 (*Tn 2603*) y los tipos PSE-1 y PSE-4, confieren resistencia frente a la estreptomina, la sulfonamida y también el mercurio.

Se ha enfatizado la frecuente relación entre la resistencia frente a los β -lactámicos y la resistencia frente al cloramfenicol y mercurio, por lo que se ha sugerido la posibilidad de un transposón ancestral común⁹⁴.

Distribución de las β -lactamasas entre los géneros bacterianos.

La presencia de β -lactamasas codificadas por genes presentes en plásmidos y transposones representa un grave problema clínico, ya que promueve su rápida transferencia de un

grupo de bacterias a otro, dando origen a una todavía más amplia distribución de β -lactamasas⁹⁴.

El mayor número de diferentes tipos de β -lactamasas, se encontraron en *P. aeruginosa* y *E. coli*, seguido por *P. mirabilis*, los géneros *Klebsiella* y *Salmonella*, identificándose hasta cinco tipos en cada uno de los microorganismos mencionados⁹⁴.

Una evidencia de la diseminación de los genes de las β -lactamasas, la constituye el tipo PSE-1 que se identificó originalmente en *Pseudomonas* y se encuentra actualmente en *E. coli*, cuatro especies de *Salmonella*, *S. liquefaciens* y *Shigella sonnei*.

El tipo más común de β -lactamasa es TEM-1, que se identifica con gran frecuencia en las muestras clínicas y es el de más amplia distribución geográfica. En general, existe un bajo porcentaje de cepas productoras de β -lactamasas codificadas por cromosomas⁹⁴.

Por otro lado, existe evidencia de que los genes de las β -lactamasas pueden transferirse

CEPA	FUENTE	PLASMIDO	β -LACTAMASA
<i>S. typhimurium</i>	Irán	TP181	OXA-1
<i>S. typhi</i>	Argelia	TP160	OXA-1
<i>S. typhimurium</i>	Gran Bretaña	NTP101	OXA-1
<i>S. wien</i>	París	---	OXA-1
<i>S. ordones</i>	Dakar	---	SHV-1

TABLA 1.1
Distribución geográfica de algunas β -lactamasas codificadas por plásmidos⁹⁴.

entre microorganismos patógenos de humanos y de animales. En un estudio de cepas de

salmonela resistentes a la ampicilina, aisladas de muestras humanas y de animales, se observó una producción de TEM-1 en 81% y 77%, respectivamente⁹⁴.

Medeiros indica que esta asociación inesperada sugiere que se comparten los mismos factores de resistencia, comprobándose esto al observarse identidad en la mayoría de los plásmidos aislados de *S. typhimurium*, var. *copenhagen* en muestras humanas y de animales, tomadas en varios lugares de Estados Unidos.

La prevalencia de diferentes tipos de β -lactamasas varía con el tiempo y el lugar (tabla 1.1).

En Sudamérica y Oriente Medio, existe una gran proporción de cepas resistentes que producen β -lactamasas mediadas por plásmidos, en las cuales se han identificado nuevos tipos enzimáticos, por lo que Medeiros indica que la flora bacteriana de estas regiones proporciona un medio fértil para el desarrollo de los nuevos mecanismos de resistencia⁹⁴.

1.3 β -lactamasas codificadas por cromosomas.

Virtualmente todas las bacterias Gram negativas producen algún tipo de β -lactamasa mediada por cromosomas, siendo a menudo específicas de especie y algunas de sub-especies⁹⁴.

La actividad enzimática es a menudo muy baja, particularmente en muestras susceptibles a la ampicilina, pero puede incrementarse por los procesos de inducción o alteraciones en el número o regulación de los genes estructurales que codifican para las β -lac-

tamasas. Las alteraciones genéticas de este tipo son las causantes de la resistencia frente a los nuevos antibióticos β -lactámicos, principalmente¹²⁴.

Normalmente, las enzimas de este tipo son inducibles o microconstitutivas⁸⁵.

La mayoría de estas β -lactamasas hidrolizan las cefalosporinas preferentemente, incluyendo muchos de los nuevos antibióticos que son resistentes a la hidrólisis de las β -lactamasas determinadas por plásmidos.

Se han descrito dos grupos principales para comprender estas enzimas⁸⁵:

1)"Cefalosporinasas con una especificidad de amplio espectro", las cuales hidrolizan la bencilpenicilina, ampicilina y carbenicilina con la misma facilidad que a las cefalosporinas.

A este grupo pertenecen las β -lactamasas de *Proteus vulgaris* (Grupo 2c de Bush, pag.215), *Klebsiella pneumoniae* (Grupo 2b'), *K. aerogenes* K1 y *K. oxytoca* (2b').

2)Las típicas cefalosporinasas, las cuales presentan poca o ninguna actividad frente a las penicilinas. Este grupo comprende las β -lactamasas de una gran cantidad de especies (Grupo 1 de Bush).

Pueden ser constitutivas: *Citrobacter freundii*, *M. morgani*, *E. cloacae*, *E. coli* y *B. fragilis*; o inducibles: *E. cloacae*, *Providencia rettgeri*, *C. freundii*, *P. aeruginosa* y *Serratia marcescens*.

Cabe señalar que, a menudo, estas β -lactamasas aparecen como inducibles¹⁵, pero en la actualidad se ha incrementado el número de cepas Gram negativas que sufren derrepresión, produciendo la enzima constitutivamente¹²⁴.

Se ha propuesto que el incremento en la producción de cefalosporinas inducibles puede ser mediante dos mecanismos:

- a) Exposición de la cepa salvaje al inductor (antibiótico), ocasionando un incremento temporal en los niveles enzimáticos (inducción reversible).
- b) Presencia de una mutación espontánea en la cepa salvaje, produciendo un estado de derrepresión estable.

En general, los antibióticos que son buenos inductores reversibles tienden a ser malos selectores de las cepas mutantes que sufrieron derrepresión estable.

Independientemente del mecanismo involucrado en el aumento de producción, el resultado final es la presencia de una resistencia múltiple frente a los antibióticos.

Inducción Reversible

Se ha reportado una gran variedad de antibióticos β -lactámicos con la capacidad de inducir la producción de cefalosporinas cromosómicas en bacterias Gram negativas¹²⁶.

Poco después de que la cepa salvaje se ha expuesto al antibiótico, los niveles enzimáticos se elevan rápidamente, presentándose el pico máximo usualmente a las 2h y manteniéndose en estos niveles mientras se encuentre presente en el medio el compuesto β -lactámico con el anillo intacto.

Cuando el inductor se extrae o se hidroliza totalmente, los niveles enzimáticos disminuyen inmediatamente.

La inducción específica por los antibióticos β -lactámicos parece no estar influenciada por:

- a) Represión por catabolito con la glucosa.
- b) Anaerobiosis.
- c) Suplementación exógena de AMP cíclico

Por otro lado, se ha reportado la presencia de inducción no específica por triptofano, tiamina, ácido fólico, hemina, glicina y varios fluidos corporales; sin embargo este tipo de inducción involucra una región de control diferente a la ejercida por los antibióticos β -lactámicos, ya que se observó que la inducción por glicina no se llevaba a cabo en condiciones anaerobias.

La capacidad de inducción de algunos antibióticos β -lactámicos, depende del tipo de microorganismo y concentración del antibiótico empleados, así como del período de inducción. A pesar de lo anterior, existen ciertos antibióticos con un potente efecto de inducción, independientemente de la especie en la que van a actuar y de las condiciones de ensayo. Entre estos compuestos se encuentran las cefamicinas (en particular la cefoxitina, siendo un poderoso inductor de *E. cloacae*, *C. freundii* y *P. aeruginosa*²⁶ y el imipenem⁵⁸.

Se indica que, todos los microorganismos estudiados hasta 1987, producían altos niveles de cefalosporinas cromosómicas por inducción de estos antibióticos, incluso a bajas concentraciones de éstos.

Muchas de las cefalosporinas de 3a. generación se encuentran incluidas en esta categoría de potentes inductores, en contraste con muchas penicilinas que parecen ser inductores muy pobres; no obstante, se ha reportado la inducción frente a concentraciones muy altas de éstos.

En otro aspecto, se han realizado estudios en relación al efecto sinérgico y antagónico presente en las combinaciones de antibióticos β -lactámicos, siendo un punto muy importante el representado por los buenos inductores de cefalosporinas cromosómicas; dichos compuestos se comportan como antagonistas para todo antibiótico que es afectado por la enzima inducida, incluyéndose ellos mismos¹²⁶.

Se ha demostrado esta capacidad para el efecto antagónico, en varios modelos animales y de acuerdo con lo anterior, los antibióticos que son buenos inductores nunca se deben emplear en combinación con otros β -lactámicos, sugiriéndose como alternativa la combinación con aminoglucósidos y así evitar el riesgo de selección de las cepas resistentes⁹⁴.

Uno de los aspectos más extraños durante el proceso antagónico entre dos antibióticos (uno muy efectivo y otro inductor), es que, para algunos de ellos, la enzima inducida no hidroliza al antibiótico efectivo, condición bajo la cual se esperaría la actividad del antibiótico; sin embargo, no está ejerciendo su efecto antibacteriano. Para explicar este fenómeno, se ha sugerido la formación de complejos β -lactamasa-antibiótico induc-

tor, que bloquean ciertas PBPs (proteínas que se unen a las penicilinas), haciendo inaccesible el ataque por el otro antibiótico β -lactámico⁹⁴.

Derrepresión Estable

En ciertos microorganismos se presenta una mutación espontánea, originando un estado de derrepresión estable, en el cual la enzima se produce constitutivamente y los niveles enzimáticos se mantienen constantes, aún en presencia de inductor.

Se ha publicado que este tipo de mutación ocurre aproximadamente de una en 10^6 a una en 10^7 células y probablemente involucra una alteración en el represor protéico.

En otros microorganismos como *P. aeruginosa*, la mutación da como resultado una derrepresión parcial, requiriéndose una segunda mutación para un proceso de derrepresión completa.

Las cepas mutantes, productoras de cefalosporinas cromosómicas, son altamente estables y persisten a pesar de los múltiples pases en medios de cultivo libres de antibiótico. Los antibióticos β -lactámicos varían en su capacidad para seleccionar las cepas mutantes que han sufrido derrepresión.

Las cefalosporinas de primera generación como la cefalotina, son selectores muy pobres debido a su moderada actividad de inducción para algunos microorganismos y a su alta susceptibilidad de hidrólisis ante las cefalosporinasas cromosómicas. De esta manera, los niveles enzimáticos producidos por las cepas salvajes son suficientes para destruir tales antibióticos antes que éstos se comporten como selectores.

Las cefamicinas son también selectores muy pobres, su actividad de inducción es tan alta para todos los microorganismos que, en presencia de tales antibióticos, las cepas salvajes y las mutantes son fenotípicamente idénticas; de esta manera, tampoco favorecen el crecimiento selectivo de las cepas mutantes.

En cuanto a los penems, penams y carbapenems tales como el imipenem, son selectores muy pobres, ya que tienen una actividad similar contra las cepas salvajes y mutantes, no siendo favorecido ningún tipo de cepa frente a tales antibióticos.

Los antibióticos β -lactámicos que favorecen el crecimiento selectivo de las cepas mutantes, son las cefalosporinas de 3a. generación (e.g. cefotaxima) y monobactams (aztreonam)¹³.

Estos compuestos son muy activos contra las cepas salvajes, generalmente son malos inductores y son hidrolizados pobremente por las cefalosporinasas cromosómicas; de esta manera, sólo las cepas mutantes que producen altos niveles de β -lactamasas son capaces de crecer en presencia de dichos antibióticos⁵⁸.

No está claro todavía si la β -lactamasa producida, es idéntica antes y después del proceso de derrepresión. Muchos investigadores han comparado las características de ambos tipos de enzimas y reportan un mínimo de diferencias. Otros más, señalan cambios en el punto isoeléctrico, especificidad de sustrato y parámetros cinéticos.

El único punto claro, hasta ahora, es que la concentración de β -lactamasa producida antes de la derrepresión, se ve incrementada después de este proceso, se encuentren o no presentes β -lactamasa adicionales²⁵.

Es posible que, en algunos microorganismos, la producción de enzimas de diferente tipo posterior al proceso de derreprección (β -lactamasas múltiples), sea consecuencia de la transcripción de múltiples genes estructurales.

En otros microorganismos, la producción de enzimas múltiples puede ser el resultado de diferentes formas moleculares del mismo gen, cuyo producto sufrió, posiblemente, diferentes procesos posteriores a la transcripción. Ambas hipótesis necesitan una evaluación posterior.

Los estudios llevados a cabo por Joris (&) ²⁵, en una cepa de *Enterobacter cloacae* (la cual produce una enzima de clase molecular C-cap.II-), demostraron que la enzima de la cepa salvaje (inducible), es idéntica a la aislada en la cepa derreprimida, indicando que la mutación es en el gen que codifica para una proteína reguladora y no en el gen estructural de la β -lactamasa.

Los estudios comparativos de susceptibilidad, entre las cepas salvajes y las cepas mutantes que han sufrido derreprección, han demostrado la importancia de este proceso en la resistencia múltiple frente a los antibióticos β -lactámicos ²⁶.

En general, las Concentraciones Inhibitorias Míminas (CIM) del aztreonam y de cefalosporinas recientes como cefotaxima, cefoperazona, ceftizoxima, ceftazidima y moxalactam, se incrementan de 64 a 256 veces con el proceso de derreprección.

Los valores de CIM de las penicilinas como la carbenicilina, mezlocilina y piperacilina, se incrementan de 16 a 32 veces, mientras que los de la amdinocilina, penem e imipenem no son afectados por el proceso de derreprección de las cefalosporinas cromosómicas.

El diferente comportamiento entre los antibióticos β -lactámicos se debe probablemente

a :

- a) El grado de penetración al interior de la célula
- b) La interacción con las cefalosporinas cromosómicas
- c) El número, localización y tipo de PBP's en la membrana celular

Factores que en un momento dado actúan en sinergismo con la β -lactamasa de las bacterias Gram negativas constituyendo la denominada resistencia múltiple (cap.III).

Genética de las Cefalosporinas Cromosómicas.

El mecanismo genético responsable de la inducción de las cefalosporinas cromosómicas, no se ha delineado completamente; sin embargo, se han realizado progresos significativos en los estudios de organización de los genes que codifican las enzimas de *C. freundii* y *E. cloacae* debido a las semejanzas con el gen *ampC*, (responsable de la producción de la cefalosporina cromosómica de *E. coli* K-12) que aunque su regulación es muy diferente a la de otros microorganismos con enzimas inducibles, la similitud entre las β -lactamasas sugiere un origen evolutivo similar.

E. coli produce niveles muy bajos de cefalosporinasa cromosómica de manera constitutiva. La expresión tan pobre de esta enzima se debe a un promotor ineficiente y a un atenuador localizado entre el promotor y el gen estructural. Menos de una cuarta parte de la transcripción iniciada en el promotor escapa de la atenuación.

El promotor para *ampC* en *E. coli* K-12, traslapa el gen estructural que codifica para la enzima fumarato reductasa. Debido a que esta enzima es esencial para el crecimiento anaerobio, son muy raras las mutaciones en el promotor *ampC*, ya que afectaría de manera adversa a la enzima fumarato reductasa. No obstante, se han reportado cepas mutantes de *E. coli* con una hiperproducción de β -lactamasa *AmpC*. Posiblemente esta superproducción se deba a la existencia de copias múltiples del gen *ampC* o a un incremento en el grado de transcripción como resultado de una mutación que afecte al promotor o atenuador⁷⁰.

En estas cepas hiperproductoras, el incremento en la producción enzimática (2 a 20 veces mayor), no es tan grande como se ha observado usualmente durante el proceso de derrepresión de otras cefalosporinasas cromosómicas, pero es suficiente para conferir una mayor resistencia frente a las penicilinas, aztreonam y muchas de las nuevas cefalosporinas.

C. freundii y *E. cloacae* han sido los microorganismos mejor estudiados entre los que poseen cefalosporinasas cromosómicas inducibles de la familia *Enterobacteriaceae*.

Se ha demostrado la localización adyacente del operón de la enzima de *C. freundii*, al operón de la fumarato reductasa; al igual que en *E. coli*, pero en esta última, las dos regiones se traslapan y en *C. freundii* se encuentran separadas por 1,100 bp (pares de bases), región a la cual se le ha denominado *ampR*.

Esta región parece contener genes reguladores para la expresión genética de la β -lactamasa, ya sea positiva o negativamente. Se ha demostrado también su función en el

proceso de inducción, sin embargo, las mutaciones que producen una derrepresión estable, parecen ser fuera de la región *ampR-ampC*¹²⁴.

Los intentos por identificar la(s) región(es) genética(s) específica(s) involucrada(s) en el proceso de inducción, se han visto obstaculizados por la necesidad de emplear cepas de *E. coli* como hospedadores para los plásmidos que contienen el operón de la β -lactamasa de *C. freundii* y *E. cloacae*, ya que no expresa eficientemente las β -lactamasas de ambos microorganismos, siendo la expresión a menudo muy pobre o incluso no inducible.

Sanders indica¹²⁴, que todos los investigadores que han usado cepas de *E. coli* como cepas hospedadoras, se han topado con este problema de expresión genética. Por lo que hace ver la importancia de encontrar una cepa receptora más idónea, debido a la necesidad de una investigación más precisa de la organización genética responsable de la inducción de las cefalosporinasas cromosómicas.

Esta investigadora sugiere que posiblemente la mejor cepa receptora para llevar a cabo este tipo de estudios, la constituyen la de la especie donadora carente de todo o una parte del operón de la β -lactamasa.

La base molecular del proceso de inducción del gen *ampC*, actualmente se conoce poco; sin embargo, se sabe que en *E. cloacae* y *C. freundii*, la expresión de la β -lactamasa es controlada por lo menos por dos genes, denominados *ampR* y *ampD*¹¹¹. Los compuestos β -lactámicos podrían interactuar posiblemente con el gen *ampD*, el cual mandaría una señal a la región *ampR*, permitiendo el proceso de transcripción del gen *ampC*. Sin embargo, se ha reportado recientemente que la inducción de la β -lactamasa en *C. freun-*

dii, no depende de la entrada del antibiótico al citoplasma⁴³, sugiriendo la presencia de una proteína que actúe como señal a través de la membrana citoplasmática¹¹¹.

En *Bacillus licheniformis* se identificó a una proteína, con propiedades similares a las PBP's, involucrada en el proceso de inducción de la β -lactamasa cromosómica; con base en este hallazgo, Brunello (&)¹¹¹, investigó y demostró la función de la enzima PBP2 en el proceso de inducción de la cefalosporinasa cromosómica de *E. coli* por el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).

Este investigador empleó cepas mutadas de *E. coli* termosensibles para la expresión de PBP2 y observó la falta de inducción del 6-APA a 42°C en estas cepas, indicando la función esencial de la enzima PBP2.

Por otro lado, experimentos preliminares en *P. aeruginosa*, sugieren que las proteínas PBP 1b, 3, 4 y 5, se encuentran involucradas en la inducción de *ampC* en este microorganismo, desconociéndose aún si el proceso de inducción en *E. coli* comprende más de un tipo de PBP¹¹¹.

Se desconoce el mecanismo por el cual el gen *ampD*, registra y reconoce las interacciones antibiótico β -lactámico-PBP.

En otro aspecto, se ha reportado recientemente la existencia de cepas mutantes en las que el proceso de derepresión, depende de la temperatura de incubación: *Enterobacter cloacae*, expresa altos niveles de β -lactamasa a 42°C (en ausencia de inductor), pero no a 28°C⁵⁸, la cefalosporinasa de *C. freundii* GN346 se sintetiza semi-constitutivamente cuando la bacteria se cultiva por arriba de los 25°C, mientras que requiere inductor a 20°C¹²⁸.

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

Lo anterior sugiere la presencia de un represor mutado, capaz de adoptar dos conformaciones dependiendo de la temperatura⁵⁸.

En otro aspecto, se ha asociado la actividad inducible de la β -lactamasa Pen A de *Pseudomonas cepacea* 249 y la capacidad para hidrolizar la penicilina, con la sorprendente capacidad que tiene esta cepa de utilizar los compuestos β -lactámicos como fuente de carbono¹¹⁸. Esta enzima difiere marcadamente de las β -lactamasas cromosómicas tipo AmpC de las enterobacterias (incluyendo a *P. aeruginosa*) compartiendo, sin embargo, algunas similitudes con la β -lactamasa de *Alcaligenes faecalis*.

No obstante que se han aislado una gran variedad de enzimas de diferente tipo codificadas por cromosomas o plásmidos, la enzima Pen A es única en su asociación con la ruta metabólica, permitiendo a *P. cepacea* metabolizar la penicilina; esto indica que esta enzima tiene una función básica en esta especie más que conferirle una simple resistencia. La β -lactamasa Pen A se conserva en toda la especie, pues ha sido aislada de muestras clínicas, del suelo y de algunas plantas.

El patrón de inducción de pen A es más característico de un gen de tipo metabólico que aquellos que codifican para la resistencia frente a los antibióticos solamente. La expresión de pen A fué inducida por una pequeña cantidad de sustrato y la expresión paraba cuando el inductor era consumido totalmente.

Este tipo de cinética es diferente a la presente en *P. aeruginosa*, ya que la β -lactamasa cromosómica es inducible pero necesita grandes concentraciones de inductor; en adición, en este último tipo hay una considerable etapa lag entre la exposición con el inductor y la producción de la enzima.

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

Estas diferencias explican la falta de similitud en la respuesta de *P. cepacea* y *P. aeruginosa* frente a los antibióticos; ya que a pesar de que ambos microorganismos poseen frente a estos la misma permeabilidad, la rápida inducción existente en *P. cepacea* le confiere una ventaja selectiva en los procesos infecciosos sobre *P. aeruginosa*¹¹⁸.

ANTIBIOTICO	TIPO DE β -LACTAMASA	
	mediadas por	
	Cromosomas	Plásmidos
Cefuroxima o cefotaxima	<i>P.cepacia</i> 11164	OXA-1
	<i>P.vulgaris</i> GN7919	OXA-4
	<i>B.fragilis</i> MULB-1008	OXA-5
	<i>K. oxytoca</i> R30	OXA-6
	<i>K. aerogenes</i> K1OXA-7	
Ceftazidim		PSE-1
		PSE-2
		OXA-1
Latamoxef	<i>K. oxytoca</i> 3859	OXA-2
		OXA-4
Monobactams	<i>K. oxytoca</i> 3859	OXA-5
		PSE-2
		PSE-3
Imipenem	<i>P. maltophilia</i> GN12873	

TABLA 1.2

β -lactamasas codificadas por cromosomas o plásmidos capaces de hidrolizar a los nuevos antibióticos β -lactámicos⁹⁴.

1.4 Relación entre las β -lactamasas codificadas por cromosomas y por plásmidos.

La tabla 1.2 muestra las β -lactamasas mediadas por cromosomas o plásmidos que hidrolizan a los nuevos antibióticos β -lactámicos. Las cepas productoras de ambos tipos representan un problema serio en la terapia.

En general, ninguna de las β -lactamasas determinadas por cromosomas presenta similitud en sus propiedades bioquímicas, con las β -lactamasas mediadas por plásmidos⁹⁴.

Una excepción a lo anterior es la β -lactamasa cromosómica aislada en muestras de *K. pneumoniae*, la cual es indistinguible por punto isoeléctrico y cinéticamente de la β -lactamasa SHV-1, mediada por un plásmido⁹⁴.

Sin embargo, existe diferencia en la cantidad producida, ya que una cepa de *E. coli*, productora de SHV-1, sintetiza una mayor cantidad de enzima que la cepa de *K. pneumoniae* 222, que produce la misma enzima pero codificada por cromosoma⁵⁹.

Se ha reportado que *K. pneumoniae* 1529E, posee dos copias del gen estructural de SHV-1, una de las cuales se localiza en un plásmido (R1293) y la otra en un replicón no transmisible, situado en el cromosoma bacteriano posiblemente⁵⁹; hecho por el cual se ha sugerido, que el gen que codifica la β -lactamasa SHV-1 se encontraba originalmente como un gen cromosómico en *K. pneumoniae*, incorporándose a un plásmido posteriormente^{51, 94}.

Debido a que no se ha encontrado el gen cromosómico ancestral de la β -lactamasa más común, TEM-1, así como para otras β -lactamasas mediadas por plásmidos, el origen de la mayoría de estas enzimas permanece desconocido⁹⁴.

Actualmente se ha demostrado la similitud en las propiedades catalíticas y moleculares entre las enzimas SHV-1 y TEM-1, por un lado^{4, 140}, y la homología inmunológica y de hibridación de ADN entre la β -lactamasa producida por *K. pneumoniae* LEN-1 (codificada por un cromosoma) y TEM-1 (codificada por el plásmido pBR322) por el otro⁴; apoyando la hipótesis que sugiere que la enzima SHV-1 puede representar un paso evolutivo entre las β -lactamasas de *K. pneumoniae* codificadas por cromosomas y las β -lactamasas tipo TEM codificadas por plásmidos⁴.

Labia (&)⁸⁵, reporta propiedades similares entre SHV-2 y TEM-3; sin embargo, difieren en su actividad frente a las metoximino-cefalosporinas y la presencia de TEM-3 confiere un mayor nivel de resistencia.

Campbell (&)²⁰, identificó una β -lactamasa cromosómica de clase A (cap.II), en una cepa de *Rhodopseudomonas capsulata* sp 108 (bacteria fotosintética); el hallazgo fue sorprendente, ya que este microorganismo vive en el agua, medio en el cual no se encuentran concentraciones dañinas de antibióticos producidos por hongos. Es poco probable que estos microorganismos se hayan expuesto a dosis quimioterapéuticas intencionales y además, generalmente esta bacteria no compete con microorganismos no fotosintéticos por nutrientes, por lo que no tiene la necesidad de sintetizar β -lactamasas.

No obstante la evidencia de que las rodopseudomonas pueden aceptar factores de resistencia de otras bacterias Gram negativas y la similitud en la estructura primaria de

las β -lactamasas tipo TEM con la enzima de *R. capsulata*, Campbell indica que la enzima se encuentra codificada por un auténtico gen del género *Rhodopseudomonas*, por lo que sugiere que no es un transposón que se haya transferido recientemente.

Esto indica la frecuencia con que los genes que codifican las β -lactamasas, se organizan como parte de elementos transferibles, que pueden transmitirse entre replicones bacterianos, independientemente de los sistemas de recombinación celular, de esta manera pueden existir como parte de un cromosoma, plásmido o ADN de un fago.

La gran frecuencia con la que los microorganismos adquieren diferentes tipos de enzimas, se debe a que la mayoría de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Pseudomonas*, pueden tener β -lactamasas cromosómica independientemente de la presencia de enzimas mediadas por plásmidos¹⁰⁵.

1.5 β -Lactamasas recientes.

Los análisis moleculares de las β -lactamasas descubiertas recientemente, han revelado que la mayoría de estas enzimas, derivan de las β -lactamasas ya reconocidas, a partir de mutaciones puntuales⁸⁸.

Se ha observado que algunos cambios en la secuencia de aminoácidos, inducen pequeñas diferencias en los parámetros cinéticos frente a los antibióticos β -lactámicos, mientras que en otros, las diferencias son mayores^{14, 24, 88}.

En el caso de las β -lactamasas tipo TEM, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas entre las bacterias patógenas Gram negativas, se reconoció que la diferencia

entre TEM-1 y TEM-2 radica en la modificación de un solo aminoácido, confiriendo a cada una de ellas una actividad semejante pero con diferentes puntos isoeléctricos. Sin embargo, para otras β -lactamasas nuevas como TEM-3, TEM-4, TEM-5 y TEM-7, las cuales presentan como mínimo dos (y en algunos casos tres o más) cambios en su secuencia con respecto a TEM-1 O TEM-2, la diferencia es muy grande (ver tablas de clasificación, cap.VI).

Esta misma situación se observa entre las β -lactamasas SHV-1 y SHV-2, las cuales, aunque varían en un solo aminoácido, presentan diferentes espectros de actividad²⁴; por otro lado, se ha encontrado una gran similitud entre la β -lactamasa TEM-1 y SHV-1 a nivel estructural y espectro de actividad^{4, 140}, difiriendo por un sólo aminoácido en el sitio activo. Cabe señalar, sin embargo, la ausencia de relación entre estas dos enzimas por análisis de hibridación⁴.

En 1986, se observó que los cambios de un sólo aminoácido en la treonina adyacente al sitio activo en la secuencia de TEM-2, daba como resultado un mínimo de 15 enzimas activas capaces de conferir resistencia frente a la ampicilina¹⁴. De acuerdo con esto, si se considera el número posible de cambios en la secuencia de aminoácidos de las β -lactamasas, no será sorprendente la aparición de un gran número de β -lactamasas en el futuro, incremento que se ha observado en los últimos años; así mismo, como lo indica Bush¹⁴, no será raro encontrar formas isoenzimáticas de estas enzimas.

Se ha observado, sin embargo, que este tipo de evolución instantánea sigue un trayecto sofisticado⁸³, pues tal parece que ciertas mutaciones puntuales se encuentran supeditadas a otras, como es el caso en las β -lactamasas tipo TEM, en las cuales se ha identificado

CAPITULO I. ASPECTOS GENETICOS Y EVOLUTIVOS DE LAS β -LACTAMASAS

cierto tipo de mutación en los residuos 104 y 238, o en el residuo 104 solamente, mientras que no se han aislado, hasta ahora, enzimas con este tipo de mutación en el residuo 238.

Cabe señalar, que la aparición o incremento de resistencia en una cepa bacteriana frente a los antibióticos β -lactámicos, no sólo se debe a la síntesis de un nuevo tipo de β -lactamasas; se debe tomar en cuenta también, un aumento en la cantidad de síntesis enzimática (como sucede en cepas que sufrieron una derepresión), así como también, la modificación de diversos factores que contribuyen a un aumento de resistencia como disminución de la permeabilidad y afinidad por las PBPs (analizados en el cap. III).

Debe tomarse en cuenta también, la posibilidad de que diferentes tipos de enzimas pueden ser producto de un mismo precursor que ha sufrido diversos procesos posteriores a la transcripción².

Finalmente, debe recalarse que el empleo de nuevos compuestos durante la terapia antimicrobiana, incluye el riesgo de selección de los nuevos determinantes de resistencia *in vivo*²⁴, como lo demuestra la reciente aparición de nuevas β -lactamasas mediadas por plásmidos, capaces de conferir resistencia a las nuevas cefalosporinas y compuestos relacionados⁷⁸.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

2.1 Antecedentes

Se han propuesto cuatro clases estructurales de β -lactamasas con base en su estructura primaria (secuencia de aminoácidos): las clases A y B de Ambler¹, la clase C de Jaurin y Grundstrom⁷⁰ y la clase D, propuesta recientemente⁶⁷.

Las clases A y C operan mediante un mecanismo que involucra la formación de un complejo intermediario acil-enzima, implicando el grupo hidroxilo de un residuo de serina. La clase B está representada por una metaloenzima que emplea Zn^{2+} como cofactor. La clase D incluye a β -lactamasas, que como A y C, son enzimas serínicas, es decir, un residuo de serina se encuentra involucrado en la actividad catalítica, pero a diferencia de aquéllas, las β -lactamasas de clase D poseen una gran actividad frente a la oxacilina.

Debido a la gran variedad de clases, se ha propuesto un origen polifilogénico para las β -lactamasas, sin embargo, Joris (&)⁷², demostró recientemente que las β -lactamasas serínicas (A, C y D) son miembros de una superfamilia (ver origen).

Muchas β -lactamasas producidas por bacterias Gram negativas se inhiben con agentes que reaccionan con el grupo tiol, tal como el p-cloromercurobenzoato, y aunque algunas pertenecen a las clases A, C y D, no se ha determinado la clase estructural de la mayoría de ellas, por lo que Ambler sugiere que estas enzimas p-cloromercurobenzoato sensibles pertenecen posiblemente a una clase con diferente mecanismo. Por otro lado, Bicknell

(&)⁸, ha identificado una nueva clase estructural de metaloenzimas; no quedando descartada, por lo tanto, la existencia de otras clases moleculares.

2.2 β -lactamasas serfínicas.

2.2.1 Clase estructural A

Esta clase estructural fue propuesta por Ambler¹, basándose en la comparación de la secuencia aminoácida de cuatro tipos de β -lactamasas (fig.2.1). Varios miembros de la clase III de Richmond y Sykes (ver cap.de clasificación), se han asignado a esta clase^{1, 42}. Es la más estudiada debido a su gran distribución, en especial las enzimas de tipo TEM, mismas que se encuentran con gran frecuencia en los microorganismos patógenos⁸⁸. Esta clase también incluye a la enzima PC1 de *S. aureus* y a la enzima de *B. licheniformis* 749/C⁹⁴.

Características Fisicoquímicas y Bioquímicas

Las β -lactamasas de clase A se encuentran en bacterias Gram positivas y Gram negativas; los genes que codifican para las β -lactamasas de esta clase, se encuentran localizados frecuentemente en plásmidos transmisibles en las bacterias Gram negativas y en cromosomas, en las bacterias Gram positivas^{15, 16, 20}. Este grupo difiere ampliamente en sus propiedades físicas y enzimáticas. Aunque la mayoría posee un P.M. alrededor de 29,000 este varía entre los 17,000 y los 34,000. Los puntos isoeléctricos fluctúan entre pH 4.7 a pH 8.6 y existen grandes diferencias en su especificidad de sustrato y otros parámetros cinéticos. En general, las β -lactamasas de clase A hasta ahora conocidas, son inhibidas por el ácido clavulánico.

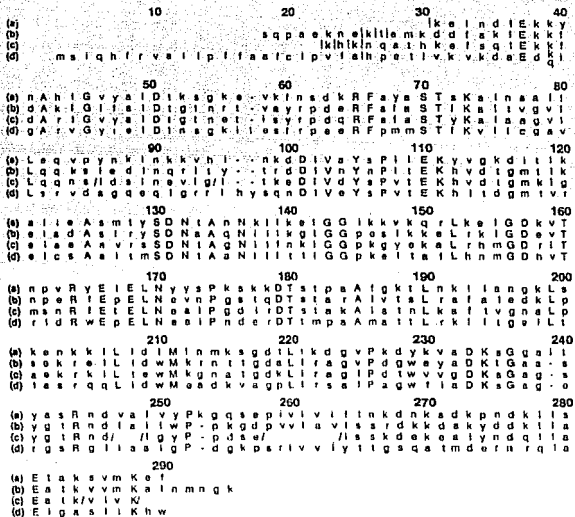


Fig. 2.1

Alineación de la secuencia de aminoácidos de las β -lactamasas de clase A.

Las secuencias son: (a) *Staphylococcus aureus* PC1, (b) *Bacillus licheniformis* 749/C, (c) *Bacillus cereus* 569/H β -lactamasa I, (d) *Escherichia coli* PBR322 y TEM.

En la secuencia (d) la única diferencia entre el plásmido es el residuo 39. Los residuos se enumeran con base al sistema propuesto por Ambler, donde la numeración inicia en el N-terminal de la forma enzimática más larga de *B. licheniformis* que se ha aislado y toma en consideración los espacios postulados en las secuencias para obtener el mejor empalme. Las líneas verticales (|) indican la región N-terminal de las moléculas enzimáticas naturalmente liberadas. Los residuos que son idénticos en las cuatro secuencias aparecen con letra mayúscula¹.

Las enzimas de esta clase se encuentran distribuidas en los grupos 2a, 2b y 2b' propuestos por Bush (ver cap. de clasificación) y aunque todas ellas son muy activas frente a las penicilinas, no se les debe considerar exclusivamente como penicilinasas, ya que algunas hidrolizan en grados apreciables a las cefalosporinas (Gpo.2b) y otras a los antibióticos aminotiazoleoxima o de amplio espectro amplificado (Gpo. 2b'). No se observa, por lo tanto, un perfil de sustrato tan específico como el de las enzimas de clase C, las cuales se consideran como cefalosporinasas, aunque en estas últimas, como se mencionará posteriormente, la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) frente a las penicilinas es apreciable.

Son β -lactamasas serínicas, ya que mediante marcadores como el ácido 6- β -iodo-penicilánico, se ha demostrado la presencia de serina en el sitio activo¹. Las β -lactamasas serínicas muestran un comportamiento similar frente a este tipo de marcadores, sugiriendo un mecanismo de acción similar. El residuo marcado corresponde al resto de serina 70, de acuerdo con la numeración de Ambler (fig.2.1).

Esta clase es sensible a la inactivación mediante yodo y aunque varía la respuesta de las enzimas frente a éste, no se comprende la base molecular de tal inactivación^{1, 3, 115}. También se ha estudiado su reacción frente al tetranitrometano y en todos los casos la tirosina-105 (fig. 2.1) se modifica rápidamente. Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre la cantidad de inactivación y la de modificación. Ha sido posible la inactivación de la enzima RTEM producida por *E. coli* mediante foto-oxidación, en la cual hay destrucción de los restos de histidina, determinándose que la histidina-112 es el resto involucrado. Los restos de histidina varían apreciablemente entre los miembros de la clase A, siendo la posición 112 el único sitio ocupado por

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

histidina en más de una de las enzimas (ver fig. 2.9) aún se desconoce la función de este residuo¹.

En la figura 2.2 se muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos alrededor del sitio activo de varias β -lactamasas de clase A, clase C y la DD-carboxipeptidasa de *Streptomyces* R61, donde se observa la presencia de la secuencia característica: Phe(66)-Xaa-Xaa-Xaa-Ser* (70)-Xaa-Xaa-Lys(73), donde Xaa es cualquier aminoácido³⁴.

	62			65 66			70			73		
CLASE A												
<i>Streptomyces cacaoi</i>	Ala	Asp	Glu	Arg	Phe	Ala	Tyr	Gly	Ser	Thr	Phe	Lys
<i>Streptomyces albus</i> G	Ala	Asp	Glu	Leu	Phe	Pro	Met	Cys	Ser	Val	Phe	Lys
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					Phe	Ala	Met	Cys	Ser	Thr	Ser	Lys
<i>Klebsiella aerogenes</i>					Phe	Ala	Met	Asn	Ser	Thr	Ser	Lys
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pro	Asp	Glu	Arg	Phe	Ala	Phe	Ala	Ser	Thr	Ile	Lys
<i>Bacillus cereus</i> I	Pro	Asp	Glu	Arg	Phe	Ala	Phe	Ala	Ser	Thr	Tyr	Lys
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ser	Asp	Lys	Arg	Phe	Ala	Tyr	Ala	Ser	Thr	Ser	Lys
<i>E. coli</i> RTEM-2	Pro	Glu	Glu	Arg	Phe	Pro	Met	Met	Ser	Thr	Phe	Lys
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Glu	Asp	Glu	Leu	Phe	Leu	Met	Asn	Ser	Thr	Val	Lys
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gly	Asp	Glu	Arg	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Thr	His	Lys
CLASE C												
<i>E. coli</i> K12	Gln	Gln	Thr	Leu	Phe	Glu	Leu	Gly	Ser	Val	Ser	Lys
<i>Enterobacter cloacae</i> P99	Pro	Gln	Thr	Leu	Phe	Glu	Leu	Gly	Ser	Ile	Ser	Lys
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18S	Pro	Glu	Thr	Leu	Phe	Glu	Ile	Gly	Ser	Val	Ser	Lys
<i>Serratia marcescens</i>	Glu	Gln	Thr	Leu	Phe	Glu	Val	Gly	Ser	Leu	Ser	Lys
DD- CARBOXIPEPTIDASA												
<i>Streptomyces</i> R61	Thr	Thr	Asp	Arg	Phe	Arg	Val	Gly	Ser	Val	Thr	Lys

Fig. 2.2

Comparación de las secuencias de aminoácidos alrededor del sitio activo de diversas β -lactamasas.

Los residuos 62-65 de la enzima de *S. cacaoi* se redujeron de la secuencia parcial de nucleótidos del gen³⁴, confirmada posteriormente mediante estudios criocrominológicos²¹. La numeración corresponde a la propuesta por Ambler²¹.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

En las β -lactamasas de la clase A es muy frecuente encontrar la secuencia Asp-Glu-Arg (63-65), los residuos Ala 67 y Thr 71, así como aminoácidos aromáticos en las posiciones 68 y 72. Sólo las enzimas de *Rhodopseudomonas capsulata* y *Streptomyces albus G* presentan Leu65 y *S. cacaoi* Gly-69, los cuales son residuos muy característicos de la clase C.

De acuerdo al sitio activo, la clase A es muy heterogénea, pues a excepción de Phe-66, Ser-70 y Lys-73 presentes en todas las enzimas, no se puede realizar un consenso general en las secuencias de esta clase, pues en todas las posiciones siempre hay como mínimo una enzima que presente un comportamiento individual, por ejemplo Leu-65 en *S. albus G* y *R. capsulata* (alanina o prolina en otros), Leu-68 en *Pseudomonas aeruginosa* (tirosina, fenilalanina o metionina en los otros).

En algunas posiciones la variación es muy grande, sin la presencia de sustituciones homólogas: posición 62 (Ala, Pro, Ser, Gly ó Glu), 69 (Gly, Cys, Asn, Ala, Met) y 72 (Phe, Ser, Ile, Tyr, Val, His)³⁴. En cambio, en las enzimas de la clase C, muchas sustituciones son altamente homólogas (posiciones 68 y 71 por ejemplo); posiblemente esto sea reflejo de la gran variedad de microorganismos Gram negativos y Gram positivos que producen β -lactamasas de clase A, explicando tal vez la gran diversidad presente en la especificidad de estas enzimas por el sustrato.

Es sorprendente encontrar que en algunas enzimas producidas por un mismo género, no exista una gran homología entre ellas como en las de otros géneros; tal es el caso de las β -lactamasas del género *Streptomyces*, en donde no hay gran similitud, en comparación con las del género *Bacillus*; aun más, puede presentarse una mayor

homología entre los miembros de diferentes géneros, como en la β -lactamiasa de *S. cacaoui*, la cual es más parecida a la enzima de *B. licheniformis* que a la de *S. albus* G.

Una característica interesante, es la presencia de un residuo de cisteína cercano al residuo de serina en el sitio activo sólo en las enzimas de *K. pneumoniae* y *Streptomyces albus* G³⁴; *K. aerogenes* también posee un residuo de cisteína, pero retirado del sitio activo⁴². Los estudios realizados en las dos primeras enzimas indican que este residuo se encuentra intensamente embebido en la molécula, siendo inaccesible el grupo sulfhidrilo y probablemente no esencial para la actividad⁴², a diferencia de la β -lactamasa II de *B. cereus* (clase B), donde el grupo sulfhidrilo es indispensable³³. Algunos estudios parecen indicar que la unión entre la enzima y el sustrato se ve deteriorada por la presencia de este grupo voluminoso cercano al sitio activo⁷³. Sin embargo, en un análisis reciente en la β -lactamasa I de *B. cereus*, donde se sustituyó la Ala-123 por Cys, se comprobó que la disminución de actividad fué muy pequeña⁹².

Es notable, que aunque la DD-carboxipeptidasa presente una secuencia más parecida a las β -lactamasas de clase C, se observe una mayor similitud entre la peptidasa y la clase A, que entre las mismas clases A y C.

Comparando las secuencias de la fig. 2.2 se observa una identidad mínima de un 25%; sin embargo, la homología puede ser menor si se comparan las secuencias completas de las enzimas³⁴.

Las β -lactamasas de clase A presentan una flexibilidad estructural poco usual. Algunos antibióticos β -lactámicos reducen la eficiencia catalítica de la enzima con una recupera-

ción lenta de la actividad total. La flexibilidad puede estar relacionada con una estabilización total baja⁶⁴.

Estructura

Los métodos de difracción de rayos x han permitido estudiar la estructura cristalina de algunas β -lactamasas de las clases moleculares A, B y C^{36, 133}.

Dideberg (&), propuso el modelo tridimensional de la β -lactamasa producida por *Streptomyces albus* G³⁶, cuyas características se mencionan a continuación como enzima representativa de la clase A en el presente trabajo (fig. 2.3).

La enzima es una típica proteína que posee dos dominios, uno de ellos contiene una estructura central la cual está conformada por cinco cadenas de láminas plegadas, es decir, de conformación β , con tres alfa-hélices en una cara y una alfa-hélice en la otra. Las cadenas S3, S4 y S5 forman un β -meandro, que es una estructura muy estable que se ha encontrado también en el sitio activo de las proteinasas serínicas de la familia de la tripsina. El segundo dominio consiste en cinco alfa-hélices. La estructura se encuentra estabilizada mediante puentes salinos. En particular, la Glu-16 (de acuerdo a la numeración de la enzima madura), de la hélice H1, interactúa con la Arg-39 de la cadena S2 (fig. 2.3).

El sitio activo (* en la figura), posee un residuo de serina en la posición 48 y se define topológicamente por la porción N-terminal de la hélice H3 de un lado, la cadena S3 en el otro, la hélice H2 en la parte posterior, una espiral formada por la conexión entre las hélices H7 y H8 en la parte superior y otra espiral formada en el fondo por la

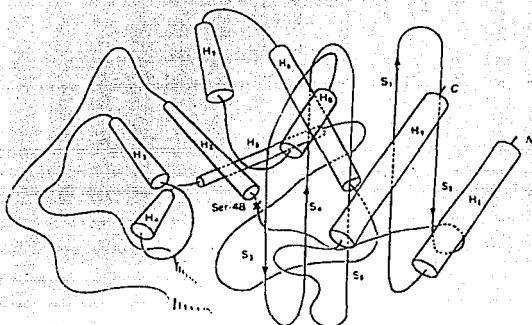


Fig. 2.3

Representación esquemática de la estructura tridimensional de la β -lactamasa de *Streptomyces albus* G³⁶.

La numeración de los residuos se encuentra referida a la enzima madura (donde la N-terminal se encuentra en la Gly-40 en el precursor de la protefna).

No fue posible definir la estructura de los residuos 77-91 debido a la falta de densidad electrónica continua.

Las cadenas de conformación β (S_i) se encuentran representadas mediante flechas y las α -hélices (H_i) mediante cilindros. N es el residuo N-terminal, C, el C-terminal

conexión entre las hélices H_5 y H_6 . El residuo Ser-48 se encuentra en la N-terminal de la hélice H_2 y Dideberg indica que esta posición posiblemente puede facilitar la catálisis.

Otros residuos que desempeñan funciones en la catálisis y/o unión del sustrato son (entre comillas la numeración de Ambler): Lys-51 "73" localizada en H_2 , Glu-150 "166" en la espiral formada entre H_5 y H_6 , Lys-218 "234" y Gly-220 "236" en S_3

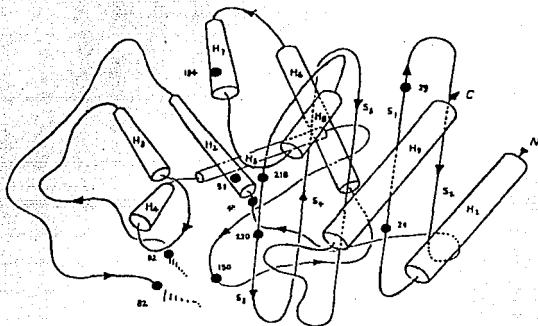


Fig. 2.4
Regiones I-VII propuestas por Joris⁷², en la molécula de *S. albus G.*

La numeración empleada corresponde a la referida para la enzima madura:

Región I. Gly⁴⁵-Asp⁵⁰, II. Ser⁴⁸-Lys⁵¹, III. Gln⁸², IV. Lys⁹², V. Glu¹⁵⁰, VI. Trp¹⁹⁴, VII. Lys²¹⁸-Gly²²⁰.

De acuerdo a la numeración de Ambler:

I. Gly⁴⁵-Asp⁵⁰, II. Ser⁷⁰-Lys⁷³, III. Gln¹⁰⁵, IV. Lys¹¹¹, V. Glu¹⁶⁶, VI. Trp²¹⁰, VII. Lys²³⁴-Gly²³⁶.

(fig. 2.4). La Lys-51, Lys-218 y Gly-220 son residuos que se conservan en las β -lactamasas serfénicas y las DD-peptidasas.

El arreglo de los elementos de la estructura secundaria en la β -lactamasa de *Streptomyces albus G.*, es semejante a los encontrados en las enzimas de *B. licheniformis* y *B. cereus I.*, excepto que falta una hélice en las estructuras de estas últimas: H8 en la enzima de *B. licheniformis* y H15 en la de *B. cereus*³⁶.

Actualmente se conoce también la estructura tridimensional de la β -lactamasa de *S. aureus*, cuya configuración en el sitio activo es semejante a la de *S. albus G*; sin embargo, dos hélices pequeñas localizadas en la enzima estafilocócica, α -3 y α -7, no se numeraron en la β -lactamasa de *S. albus*. Por lo tanto, las hélices α -1, α -2, α -4, α -5, α -6, α -8, α -9, α -10 y α -11 en la enzima de *S. aureus* equivalen a las hélices de la enzima de *S. albus* H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8 y H9 respectivamente⁷².

Gracias a los estudios cristalográficos ha sido posible relacionar la secuencia aminoácida y la estructura tridimensional⁷², permitiendo ubicar en ésta última la posición de los aminoácidos involucrados en el proceso catalítico. Algunos de estos aminoácidos son restos invariantes en la secuencia de las β -lactamasas sérficas y las DD-peptidasas. La fig. 2.4 muestra la posición de estas siete regiones invariantes en la molécula de la β -lactamasa de *Streptomyces albus G*.

2.2.2 Clase estructural C

La clase estructural C se encuentra representada por las cefalosporinasas cromosómicas de las bacterias Gram negativas, ya que hasta la fecha, todas las enzimas que se han catalogado dentro esta clase estructural, han sido de este tipo⁸².

Las enzimas de clase C se encuentran comprendidas en las subclases Ia, Ib y Id propuestas por Richmond & Sykes (R & S) que corresponden al grupo I de Bush (pag.206).

Cabe señalar que la clase Ic de R & S corresponde al grupo 2e de Bush y de acuerdo a sus características, posiblemente pertenecen a la clase estructural A.

Galleni y Frère indican que las β -lactamasas de clase C encajan perfectamente en la clase I de R & S, si se toma como único parámetro el valor de Kcat; sin embargo, respecto a la relación Kcat/Km, esta clasificación no está ampliamente justificada⁵⁴; esto puede deberse a que en la mayoría de los primeros trabajos, se reporta una actividad calculada a concentraciones mayores de 100 micromoles y muchos valores de Km son menores que ésta.

Al igual que en la clase A, las β -lactamasas de la clase C son enzimas serfínicas; sin embargo, la secuencia alrededor del sitio activo es diferente (fig. 2.5). Como se aprecia comparativamente en la fig. 2.2, sólo se conservan tres residuos: Phe-66, Ser-70 y Lys-73⁸⁰.

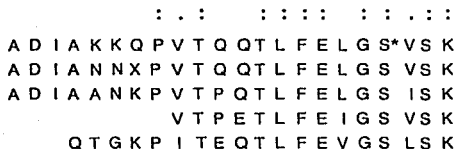


Fig. 2.5

Secuencia de aminoácidos alrededor del sitio activo de algunas β -lactamasas de clase C.

Es claro que la serina del péptido corresponde a la serina del sitio activo. Los residuos que se conservan en todas las enzimas de la clase C se encuentran indicados con dos puntos. Las sustituciones homólogas se indican por un sólo punto⁷⁴.

En esta clase, muchas de las sustituciones son altamente homólogas, localizándose Val, Leu o Ile en las posiciones 68 y 71. La DD-carboxipeptidasa de *Streptomyces* R61 presenta un comportamiento similar, considerándose a esta última, con base en la

estructura primaria, más relacionada a la clase C que al resto de las clases estructurales^{34, 72}.

Al compararse las secuencias aminoácidas completas de un grupo de β -lactamasas de esta clase, se encontró una identidad mayor al 70%, esto señala que a diferencia de las β -lactamasas de clase A, las enzimas de clase C representan un grupo más homogéneo. Esto puede deberse a que las enzimas de clase C, hasta ahora identificadas, las sintetizan miembros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* y *Serratia*, y otro bacilo Gram negativo: *Pseudomonas*⁷⁴. De ahí que se consideren β -lactamasas específicas de especie¹³⁷.

Las enzimas de esta clase se encuentran localizadas en el espacio periplasmático, esto es, son intracelulares.

Las β -lactamasas de clase C tienen una gran importancia en el campo clínico, ya que son responsables de los altos niveles de resistencia que presentan las bacterias patógenas Gram negativas frente a los antibióticos β -lactámicos¹³⁸.

Aunque se ha determinado la secuencia aminoácida completa de algunas β -lactamasas de clase C⁵³, faltan estudios para definir la homología total entre las secuencias de estas enzimas. Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados se han limitado a la secuencia alrededor del sitio activo.

Joris (&), indica que este aspecto requiere de futuras investigaciones⁷⁶.

Características Fisicoquímicas y Bioquímicas

Las β -lactamasas de clase C tienen muchas características en común¹²⁴. Son enzimas relativamente grandes (30-42 kd), usualmente con puntos isoeléctricos alcalinos.

Las β -lactamasas de esta clase se conocen comúnmente como cefalosporinasas, ya que sus grados de hidrólisis (V_{max}) frecuentemente son mucho mayores para las cefalosporinas que para las penicilinas; hidrolizan rápidamente la cefaloridina y en general, la cefalotina, siendo lenta su hidrólisis frente a la cefotaxima⁵³. No obstante, son capaces de hidrolizar cierto tipo de penicilinas con una eficiencia catalítica muy alta (V_{max}/K_m), debido a la alta afinidad por éstas (bajo K_m)⁷⁴.

Estas enzimas son susceptibles a la inhibición por la cloxacilina pero no por el p-cloromercurobenzoato, el ácido clavulánico o sulbactam (a diferencia de las enzimas de clase A)¹²⁴.

Han existido dificultades para definir la especificidad del sustrato real de las β -lactamasas en general, debido a diferentes razones; en primer lugar han sido pocos los estudios que se han realizado con enzimas purificadas y un gran número de sustratos, dándose un panorama muy pobre; en segundo lugar, muchos de los nuevos antibióticos β -lactámicos no pueden examinarse con precisión bajo las condiciones estándar usualmente empleadas (con exceso de sustrato) ya que son sustratos muy pobres (V_{max} baja), para los cuales las enzimas tienen una gran afinidad¹²⁴, por lo que, para estos compuestos, el K_m se determina como K_i .

Por lo anterior, se hacía imposible una comparación entre los diversos estudios realizados, debido al uso de diferentes sustratos en cada uno de ellos; es hasta 1988 cuando Galleni (&) realizó un estudio cinético completo para un grupo de β -lactamasas de clase C frente un grupo de antibióticos^{53, 54}.

A pesar de este aspecto, se habían realizado generalizaciones concernientes a las interacciones de las β -lactamasas de esta clase con varios sustratos en *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *P. rettgeri* y *M. morgani*¹²⁴, clasificando a los antibióticos β -lactámicos en tres grupos de acuerdo a su afinidad (Km) y grado de hidrólisis (Vmax). Ver tabla 2.1.

Los parámetros cinéticos de las β -lactamasas de clase C varían entre el género, especie y cepas de la misma especie¹²⁴.

Cinética de la clase C

Galleni (&) analizó la interacción de estas enzimas con varias penicilinas, cefalosporinas y otros compuestos β -lactámicos. Este estudio se llevó a cabo bajo condiciones idénticas para permitir una comparación válida, empleándose la benzilpenicilina como referencia en todos los casos.

Penicilinas

En esta parte se examinó la influencia en la hidrólisis de las penicilinas que poseen un grupo amino (ampicilina), un grupo carboxilo (carbenicilina) y otras penicilinas cuyas grandes cadenas laterales confieren impedimento estérico (oxacilina, cloxacilina y meticilina).

AFINIDAD	GRADO DE HIDROLISIS
baja ($K_m > 100 \mu M$)	Baja ($V_{max} < 1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
cefaloridina	cefuroxima
cefazolina	cefotaxima
cefotiam	moxalactam
cefpirom	ceftazidima
BMY-28142	cefpirom
	BMY-28142
Moderada ($K_m > 1 \mu M$)	cefoxitina
cefalotina	cefmetazol
cefalexina	ampicilina
cefamandol	cloxacilina
cefoperazona	aztreonam
ceftazidima	imipenem
penicilina G	
	Moderada ($V_{max} > 1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
Alta ($K_m < 1 \mu M$) ^a	cefalexina
cefuroxima	cefotiam
cefotaxima	cefamandol
moxalactam	cefoperazona
cefoxitina	penicilina G
cefmetazol	
ampicilina	Alta ($V_{max} > 100 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
carbenicilina	cefaloridina
cloxacilina	cefalotina
aztreonam	cefazolin
imipenem	

TABLA 2.1

Parámetros cinéticos de las enzimas de clase I de Richmond & Sykes frente a varios compuestos β -lactámicos⁷²⁴.

^a K_i se determina usualmente en lugar de K_m .

Como se mencionó anteriormente, los valores de K_{cat} para la bencilpenicilina son muy bajos; sin embargo, los pequeños valores de K_m confieren una alta eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m), comportamiento que en cierto modo contradice la clasificación de estas enzimas como simples "cefalosporinas"⁵³.

Los valores de K_{cat} obtenidos para la ampicilina fueron muy bajos y debido a la poca variación en los valores de K_m (siempre con respecto a la bencilpenicilina), la relación K_{cat}/K_m fue muy pequeña: la adición de un grupo amino en la cadena lateral de la bencilpenicilina (ampicilina), disminuyó de 10-100 veces el valor de K_{cat} (3-20%).

Con la carbenicilina se obtuvieron valores de K_{cat} muy bajos: la presencia del grupo carboxilo provocó una disminución de 10,000 veces el K_{cat} , por lo que Galleni propone un estudio de la estructura tridimensional en el sitio de unión para explicar este efecto tan grande.

Con la carbenicilina, cloxacilina y oxacilina se obtuvieron valores bajos de K_{cat} , sin embargo, los valores de K_2/K fueron altos (ver ecuación 2.1) indicando la formación eficiente de un complejo acil-enzima estable, dando como resultado: (a) valores de K_m muy bajos (b) aparente inhibición competitiva ó inactivación transitoria cuando se emplea junto con un buen sustrato.

A pesar de que se presenta inactivación inducida por el sustrato en algunas enzimas de clase A con la cloxacilina u oxacilina (pag.160), los valores de K_{cat} obtenidos para las β -lactamasas de clase C son menores que para la clase estructural A.

Finalmente, con la meticilina se observó en algunos casos inactivación inducida por el sustrato y una cinética bifásica, donde la velocidad de la reacción, después de la transición, fue mucho menor que la observada con las enzimas de clase A.

De acuerdo con lo anterior, los valores bajos de K_m pueden atribuírse a una relación pequeña de k_3/k_2 (ec. 2.1). Es por lo que se sugiere que la desacilación es la etapa

limitante de la reacción, dando como resultado la acumulación del complejo acil-enzima.

Cefalosporinas y otros compuestos β -lactámicos

En esta parte se estudió la interacción entre las enzimas y varias cefalosporinas, una cefamicina (cefotixina), una oxo-cefamicina (moxalactam), un carbapenem (imipenem o N-formimidoil-tienamicina) y compuestos monobactams (aztreonam y camuronam). Los compuestos se eligieron como representativos de varias clases de sustratos potenciales para las β -lactamasas. También se estudiaron los sustratos cromógenos: nitrocefina y PADAC (cromóforo de piridina-2-azo-p-dimetilanilina).

Con la nitrocefina, cefaloridina, cefazolina, cefaloxina, cefalexima y cefalotina, se obtuvieron los valores de K_{cat} más altos. Sin embargo, los valores de K_m fueron más altos que para la bencilpenicilina⁵⁴.

La cefalotina es uno de los mejores sustratos debido, posiblemente, a su alta V_{max} y K_m moderado (tabla 2.1). Las cefalosporinas de primera generación, como la cefaloridina y la cefaloxina, también se hidrolizan rápidamente a pesar de la baja afinidad por ellas¹²⁴. En ninguno de estos sustratos se observó inactivación sustrato-inducida⁵⁴.

Para la cefotixina, cefuroxima y cefotaxima (antibióticos de primera, segunda y tercera generación, respectivamente), los valores de K_{cat} fueron bajos, así como los de K_m , lo que sugiere que la etapa limitante es la desacilación, de ahí su eficiencia como antibióticos, al formar un complejo acil-enzima estable, debido a su alta afinidad.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

En cuanto al imipenem, camurona y aztreonam, se obtuvieron los valores de K_{cat} más bajos, con una relación k_2/K alta, por lo que estos compuestos se comportan como eficientes inhibidores transitorios.

Con el moxalactam se observó una cinética bifásica, indicando un posible rearrreglo del grupo oxo-cefalosporoil, los valores de K_{cat} obtenidos para este sustrato fueron altos.

Finalmente, el PADAC fue un buen sustrato y en todos los casos presentó una cinética bifásica.

La inactivación transitoria que se ha observado con la cloxacilina y carbenicilina se ha interpretado en los primeros reportes como una fuerte inhibición competitiva y en efecto, corresponde a un caso de competencia por el sustrato, donde la estabilidad de la β -lactamasa con el sustrato-inhibidor no se alcanza de inmediato; siendo, como consecuencia, muy lenta la velocidad de hidrólisis⁵⁴.

Los estudios de Galleni confirman la uniformidad existente entre las propiedades cinéticas de las β -lactamasas de clase C, lo cual puede estar relacionado con el porcentaje tan alto de residuos invariantes u homólogos en las secuencias de aminoácidos⁵⁴. Aún más, dos enzimas producidas por *Enterobacter cloacae* con algunas diferencias en su estructura primaria, poseen parámetros cinéticos semejantes⁵³.

Posiblemente la conformación proteica, las propiedades cinéticas y de enlace, sean muy parecidas en todas las enzimas de clase C⁵⁴.

Los valores generalmente bajos de K_m obtenidos en la mayoría de los sustratos, indican que el proceso de desacilación es la etapa limitante.

Con respecto a los sustratos con valores bajos de K_{cat} , cabe mencionar que algunas cepas producen constitutivamente una gran cantidad de β -lactamasas de clase C, almacenándose en el espacio periplasmático; tal situación puede producir una hidrólisis eficiente de los compuestos β -lactámicos, aún con K_{cat} bajos y si, además, la velocidad de penetración del antibiótico es lenta, puede ser destruída una gran proporción del antibiótico que entra a la célula⁵⁴.

Debido a lo anterior los grados de hidrólisis y afinidad no pueden usarse como únicos parámetros para predecir correctamente la inactivación de cada sustrato por las enzimas cuando éstas están presentes en la célula intacta, ya que depende de otros factores que deben considerarse (capítulo III)¹²⁴.

Por otro lado, tampoco es sorprendente que la resistencia de los nuevos antibióticos β -lactámicos frente a las β -lactamasas no sea predecible mediante sólo el análisis de sus valores de V_{max} y K_m , ya que bajo condiciones de exceso de sustrato, los antibióticos actúan como sustratos pobres (baja V_{max}) y de hecho como buenos inhibidores de las enzimas (bajo K_i)¹²⁴.

Estructura

Oefner (&), reportó el modelo estructural de la β -lactamasa de clase C de *Citrobacter freundii* (fig. 2.6)¹¹⁰; este investigador señala una gran similitud estructural con las enzimas de clase A.

A partir de la estructura observada en el complejo acil-enzima formada con el aztreonam, propone un modelo molecular en el cual se indica el mecanismo de hidrólisis de este compuesto (ver mecanismo 2.III).

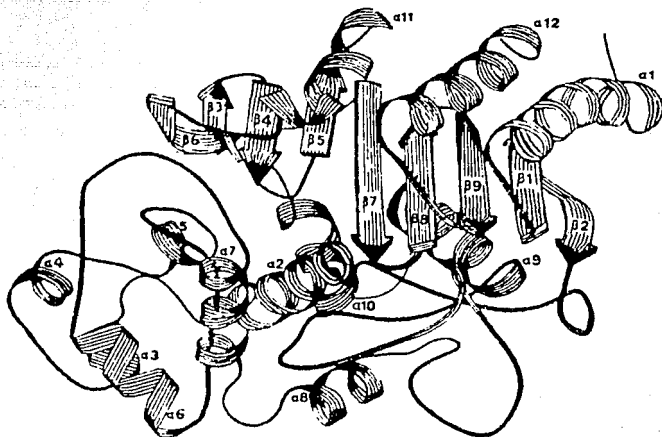


Fig. 2.6

Representación de la β -lactamasa plegada de *C. freundii* (clase C).

Donde se observa el diagrama de Ribbon de la cadena polipeptídica.

La conformación β (de β -1 a β -9) se encuentra representada por flechas, las α -hélices (de α -1 a α -12) por líneas¹¹⁰.

Al igual que la enzima de clase A, la enzima de *C. freundii* es una proteína constituida por conformaciones β y alfa-hélices. Su estructura tridimensional está relacionada con

las β -lactamasas de clase A de *S. aureus*, *Streptomyces albus* G y a la DD-carboxipeptidasa de *Streptomyces* R61, a pesar de la falta de similitud de su secuencia de aminoácidos con la de las primeras.

La enzima presenta dos dominios; el mayor consiste en nueve láminas- β dispuestas de manera antiparalela, flanqueadas por tres alfa-hélices en una cara y dos alfa-hélices en la otra.

Las primeras α -hélices, α -1, α -12 y α -11, corren antiparalelamente una de la otra, en contraste con las α -hélices correspondientes en las enzimas de clase A (fig.2.3).

La conformación β , con la topología β -2, β -1, β -9, β -8, β -7, β -5, β -4, β -3, β -6, contiene cinco láminas "enlazadas" β -2, β -1, β -9, β -8, β -7 que se conservan entre las enzimas relacionadas con estructura conocida³⁶.

El dominio menor, que involucra los residuos Gly-63, Lys-224, contiene siete α -hélices (α -2 a α -8) y regiones extensas de espirales. El residuo esencial de serina se encuentra ubicado en la región N-terminal de la hélice central α -2, al igual que en las β -lactamasas de clase A y la carboxipeptidasa R61.

En la enzima de *C. freundii*, los dos residuos invariantes Ser-64 y Lys-67 (70 y 73 de acuerdo con la numeración de Ambler), se encuentran localizados en el mismo lado de la hélice α -2 y el trío Lys 315-Thr 316-Gly 317 (234,235 y 236) es parte de la lámina β -7 que delimita el sitio activo.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

2.2.3 Clase estructural D

Esta clase molecular, postulada en 1988, comprende hasta la fecha dos β -lactamasas: OXA-2 y PSE-2. Anteriormente la primera enzima se consideraba dentro de la clase A^{34,42}.

La homología entre las secuencias de PSE-2 y OXA-2 (fig.2.7) y la falta de similitud estructural con las β -lactamasas TEM-1 o *ampC* fueron motivo suficiente para que Houvienen (&) estableciera la clase molecular D⁶⁷, a la cual, señala, pueden per-

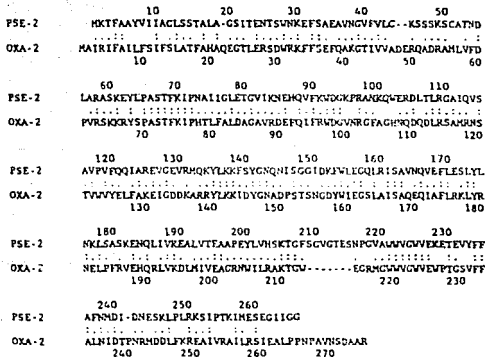


Fig. 2.7

Comparación de las secuencias de aminoácidos de PSE-2 y OXA-2.

Dos puntos indican identidad y uno, una sustitución homóloga. Las líneas punteadas se introdujeron para mejorar el alineamiento⁶⁷.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

tenecer otras enzimas tipo PSE, CARB y OXA, cuyas estructuras no se hayan determinado.

Comparando las secuencias de aminoácidos alrededor del sitio activo de las β -lactamasas de clase D con las clases A y C, se observa que la fenilalanina en la posición 66 ha sustituido por tirosina (fig.2.8). Sin embargo, comparte la secuencia:

secuencia alrededor del sitio activo de las clases A y C:					66					70					73					
					Phe	Xaa	Xaa	Xaa		Ser	Xaa	Xaa			Lys					
clase D:																				
					62					66					70					73
					Ser	Lys	Arg		Tyr	Xaa	Xaa	Xaa		Ser	Xaa	Xaa				Lys

Fig. 2.8

Alineamiento de las secuencias alrededor del sitio activo de las clases A, C y D.

La numeración corresponde a la propuesta por Ambler⁶⁷.

característica Ser^{*}-Xaa-Xaa-Lys con estas clases, presentando un residuo de serina en el sitio activo, por lo que las enzimas de las clase estructurales A, C y D se consideran β -lactamasas serínicas.

Características Ficoquímicas y Bioquímicas

Las enzimas OXA-2 y PSE-2 se caracterizan por hidrolizar la cloxacilina con mayor facilidad que la bencilpenicilina, por lo que se encuentran comprendidas en el grupo 2d propuesto por Bush (pag.212); además, la β -lactamasa PSE-2 hidroliza rápidamente la carbenicilina, no determinándose aún la velocidad de hidrólisis de este antibiótico frente a OXA-2.

Son enzimas relativamente pequeñas (27 y 29.6 Kd), con puntos isoeléctricos variables (6.1 y 8.65)¹⁶.

Ambas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico y sólo la enzima PSE-2 es inhibida por el p-CMB, indicando esto último la presencia de un residuo de cisteína catalíticamente importante en PSE-2.

Esto concuerda con las secuencias mostradas en la fig. 2.7, donde se observa la presencia de tres residuos de cisteína cercanos a la secuencia N-terminal, sólo en PSE-2. Posiblemente los estudios de la estructura tridimensional de PSE-2 revelen la importancia de este residuo.

La β -lactamasa OXA-2 es una enzima que se encuentra en una pequeña proporción en las muestras clínicas de bacterias Gram negativas resistentes a la ampicilina; el plásmido que codifica esta enzima se aisló originalmente de *Salmonella typhimurium*³¹.

Esta enzima, además de tener capacidad para hidrolizar oxacilina y otras penicilinas del grupo isoxazolil, interactúa con la antraquinona tñéndola de azul³¹.

Comparando la secuencia nucleotídica de OXA-2 con las β -lactamasas tipo TEM, no se observa una homología significativa. Sin embargo, con base en sus secuencias aminoácidas se encontraron tres regiones aparentemente homólogas, una de las cuales corresponde al sitio de escisión propuesto para el péptido señal³¹ (capítulo III).

2.3 Mecanismo general de acción de las β -lactamasas séricas

Uno de los propósitos del estudio del mecanismo enzimático es la caracterización de los compuestos intermedios, formados a lo largo de la reacción entre el sustrato y el producto, la cual debe ser tanto estructural como cinética²⁹.

Las técnicas crioenzimológicas han permitido el aislamiento del complejo covalente acil-enzima en las β -lactamasas séricas (clases A, C y D), así como el de los complejos intermediarios no covalentes formados durante la reacción con la β -lactamasa II de *B. cereus* (clase B), para su mejor caracterización^{9, 21}.

Se ha obtenido una gran información del mecanismo de hidrólisis de las β -lactamasas séricas mediante el estudio estructural, cinético y fisicoquímico de enzimas que se han mutadas artificialmente y en las cuales se ha alterado la actividad enzimática (mutagénesis dirigida)⁶⁸.

Se ha reportado que simples mutaciones en el gen estructural que codifica para las β -lactamasas, originan la formación de enzimas con propiedades catalíticas que difieren marcadamente de la original, presentándose alteraciones en la especificidad por el sustrato, actividad enzimática y la termoestabilidad^{4, 88}.

Este tipo de estudios se ha realizado también en cepas aisladas que han sufrido una mutación natural, en las cuales se identifican los restos de aminoácidos que han sufrido cambios mediante su comparación con la secuencia de aminoácidos de la cepa salvaje¹.

El estudio cristalográfico es otro método que ha aportado gran información acerca del mecanismo de hidrólisis; ha permitido relacionar las estructuras primaria y secundaria de algunas β -lactamasas, por lo que ha sido posible postular la función de algunos grupos aminoácidos con base en su posición en el modelo estructural del sitio activo⁹³.

Reacción de las β -lactamasas serfínicas

Las β -lactamasas hidrolizan el anillo β -lactámico de sus sustratos correspondientes que comprenden: penicilinas, cefalosporinas, penems, carbapenems y monobactams¹⁰⁵.

El mecanismo de hidrólisis de estos compuestos es básicamente idéntico, con algunas diferencias dependiendo del sustrato en particular (ver ecuación 2.1).

En general, la β -lactamasa (E) forma inicialmente un complejo no covalente enzima-sustrato (complejo de Michaelis), con el antibiótico (S); esta etapa es reversible^{68, 124}.

Este complejo sufre una modificación subsecuente y la enzima hidroliza entonces el anillo β -lactámico, formándose el intermediario covalente acil-enzima (E-S), el cual es importante en todas las reacciones de las enzimas serfínicas en general. Este paso se conoce como etapa de acilación.

Se ha indicado que en las β -lactamasas (las cuales carecen de una estructura terciaria rígida) la formación del complejo enzima-sustrato induce un cambio conformacional en

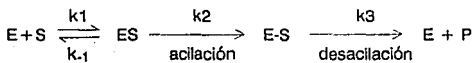
la enzima, provocando el alineamiento de los aminoácidos activos involucrados en el proceso catalítico.

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que un residuo de serina se encuentra implicado en el proceso de acilación. La serina es alineada por el grupo carbonilo del anillo β -lactámico del antibiótico.

En la siguiente etapa (desacilación), la enzima escinde la unión covalente, liberándose la molécula β -lactámica hidrolizada (P) y se regenera la conformación de la β -lactamasa¹⁰⁵.

En general, las β -lactamasas catalizan la hidrólisis con una alta eficiencia, frente a sustratos óptimos²⁹.

La reacción general catalizada por las β -lactamasas sérficas puede resumirse como:

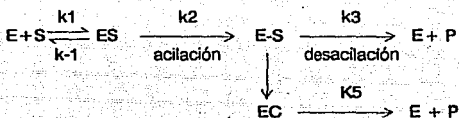


Ecuaación 2.1

Donde: E representa a la β -lactamasa, S el antibiótico β -lactámico y P el producto.

En algunas enzimas se ha observado que la hidrólisis del antibiótico es mediante una ruta ramificada (caso de la β -lactamasa PC1 de *S. aureus* frente a las cefalosporinas con restos-3', esenciales para su actividad antimicrobiana como en la cefaloridina y cefalotina) por la cual el complejo acil-enzima puede hidrolizarse directamente (desacilación) o

transformarse en un intermediario casi inerte por eliminación del sustituyente-3' (EC); en algunos casos no se observa la hidrólisis directa, formándose el producto sólo de la hidrólisis lenta del intermediario "inerte" (ecuación 2.2)⁷⁴.



Ecuación 2.2

Las β -lactamasas serínicas actúan mediante una catálisis covalente, a diferencia de la clase estructural B.

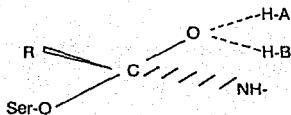
Al igual que las proteinasas serínicas, emplean el grupo hidroxilo de la serina como agente nucleofílico involucrando una reacción de doble desplazamiento o de ping-pong¹⁰².

En general, un rasgo muy importante en el proceso catalítico de las proteinasas serínicas es la presencia de una cavidad oxianiónica (estructura 2.1), mediante la cual se cataliza la transferencia del grupo acilo al residuo nucleofílico de serina y posteriormente a la

molécula de H₂O por estabilización de un intermediario tetrahédrico, el cual se encuentra asociado a estados de transición (ver mecanismos)¹⁰².

Se requiere de una estabilización para que se forme este complejo intermediario, la cual puede ser a través de puentes de hidrógeno, ya sea de los grupos funcionales de la enzima o de los grupos NH- de la cadena peptídica; (representados como H-A y H-B en la estructura 2.1).

Al sitio de unión con el oxianión se le denomina cavidad oxianiónica y es el que confiere la estabilidad en el estado de transición. Esta estabilización sólo se lleva a cabo cuando el grupo carbonilo del anillo β -lactámico, se une covalentemente a la enzima⁸⁴.



ESTRUCTURA 2.1
Intermediario tetrahédrico.

La presencia de la cavidad oxianiónica en las β -lactamasas, se comprobó mediante el estudio con derivados azufrados de los substratos específicos¹⁰², donde el oxígeno del grupo carbonilo del anillo β -lactámico se sustituye por azufre. Los análogos azufrados de los substratos específicos de las proteinasas serínicas son, en general, substratos muy

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

pobres, comportamiento que se ha tomado como evidencia de la importancia catalítica de la cavidad oxianiónica en estas enzimas.

El análogo azufrado de la estructura 2.1 es estabilizado muy débilmente debido a la menor tendencia del azufre para formar puentes de hidrógeno y/o a la dificultad de orientar el enlace, que es más largo en C-S que en C-O.

A pesar de la presencia de esta cavidad, el mecanismo de catálisis de las β -lactamasas no es similar al resto de las proteinasas serínicas⁷².

Se ha propuesto que en la β -lactamasa de clase A de *Staphylococcus aureus*, se encuentran involucrados los grupos NH- de la Ser-70 y Gln-27 en la formación de la cavidad aniónica¹⁰²; mientras que en la β -lactamasa de clase C producida por *C. freundii*, el oxianión forma puentes de hidrógeno con los dos grupos NH- de las uniones peptídicas de la Ser-64 y Ser-318 (ver mecanismo 2.III, estructura d)¹¹⁰.

Se ha demostrado que la carboxipeptidasa de *Streptomyces* R61 también emplea una cavidad oxianiónica durante su interacción con los antibióticos β -lactámicos¹⁰².

Formación y caracterización del complejo acil-enzima

La formación del complejo acil-enzima depende del grado de afinidad de la enzima por el sustrato, misma que debe expresarse propiamente como K_s ($=K_{+1}/K_{-1}$), se determina como K_m más frecuentemente. Entre mayor sea el valor de K_m , menor es la afinidad de la enzima por el sustrato y viceversa.

De acuerdo con lo anterior, para que una β -lactamasa sea efectiva, debe tener un valor de Km semejante a la concentración de antibiótico empleada durante la terapia⁶³.

Al disminuir la concentración del antibiótico, como ocurre *in vivo* durante los intervalos de dosis sucesivas, disminuye la velocidad de formación del complejo acil-enzima. Este efecto origina una disminución en la velocidad total de hidrólisis del antibiótico. De esta manera, es claro que entre mayor sea el factor por el cual la concentración del antibiótico *in vivo*, exceda el valor de CIM, mayor será la capacidad del antibiótico para ejercer su efecto antibacteriano frente a una β -lactamasa activa⁶³.

El complejo acil-enzima se ha determinado mediante estudios que emplean sustratos marcados, ya sea mediante fluorescencia (dansil-penicilina) o radioactividad (C^{14} benzilpenicilina, ácido [H^3] penicilánico) entre otros, estudiándose el intermediario al parar la reacción (con ácido tricloroacético generalmente)^{93, 117}.

De esta manera se comprueba, en la mezcla de reacción, la presencia de la enzima desnaturalizada unida covalentemente a un equivalente 1 molar, ya sea del grupo dansilo o de C^{14} .

Otro método empleado para determinar el compuesto intermediario acil-enzima se basa en la medición de los grupos peniciloil por la reacción del penamaldato; este estudio es menos costoso que los métodos que emplean sustratos radioactivos y ha demostrado ser uno de los métodos más apropiados para la determinación de las constantes de acilación y desacilación^{93,29}.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

Ha sido difícil la demostración directa de la unión covalente de la serina 70, durante la catálisis con buenos substratos, debido a la vida media tan corta del complejo acil-enzima, el cual se aísla fácilmente al emplearse substratos pobres, debido a la formación de un complejo muy estable⁵⁸.

El empleo de la crioenzimología ha facilitado actualmente el aislamiento de este compuesto intermediario en la β -lactamasa I de *B. cereus*²¹ (capítulo IV) ya que a temperaturas tan bajas es posible parar eficientemente la reacción (en este caso con ácido) debido a que la velocidad de la desnaturalización ácida es mayor que el proceso de desacilación, permitiendo la acumulación del intermediario.

En esta enzima no se puede detectar la formación del complejo a temperatura y pH altos, pues en estas condiciones el proceso de acilación es la etapa limitante durante el transcurso de la reacción y en el caso contrario, a temperatura y pH bajos, la desacilación es la etapa limitante. Lo anterior se cumple sólo para ciertos substratos como el furilacriloilpenicilina²¹.

Con técnicas crioenzimológicas ha sido posible determinar también el complejo acil-enzima mediante experimentos de transferencia de energía fluorescente con dansilpenicilina como substrato⁹⁵.

Este estudio se basa en que la banda de emisión del triptofano coincide con la de excitación para la dansilpenicilina, siendo posible la transferencia de energía cuando hay unión del substrato con la enzima. Así, el incremento inicial de fluorescencia se debe a la formación del complejo y la disminución subsecuente de ésta, al proceso de desacilación.

Caracterización cinética (acilación y desacilación)

Se ha indicado que para las enzimas de clase C, el proceso de desacilación, esto es, la hidrólisis del complejo acil-enzima, es la etapa determinante en la velocidad de reacción, siendo $K_{cat} = K_3^{25, 42, 53, 54}$ (ecuación 2.1).

En cuanto a las β -lactamasas de clase A, existe una gran controversia. Hasta hace poco se tenía la idea de que en la mayoría de las enzimas, como la β -lactamasa I de *B. cereus*, el proceso de acilación era la etapa determinante^{25, 42}; mientras que para la enzima PC1 de *S. aureus* era la desacilación en penicilinas tipo S, clasificación que propuso Citri para algunas penicilinas con base en la relación cinética y estructural de la cadena lateral en los derivados del ácido 6-aminopenicilánico frente a las penicilinas³⁰.

Esto implicaba que la enzima de *S. aureus* tuviera una mayor dificultad para catalizar la desacilación que el resto de las β -lactamasas de clase A. Sin embargo, su eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) no es mucho menor que éstas; consecuencia de su gran afinidad (K_m bajo)¹¹⁷.

Por otro lado, una caracterización cinética completa implica la determinación de las cuatro constantes de la ecuación 2.1, a saber: $k+1$, $k-1$, $k+2$ y $k+3$ ²⁹.

Ha sido difícil la determinación de las constantes de acilación ($k+2$) y desacilación ($k+3$) frente a buenos sustratos, sin embargo, Martín y Waley desarrollaron un método para efectuar esta medición en la β -lactamasa I de *B. cereus* (clase A), el cual se basa en la medición de la fracción de enzima presente como complejo acil-enzima, en el estado estable de la reacción⁹³.

CAPÍTULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

Este método se empleó posteriormente en las β -lactamasas de clase A, PC1 de *S. aureus* y RTEM de *E. coli* por Christensen (&), quien calculó también el valor de las cuatro constantes (para estas dos enzimas y la I de *B. cereus*), con base en la variación de K_{cat}/K_m con la viscosidad del medio²⁹.

Este investigador reporta que los valores obtenidos para las constantes de acilación y desacilación, con la bencilpenicilina, fueron aproximadamente iguales (no más del doble), por lo que señala que no debe considerarse al proceso de acilación o desacilación, como etapas limitantes en estas enzimas.

Esto contradice la idea general que considera al proceso de acilación como etapa limitante en las β -lactamasas de clase A, frente a las penicilinas.

Por otro lado, se ha observado que el valor de k_{+2} es mucho menor que k_{+3} para la β -lactamasa I de *B. cereus* frente a algunas cefalosporinas, siendo la acilación, en este caso, la etapa limitante²⁵.

Se estudió el comportamiento de las constantes de acilación y desacilación en función del pH en la β -lactamasa I de *B. cereus*. A pH alcalinos, se observó un comportamiento similar, indicando que el mismo grupo de aminoácidos participa en el proceso de acilación y desacilación^{93, 64}.

La determinación individual de las constantes de acilación y desacilación, es necesaria para obtener un mayor beneficio en los experimentos de mutagénesis dirigida, en los cuales, como se mencionó con anterioridad, se reemplaza algún residuo del sitio activo; de esta manera es posible identificar la etapa afectada en la reacción⁹³.

Relación estructura del sustrato/cinética

Al relacionar la estructura del sustrato con las constantes de acilación y desacilación²⁹, se observó que en algunas β -lactamasas de clase A frente a buenos sustratos con cadenas laterales polares, el valor de $k+2$ varió menos que $k+3$; $k+3$ disminuyó conforme la cadena lateral ramificada era mayor, sugiriendo un impedimento en el acercamiento de la molécula de H_2O en la etapa de desacilación.

El efecto de variación de la cadena alquil-lateral sobre la relación K_{cat}/K_m frente a las penicilinas, mostró que la interacción entre la cadena lateral y la enzima, es relativamente débil (el valor de K_m no varió notablemente).

Finalmente, tanto $k+2$ como $k+3$ disminuyeron con la carbenicilina, al igual que un derivado cefalosporínico con carboxilato en la cadena lateral.

En este aspecto hacen falta más estudios, ya que no se ha realizado un análisis general entre la relación estructural del sustrato y su cinética frente la mayoría de las β -lactamasas, conocimiento que ayudaría al desarrollo de nuevos antibióticos.

Eficiencia Catalítica

En general, se ha discutido mucho acerca de las condiciones existentes para considerar la eficiencia máxima en una enzima, distinguiéndose dos casos principalmente²⁹. En el primero (reversible), se deben encontrar presentes concentraciones semejantes de producto y de sustrato en la reacción dentro de la célula. En el segundo, (al cual pertenecen las β -lactamasas) la reversibilidad de la reacción prácticamente no existe, ya

sea porque, efectivamente, se trata de una reacción irreversible o debido a que la concentración de producto es insignificante.

En cuanto a las β -lactamasas, una máxima eficiencia catalítica implica que la constante de acilación sea igual a la constante de desacilación ($k_{+2} = k_{+3}$)²⁹.

El hecho de que k_{+2} y k_{+3} sean de la misma magnitud es interesante, ya que este comportamiento se esperaría en una enzima "perfecta", debido a la suposición de que K_{cat} puede ser tan grande como sea posible⁹³.

En tres tipos de β -lactamasas de clase A (enzima I de *B. cereus*, PC1 de *Staphylococcus aureus* y RTEM de *E. coli*), se han encontrado valores similares en las constantes de acilación y desacilación durante la hidrólisis de compuestos penicilánicos, los cuales son buenos sustratos^{29, 93}, en contraste con las cefalosporinas que son malos sustratos, $k_{+3} > k_{+2}$ ⁹³. De acuerdo con el criterio anterior, estas β -lactamasas de clase A están cercanas a una eficiencia máxima frente a las penicilinas²⁹.

Grupos involucrados en el proceso catalítico

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las β -lactamasas sérficas (A, C y D) y las DD-peptidasas propuesto por Joris (&)⁷², a revelado la existencia de siete regiones de aminoácidos invariantes, ya sean idénticos u homólogos, (fig. 2.9), por lo que se sugiere un origen común.

Debido a que se conservan, es de suponerse que estos residuos tienen un papel importante durante la interacción con los antibióticos β -lactámicos, como se ha demostrado para algunas regiones que se analizarán posteriormente.

En la figura 2.9 se puede observar que:

- 1) El residuo de serina en el sitio activo (*), siempre se encuentra acompañado por uno de lisina (conservándose la secuencia característica Ser*-Xaa-Xaa-Lys).
- 2) El sitio activo en las β -lactamasas, se encuentra cerca del residuo N-terminal.
- 3) En las β -lactamasas se conservan los tres aminoácidos Lys 234 -Thr/Ser-Gly 236 (de acuerdo con la numeración de Ambler).

Cabe señalar que la sustitución Thr/Ser es muy frecuente en las proteínas homólogas.

Aunque existen regiones invariantes en la secuencia de las β -lactamasas séricas, el resto de las secuencias difieren marcadamente, sugiriendo una gran diversidad en el proceso evolutivo para cada una de estas enzimas⁸⁰.

Las regiones II, III, IV, V y VII propuestas por Jaurin (&), ocupan posiciones críticas en los modelos estructurales propuestos para las β -lactamasas de *S. aureus* y *S. albus* G (ver fig. 2.4).

Mediante los estudios de mutagénesis dirigida, se ha demostrado que la sustitución de los aminoácidos en cada una de estas regiones, afecta o inhibe la actividad de las β -lactamasas y DD-peptidasas⁷².

Con excepción de la función de la serina, se sabe muy poco acerca del resto de los residuos que conforman el sitio activo, así como los detalles del mecanismo catalítico en estas enzimas²¹. Sin embargo, se ha propuesto la función catalítica de la molécula de agua y algunos residuos para explicar el mecanismo de acción.

Serina

(Región II: residuo 64 para la clase C, 70 para la clase A).

La numeración de la clase A corresponde a la propuesta por Ambler⁷², la de la clase C corresponde a la numeración normal de la enzima madura.

El residuo de serina es el agente nucleofílico⁸⁰, que ataca el C del grupo carbonilo del anillo β -lactámico (ver mecanismos, pag. 85).

Mediante estudios de mutagénesis dirigida, se ha demostrado que este residuo es esencial durante la catálisis^{21, 72}. No obstante el tiol-análogo, en el cual se sustituye la serina por cisteína, posee cierta actividad catalítica.

Una de las interrogantes clave en el mecanismo de reacción, había sido si la hidrólisis implicaba una catálisis covalente mediante un ataque nucleofílico, formándose un intermediario covalente acil-enzima; o una catálisis ácido/base sin la presencia de un complejo intermediario²¹.

Muchos investigadores han demostrado, frente a sustratos buenos o pobres, la presencia de intermediarios covalentes durante la hidrólisis de varias β -lactamasas de clase A y C. Así mismo se ha observado la participación covalente del residuo de serina durante la interacción con cierto número de inhibidores²¹.

Los estudios de mutagénesis dirigida con la β -lactamasa pBR322 (TEM), han revelado que: (a) la inversión del par Ser*-Thr a Thr-Ser confiere a una cepa de *E. coli* un fenotipo

ampicilina-sensible, (b) al remplazar Ser* por Cys se genera una tiol- β -lactamasa con especificidad por el sustrato diferente a la enzima original y con una menor actividad⁹².

H₂O

Los estudios crioenzimológicos llevados a cabo en la β -lactamasa I de *B. cereus*²¹, demostraron la importancia de la presencia de H₂O en el proceso catalítico, pues se observó que el valor de Kcat disminuyó linealmente al aumentar la concentración de metanol (criosolvente); indicando que el H₂O es un agente activo en el proceso catalítico, al comprobarse que la disminución en la actividad no se debía a un cambio conformacional inducido por el metanol sino a la pérdida de agua en la mezcla de reacción.

Se observó también un aumento en el valor de Km frente a la bencilpenicilina y dansilpenicilina, atribuido a un efecto de interacción hidrofóbica en la unión con el sustrato, (fig.2.10).

En la figura se observa que la enzima es activa en concentraciones menores al 90% de metanol.

Mediante este estudio se demostró también que el sitio de ataque de la molécula de H₂O en el complejo intermedio acil-enzima, es inaccesible a otros agentes nucleofílicos como el metanol, el cual podría competir con el H₂O por el complejo acilado, por lo que se sugiere la presencia de un sitio con impedimentos estéricos y/o electrónicos que impiden la unión de otros agentes²¹.

Sin embargo, en algunas enzimas de clase C, se ha demostrado que el aceptor del grupo acilo puede ser el metanol (metanólisis), mientras que, sorprendentemente, otros agentes

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

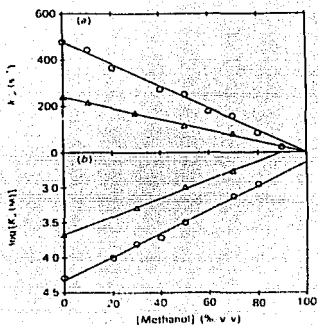


Fig. 2.10

Actividad enzimática de la β -lactamasa de *B. cereus* contra concentración de metanol²¹

O = Bencil-penicilina.

Δ = Dansil-penicilina.

nucleofílicos más pequeños como el amonio y la hidroxilamina no lo son⁵⁷. Puede considerarse, de manera general, que el intermediario acil-enzima es protegido de las moléculas nucleofílicas no específicas¹¹⁶.

De acuerdo con los reportes estructurales del sitio activo en las β -lactamasas^{64, 72, 110}, es posible esperar que la molécula de H₂O se encuentre totalmente rodeada por la enzima y el sustrato en el intermediario acil-enzima²¹.

Herzberg y Moulton indican que, un puente salino entre los residuos de Lys-73 y de Glu-166 evita una posible apertura de la cavidad donde posiblemente penetra la molécula de H₂O⁶⁴.

Otra explicación menos probable, es la inducción de cierto cambio conformacional en la enzima por la unión con el sustrato, que proteja a la molécula de H₂O y parte del sustrato²¹.

Lisina

(Región I : residuo 73 para la clase A, 67 para la clase C)

El pk básico reportado durante la hidrólisis de la bencilpenicilina por la β -lactamasa I de *B. cereus*, se atribuye a este residuo de lisina²¹.

Con base en los residuos invariantes de lisina en la secuencia de las β -lactamasas y los residuos del sitio activo determinados⁶⁴, este pk podría ser de la Lys-73 o Lys-234 (de acuerdo con la numeración de Ambler), siendo los residuos responsables de la disminución de la actividad catalítica a pH altos²¹.

Cartwright sugiere que la catálisis ácida general, llevada a cabo por la Lys-73 facilita la escisión de la unión β -lactámica²¹, induciendo la formación del complejo intermediario acil-enzima; algunos investigadores postulan que la lisina dona un protón al átomo de Nitrógeno del anillo β -lactámico^{21, 80}.

Este residuo ocupa la misma posición en muchas DD-peptidasas⁶⁴. La mutación de este residuo da como resultado una enzima con baja actividad o con menos capacidad para unirse al sustrato (notándose un aumento del Km). Su función aún causa controversia⁶⁸.

Otra hipótesis propuesta por Herzberg y Moulton, con base en sus estudios estructurales en la β -lactamasa PC1 de *S. aureus*, sugiere que este residuo sólo ayuda a orientar el protón

del grupo hidroxilo de la serina al N del anillo β -lactámico, debido a la carga positiva de la lisina, el cual interactúa con el ácido glutámico-166 en las β -lactamasas de clase A mediante una unión por puentes salinos (ver mecanismo 2.II)⁶⁸.

El residuo Glu-166, corresponde al residuo Asp-217 en la β -lactamasa de clase C de *C. freundii* en el cual se investiga la posibilidad de una interacción de puentes salinos con la Lys-73¹³⁷.

La sustitución de Lys-73 por arginina en la β -lactamasa de clase A en una cepa de *B. cereus*, indujo una gran disminución en el valor de K_{cat} ⁹², sin embargo, los estudios realizados por Tsukamoto (&) en la β -lactamasa de clase C de *C. freundii* demostró, mediante esta misma sustitución en la Lys-67, que es importante la presencia de un aminoácido básico en esta posición para conservar una alta actividad catalítica¹³⁷.

Este investigador observó que con esta sustitución disminuyó más el valor de K_{cat} frente a la cefaloridina (una cefalosporina con carácter anfótero), que en las cefalosporinas monoaniónicas y que la afinidad por inhibidores como el aztreonam y la cloxacilina también disminuía, por lo que sugieren una función esencial en el mantenimiento de la estructura terciaria de la cavidad del sitio activo para este residuo de lisina, el cual proporciona además de una adecuada fuerza electrostática en la cavidad, funciones adicionales a su efecto directo durante el proceso catalítico¹³⁷.

Fenilalanina

(Cercano a la región H: residuo 66 para la clase A, 60 para la clase C)

Los residuos de fenilalanina y lisina-73 (67), se encuentran en posiciones equivalentes, por lo que se sugiere la posibilidad de que cumplan funciones similares³⁴.

Lisina-Treonina-Glicina

(Región VII: 234-235-236 para la clase A, 315-316-317 para la clase C)

Estudios realizados por Oefner (&), en la enzima de *C. freundii* GN346 (clase C), han demostrado la ubicación cercana de esos residuos al sitio activo¹¹⁰. Este investigador supone que la Lys-234(315) forma una red mediante puentes de hidrógeno con la Serina-64*, Lys-67, Tyr-150 y Asn-152 (de acuerdo con la numeración de la enzima madura), además sugieren que el residuo de Lys-315 se encuentra involucrado en la hidrólisis del aztreonam (ver mecanismo 2.III).

Tsukamoto (&), demostró, mediante estudios de mutagénesis dirigida en esta misma enzima¹³⁸ que para mantener la actividad enzimática, es esencial la presencia de un aminoácido básico en la posición 315 y de un residuo pequeño sin carga en 317; así mismo revelaron que no se requiere el grupo hidroxilo de la Thr-316 para la actividad enzimática, aunque la conversión de Thr-316 por valina dió como resultado una disminución en la afinidad por la cefalotina y la cefaloridina.

También señalan la presencia de una unión entre la Lys-315 y el sustrato a través de una interacción iónica en la que participa el grupo épsilon-amino, como lo propuso Oefner (&), para el sulfonato y aztreonam¹¹⁰.

Finalmente, sugiere que la posición 315 se encuentra involucrada en la distinción del núcleo de cefalosporinas y penicilinas, función que posiblemente desempeña la posición

316, pues disminuyó marcadamente la afinidad para los núcleos de cefoxitina y cefamicina en la enzima con Val-316.

Si se substituye la Lys-315 por arginina, ó Thr-316 por valina, se observa un aumento en el valor de Kcat frente a la bencilpenicilina y ampicilina (excepto para la Val-316 frente a la ampicilina), aunque esta conversión causa la disminución en la afinidad para penicilinas, cefamicinas y compuestos monobactámicos¹³⁸.

En los estudios realizados en las β -lactamasas de clase A, se ha observado también la importancia de la Lys-234 en la capacidad de unión con el sustrato y la estabilización en estados de transición⁶⁸.

Residuos específicos de las clases estructurales A y C

Uno de los objetivos en el estudio de los residuos aminoácidos específicos para cada clase, es comprender de qué manera afectan y determinan las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de las clases estructurales, para un mejor entendimiento del mecanismo de hidrólisis de los compuestos β -lactámicos.

Residuos específicos de la clase A:

Glutamato-166

(Región V)

Este residuo se encuentra en todas las β -lactamasas de clase A^{4, 72}.

El pk ácido obtenido durante la hidrólisis de la bencilpenicilina por la β -lactamasa I de *B. cereus*, se atribuye al grupo carboxilo de este residuo²¹. Cartwright sugiere que éste actúa como base general, facilitando el ataque nucleofílico del átomo de O del residuo de Ser-70* sobre el grupo carbonilo del anillo β -lactámico durante el proceso de acilación, al tomar el protón del grupo hidroxilo de la serina; desprotonizando posteriormente a la molécula de H₂O y activándola para el ataque nucleofílico sobre el complejo acil-enzima en el proceso de desacilación^{21, 93}, (ver mecanismo 2.I).

Los estudios cristalográficos han demostrado que la cadena lateral de este residuo apunta hacia el sitio activo⁷², apoyando la hipótesis de que el grupo carboxilo es importante en el proceso catalítico.

La sustitución de este residuo por asparagina da como resultado una disminución en los valores de las constantes de acilación y desacilación⁶⁸.

SER-130 - ASP-131 - ASN-132

(Localizados entre las regiones IV y V)

Estos residuos forman una pared en la cavidad del sitio activo, los grupos R de la Ser-130 y Asn-132 apuntan hacia el sitio activo, mientras que el del Asp-131 apunta hacia el lado contrario⁶⁸.

De acuerdo con las observaciones en los estudios de mutación dirigida, se proponen las siguientes funciones⁶⁸:

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

La Ser-130 ayuda en el mantenimiento de la estructura de la cavidad del sitio activo, mediante la formación de puentes de hidrógeno con la estructura α/β .

Asp-131 parece ser un residuo clave en la estabilidad de la estructura protéica y la Asn-132 actúa en el proceso catalítico, involucrado tal vez en la estabilización de un estado de transición. Una observación interesante fue el hecho de que las mutaciones en las posiciones 130 y 132 disminuyeron siempre la actividad de cefalosporinasa, más que la de penicilinas, con excepción de la nitrocefina. Esto puede estar relacionado con el hecho de que las β -lactamasas de clase A son generalmente mejores penicilinasas y puede indicar que la hidrólisis de las cefalosporinas requiere una geometría más precisa entre el sitio activo y el sustrato⁶⁶.

TIROSINA-105

(Región III)

Este residuo se encuentra en todas las β -lactamasas, excepto en la enzima de *Streptomyces albus G*, el cual posee Glutamina.

Se ha demostrado que este residuo puede reaccionar fácilmente con algunos reactivos, indicando que debe ocupar un sitio específico con impedimento estérico, que le impide participar en enlaces intermoleculares⁷².

Hasta ahora no existe evidencia de que la tirosina 105 forme parte del sitio activo¹.

La tirosina-71 es otro residuo del sitio activo que se encuentra involucrado principalmente en la estabilidad de las β -lactamasas de clase A⁶⁸.

Residuos específicos de la clase C:

Tirosina-150

(Cercano a la Región IV)

Los residuos de Tyr-150 y Lys-315 son determinantes en el proceso de desacilación del complejo acil-enzima¹³⁸.

Oefner (&), superpuso la molécula de la enzima de clase C en una de Tripsina, usando como referencia el sitio activo de serina y la cavidad oxianiónica¹¹⁰ y sorprendentemente encontró que el oxígeno fenólico de la Tyr-150 correspondía al átomo del N-épsilon del residuo de histidina, esencial para la actividad catalítica de la tripsina, por lo que este investigador señala que la Tyr-150 en su forma aniónica, actúa como una base general durante el proceso catalítico, al igual que la histidina en la tripsina.

De acuerdo con la anterior, Oefner (&), propone que la Tyr en su forma desprotonizada acepta el protón de la Ser* y lo dona posteriormente al átomo de N del anillo β -lactámico. Durante la desacilación, la forma aniónica de la Tyr podría actuar como una base general, activando una molécula de H₂O para el ataque nucleofílico al complejo acil-enzima (ver mecanismo 2.III).

El residuo de Tyr-150 en las β -lactamasas de clase C tiene una función semejante a la postulada para el residuo de Glu-166 en las β -lactamasas de clase A.

Relación estructura/función

A pesar de los estudios realizados para determinar la función de los aminoácidos invariantes en la clase A, no ha sido posible explicar ampliamente la relación entre las variaciones de secuencias importantes y las especificidades por el sustrato, tan variables dentro de esta clase. La correlación ha sido difícil por la falta de vinculación con las estructuras del antibiótico, no existiendo aparentemente un patrón⁶⁸.

En este aspecto, los estudios más avanzados se han realizado en las β -lactamasas de tipo TEM (clase A), debido a su gran distribución^{24, 88, 112}. Las β -lactamasas TEM-3, TEM-4, TEM-5 Y TEM-7 derivan de TEM-1 o TEM-2 por dos o más mutaciones puntuales, confiriendo a cada tipo de enzima tanto diferente especificidad por el sustrato como propiedades cinéticas y físicas.

Las β -lactamasas TEM-1 y TEM-2 se diferencian por un sólo aminoácido en la posición 37 (de acuerdo con la numeración de Ambler), ocupados por glutamina y lisina respectivamente¹¹²; sin embargo, conservan el mismo perfil de sustrato (grupo 2b de Bush). Las enzimas TEM-3 y TEM-4 tienen un residuo de lisina en lugar de Glu en la posición 104 y uno de serina en lugar de glicina en la posición 238, aumentando el perfil de sustrato al conferirles capacidad para hidrolizar la cefotaxima⁸⁸, (grupo 2b' de Bush). TEM-2 y TEM-7 varían por un sólo aminoácido en la posición 164 (de acuerdo con la numeración de Ambler), ocupada por Arginina y Serina respectivamente y a pesar de que se trata de una sola sustitución, parece que la serina le confiere además a TEM-7 la capacidad para hidrolizar la ceftazidima y el aztreonam²⁴, mismo perfil que TEM-5 (conocida actualmente como CAZ). También se observó una disminución en los valores de K_i para el

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (inhibidores de las β -lactamasas) y un cambio en el valor del pH óptimo para la actividad enzimática²⁴.

Los residuos de serina en las posiciones 238 (cercano a la región VII) y 164 (cercano a la V) de TEM-3 y TEM-7 respectivamente, se encuentran localizados en un borde del sitio activo, de acuerdo con la estructura tridimensional propuesta; sugiriendo que los grupos hidroxilo libres adicionales, localizados en este lugar, contribuyen al cambio de posición de compuestos que normalmente no son sustratos, a través de puentes de hidrógeno, confirmando a estas enzimas un mayor perfil de sustratos²⁴.

Collatz (&)²⁴, señala que si se considera la capacidad de hidrólisis de SHV-2, TEM-3, TEM-4, TEM-5 y TEM-7 frente a la cefotaxima y cefazidima en relación a sus mutaciones por las cuales adquirieron grupos hidroxilo libres (residuos de serina), las pequeñas variaciones cercanas a las regiones V ó VII pueden ser determinantes en la interacción selectiva del sustrato.

De esta manera, la interacción con la cefotaxima parece requerir que el grupo hidroxilo se localice cerca de la región VII, mientras que para la interacción con ceftazidima, cerca de la región V ó VII²⁴.

Recientemente, mediante el método de mutagénesis dirigida, desarrollado por Lenfant (&)⁸⁸, a partir del cual se pueden llevar a cabo fácilmente dos o más mutaciones simultáneas, se ha demostrado la función conjunta de dos grupos aminoácidos para conferir a la enzima RTEM-1 una nueva capacidad para hidrolizar a la cefotaxima.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

Este investigador encontró que una mutación combinada en las posiciones 104 y 238 en TEM-1 confiere un fenotipo resistente a la cefotaxima a una cepa de *E. coli*, adquiriendo una actividad semejante a TEM-3 y TEM-4.

Lo anterior sugiere que los estudios de mutagénesis que se lleven a cabo para determinar la correlación entre la estructura primaria y la especificidad de la enzima, deben comprender también mutaciones simultáneas, ya que la especificidad puede estar determinada por el sinergismo de dos o más residuos.

Hasta ahora, todas las investigaciones se han enfocado al análisis de residuos cargados (debido a que frecuentemente son los más importantes en el proceso catalítico y su número es limitado) restando atención a los no cargados, los cuales posiblemente tienen un papel esencial en la especificidad de la β -lactamasa⁶⁸.

Los resultados obtenidos en algunos estudios, parecen demostrar que a pesar de existir una buena superposición de la mayoría de los residuos del sitio activo entre las β -lactamasas de clase A y C, algunos operan de acuerdo a mecanismos diferentes, tal es el caso de la Ser-130 (clase A) y la Tyr-150 (clase C); o al contrario, residuos que no tienen posiciones similares, pueden presentar funciones semejantes, como la Glu-166 (clase A) y la Tyr-150 (clase C)⁶⁸.

Los estudios llevados a cabo actualmente en las β -lactamasas están encaminados a comprender la relación entre la estructura y la especificidad por el sustrato y aunque se han obtenido resultados positivos para establecer la relación entre la estructura primaria y la capacidad de hidrólisis frente a las cefalosporinas en las β -lactamasas tipo TEM²⁴, en general no ha sido posible postular un modelo que explique satisfactoriamente su

interacción, ya que se han encontrado comportamientos contradictorios⁸⁸, demostrando que la situación es más compleja. Sin embargo, a partir del estudio de la estructura tridimensional de cada tipo de enzima, mediante el análisis cristalográfico de rayos X, se espera encontrar una explicación definitiva para entender la interacción β -lactamasa/antibiótico.

2.4 Mecanismos de las β -lactamasas A y C

Clase A

Existen dos hipótesis postuladas para explicar el mecanismo molecular en las β -lactamasas de clase A, cuya diferencia estriba en la función del residuo de Gly-166 y Lys-73.

1.-La primera sugiere que la Lys-73 dona un protón al átomo de N del anillo β -lactámico^{21, 80} y el Glu-166 desprotoniza a la Ser-70 en el proceso de acilación y a la molécula de H₂O, en la desacilación^{93, 21}, (ver mecanismo 2.I).

2.-La segunda, propuesta por Herzberg y Moul⁶⁴, (quienes sugieren el mecanismo de unión e hidrólisis de la ampicilina frente a la β -lactamasa PC1 de *S. aureus* con base en la estructura tridimensional alrededor del sitio activo), señala la transferencia directa del protón de la Ser-70 al átomo de N del anillo β -lactámico, facilitado por la repulsión protónica debido al residuo R de la Lys-73 cargado positivamente. La Lys-73 interactúa con el Glu-166 a través de un puente salino. El Glu-166 desprotoniza la molécula de H₂O durante la hidrólisis del complejo acil-enzima (ver mecanismo 2.II).

CAPÍTULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

Estos investigadores explican la interacción de la ampicilina con la enzima y recalcan la preferencia por los sustratos con grupos hidrófobos terminales sin impedimento estérico; así mismo, reafirman el hecho de que los antibióticos β -lactámicos con cadenas laterales voluminosas y rígidas, son más resistentes a la hidrólisis por las β -lactamasas de clase A.

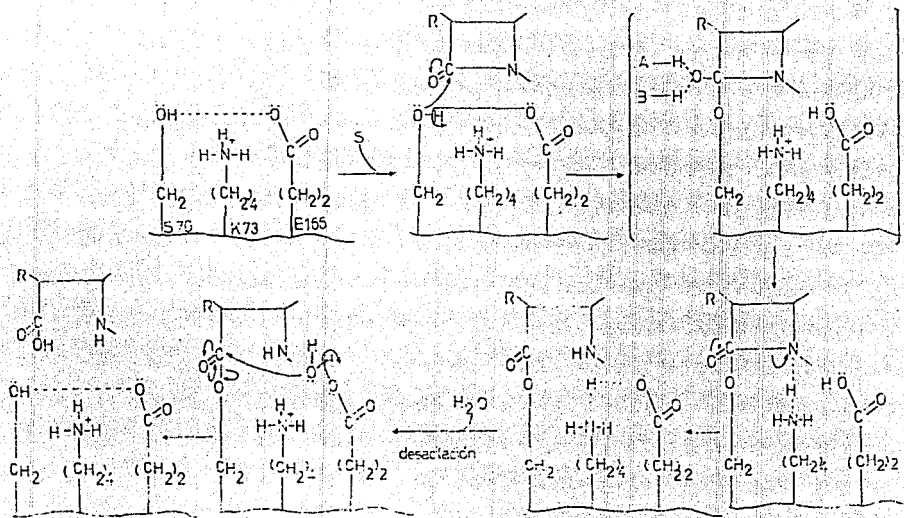
Para que el residuo de Glu-166 actúe como base general, se requiere un cambio en la conformación de la proteína, conduciendo al acercamiento de la Glu-166 a la Ser-70 para efectuarse la unión con el sustrato⁶⁸.

Por otro lado, el hecho de que las constantes de acilación y desacilación presenten un comportamiento similar durante la variación del pH⁹³, sugiere que los mismos grupos aminoácidos participan en la acilación y desacilación; hecho que apoya la primera hipótesis. Sin embargo, debe considerarse que la lisina y el ácido glutámico pueden actuar como bases generales durante el proceso de acilación y desacilación⁹².

Clase C

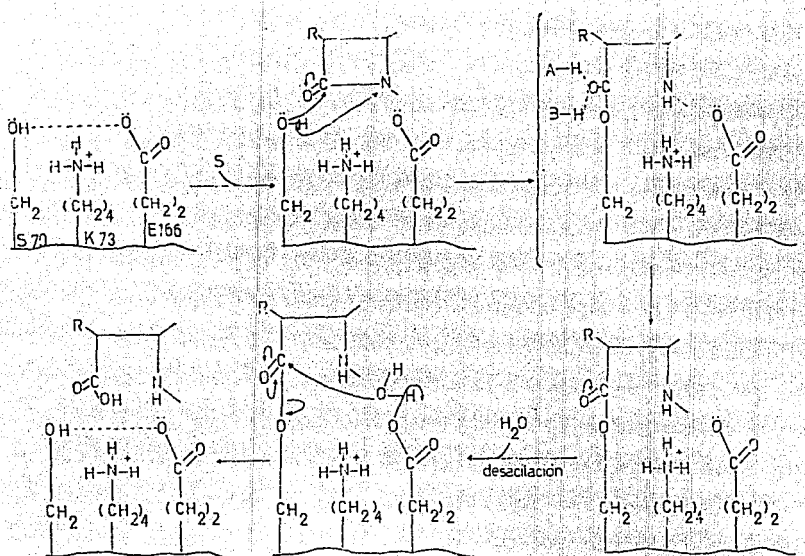
Oefner (&), ha propuesto el mecanismo de hidrólisis de la β -lactamasa de *C. freundii* (clase C) frente al aztreonam¹¹⁰, el cual es un inhibidor monobactámico (mecanismo 2.III).

La región del sitio activo de la β -lactamasa "madura" de clase C, incluyendo los residuos que probablemente son esenciales en la catálisis, se muestra en el mecanismo 2.III. Es notable la marcada densidad electrónica de la red formada por los puentes de H⁺, involucrando ambos residuos invariantes de lisina. Ser-64*, Tyr-150 y Asn-152.



Mecanismo 2.1

Primer mecanismo de las β -lactamasas de clase A^{21, 80, 93}



Mecanismo 2.II

Segundo mecanismo propuesto para las β -lactamasas de clase A⁶⁴.

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

El acil-amino NH formado con el inhibidor, se une al átomo de O del grupo carbonilo de la Ser-318 a través de un puente de H^+ .

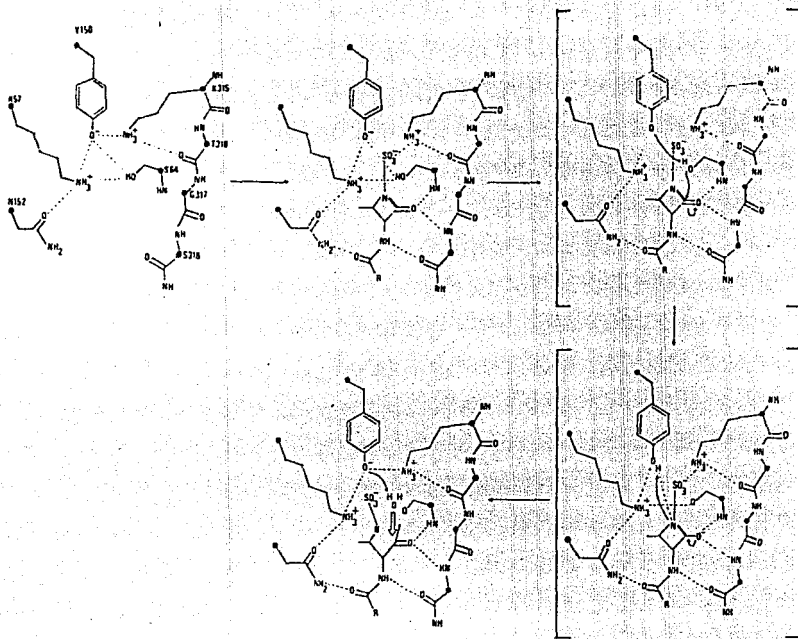
La Tyr-150 opera como una base general, este residuo se encuentra en una posición óptima para actuar como aceptor y donador del protón, mientras que la Lys-67 se encuentra demasiado retirada para donar un protón al átomo de N eliminado durante la apertura del anillo β -lactámico. La molécula de H_2O debe ser atacada en la dirección en la cual el N β -lactámico es eliminado, si los mismos grupos catalíticos participan en la desacilación; esto implica una rotación del sustrato, lo cual también cambia la interacción del sulfonato con la Lys-315 y permite que la red de puentes de H^+ se reconstituya.

La Tyr-150 deberá ser, por tanto, menos básica y en consecuencia menos efectiva para actuar como base general en el proceso de desacilación que durante la acilación, lo que explicaría la desacilación como etapa limitante en las enzimas de clase C.

Oefner sugiere que este mecanismo puede ser aplicable a otros miembros de la superfamilia propuesta por Joris (&)⁷², sin embargo faltan estudios para confirmar esta hipótesis¹¹⁰.

La Tyr-150 en la β -lactamasa de *C. freundii*, podría corresponder a la Tyr-159 de la carboxipaptidasa R61, en la cual la Lys-315 es remplazada por histidina.

Oefner (&), mostró mediante superposiciones estructurales, que la Tyr-150 en la enzima de *C. freundii* corresponde a la Ser-130 de la enzima de *S. aureus* (clase A), que es un residuo invariante en las β -lactamasas de clase A; sin embargo, este investigador indica



Mecanismo 2.III

Mecanismo propuesto para la β -lactamasa clase C de *C. freundii* frente al aztreonam¹¹⁰.

que la participación de una forma aniónica de serina como una base general en la reacción de acilación no tiene precedentes, indicando finalmente la posibilidad de considerar que la Lys-73 actúe como base general durante el proceso de hidrólisis de las β -lactamasas de clase A.

Jacob (&)⁶⁸, indica que la Ser-130 no tiene la misma función que la Tyr-150 en las β -lactamasas de clase A, ya que se substituyó el primer residuo por otros aminoácidos y no se observó gran pérdida en la actividad enzimática.

2.5 β -lactamasas no serínicas

2.5.1 Clase estructural B

Una de las β -lactamasas más estudiadas es la β -lactamasa II de *B. cereus* 569/H/9. Debido a que las propiedades de esta enzima difieren marcadamente de las enzimas de clase A, Ambler¹ propuso la clase estructural B para comprender a dicha enzima. Esta clase sólo se ha aislado en cepas de *B. cereus* 569/H/9, las cuales la producen naturalmente junto con una enzima de clase A (β -lactamasa I) y otra β -lactamasa que se encuentra unida a la membrana, denominada β -lactamasa III²³. Sin embargo, en 1975 se aisló una cepa mutante que sólo produce la enzima de clase B, *B. cereus* 5.B/6, ofreciendo ventajas en términos de purificación¹⁰³.

Como metaloenzima, se distingue claramente de los miembros de las clases A, C y D que contienen un residuo de serina en el sitio activo y no requieren cofactores¹³³.

Características Fisicoquímicas y Bioquímicas

La β -lactamasa II de *B. cereus* se encuentra codificada por un cromosoma, es mucho más pequeña que la mayoría de las β -lactamasas de clase A y el PM reportado es de 22,500.

Esta enzima requiere Zn^{2+} para su actividad, es decir es una metaloenzima, y aunque se ha clasificado junto con las metaloenzimas producidas por *Flavobacterium odoratum*, *Legionella gormanii* y *Pseudomonas maltophilia* en el grupo 3 propuesto por Bush para la clasificación general de las β -lactamasas, difiere de éstas en algunas propiedades, por lo que es posible que esta enzima sea el único miembro de la clase B en este grupo^{8, 16}, sugiriendo la existencia de más de una clase de metalo- β -lactamasas¹³³.

La β -lactamasa II posee una gran actividad frente a un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos y debe su descubrimiento a su gran capacidad para hidrolizar las cefalosporinas.

Esta enzima es capaz de hidrolizar sustratos que son estables frente a las β -lactamasas serínicas, como la cefoxitina, imipenem y moxalactam¹⁰⁵.

Se encuentran involucrados residuos de histidina y uno de cisteína, en la unión del metal, cuya posición se ha determinado en la secuencia de aminoácidos; en la fig. 2.11 se muestran las secuencias alrededor de los residuos de histidina y cisteína. Los fragmentos más largos se compararon con las secuencias de las enzimas de clase A mostradas en la fig. 2.1, sin encontrarse semejanza alguna. Debido a la diferencia en el mecanismo y tamaño entre las enzimas de la clase A y B, y a la aparente falta de similitud

```

.I K A H S T A L T A E L A K .
A H A N . . . L H T .
N I N A V V P G H G E V K G G .
F G N M K V E T F Y P G K G H .
.I L V G G C L V K S T S A K D .
    
```

Fig. 2.11

Secuencias de los segmentos peptídicos de la β -lactamasa II de *B. cereus* 569/II que contienen histidina y cisteína.

Las secuencias se dedujeron de un estudio mediante digestión con tripsina y termolisina, de la proteína tratada con ácido per fórmico; se identificó un quinto residuo de histidina, aparentemente no esencial, en el segundo segmento peptídico¹.

entre sus secuencias, Ambler sugiere que estas dos clases tienen orígenes independientes¹.

Las cepas 569/II/9 y 5/B/6 de *B. cereus* producen grandes cantidades de esta metaloenzima constitutivamente y la secretan extracelularmente.

El requerimiento de metal les confiere un mecanismo singular a estas enzimas, por ejemplo, la V_{max} de la β -lactamasa II de *B. cereus* frente a la cefalosporina C puede ser 8,000 veces mayor que una típica β -lactamasa que no requiere ion metálico para su actividad¹⁰³.

La metaloenzima de la cepa 5/B/6 es muy parecida a la de 569/II/9 en cuanto a su estructura proteica y peso molecular, sin embargo, difieren un poco en su especificidad

de sustrato¹⁰³. Todos los estudios se han realizado en la cepa 569, de acuerdo a la literatura consultada.

Se han analizado otros iones metálicos como posibles cofactores además del Zn^{2+} , obteniéndose la mayor actividad enzimática con este último^{122, 133}. Sustituyendo el Zn^{2+} por Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} ó Hg^{2+} se obtiene una enzima con menor actividad. En la presencia de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} ó Ca^{2+} no se detecta actividad³³.

Sabath y Abraham, señalan que la adición de Cu^{2+} y Fe^{2+} como sales de sulfato, no afecta la actividad enzimática. Sin embargo, indican que a altas concentraciones los iones metálicos tienen propiedad inhibitoria¹²².

Por otro lado, la sustitución de cobalto por zinc ha permitido el estudio del mecanismo de esta metaloenzima, puesto que la actividad catalítica se retiene^{33, 103}, comprobándose que el Co^{2+} se une en el mismo sitio que el zinc en la β -lactamasa II⁵².

Davies y Abraham, demostraron, mediante equilibrio de diálisis, que la enzima se une a dos iones de Zn^{2+} ó Co^{2+} , indicando la presencia de dos sitios de unión en la enzima³³.

El primer sitio, identificado como esencial para la actividad, posee una pequeña afinidad por el Zn^{2+} , siendo mayor que la del segundo sitio. Los estudios de R.M.N. (resonancia magnética nuclear) tanto en la enzima-Zn como la reconstituida con Co^{2+} de *B. cereus* 569, revelaron los residuos aminoácidos involucrados en la unión del ion metálico¹⁰³, identificándose tres residuos de histidina en el sitio principal y uno adicional en el segundo sitio⁵². Se ha demostrado también la presencia de un residuo

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

de cisteína en el sitio principal^{7, 9, 33, 52} y se ha sugerido que funciona como ligando, ya que la apoenzima no se reactiva por la adición de Zn^{2+} después de la adición de un agente que reaccione con el grupo sulfhidrilo (iodoacetato, pCMB)³³.

Se ha postulado que la presencia de Zn^{2+} en este sitio protege a la cisteína contra modificaciones químicas, ya que en presencia de éste, no hay reacción con el reactivo de Ellman, el cual actúa sobre el grupo sulfhidrilo, indicando un "enmascaramiento" de la cisteína por el zinc³³.

Recientemente se identificó la presencia de un residuo esencial de ácido glutámico por modificación química⁹⁰, empleando agentes usuales para modificar los grupos carboxilo en las protefnas.

La caracterización espectrofotométrica de los compuestos intermediarios^{7, 9}, ha indicado el comportamiento de una ruta cinética ramificada y ha confirmado la interacción directa del ion metálico en la catálisis. Este mecanismo, marcadamente diferente, explica la falta de susceptibilidad de la β -lactamasa II frente a los inhibidores de las enzimas A, C y D, desconociéndose aun inhibidores para las metalo- β -lactamasas.

Sutton (&) espera que el conocimiento de la estructura tridimensional propuesta facilite el desarrollo de un compuesto inhibidor¹³³.

Estructura

El análisis cristalográfico de la β -lactamasa II, efectuado por Sutton (&), con Cd^{2+} en lugar de Zn^{2+} , ha confirmado y revelado la disposición de los residuos alrededor del ion metálico esencial, así como la identificación de los sitios no esenciales.

También reveló que el residuo de cisteína 168 adyacente al ion metálico, no es un fuerte ligando ya que se encuentra un poco separado de éste. Sin embargo, la localización de este residuo confirma la hipótesis de la presencia del ion metálico como posible protector de la cisteína ante una modificación química y que la unión del Zn^{2+} con otros ligandos, estabiliza la conformación proteica en la cual el grupo sulfhidrilo es inaccesible³³.

La afinidad de la β -lactamasa II por el Zn^{2+} en este sitio es muy baja, por lo que es posible la sustitución por otros cationes.

Sitios Menores (no esenciales)

De los tres sitios menores localizados con Cd^{2+} , sólo dos se encuentran adyacentes al sitio principal: en uno se encuentra el ácido aspártico 56 y en otro los residuos 81 y 90 de ácido aspártico también (fig.2.12). En el tercer sitio se encuentra un residuo de histidina.

El efecto de saturación observado en los sitios menores, que afecta la actividad de la enzima frente a ciertas cefalosporinas, se atribuye al segundo sitio (residuos 81 y 90)¹³³.

Davies y Abraham sugirieron, con base en los resultados obtenidos, la posibilidad de un efecto cooperativo positivo ejercido por el sitio no esencial, sobre la región esencial para la unión del Zn^{2+} ³³ y aunque estos investigadores señalan otra explicación posible a los resultados obtenidos, como un error de cálculo, la primera sugerencia no se ha descartado de acuerdo con la literatura consultada.

Región del Sitio Activo

El sitio principal se encuentra en una hendidura poco profunda de la molécula, permitiendo una interacción directa con el sustrato. Esta hendidura se encuentra rodeada por residuos hidrófobos principalmente y se extiende desde el ion metálico hacia la cadena lateral del ácido glutámico 37. Se ha demostrado que la modificación de este residuo inactiva a la enzima, debido a su localización crítica dentro de esta hendidura. Little (&)⁹⁰, propone que el residuo Glu-37 actúa como una base general, tomando un protón de la molécula de agua que se encuentra coordinada con el metal (fig. 2.15); sin embargo el estudio de cristalografía reveló la presencia de una gran distancia entre la Glu-37 y el ion metálico, por lo que Sutton (&), propone a la Glu-212, que se encuentra más cerca al ion, como una posible alternativa para ejercer dicha función; aun así, este residuo no se encuentra tan cerca del ion, al menos en la enzima libre, en ausencia de sustrato.

Estructura de la Apoenzima

El estudio de Sutton (&) sólo reveló la modificación de tres residuos (His-88,-210 y Cys-168) entre la apoenzima y la holoenzima (fig.2.12 y 2.13); sin embargo, los estudios de R.M.N. y C.D. (circular-dichroism)³³, indican cambios en la conformación de las proteínas, sugiriendo que la modificación se extiende a través del sitio proteico involucrado en la unión con el metal, existiendo cambios en los residuos aromáticos circundantes y un cambio en el plegamiento de la cadena peptídica.

Sutton señala que la diferencia en sus resultados se debe a que los estudios de R.N.M. son más sensibles a cambios de conformación pequeños.

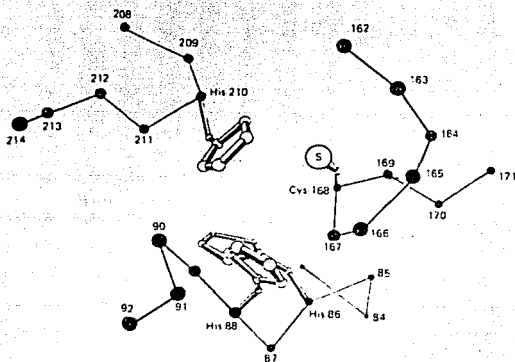


Fig. 2.13

Estructura de la apoenzima.

En la misma región como se presentó en la fig 2.12.

Mecanismo

Los estudios de modificación química⁹⁰, espectrofotometría en Barrido Rápido de Detención de Flujo⁷, de crioenzimología⁹, hidrólisis frente a compuestos tiono- β -lactámicos¹⁰¹ y cristalografía en la β -lactamasa II de *B. cereus*, señalan la formación de complejos intermedios enzima-sustrato no covalentes durante el proceso de hidrólisis, involucrando además una ruta ramificada, por lo que se han discutido varios

mecanismos posibles para considerar estos intermediarios^{7, 9, 101}. A continuación se presenta un resumen de estos estudios.

I. Bicknell (&), demostró que la β -lactamasa II sigue una ruta ramificada durante el proceso catalítico^{7, 9}, y aunque sus estudios se han enfocado al sistema bencilpenicilina/ Co^{2+} - β -lactamasa, señala que este tipo de ruta se observa también con Zn^{2+} y Mn^{2+} . Este investigador propone dos opciones (cinéticamente indistinguibles) (fig. 2.14), donde ES^1 y ES^2 representan el estado preestable y estable respectivamente. El mecanismo difiere en que ES^2 es activo en la ecuación I pero no en la II, sin embargo en la literatura reciente, sólo se hace alusión a la ecuación I¹⁰¹.

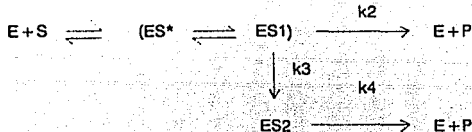
La etapa limitante es la conversión de ES^1 a ES^2 ⁷. Los experimentos de inactivación ácida indican que ninguno de los tres complejos, hasta ahora detectados (ES^* , ES^1 y E^2), involucran una interacción covalente entre la enzima y el sustrato y que todos son complejos enzima-sustrato, más que enzima-producto¹⁰¹.

II. La variación en la actividad de la β -lactamasa II frente a una 8-tiono cefalosporina respecto a su oxo-análogo al variar el ion metálico por iones con diferente afinidad por el azufre (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+}) es tomada por Murphy y Pratt como evidencia de un contacto directo, cinéticamente importante, entre el ion metálico y el grupo carboxilo del anillo β -lactámico¹⁰¹; pues demostraron que la disminución en la actividad del Tiono-compuesto con respecto a su análogo estaba en función del ion metálico. Estos investigadores sugieren un estado de transición que involucra un cuarto intermediario ES^3 , subsecuente a ES^1 . Sin embargo, no ha sido posible caracterizar a este complejo intermediario, debido probablemente a que no se acumula durante la

reacción¹⁰¹. Hasta ahora sólo Bicknell (&), ha demostrado y caracterizado tres complejos intermedarios: ES^* , ES^1 y ES^2 ,^{7, 9}.

III. Bicknell (&), demostró la presencia de modificaciones en el número de coordinación del ion metálico en el sitio activo durante el proceso de catálisis⁷. Sus estudios de espectrofotometría indican que el Co^{2+} , en la enzima libre (E) y en ES^2 , se encuentra coordinado por cinco enlaces (fig. 2.15): con tres residuos de histidina, uno

Ecuación I:



Ecuación II:

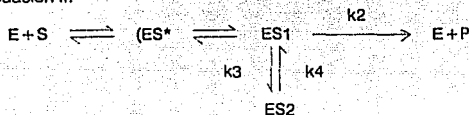


Fig. 2.14

Rutas alternas propuestas para la β -lactamasa II de *B. cereus* 569^{7, 9}.

de cisteína y proponen una molécula de agua como quinto ligando en la enzima libre, el cual se ve desplazado (pero no reemplazado) por el sustrato, formando un intermedio tetraédrico con éste en ES^1 , que probablemente, posee sólo cuatro ligandos.

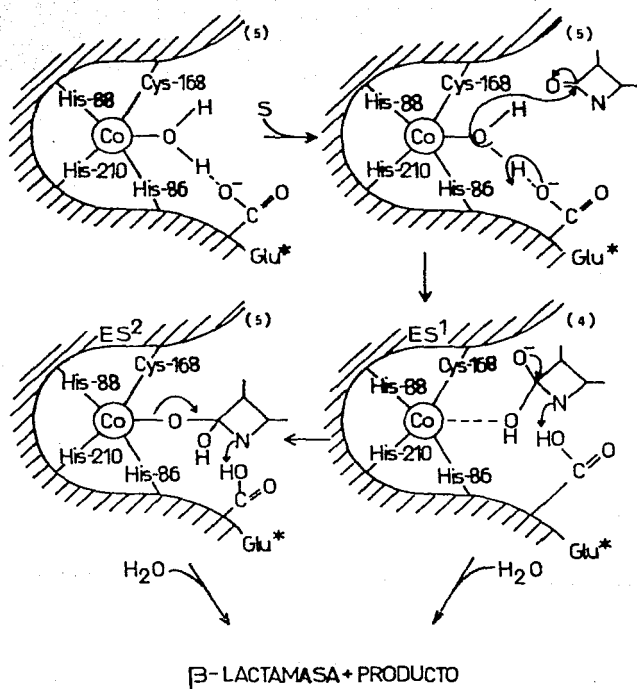


Fig. 2.15
Mecanismo propuesto por Bicknell (&)⁷, para la β -lactamasa II.

El número de coordinación se indica con "()".

Debido a la gran similitud entre la absorción espectrofotométrica de ES^* y ES^1 , Bicknell (&), sugiere que el número de coordinación en ES^* es también de cuatro, indicando una pérdida de un ligando en la enzima libre cuando se convierte en ES^{*7} (fig. 2.15).

El quinto ligando en ES^2 es probablemente con el sustrato⁷; Murphy y Pratt sugieren que el cuarto intermediario propuesto por ellos (ES^3), dará origen a ES^2 con mayor facilidad que ES^1 ¹⁰¹, debido a que el grupo carbonilo del anillo β -lactámico se encuentra más unido al ion metálico en ES^3 que en ES^1 .

Mecanismo de Acción de la β -lactamasa II.

Bicknell (&), propone el mecanismo de hidrólisis⁷, que en ausencia de alguna evidencia de la existencia de un intermediario covalente, sugiere un simple mecanismo que involucra un ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el grupo carbonilo del anillo β -lactámico (fig.2.15).

La dirección del ataque nucleofílico es desde el sitio con menos impedimento estérico (sitio alfa), de esta manera una gran variedad de sustratos β -lactámicos pueden ser fácilmente hidrolizados, a una velocidad semejante, sin tener en cuenta el tamaño del grupo sustituyente de la cadena lateral, aún más, la meticilina (un derivado de la penicilina con una cadena lateral voluminosa) se hidroliza más rápidamente que la bencilpenicilina.

ES^* es el primer complejo detectado durante el transcurso de la reacción, sin embargo Bicknell indica que debe estar precedido por un intermediario aún no detectado, como

complejo de Michaelis. ES^* debe estar como un complejo intermediario tetrahédrico. (Fig. 2.14)

ES^1 se colapsa con el sustrato, siguiendo dos rutas posibles:

- (a) La formación de un complejo enzima-sustrato no covalente (ES^2).
- (b) La enzima se estabiliza al formar un intermediario tetrahédrico, el cual sufre una conversión irreversible a producto (k_2).

El número de coordinación disminuye de cinco a cuatro cuando la bencilpenicilina se une a la enzima, pero se regenera a cinco en el intermediario ES^2 . La disminución del número de coordinación en el ion metálico, es un fenómeno sorprendente y sugiere que el sustrato no se coordina con el metal en ES^* ni en ES^1 .⁷ Se ha propuesto que un residuo de ácido glutámico actúa como base general durante el proceso de catálisis, al igual que en la carboxipeptidasa A^{7, 90}; este residuo estabiliza la molécula de agua unida al metal⁷ (fig. 2.15).

El ácido glutámico toma un protón de la molécula de agua que se encuentra coordinada al ion metálico y se libera como ion hidroxilo, el cual ataca al anillo β -lactámico; el ac. glutámico cede el protón al átomo de N del anillo β -lactámico.

Una distorsión en el intermediario tetrahédrico ES^1 podría inducir una pequeña interacción con el compuesto β -lactámico (lo cual se muestra en la fig.2.15 como una línea punteada).

El anillo β -lactámico permanece intacto en el complejo ES^1 .⁷

La conversión de ES^1 a ES^2 se acompaña por el aumento del número de coordinación (5), en el cual el sustrato se coordina con el metal en ES^2 .

Es posible que el oxianión generado sea atrapado por el metal, formándose el quinto ligando, lo cual conduce a un debilitamiento de la unión entre el metal y la cisteína-168.

Bicknell señala que no se conoce con exactitud la identidad de ES^2 , si se encuentra coordinada o no con el sustrato y con qué grupos del sustrato, sin embargo Murphy y Pratt, mencionan una interacción directa del ion metálico con el grupo carbonilo del anillo β -lactámico¹⁰¹, por lo que es probable que en ES^2 sí se presente una coordinación con el sustrato.

Lo anterior excluye, por lo tanto, a los mecanismos propuestos en los que se postulaba que la única función del ion metálico era la activación del agua o el sustrato, por medio de la coordinación con el átomo de N del anillo β -lactámico, los cuales se habían propuesto inicialmente para explicar la hidrólisis de las penicilinas¹⁰¹.

Bicknell menciona la posibilidad de la existencia de pasos adicionales a los propuestos, incluyendo transferencia de protones, producto de disociación y reacomodo de otra molécula de agua; así mismo indica que la ruta ramificada, vía ES^2 es menos eficiente ($k_4 < k_2$) (fig. 2.14), pero también involucra menos reorganización del sitio activo (pentacoordinación del metal, tanto en E como ES^2). Es posible que la catálisis proceda vía ES^2 exclusivamente⁷.

El mecanismo de reacción propuesto, es marcadamente diferente al propuesto para la β -lactamasas serfínicas, esto explica la total inefectividad de los inhibidores basados en

CAPITULO II. ESTRUCTURA DE LAS β -LACTAMASAS

el mecanismo de estas últimas frente a las metalo β -lactamasas: ácido clavulánico, ácido 6- β -iodopenicilánico, ácido sulfo-hidroxi-bencilpenicilánico, ácido fenilborónico, entre otros⁸.

Aún más, la β -lactamasa II cataliza la hidrólisis de algunos de estos compuestos (pag.151)³⁵.

No se conocen aún inhibidores para estas metaloenzimas, a excepción de los agentes quelantes.

Hasta la fecha, el único microorganismo patógeno conocido que produce metalo- β -lactamasas es *Pseudomonas maltophilia*⁸ y es claro que conforme se vayan identificando más metalo-enzimas, se requerirá el desarrollo de sustancias inhibitoras para estas enzimas, las cuales son causantes de una gran parte de la resistencia actual frente a la terapia β -lactámica⁷.

Desactivación de la β -lactamasa II sustrato-inducido por cefalosporinas

Se ha observado que la hidrólisis de ciertas cefalosporinas disminuye progresivamente frente a la β -lactamasa II; esto no se debe a un agotamiento de sustrato ni a una inhibición por producto, además este fenómeno se encuentra restringido a las cefalosporinas que poseen un grupo metilo en la posición C-3.

La salida de este grupo es catalizada por la β -lactamasa II, y Bicknell señala que la desactivación se debe a la acumulación progresiva de un complejo enzima-sustrato no covalente, formado de acuerdo a la ruta ramificada propuesta⁹.

Propiedades moleculares de la metalo- β -lactamasa de *Pseudomonas maltophilia*

No se ha determinado aún la clase molecular a la que pertenece la metaloenzima de *P. maltophilia*; sin embargo, debido a la importancia clínica de este microorganismo, se hace necesaria la mención de algunas características de esta β -lactamasa conocida como L1⁸.

La β -lactamasa L1 es una enzima tetramérica; como es usual en los microorganismos Gram negativos, se encuentra localizada en el espacio periplasmático.

Se han identificado tres variantes de esta enzima con diferentes puntos isoeléctricos. Cada variante contiene dos moléculas de Zn y (dos de ellas) un residuo de cisteína, pero a diferencia de la β -lactamasa II de *B. cereus*, el grupo sulfhidrido no se requiere para la actividad enzimática ya que parece que no funciona como ligando del ion metálico, puesto que el reactivo de Ellman reacciona rápidamente con la enzima y no se observa pérdida en la actividad enzimática.

Sustituyendo al Zn^{2+} por Co^{2+} , Cd^{2+} ó Ni^{2+} , se forma una enzima con menor actividad que en presencia de Zn.

Hidroliza más rápidamente a las penicilinas que las cefalosporinas, al contrario de la β -lactamasa II, pero al igual que ella, no la inactivan los inhibidores de las β -lactamasas sérfnicas.

Las β -lactamasas II y L1 hidrolizan la N-formimidoiltienamicina siendo la segunda particularmente eficiente. Este antibiótico β -lactámico lo pueden hidrolizar también las dipeptidasas renales, a diferencia del resto de los β -lactámicos. Sin embargo, las

β -lactamasas II y L1 son incapaces de hidrolizar otros sustratos de las dipeptidasas renales.

Existen muchas diferencias estructurales y cinéticas entre la β -lactamasa II de *B. cereus* y la enzima L1 de *P. maltophilia*.

Bicknell (&), determinó la secuencia aminoácida de 32 residuos del resto N-terminal de la enzima L1 y no encontró semejanza con las secuencias N-terminales de otras β -lactamasas, por lo que sugiere una nueva clase molecular de metalo- β -lactamasas, que comprendería a la β -lactamasa L1 de *Pseudomonas maltophilia*⁸.

CAPITULO III. INTERACCION β -LACTAMASA-ANTIBIOTICO-CELULA BACTERIANA

Estudios recientes, enfocados al entendimiento del mecanismo de resistencia de las β -lactamasas a nivel molecular, demostraron la existencia de diversos factores (presentes en la bacteria), involucrados en la interacción β -lactamasa/antibiótico²⁶; dichos factores pueden actuar en sinergismo con las β -lactamasas para conferir una mayor resistencia a la célula bacteriana y en un momento dado, determinan el grado de este nivel de resistencia^{62, 66}.

Estos factores comprenden principalmente:

- 1) Elementos que determinan el grado de permeabilidad en la membrana celular externa frente a los compuestos β -lactámicos.
- 2) Afinidad, tipo y número de PBPs, los blancos directos de los compuestos β -lactámicos.

En las cepas inducibles, se debe de tomar en cuenta también el grado de expresión y secreción de la enzima²⁶.

3.1 Transporte y localización de las β -lactamasas.

En general, se cree que las proteínas adquieren su estructura tridimensional nativa durante y/o inmediatamente después de su síntesis en el ribosoma y que deben cruzar la membrana citoplasmática, atravesando en un estado de plegamiento diferente al estado

compacto nativo (proteína precursora); aún se desconoce el mecanismo exacto y los factores involucrados en la coordinación de dicho transporte; sin embargo, las proteínas que se transportan a través de la membrana plasmática (como las β -lactamasas), comparan ciertas características en común, siendo la más notable la presencia de un péptido de "señal" en la proteína precursora⁸⁷.

Se ha identificado la secuencia del péptido de "señal" en algunas β -lactamasas, siendo común: la presencia de una región central, constituida por aminoácidos hidrófobos; uno o dos residuos cargados positivamente en la región N-terminal y un aminoácido con una cadena lateral que contenga a lo sumo un C en la región C-terminal⁷⁰.

Laminet y Pluckthun⁸⁷, demostraron que el péptido de "señal" en la enzima tipo TEM de *E. coli*, retardaba el plegamiento de la pre- β -lactamasa, pero no evitaba su plegamiento al estado maduro, ya que comprobaron que la enzima precursora puede adquirir una conformación activa.

No fue posible elucidar qué factores estructurales específicos, presentes en el péptido "señal", eran necesarios para conferir este efecto retardado. Se ha reportado que no existe homología entre las secuencias de aminoácidos de los péptidos de "señal" bacterianos, por lo que Laminet y Pluckthun sugieren la posibilidad de que, tanto el carácter hidrófobo y un tamaño suficiente son necesarios para evitar la presencia de plegamientos prematuros.

Goto y Fink⁵⁶ reportan, en la β -lactamasa de *B. cereus*, la existencia de diferentes estados conformacionales transitorios, cuya formación depende de la fuerza iónica y pH del medio, propiedad general de muchas proteínas, incluyendo otras β -lactamasas. Sus

resultados recalcan la importancia de las interacciones hidrófobas en la formación de estos estados conformacionales durante el proceso de plegamiento. Esta bien establecido que las interacciones hidrofóbicas constituyen la principal fuerza en el plegamiento protéico y los puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas contribuyen a guiar tal proceso⁵⁶.

El precursor se encuentra en el citoplasma y la enzima madura en el espacio periplasmático. El plegamiento posterior al paso a través de la membrana no esta bien definido¹¹.

Es posible que existan alteraciones durante este proceso, que permitan la presencia del inductor en el espacio periplasmático, formando enzimas inactivas. Este fenómeno se puede presentar cuando hay un exceso de producción¹¹.

Las bacterias Gram positivas producen β -lactamasas extracelulares (principalmente) e intracelulares.

En microorganismos como *B. cereus*, se libera un 80 a 90% de la enzima, mientras que en las bacterias patógenas Gram positivas, prácticamente el 100% de la enzima se secreta al medio¹⁰⁵.

Debido a esta producción extracelular, se puede presentar una baja concentración enzimática alrededor de cada célula, a pesar de la liberación de una gran cantidad de β -lactamasa.

El bajo porcentaje de β -lactamasa intracelular producida por las bacterias Gram positivas, se encuentra unido a las lipoproteínas de la membrana. Estas enzimas poseen

una menor actividad que las extracelulares, pero representan una segunda defensa contra el antibiótico residual que no hidrolizaron las enzimas secretadas, si se toma en cuenta que sólo una pequeña cantidad de enzima es necesaria para proteger a las proteínas PBP's cuando las β -lactamasas se encuentran localizadas estratégicamente¹⁰⁵.

Las β -lactamasas de las bacterias Gram negativas, a diferencia de las Gram positivas, son enzimas intracelulares; se localizan como enzimas solubles en el espacio periplasmático (fig. 3.1), alcanzando altas concentraciones por célula, a diferencia de las bacterias Gram positivas¹⁰⁵.

Las β -lactamasas de las bacterias Gram negativas sólo se liberan al medio cuando la célula es sujeta a alguna forma de lisis¹²⁰.

3.2 Modelos Generales de Resistencia

Existe una gran diferencia entre las bases moleculares de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos en las bacterias Gram positivas y Gram negativas¹²⁰.

Se distinguen principalmente tres modelos por medio de los cuales, las β -lactamasas localizadas en la célula bacteriana, contribuyen a la resistencia frente a los antibióticos⁹⁴:

I- El modelo más simple comprende a las β -lactamasas producidas por las bacterias Gram positivas, las cuales se producen de manera constitutiva o inducible; una vez expuesta la célula bacteriana a la penicilina (inducibles), se inicia la síntesis de la β -lactamasa, la cual se libera posteriormente al medio.

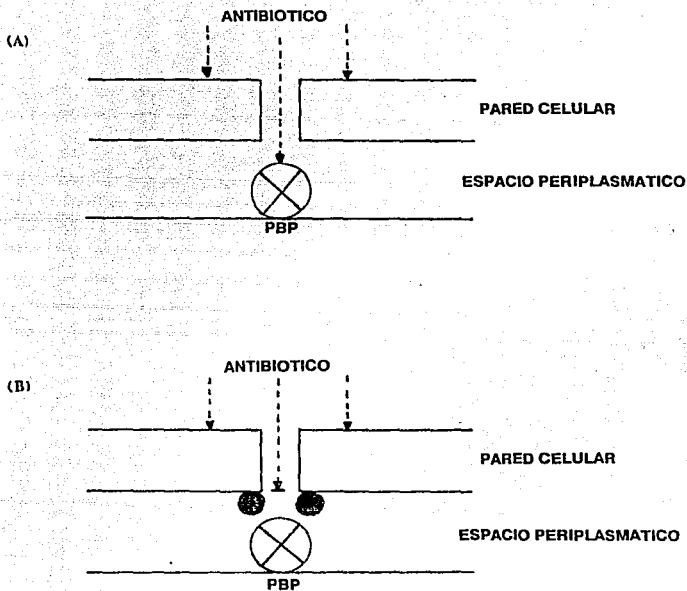


Fig. 3.1

Diagrama de la distribución de las β -lactamasas con respecto a las PBPs blanco en las bacterias Gram negativas.

Donde "•" indica las β -lactamasas (modelo propuesto por Richmond y Sykes)¹²⁰.

(A) Representa a una célula no productora de β -lactamasa. El antibiótico tiene acceso a las enzimas PBPs a través de canales formados por las proteínas Omp.

(B) Célula productora de β -lactamasa. El antibiótico penetra a través del mismo canal que A, sin embargo, es hidrolizado antes de interactuar con las enzimas PBPs.

De esta manera, la producción extracelular de la enzima protege a la bacteria buscando y destruyendo a los antibióticos presentes en el medio de crecimiento, antes de que estos últimos hagan contacto con la superficie celular.

Si permanecen algunas células viables después de la exposición al antibiótico, el desarrollo celular se regenera una vez disminuida la concentración a niveles menores de CIM (Concentración Mínima Inhibitoria).

II- El segundo modelo muestra un efecto cinético similar. Comprende a los bacilos Gram negativos que poseen una gran permeabilidad por los antibióticos β -lactámicos, no presentando ningún tipo de barrera a la penetración del antibiótico hacia el interior de la célula.

De acuerdo a lo anterior, el único factor que determina la resistencia, es el número de microorganismos. Un ejemplo de este modelo lo constituye la β -lactamasa TEM-1 de *H. influenzae*; el bajo nivel de resistencia que confiere cada célula (debido a esta rápida penetración del antibiótico), hace posible que se curen con ampicilina algunas infecciones producidas por cepas de *H. influenzae* productoras de β -lactamasas, cuando el inóculo responsable de la infección fue pequeño.

III- El tercer modelo comprende la interacción de los tres factores involucrados en el grado de resistencia en las bacterias Gram negativas frente a los antibióticos β -lactámicos⁴⁹: afinidad de las PBP por el antibiótico, síntesis y tipo de β -lactamasa, barrera de permeabilidad.

Este caso lo ejemplifica la cepa de *E. coli* resistente a la ampicilina y que produce la β -lactamasa TEM-1. Esta bacteria posee una barrera de permeabilidad en la membrana externa, impidiendo el paso a las moléculas del antibiótico β -lactámico.

El mecanismo es más complicado en este modelo; las enzimas (que se almacenan en el espacio periplasmático), se encuentran localizadas estratégicamente entre la membrana externa y los blancos del antibiótico (PBPs localizadas en la membrana citoplasmática), pueden destruir progresivamente las moléculas del antibiótico conforme vayan entrando. Como consecuencia, se pueden presentar altos niveles de resistencia en una sola célula, a diferencia del modelo anterior.

Se pueden presentar variaciones en este modelo al incrementarse la producción de β -lactamasa cuando la célula se expone al antibiótico β -lactámico, como ocurre en la familia *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadacea* (inducción), ya que se producen altos niveles de β -lactamasa después de un período de exposición y la resistencia puede expresarse tarde (a excepción de *P. cepacia* 249, pag. 23).

Frere y Joris⁴⁹, indican que estos tres factores no actúan independientemente y en las bacterias Gram negativas, la barrera de permeabilidad es significativa en el grado de resistencia conferido sólo cuando la bacteria produce β -lactamasas.

De la acción conjunta de estos tres factores, se ha recalcado que la expresión de las β -lactamasas y el espectro de actividad, son los factores principales que determinan el nivel de resistencia⁶⁶.

De acuerdo a lo anterior, el nivel de resistencia en las bacterias Gram positivas, depende solamente de ¹²⁰:

- 1.- La cantidad de β -lactamasa secretada.
- 2.- La afinidad por el antibiótico.
- 3.- El espectro de actividad de la enzima.

Sin embargo, este tipo de producción enzimática tiene la ventaja de conferir protección a muchas células, siendo un fenómeno de población, originando un marcado "efecto de inóculo", fenómeno que se aprecia al determinar la resistencia de estas bacterias en el laboratorio.

Las bacterias Gram negativas presentan un patrón diferente; generalmente producen pequeñas cantidades de β -lactamasas, sin embargo, también se encuentran involucrados factores intrínsecos de resistencia (que se analizan posteriormente), los cuales actúan en sinergismo con las β -lactamasas; además, las enzimas se encuentran localizadas en lugares estratégicos, impidiendo el acceso a las PBP's (por lo que tiene el mismo efecto que las grandes cantidades de enzima extracelular liberada por las bacterias Gram positivas), excepto que el fenómeno de población es menor y por consecuencia el "efecto de inóculo" es poco común ¹²⁰.

De acuerdo a lo anterior, Richmond y Sykes ¹²⁰, indican que el mecanismo de protección enzimático de las bacterias Gram negativas es más sofisticado que el de las bacterias Gram positivas.

3.2.1 Permeabilidad

En general, los factores de resistencia bacteriana se han clasificado en dos categorías²⁸:

- 1). Resistencia intrínseca
- 2). Resistencia adquirida

El término "intrínseco" se emplea para indicar las características inherentes en la célula responsables de evitar el acceso del antibiótico al interior de la célula y distinguir este tipo de resistencia con la adquirida, la cual se presenta en cepas resistentes originadas a partir de cepas sensibles, debido a la adquisición de plásmidos o mutaciones cromosómicas.

En la primera categoría se encuentra la resistencia, en general, de los bacilos Gram negativos frente a los antibióticos hidrofóbicos, debido a la baja difusión de estos compuestos a través de las membranas externas de la pared celular. Aun así, entre este grupo de microorganismos existen marcadas diferencias en los niveles de resistencia por este factor, dependiendo de la solubilidad del antibiótico en el medio acuoso²⁸.

Es poco común la falta de permeabilidad a los antibióticos hidrofílicos, sobre todo de moléculas pequeñas; el paso de estos compuestos depende del tamaño de los poros en la pared celular (determinado por el tipo de proteínas presentes). *P. aeruginosa*, en particular, presenta resistencia a un número considerable de antibióticos hidrofílicos debido a que posee poros de diámetro pequeño.

De acuerdo con lo anterior, algunas bacterias Gram negativas, productoras de β -lactamasas, pueden presentar resistencia frente a ciertos antibióticos por falta o disminución de permeabilidad en la membrana externa a estos compuestos, más que una hidrólisis enzimática; caso de la cepa de *K. pneumoniae* 160, la cual presenta resistencia frente a las alfa-metoxi-cefalosporinas y la β -lactamasa sintetizada por esta cepa (SHV-5) es incapaz de hidrolizar dichos compuestos⁵⁹.

Esta barrera de permeabilidad presente en las bacterias Gram negativas, (que de manera general impide más el paso a las penicilinas que a las cefalosporinas), explica porqué, especies bacterianas Gram positivas productoras de grandes cantidades de β -lactamasa como *Bacillus anthracis* y *B. licheniformis*, presentan mayor sensibilidad a la bencilpenicilina que las bacterias Gram negativas⁶³; así mismo demuestra el efecto sinérgico con la actividad de las β -lactamasas.

Por otro lado, evaluaciones recientes indican que la presencia de cápsula en microorganismos clínicamente importantes como especies de *Klebsiella*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, no contribuye a una resistencia intrínseca frente a los antibióticos en general²⁸.

En la segunda categoría (resistencia adquirida), se encuentran las mutaciones cromosómicas que afectan el transporte pasivo (difusión a través de las proteínas de la membrana externa en las bacterias Gram negativas) o el transporte activo a través de la membrana citoplasmática; ambos tipos de mutaciones impiden o disminuyen la permeabilidad frente a los antibióticos en general.

Este tipo de mutaciones producen alteraciones en las proteínas transportadoras, en las proteínas de la membrana externa o en los factores involucrados en el transporte activo del antibiótico²⁸.

En particular, se ha observado un incremento de alteraciones en las proteínas de la membrana externa (porinas) de las bacterias Gram negativas productoras de β -lactamasas⁶⁶, actuando de manera conjunta con la actividad enzimática; este tipo de alteración se ha relacionado con el fenómeno de derrepresión.

Finalmente, se ha identificado en algunas cepas de *E. coli*, un tipo no usual de resistencia conferida por plásmidos²⁸, la cual origina la supresión de la síntesis de las proteínas de la membrana externa involucradas en el transporte de los antibióticos en general; este fenómeno no se ha reportado aún en el caso de los microorganismos productores de β -lactamasas; no obstante, ilustra que algunos plásmidos se encuentran involucrados en la alteración del sistema de control de las proteínas externas y tienen la capacidad de disminuir la permeabilidad.

Por otro lado, debe tomarse en cuenta que la disminución de la permeabilidad, puede interferir también en la eficiencia de los inhibidores⁵⁹.

Proteínas de la membrana externa

Se ha reportado que tres grupos de proteínas presentes en la membrana externa de los bacilos Gram negativos (denominadas OmpF, OmpC y OmpD), afectan el grado de permeabilidad a los antibióticos β -lactámicos^{4, 66}.

La facilidad de entrada de estos antibióticos a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, se encuentra en función de la cantidad y tipo de dichas proteínas, por lo que en la actualidad se ha intensificado el estudio de la función de los canales protéicos en el grado de permeabilidad de la célula bacteriana⁶⁶.

El grado de permeabilidad a través de la proteína OmpF es el más alto, seguido en orden decreciente, por OmpD y OmpC⁶, por lo que algunos antibióticos β -lactámicos como la cefoxitina penetran más rápidamente a través de las proteínas OmpF, que el tipo OmpC; lo anterior explica la diferencia de permeabilidad de los compuestos β -lactámicos en las bacterias Gram negativas de acuerdo al tipo y número de proteínas Omp presentes.

Bellido (&)⁶, aisló cepas de *Salmonella muenchen* en un paciente bajo tratamiento con ampicilina; las cepas mostraron resistencia frente a ésta, a otros antibióticos β -lactámicos y a antibióticos no relacionados, debido a una disminución en la expresión de la proteína OmpF.

Es muy común que antibióticos estructuralmente no relacionados, sean afectados debido a una modificación en la permeabilidad a través de la membrana externa^{6 18}, explicando el carácter no específico de la barrera de permeabilidad.

Este investigador también observó un aumento conjunto de la proteína OmpC, atribuyéndolo a un mecanismo de adaptación del sistema osmótico de la bacteria.

Hiraoka (&)⁶⁶, demostró, mediante cepas mutadas de *E. coli* deficientes de OmpF y OmpC, la reducción en la susceptibilidad frente a ciertos antibióticos, incluyendo cefalosporinas, oxacefamincinas, cefoxitina y aztreonam.

La reducción de susceptibilidad (aumento en el valor del CIM) fue mucho mayor para la cefoxitina y oxacefamincinas, que para los otros compuestos. Las cefalosporinas mostraron el menor incremento en el valor de CIM debido a esta mutación.

Este investigador estudió el efecto sinérgico de la alteración de las proteínas externas y la producción de β -lactamasas, demostrando que en cepas productoras de dichas enzimas (carentes de OmpF y OmpC) el efecto sinérgico fue muy marcado frente a los cefems y aztreonam, pero no frente a las penicilinas e imipenem, indicando una mayor dependencia de los cefems y aztreonam por OmpF y OmpC para su paso a través de la membrana externa que las penicilinas e imipenem, presentando este último una permeabilidad muy alta.

La falta de OmpC solamente, no produjo ningún incremento en la resistencia de las cepas productoras de β -lactamasas; sin embargo, debe tomarse en cuenta que las cepas mutantes de OmpC que son osmorreguladas por OmpF, pueden comportarse como OmpC y OmpF bajo condiciones de alta osmolaridad⁶⁶.

Se reporta que la resistencia presente en una cepa de *S. typhimurium* (aislada durante una terapia con cefalexina), se debió a una pérdida de OmpC; sin embargo, sólo se observó un incremento en el valor de CIM frente a las cefalosporinas⁶.

De acuerdo con lo anterior, la modificación de OmpF afecta la permeabilidad de un gran espectro de compuestos β -lactámicos, mientras que la de OmpC se encuentra asociada sólo a pequeñas alteraciones de susceptibilidad; esto concuerda con el diferente grado de permeabilidad que presenta cada una de las proteínas Omp.

Se ha destacado el efecto sinérgico de la disminución de la permeabilidad con la producción de β -lactamasas para conferir una mayor resistencia y aunque se ha indicado que el espectro de actividad y cantidad de producción de β -lactamasa son los factores determinantes, la alteración de la permeabilidad puede ser decisivo en la resistencia de microorganismos patógenos productores de β -lactamasas de amplio espectro⁶⁶.

Relación Derrepresión-Disminución de permeabilidad

Existe evidencia de que algunas cepas que sufrieron derrepresión, muestran también una marcada alteración en la expresión de las proteínas de la membrana externa¹⁸; dicha modificación en el grado de permeabilidad puede participar en la resistencia observada en estas cepas⁵⁸.

Desafortunadamente, se han llevado a cabo pocos estudios para examinar el proceso de derrepresión de las β -lactamasas y la expresión de las proteínas de la membrana externa, tanto en las cepas salvajes como en las correspondientes cepas mutadas derreprimidas, para determinar de esta manera si estos dos factores son el resultado de un simple proceso de derrepresión.

Estudios realizados por Graham (&)⁵⁸, en cepas de *E. cloacae*, tanto en una cepa salvaje (inducible), como en una cepa mutada que expresaba constitutivamente altos niveles de β -lactamasas, demostraron que en esta última, la permeabilidad hacia el aztreonam había disminuído cuatro veces en comparación con la cepa salvaje; al parecer esto estaba asociado con cambios importantes en la expresión de las proteínas de la membrana externa (esto se determinó aislando las membranas externas de cada cepa y comparando el corrimiento electroforético de las muestras).

No obstante que este investigador demostró que la resistencia de las cepas mutadas se debía a la aparición de una mayor cantidad de β -lactamasas, más que a un cambio pequeño en la permeabilidad, señala que se requiere de más estudios para delimitar la contribución de estos dos factores en la resistencia observada.

Este mismo investigador, señala que pueden existir elementos reguladores comunes para la expresión de las β -lactamasas y la proteínas de la membrana externa; hipótesis que se ve reforzada por sus recientes observaciones, donde algunos osmorreguladores parecen afectar tanto los niveles de β -lactamasas como la expresión de las proteínas de la membrana externa en una cepa de *E. cloacae*.

Finalmente, sería interesante conocer si, de alguna manera, las mutaciones en los genes estructurales de las β -lactamasas modifican la expresión de las proteínas de la membrana externa y por lo tanto, la permeabilidad, ya que explicaría algunas discrepancias observadas en estudios de mutagénesis dirigida, donde el valor de K_{cat} obtenido, no concuerda con el valor de CIM para ciertos sustratos, cuando se comparan estos valores en la cepa salvaje y la mutada artificialmente (K_{cat} más alto y menor valor

de CIM)¹³⁸, como si hubiera aumentado la velocidad de penetración del antibiótico prueba en la cepa mutada.

Por otro lado, se puede presentar resistencia por disminución en la permeabilidad a las cefalosporinas, sin involucrar un aumento en la cantidad de β -lactamasa producida, como en el caso de una cepa mutada de *Salmonella thyphimurium* frente a la cefalexina. Esta cepa sólo produjo una de las dos proteínas necesarias para el transporte de los antibióticos β -lactámicos. Dicho fenómeno es ejemplo de otro tipo de resistencia adquirida durante la terapia⁹⁴.

3.2.2 PBP's

Cada una de las especies bacterianas examinadas hasta ahora poseen uno o varios tipos de PBP's (proteínas que se unen a las penicilinas) muchas de las cuales son enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular (transpeptidasas), siendo el blanco directo de acción de los antibióticos β -lactámicos⁶².

La caracterización de cada una de estas proteínas puede llevarse a cabo mediante determinaciones genéticas, inmunológicas y estructurales.

Se ha observado que el número, el tamaño molecular y la afinidad por los compuestos β -lactámicos se conserva entre las especies⁶².

Los antibióticos β -lactámicos difieren en su afinidad por las PBP's, lo que podría explicar la diferente respuesta de las bacterias frente a un compuesto determinado de acuerdo al tipo y número de PBP's presentes.

CAPITULO III. INTERACCION β -LACTAMASA-ANTIBIOTICO-CELULA BACTERIANA

La bencilpenicilina tiene una gran afinidad por las PBP's numeradas como 1a, 1b, 3, 4, 5 y 6, pero poca afinidad por PBP2; en contradicción con la meticilina que se une exclusivamente a PBP2¹²⁸.

La cefuroxima, cefalexina y aztreonam, se unen a PBP3 con mayor facilidad^{6, 128}.

Un grupo de cefalosporinas monoaniónicas no mostraron afinidad por la enzima PBP1a en una cepa de *Bacteroides fragilis*, en cambio, presentaron una gran afinidad por las PBP's 1b, 1c, 2 y 3¹⁴⁷.

El imipenem, al igual que otros penems, penams y carbapenems, se une con facilidad a las PBP's 1 y 2. Estos tipos de enzimas son las PBP esenciales menos numerosas de la célula bacteriana¹²⁴. Se ha reportado que la saturación de sólo el PBP2, del cual la célula contiene 20 moléculas, es suficiente para provocar la muerte de la bacteria. En cambio, las penicilinas y cefalosporinas tienen mayor afinidad por el tipo PBP3 y PBP1 (los cuales son esenciales pero más numerosos) y otros PBP's no esenciales.

De acuerdo a lo anterior, se necesita una mayor cantidad de antibiótico libre en las penicilinas y cefalosporinas que con el imipenem para destruir a la célula¹²⁴.

Esta diferencia de afinidad entre los antibióticos por el tipo de PBP's, puede también explicar porqué la barrera de permeabilidad no impide el acceso a los antibióticos con la misma eficiencia¹²⁶.

Se desconoce aún la disposición tridimensional de cada tipo de PBP y las β -lactamasas en la célula; según Sanders¹²⁴, es muy posible que la β -lactamasa proteja menos

eficientemente a PBP2 que a otros blancos del antibiótico, debido a su localización en la célula.

Se ha sugerido que las diferentes afinidades por las enzimas PBPs, pueden estar relacionadas con los efectos morfológicos producidos por los antibióticos en la célula bacteriana como resultado de la inhibición de los diferentes tipos de enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular¹²⁸.

De manera general, las penicilinas y cefalosporinas provocan, a bajas concentraciones, una prolongación en los bacilos, confirmando la apariencia de filamentos; esto se debe a la inhibición de un tipo específico de enzimas que sintetiza enlaces cruzados; mientras que a altas concentraciones producen esferoblastos, cuya facilidad de formación depende de la afinidad por las enzimas PBPs y la eficiencia de su inhibición por el antibiótico. La cefaloridina se caracteriza por producir esferoblastos a bajas concentraciones.

La enzima PBP3 tiene actividad de polimerasa y transpeptidasa del peptidoglucano⁶, parece estar involucrada en la síntesis de los enlaces cruzados (encontrándose activa principalmente durante la división celular), por lo que compuestos como la cefuroxima y la cefalexina, que inhiben principalmente esta enzima, producen filamentos.

La enzima PBP3 es muy sensible a la inhibición por compuestos β -lactámicos, mientras que las enzimas involucradas en la síntesis de los enlaces laterales (notablemente PBP1b) se inhiben solamente a altas concentraciones, las cuales varían de acuerdo al antibiótico empleado⁷³.

La enzima PBP2 es una enzima poco común, ya que parece estar encargada de la síntesis de las "esquinas" de los bacilos, por lo que su inhibición origina la formación de células ovoides¹²⁸.

Por otro lado, se ha demostrado la función de algunas enzimas PBPs en el proceso de inducción de las cefalosporinasas cromosómicas.

Se cree que las enzimas PBPs son atacadas en la superficie externa de la membrana citoplasmática y que el acceso del compuesto β -lactámico se frena por la presencia de una barrera de permeabilidad en las bacterias Gram negativas como se analizó anteriormente¹⁴⁷. En el caso de las bacterias Gram positivas no existe una barrera de permeabilidad considerable al acceso de antibióticos β -lactámicos de bajo PM¹⁰⁵.

Alteraciones en las enzimas PBP

Recientemente se han identificado cepas mutadas cuyo aumento de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos se ha relacionado con modificaciones en las proteínas PBPs (resistencia adquirida).

Estas alteraciones pueden comprender⁶²:

I- Síntesis de una nueva enzima PBP estable al compuesto β -lactámico, como en el caso de algunas cepas de *S. aureus* y *Streptococcus faecalis* frente a la meticilina.

II- Disminución de la afinidad de las PBPs por el antibiótico.

Este tipo de modificación se ha identificado en muestras de *Bacteroides fragilis* (cepa productora de β -lactamasa)¹⁴⁷, gonococos, *Haemophilus influenzae* y neumococos; confiriendo un nivel de resistencia bajo o intermedio.

En este caso las cepas parecen tener el mismo tipo de PBPs, pero una o más de éstas han disminuído en su capacidad de unión con los antibióticos.

III- Desaparición de una o varias PBPs muy sensibles a los compuestos β -lactámicos (tipos 1a y 2 de PBPs, por ejemplo) y aparición de una nueva PBP estable a éstos.

IV- Exceso de producción de PBPs, como F. Bellido (&)⁶, demostró en una cepa productora de β -lactamasa de *Salmonella muenchen* aislada de un paciente bajo tratamiento con ampicilina; en esta cepa se observó un incremento en la expresión de PBP3, así como también una disminución en la permeabilidad; sin embargo, en ausencia de una producción de β -lactamasa significativa, este investigador señala que la modificación de permeabilidad no pudo ser el único factor que confería el alto nivel de resistencia observado en esta cepa, pero la alteración de PBP era más efectiva cuando sólo un número pequeño de moléculas del compuesto β -lactámico era capaz de penetrar.

Yotsuji (&)¹⁴⁷, estudió en *Bacteroides fragilis*, los tres factores que determinan la resistencia (estabilidad de la β -lactamasa, permeabilidad de la membrana externa y afinidad de las PBPs), frente a un grupo de cefalosporinas monoaniónicas; demostró que la disminución en la afinidad del tipo PBP3 era determinante en la resistencia frente al ceftazol, cefazolina y cefalotina en cepas con baja actividad de β -lactamasa.

En cambio, la actividad enzimática fue el principal factor de resistencia frente a todos los antibióticos analizados en cepas con gran actividad de β -lactamasa.

De acuerdo con lo anterior, debe considerarse que la disminución o alteración de las enzimas PBPs puede ser el principal factor de resistencia frente a los compuestos β -lactámicos en cepas con baja actividad de β -lactamasa, más que la acción enzimática de hidrólisis misma.

3.3 Interacción β -lactamasa/antibiótico in vivo

La reacción catalizada por la β -lactamasa con penicilinas como sustratos, es la hidrólisis de la unión β -lactámica para formar el correspondiente ácido penicilóico, el cual es un compuesto normalmente estable¹²⁰, siendo estequiométrica la conversión de penicilina a ácido penicilóico (fig. 3.2.A).

Con respecto a las cefalosporinas, el proceso es más complejo¹²⁰; la ruptura de la unión β -lactámica se encuentra acompañada por una serie de modificaciones posteriores, cuya secuencia depende del tipo de cefalosporina involucrada.

Se considera que el primer cambio es la expulsión del residuo en la posición 3 del anillo de dihidrotiazina (fig. 3.2.B), si este proceso es químicamente posible.

Un cambio subsecuente puede ser el rompimiento del residuo 7C, dando origen a un número de fragmentos. Esta serie de reacciones puede ser independiente de la expulsión del residuo 3C.

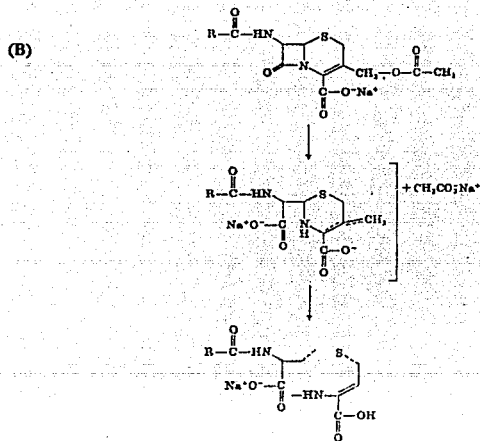
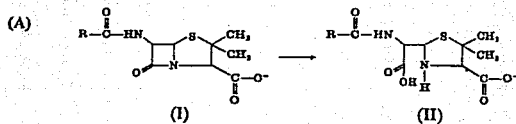


Fig. 3.2

Reacción general catalizada por las β -lactamasas con penicilinas y cefalosporinas como sustratos¹²⁰.

(A) Reacción con la penicilina, donde (I) representa la estructura básica de la penicilina, (II) estructura básica del ácido penicilóico.

(B) Posible secuencia del proceso catalítico de las β -lactamasas frente a las cefalosporinas.

Una consecuencia de este rompimiento complejo de las cefalosporinas, catalizado por las β -lactamasas, es la ausencia de una relación estequiométrica entre la hidrólisis de la cefalosporina y la formación de un sólo producto, hecho que invalida el cálculo absoluto de la actividad de cefalosporinasa mediante el método iodométrico, el cual, como se analiza posteriormente (capítulo IV), se basa en la reducción del yodo por el ácido penicilínico o cefalosporoico^{109, 120}.

Existen diferentes formas por las cuales un antibiótico β -lactámico puede ser estable a la acción de las β -lactamasas⁶³:

a) Baja afinidad de la enzima por el antibiótico.

El K_m de la β -lactamasa estafilocócica frente a la meticilina es de $28\mu M$, mientras que el valor de CIM es de $10\mu M$ aproximadamente; cuando la meticilina se encuentra presente a concentraciones inhibitorias, el grado de hidrólisis de la enzima estafilocócica es sólo un 0.036% del valor de V_{max} .

Esta baja velocidad de hidrólisis, permite que el antibiótico sea estable frente a la β -lactamasa.

La estabilidad del cefepim y ceftiofima frente a las cefalosporinas se debe a la baja afinidad por éstos⁶⁶.

En este punto, también se debe tomar en cuenta el valor de CIM , pues cuando éste es grande, sí puede existir un grado de hidrólisis apreciable.

b) V_{max} muy baja (K_m bajo)

La β -lactamasa estafilocócica tiene una gran afinidad por la cefalotina (K_m de $0.1\mu M$). El valor de CTM para la cefalotina es de $1\mu M$, concentración en la cual la velocidad de hidrólisis corresponde prácticamente al valor de V_{max} , la cual representa el 0.01% de la V_{max} observada con la bencilpenicilina. Esto permite que la cefalotina tenga gran estabilidad frente a la β -lactamasa estafilocócica.

Este es el mismo caso de la cloxacilina, por lo cual puede actuar como inhibidor, debido a su gran afinidad⁸⁰.

c) Baja actividad enzimática

En este caso, pequeñas cantidades de antibiótico pueden inhibir bacterias productoras de β -lactamasas. Esto debe aplicarse no sólo a cepas productoras de pequeñas cantidades de β -lactamasas, sino a otras cepas ante un inhibidor enzimático como el ácido clavulánico.

3.4 Mecanismo responsable de la multi-resistencia β -lactámica en las cefalosporinasas cromosómicas de bacterias Gram negativas

La introducción de las cefalosporinas de tercera generación y compuestos relacionados, ha permitido contrarrestar la resistencia de algunas cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, gonococos, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a los primeros antibióticos⁵⁸.

Desafortunadamente, cada vez es mayor el número de microorganismos que presentan resistencia frente a agentes nuevos como los monobactams, cefamicinas y amino tiazolid-

oxim cefalosporinas²⁶, impidiendo su uso como agentes terapéuticos debido a los altos niveles de resistencia que pueden alcanzarse, como lo demostró Curtis (&)²⁶, en las β -lactamasas de clase I de Richmond y Sykes.

Se ha estudiado detalladamente este fenómeno de resistencia en algunas especies como *Enterobacter*, *Serratia* y *Aeromonas* entre otras y se ha asociado este tipo de resistencia con el proceso de derrepresión en la producción de las cefalosporinasas cromosómicas, por el cual el incremento en la concentración de la β -lactamasa periplasmática puede ser hasta 1,000 veces mayor⁵⁸; por lo que, más que una modificación en la estructura primaria (para dar origen a una nueva β -lactamasa), es un aumento en la cantidad de expresión de la enzima en este tipo de microorganismos, la cual se ha asociado a mutaciones en el promotor y, en caso de existir, en el atenuador.

Por otro lado, como se analizó anteriormente, se encuentran involucrados otros factores que actúan en sinergismo con la actividad enzimática, constituyendo la denominada resistencia múltiple¹²⁴. Sin embargo, algunas especies bacterianas que no poseen cefalosporinasas cromosómicas, también han desarrollado resistencia a las cefalosporinas de 3a. generación, debido a fenómenos de selección. Este nuevo tipo de resistencia se ha atribuido a la presencia de β -lactamasas de amplio espectro (tipo SHV y TEM)^{4, 59, 140}; estas enzimas se han identificado en varias especies de la familia *Enterobacteriaceae* tales como *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, algunas de las cuales han causado brotes epidémicos de enfermedades intrahospitalarias¹⁴⁰.

El mecanismo responsable de la resistencia múltiple mediada por cefalosporinas cromosómicas ha sido objeto de grandes controversias y aún no se ha resuelto completamente¹²⁴.

Una vez que se clonaron los genes que codifican la β -lactamasa de *E. cloacae* y se transfirieron a una cepa sensible de *E. coli*, se demostró concluyentemente que sólo la enzima era responsable de la resistencia conferida a ésta¹²⁴.

Sólo quedaba explicar cómo algunas β -lactamasas podían propiciar niveles altos de resistencia frente a los antibióticos, cuando *in vitro* no eran capaces de hidrolizar a varios de ellos¹²⁴.

Se han propuesto dos teorías para explicar este comportamiento:

I- Sugiere que la β -lactamasa "atrapa", por largo tiempo, a los antibióticos pobremente hidrolizables, formando así un complejo biológicamente inactivo en el espacio periplasmático que impide que los antibióticos interactúen con las enzimas PBPs localizadas en la superficie de la membrana citoplasmática¹³⁵; tales complejos requieren no involucrar interacciones covalentes o hidrólisis enzimática del antibiótico, mientras se encuentre presente mayor cantidad de enzima que de antibiótico.

Esto haría muy improbable la presencia de antibiótico libre, no unido o no hidrolizado, en cantidades suficientes para causar la muerte del microorganismo.

Esta teoría se basa en las mediciones de los primeros estudios que indicaban la ausencia de hidrólisis con cefotaxime, ceftriaxone y moxalactam⁵⁸, sin embargo, en estudios recientes, se ha demostrado que estos antibióticos son sustratos, aunque extremadamente pobres, donde el complejo acil-enzima es muy estable y la hidrólisis se efectúa muy lentamente, esto se debe a la gran afinidad de las β -lactamasas por los sustratos¹⁸.

Por otro lado, los cálculos efectuados por Medeiros⁹⁴, indican que tendría que estar presente una gran cantidad, aun no registrada, de β -lactamasas en la célula para poder bloquear al antibiótico; suponiendo que una molécula de enzima se une a una de sustrato.

Sanders¹²⁶ indica que en el espacio periplasmático se puede encontrar una mayor cantidad de enzima que moléculas de antibiótico, debido a la restricción del paso a través de la membrana externa, por lo que sugiere la posibilidad de que se den estas condiciones de exceso.

Se ha estimado que el número de moléculas de cefalosporinas cromosómicas en el espacio periplasmático después del proceso de represión en las bacterias Gram negativas, es de 2×10^5 moléculas por célula. Debido a la restricción en el paso del antibiótico al interior de la célula, la concentración de sustrato es muy baja, existiendo de esta manera un exceso de enzima en el espacio periplasmático¹²⁴.

II- Es la hipótesis mas convencional; se propone la existencia de una hidrólisis, lenta pero eficiente de los antibióticos que son substratos pobres, en el entorno del espacio periplasmático.

Lo anterior se demostró en la cepa de *E. cloacae* 55W, en la cual se pensaba funcionaba el mecanismo anterior y se comprobó que la hidrólisis por la enzima era la mayor contribución en el nivel de resistencia frente a los antibióticos, más que la simple unión¹⁴¹.

Este mecanismo se lleva a cabo ya que los niveles enzimáticos son altos y la concentración del antibiótico es baja¹²⁴.

Es así como los valores bajos de Km (alta afinidad), de los nuevos compuestos β -lactámicos, permiten una velocidad de hidrólisis cercana a la Vmax que, aunque es baja, es aun más rápida que la velocidad de penetración del antibiótico al interior de la célula, permitiendo una hidrólisis eficiente.

Sanders¹²⁴ menciona qué aspectos de ambas teorías ayudan a explicar la resistencia de las cefalosporinasas cromosómicas frente a los nuevos antibióticos.

Además, como se analizó con anterioridad en los microorganismos Gram negativos, la capacidad de protección de las cefalosporinasas cromosómicas (al igual que otro tipo de β -lactamasas), depende de varios factores:

- a) La capacidad de interacción de la enzima con el antibiótico.
- b) La velocidad de penetración del antibiótico al interior de la célula.

c) El número, tipo y localización de las enzimas PBPs.

Tomando en cuenta estas condiciones, es posible predecir la forma estructural en la que se encuentra el antibiótico en la célula bacteriana productora de β -lactamasa; ya sea como sustrato (S), como complejo de Michaelis (ES), complejo acil-enzima (E-S) o producto hidrolizado (P)¹²⁴.

I- Los antibióticos de moderada a alta afinidad (K_m bajo) y alta V_{max} , como la cefalotina, se encontrarán en la forma P principalmente, ya que el antibiótico se hidrolizará rápidamente y la concentración de éste no será suficiente para saturar a la β -lactamasa. La hidrólisis real (V_{act}), estará por debajo de la V_{max} y dependerá de la concentración de antibiótico que entre a la célula.

II- Los antibióticos de moderada a alta V_{max} y baja afinidad (K_m alto), como la cefaloridina, se encontrarán también como P, siempre y cuando la velocidad de penetración al interior de la célula sea suficiente para permitir que la concentración intracelular del antibiótico se aproxime a su K_m .

III- Un antibiótico con baja afinidad y una velocidad muy baja de penetración estará en la forma S principalmente, debido a que su V_{act} sería mucho más pequeña que su V_{max} . Los antibióticos con V_{max} y afinidad baja, como la cefiproma, deben encontrarse más en la forma S que P.

Para estos antibióticos, la velocidad real V_{act} estará por debajo de la V_{max} debido a la baja concentración de sustrato.

IV- Los antibióticos con alta afinidad y baja V_{max} , como la cefuroxima y moxalactam, estarán principalmente en la forma de ES y E-S (ecuación 2.1) ya que la concentración intracelular del antibiótico es próxima al valor de K_m y la V_{act} se acerca a la V_{max} . Es difícil predecir las cantidades relativas de ES y E-S, sin embargo, los antibióticos que se encuentran presentes principalmente en la forma E-S, inhibirán irreversiblemente a la enzima, ya que la desacilación (K_3) ocurre lentamente. Este es el caso del aztreonam y moxalactam. Dichos antibióticos son desaclados muy lentamente, considerándose en algún tiempo "inhibidores suicidas" de las cefalosporinas cromosómicas de las bacterias Gram negativas.

El comportamiento anterior se puede ver modificado por la presencia de una alta velocidad de penetración al interior de la célula. Yoshimura y Nikaido¹⁸, demostraron que los antibióticos con carácter anfótero β -lactámicos, tales como la cefaloridina e imipenem, penetran rápidamente al interior de la célula Gram negativa; de acuerdo a esto, Sanders¹²⁴, indica que probablemente la cefpiroma y el BMY 28142, los cuales son otros anfóteros, penetran rápidamente.

Esta capacidad de penetración, que es más rápida a la de los antibióticos β -lactámicos monoaniónicos y diadiónicos, permite que la concentración intracelular se aproxime a su K_m probablemente. Por lo tanto, para la cefpiroma y BMY 28142, la V_{act} se aproxima a su V_{max} y el antibiótico no debe encontrarse en la forma S principalmente, como se había predicho originalmente; sin embargo, incluso con un gran poder de penetración, estos antibióticos son los menos afectados por las cefalosporinas cromosómicas en

comparación con otras cefalosporinas, ya que su afinidad es muy baja y probablemente no se alcance su K_m ¹²⁴.

Por otro lado, el valor de K_m para el imipenem es muy bajo (alta afinidad), por lo que la concentración de saturación se alcanza fácilmente frente a este antibiótico, debido a su gran velocidad de penetración, encontrándose principalmente en la forma S y no como ES, E-S como se había predicho, explicando de esta manera la estabilidad del imipenem frente a las cefalosporinasas cromosómicas.

Aunque se ha demostrado que las cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, carentes de cefalosporinasas cromosómicas inducibles, son más sensibles al imipenem que las cepas salvajes que han experimentado inducción reversible o las cepas mutantes con derrepresión estable, se ha observado que estas dos últimas son aún sensibles al imipenem a concentraciones relativamente bajas de éste.

Esto se debe a que la velocidad de penetración del antibiótico es muy alta y satura a la enzima, siendo su $V_{act} = V_{max}$ y ya que la velocidad de entrada del antibiótico puede exceder a la V_{max} , el antibiótico se acumula en la forma S, encontrándose libre para interactuar con las enzimas PBP_s¹²⁴.

Lo anterior explica por qué el imipenem y compuestos relacionados (penams, penems y carbapenems), son los antibióticos menos afectados por una derrepresión de cefalosporinasas cromosómicas. Estos compuestos tienen el más alto grado de penetración y requieren el mínimo de moléculas activas del antibiótico para interactuar con las enzimas PBP_s esenciales. Es así como, aún en presencia de grandes cantidades de β -lactamasas, la actividad de estos antibióticos se ve poco afectada.

En contraste, las cefalosporinas aniónicas, penicilinas y monobactams, poseen un grado muy bajo de penetración, por lo que es suficiente la presencia de una gran cantidad de β -lactamasas para que interactúen con estos antibióticos y formen los complejos ES, E-S o P, disminuyendo así el número de moléculas activas de antibiótico capaces de interactuar con las PBP's esenciales más numerosas en la célula.

Las cefalosporinas anfóteras se afectan menos que las cefalosporinas aniónicas, debido a la afinidad más baja de la enzima por la primera y una velocidad alta de penetración al interior de la célula¹²⁴.

Considerando los diversos factores anteriores, se puede entender la presencia de un alto nivel de resistencia sin la formación necesaria de P solamente, pues puede depender desde la velocidad de penetración al interior de la célula, así como la formación de ES y E-S, los cuales también son formas inactivas del antibiótico.

Sanders señala la necesidad de desarrollar nuevos métodos que permitan determinar específicamente cada una de las formas inactivas, para así poder determinar la importancia relativa de cada factor involucrado en la resistencia mediada por las β -lactamasas.

3.5 Patogenicidad Indirecta

Se ha enfatizado en la posibilidad de que la presencia de un microorganismo comensal productor de β -lactamasa pueda afectar el tratamiento de un microorganismo patógeno sensible a los antibióticos; de esta manera, el comensal podría actuar como "patógeno indirecto". Aunque existe evidencia de que este fenómeno se presenta bajo ciertas circunstancias en algunas infecciones como las pulmonares, pero también se ha

demostrado que este comportamiento no se sigue en otras infecciones, como en la faringitis y la gonorrea⁶³.

Se han presentado infecciones mixtas donde una de las dos patógenas es el productor de β -lactamasa, que actúa en sinergismo con el otro, confiriéndole resistencia al secretar la enzima al medio¹¹⁹.

Este mismo efecto, que en este caso es perjudicial, llega a ser beneficioso si se toma en cuenta que el microorganismo productor de la β -lactamasa puede ayudar a conservar la flora habitual del tracto intestinal mientras se lleva a cabo un tratamiento con antibióticos en vías respiratorias⁸⁹.

CAPITULO IV. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS β -LACTAMASAS

Debido al incremento del estudio de las β -lactamasas, se han desarrollado diferentes métodos para su identificación y caracterización, por lo cual, en la actualidad, se dispone de una gran cantidad de información que muchas veces es difícil de correlacionar debido a las diferentes condiciones empleadas en su determinación.

Por lo anterior, se hace necesario establecer parámetros para evaluaciones estandarizadas en el estudio de las β -lactamasas. A continuación se mencionan los más empleados en dicha caracterización.

4.1 Identificación: Pruebas de sensibilidad

Como se analizó con anterioridad, la resistencia de las bacterias frente a los antibióticos β -lactámicos puede deberse a otros factores además de la síntesis de β -lactamasas. Por lo tanto, la ausencia de actividad de β -lactamasa no garantiza que un microorganismo sea susceptible a determinado antibiótico, por lo que siempre es necesaria una determinación directa de la actividad del antibiótico frente al microorganismo^{38, 61}.

Los métodos más empleados son¹³⁹:

- a) Métodos de dilución en tubos.
- b) Métodos de difusión en disco.

c) Métodos de dilución en agar.

En general, se deben tomar en cuenta los siguientes factores para llevar a cabo una buena determinación:

- 1) Tamaño del inóculo: En este aspecto se debe recalcar que las bacterias Gram positivas productoras de β -lactamasa, presentan un "efecto de inóculo" mucho mayor que las Gram negativas.
- 2) Solubilidad, difusión y estabilidad del antibiótico a examinar.
- 3) Composición del medio empleado y condiciones de incubación⁷⁸.

Las diluciones en tubo y el método de dilución en agar son técnicas laboriosas, pero proporcionan resultados cuantitativos, permitiendo el cálculo de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). En cambio, la difusión en disco es más sencilla, pero proporciona solamente resultados cualitativos¹³⁹.

El método más empleado para determinar susceptibilidad es el de dilución en agar⁶⁶.

Un grave problema es la presencia de un número muy pequeño de bacterias resistentes entre una gran población de bacterias sensibles, ya que es difícil la identificación de las primeras, debido a lo cual, algunas veces pasan inadvertidas en el laboratorio. Este problema se puede minimizar al aumentar el período de incubación⁶¹.

Una de las principales dificultades clínicas, causadas por las bacterias patógenas Gram negativas con β -lactamasas inducibles, lo constituye su aparente susceptibilidad frente a muchos antibióticos β -lactámicos en el análisis de rutina²⁶. Se debe tomar en cuenta que

las cepas productoras de β -lactamasas inducibles, son capaces de sintetizar altos niveles de enzima después de un período de inducción, por lo cual la resistencia se expresa tarde. Esto origina frecuentes problemas al microbiólogo, ya que el análisis de difusión en disco puede dar resultados de susceptibilidad falsos positivos al no tomarse en cuenta el tiempo de inducción durante el análisis⁹⁴.

Si no se toma en cuenta el fenómeno de inducción, el tratamiento con el antibiótico elegido en el laboratorio, puede causar la selección de las cepas productoras de β -lactamasas inducibles en el paciente, originando complicaciones en el cuadro clínico²⁶.

Para evitar este problema, se recomienda la pre-incubación de la bacteria con el antibiótico a determinar, antes del análisis de susceptibilidad⁹⁴.

Debe tomarse en cuenta que, en el análisis *in vitro* se determina frecuentemente la cantidad óptima de inductor, por lo que los niveles enzimáticos alcanzados que se reportan en la literatura no son una buena guía necesariamente, ya que, la mayoría de las veces, la cantidad de inductor empleado en estos estudios no corresponde a la presente en el organismo humano⁶³.

Hacen falta métodos de laboratorio estandarizados para detectar, en las muestras aisladas de los pacientes, la facilidad de inducción y desarrollo de resistencia frente a los antibióticos que se dan en la terapia en ese momento.

Debido a la frecuente aparición de cepas resistentes durante el tratamiento con las nuevas cefalosporinas, Weinbren y Perinpanayagam¹⁴⁴, proponen una simple determinación

para conocer si el potencial de inducción de las bacterias productoras de cefalosporinas, aisladas en las muestras clínicas, puede interferir con la terapia.

Otro problema puede surgir cuando el microorganismo prueba se expone a dos antibióticos, uno de los cuales puede ser un potente inductor y el otro un buen antibiótico, ya que se puede presentar un antagonismo entre ambos⁹⁴.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La susceptibilidad de un microorganismo se expresa como el valor de CIM del antibiótico a determinar¹³⁸, un valor de CIM mayor al establecido como límite de susceptibilidad, indica resistencia.

En una determinación *in vitro* de las β -lactamasas, se puede observar que los valores de eficiencia catalítica obtenidos (Kcat/Km), a veces no coinciden con los valores de CIM; esto demuestra que se encuentran involucrados otros factores de resistencia además de la acción de las β -lactamasas. Una eficiencia catalítica baja y un valor muy alto de CIM, podría indicar falta de permeabilidad de la membrana externa al antibiótico⁵⁹ o disminución de la afinidad de las PBPs por éste; de acuerdo a lo anterior, CIM es el valor que representa mejor la interacción β -lactamasa/antibiótico/microorganismo, por ser un estudio que se realiza con la célula bacteriana intacta.

En general, es importante recalcar la necesidad de estandarizar y reevaluar los métodos de susceptibilidad cada determinado tiempo (función llevada a cabo por la N.C.C.L.S.¹), para que queden bien establecidos los valores de referencia de susceptibilidad y resistencia para cada antibiótico y tipo de microorganismo como lo demostró Doern (&) en los discos de susceptibilidad, además de permitir efectuar comparaciones válidas entre diferentes laboratorios³⁸.

4.2 Identificación, aislamiento y purificación

Identificación

En la actualidad, el método más empleado para identificar la actividad de β -lactamasa en un microorganismo se basa en el uso de cefalosporinas cromógenas.

Debido a la sensibilidad, especificidad y sencillez de este método, es el de elección para las determinaciones de tipo cualitativo.

Existe también el empleo de anticuerpos para identificar una cepa productora de β -lactamasa, pero no debe tomarse como único criterio; se ha reportado la falta de reacción entre el conjugado comercial de anticuerpos monoclonales marcados con agentes fluorescentes y dos cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinas¹⁴², demostrando la necesidad de emplear más de un método confirmatorio.

1 NCCLS: National Commite of Clinical Laboratory Standards.

CAPITULO IV. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS β -LACTAMASAS

Generalmente los métodos que se emplean para detectar bacterias resistentes a los antibióticos β -lactámicos (pruebas de sensibilidad) requieren cultivos primarios puros de los microorganismos. Debido al tiempo que se llevan estas pruebas, raramente se emplean los resultados clínicos en la terapia primaria en casos de infecciones severas como la gonorrea¹²³.

R. Sánchez (&), desarrolló un método capaz de identificar selectivamente el gen que codifica la enzima TEM-1 en muestras de *N. gonorrhoeae* y algunas de *Haemophilus sp.*¹²³; el método es muy rápido y sensible, permitiendo la identificación directa en muestras clínicas de cepas de gonococo productoras de penicilinas (PPNG), que actualmente se encuentran muy diseminadas, representando un grave problema clínico.

Aislamiento

En el proceso de aislamiento de β -lactamasas se debe de tomar en cuenta principalmente:

- a) Tipo de bacteria.
- b) Condiciones de incubación necesarias para la síntesis y estabilidad de la enzima.
- c) Modificaciones genéticas.

En las bacterias Gram positivas la enzima se libera al medio, sin embargo, en las Gram negativas se deben emplear métodos de rompimiento celular para liberar la enzima. Los métodos más empleados son el ultra sonido, congelamiento-descongelamiento y

CAPITULO IV. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS β -LACTAMASAS

presión; sin embargo, se ha reportado que el empleo de ultra sonido origina una inactivación parcial o total en ciertas β -lactamasas^{95, 106}.

Algunos investigadores lo atribuyen a un aumento local de temperatura durante el proceso y también a la liberación de proteasas, sugiriendo que éstas últimas no se liberan durante el proceso de congelamiento-descongelamiento. Por otro lado, Mett (&), demostró la ausencia de proteólisis en la cefalosporinasa cromosómica de *P. aeruginosa*, así como también descartó la inactivación por aumento de la temperatura al comprobarse que esta enzima es termoestable^{95, 106}.

Se ha demostrado que el método de congelamiento-descongelamiento produce una mayor actividad enzimática que el de ultra sonido, sin embargo, el primero no se ha comparado directamente con el método de presión¹⁰⁶.

No obstante, los autores citados mencionan la necesidad de emplear el ultrasonido por ser un método rápido y simple que permite el estudio de un gran número de muestras, y que es necesario para llevar a cabo estudios comparativos. Estos investigadores sugieren que se realice un control de temperatura durante el proceso, haciendo la aclaración que el método de congelamiento-descongelamiento proporciona muestras enzimáticas con mayor actividad específica y es útil cuando se requieren preparaciones más puras de β -lactamasas¹⁰⁶.

En cuanto a las condiciones necesarias para la síntesis de β -lactamasa, debe tomarse en cuenta que estas varían de acuerdo a la especie bacteriana y al tipo de β -lactamasa producida; cabe mencionar en este punto la importancia de la temperatura, debido al fenómeno de derrepresión a alta temperatura (presente en algunas especies), así como a

la adición de suero bovino en las soluciones de trabajo para estabilizar la enzima, ya que se ha observado que la β -lactamasa de *E. cloacae* pierde actividad espontáneamente cuando se encuentra a bajas concentraciones, fenómeno que no se observa a altas concentraciones⁷⁵.

En algunas bacterias, el grado de expresión del gen que codifica la β -lactamasa es muy bajo; debido a las dificultades de aislamiento que esto implica, es frecuente el empleo de cepas transconjugantes, en las cuales la cantidad de enzima expresada es mayor que la de las células donadoras^{34, 40, 68, 72, 137}.

Una de las desventajas de emplear cepas transconjugantes es que no se toman en cuenta otros factores que pueden estar involucrados en la resistencia de la cepa donadora, como la disminución de la permeabilidad⁵⁹.

Purificación

En la actualidad, es posible obtener muestras de β -lactamasas sérfnicas con un alto grado de pureza mediante la cromatografía de afinidad desarrollada por Cartwright y Waley^{23, 42, 73}. Anteriormente se empleaba la cromatografía de intercambio iónico, con la que se siguen logrando altos rendimientos de β -lactamasas sérfnicas⁵⁸ y, con algunas modificaciones, de metalo- β -lactamasas¹⁰³.

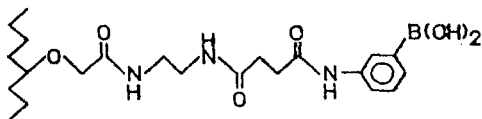
El método desarrollado por Cartwright y Waley se basa en la afinidad de las β -lactamasas por el ácido m-aminofenilbórico, el cual actúa como ligando.

Existen varios inactivadores irreversibles de las β -lactamasas, sin embargo, los inhibidores reversibles son poco comunes, en esta última categoría se encuentran el ácido bórico y ácidos fenilbóricos²³.

En forma característica, las β -lactamasas serfínicas son inhibidas por estos ácidos, variando el grado de inhibición de cada enzima; en cambio, las metalo- β -lactamasas no son inhibidas por estos compuestos²³.

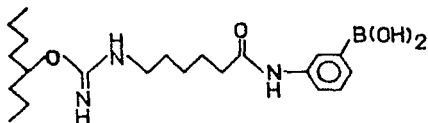
Este procedimiento es rápido y simple, permitiendo la purificación de cantidades grandes de la enzima apartir del extracto bacteriano con un gran rendimiento^{23, 51}. Se emplean dos clases de columnas:

- a) Una columna típica de ácido bórico con una unión hidrofílica, denominada tipo-L (estructura 4.1).



Estructura 4.1

Estructura de la unión tipo-L.



Estructura 4.2

Estructura de la unión tipo-B.

b) Una columna de ácido bórico con brazo de unión hidrofóbica, denominada tipo-B (estructura 4.2).

Para las β -lactamasas con afinidad relativamente alta por el ácido amino-fenilbórico (clase C), la columna tipo-L, proporciona un adecuado grado de unión.

Para las β -lactamasas con baja afinidad por el ácido amino-fenilbórico (clase A), la unión hidrofóbica de la columna tipo B, proporciona una fuerza de unión adicional, para una mayor afinidad.

De forma característica, las β -lactamasas de clase estructural C son retenidas en ambos tipos de columna, mientras que la clase A sólo es retenida por la columna tipo B, permitiendo de esta manera una caracterización estructural preliminar de la β -lactamasa aislada.

4.3 Caracterización

Las β -lactamasas varían ampliamente en sus propiedades moleculares y enzimáticas. Una comparación sistemática de estas propiedades entre las β -lactamasas hasta ahora conocidas, es aún difícil debido a que cada investigador analiza una propiedad en particular y cuando es la misma determinación, la variedad de métodos empleados de un laboratorio a otro ocasiona que el análisis comparativo pierda confiabilidad.

Las propiedades que se han usado para diferenciar y clasificar a las β -lactamasas son:

1. Actividad frente a un grupo de antibióticos β -lactámicos (perfil de sustrato).

2. Interacción con inhibidores e inactivadores (perfil de inhibición).
3. Peso molecular.
4. Punto isoeléctrico.
5. Secuencia de nucleótidos del gen que codifica la β -lactamasa.
6. Secuencia total de aminoácidos.
7. Naturaleza del sitio activo: identificación de grupos funcionales esenciales para la catálisis.
8. Conformación tridimensional.

Tales determinaciones varían en cantidad de material y tiempo requeridos, así como en la información que proporcionan acerca del origen y relación de las β -lactamasas.

El perfil de sustrato se basa en el grado de hidrólisis de un determinado grupo de antibióticos β -lactámicos frente a la enzima en prueba; constituye una de las pruebas más definitivas para caracterizarlas¹⁴. Normalmente el perfil se expresa en términos de porcentaje relacionado a un valor de sustrato elegido (usualmente bencil-penicilina)¹²⁰.

Idealmente, una determinación completa de V_{max} y K_m sería útil para cada β -lactamasa, siendo la relación V_{max}/K_m (eficiencia catalítica), la más demostrativa de la actividad enzimática, sobre todo cuando se considera la β -lactamasa frente a varios sustratos^{42, 66}.

El perfil de inhibición es tan importante como el de sustrato, se basa en el grado de inhibición que experimenta la enzima frente a una serie de inhibidores; originalmente se asignaban con un signo (+) indicando sensibilidad o un signo (-) indicando resistencia. Posteriormente se determinaron los valores de K_i y I_{50} (concentración del inhibidor requerida para inactivar el 50% de la actividad enzimática); sin embargo, el primero no es tan representativo de la interacción enzima-inhibidor, dada la complejidad de acción del inhibidor, siendo el segundo el más empleado para los estudios de tipo comparativo. Sin embargo, para inhibidores como el aztreonam y la cloxacilina se prefiere determinar el valor de K_i , ya que actúan solamente como sustratos pobres¹⁴.

En cuanto al peso molecular, su sola determinación no sirve como único criterio para caracterizar a las β -lactamasas, ya que existe una gran variabilidad en éste, aún dentro de los grupos propuestos por Bush. Esto se debe, tal vez en menor parte, a los diferentes métodos empleados en su determinación. Los que se encuentran basados en la secuencia de aminoácidos y nucleótidos son los más representativos¹⁴.

También debe tomarse en cuenta la posibilidad de que un solo precursor puede dar origen a especies moleculares variadas, debido a que algunas veces existen diversos sitios de corte en el péptido de señal⁷², fenómeno que también debe tomarse en cuenta en la determinación del punto isoeléctrico (pI)⁶⁸.

Al igual que la determinación del PM, el pI no se puede emplear como único criterio para una caracterización; asimismo, no proporciona ninguna información de la existencia de alguna relación entre las enzimas estudiadas. Este punto es particularmente importante, ya que se ha incrementado el número de enzimas no relacionadas con pI semejante

(OXA-5, SHV-1, con 7.62 y 7.6 respectivamente) y enzimas relacionadas con diferente pI (OXA-1, OXA-2, con 7.4 y 8.65)^{15, 16}, haciendo esta prueba poco confiable^{68, 94, 112, 140}, pese a ser un método rápido en el que no se requiere purificar los extractos celulares y que permite una rápida identificación de la enzima, aún cuando se encuentren presentes varias clases de β -lactamasas en la misma célula bacteriana.

Por otro lado, se ha reportado que se pueden emplear métodos cromatográficos para determinar el pI, aislar las β -lactamasas de una célula y separar diferentes tipos de β -lactamasas de una misma mezcla^{2, 3, 51}.

Se han desarrollado diversas pruebas genéticas para caracterizar a las β -lactamasas, representando un complemento o alternativa a su identificación; entre éstas se encuentra la propuesta por Ouellete (&), en la que se sugiere el empleo de pruebas con oligonucleótidos en lugar de la determinación del punto isoeléctrico. Dicha prueba puede usarse para identificar y diferenciar los genes que codifican las β -lactamasas que difieran hasta por un solo aminoácido, como ocurre con TEM-1 y TEM-2¹¹².

En general, las pruebas de ADN se emplean actualmente en estudios de caracterización y epidemiología de genes bacterianos que confieren resistencia¹¹².

Ouellete (&), demostró la eficiencia de la prueba de oligonucleótidos en 114 cepas bacterianas para identificar a las productoras de las β -lactamasas tipo TEM-1 y OXA-2; proponiéndola como posible método de caracterización de los genes de β -lactamasas al observar gran correlación con los puntos isoeléctricos.

La prueba es más rápida que la determinación del pI y con pruebas apropiadas con oligonucleótidos, es posible diferenciar enzimas de diferente tipo que poseen el mismo pI y enzimas genéticamente relacionadas con valores de pI diferentes.

El riesgo de hibridación cruzada con una posible región homóloga se puede reducir empleando oligonucleótidos de mayor longitud.

Muchas de las nuevas β -lactamasas descritas recientemente, poseen una estructura semejante pero diferente espectro de actividad, por lo que esta prueba no puede emplearse igual que en los otros casos, como único criterio para la caracterización de las β -lactamasas¹¹².

La determinación de la secuencia de aminoácidos es necesaria para caracterizar a las β -lactamasas, ya que mediante este estudio se determina la clase estructural a la que pertenecen, asimismo proporciona información filogenética¹²⁴.

Realmente la clasificación en clases moleculares se ha basado en la secuencia aminoácida alrededor del sitio activo. Ambler determinó las secuencias totales para establecer las clases moleculares; sin embargo, la mayoría de los investigadores se limitaba a la secuencia del sitio activo (esto se entiende debido a que la mayoría de los aminoácidos determinantes de cada clase se localizan principalmente en el sitio activo). Actualmente se trata de realizar una secuenciación completa, ya que ésta es necesaria para una determinación estructural rigurosa⁴².

En general, existen diversos métodos para identificar los centros activos de las enzimas, en particular, los métodos más empleados en el estudio de las β -lactamasas se

basan en el marcaje por afinidad, en el cual se emplean agentes marcados que forman un derivado covalentemente estable con las enzimas¹.

El agente marcado puede ser un inhibidor o un sustrato que tenga una K_{cat} muy baja, ambos son apropiados para determinar con exactitud la secuencia alrededor del sitio activo⁷⁶.

Actualmente, las técnicas crioenzimológicas permiten una mejor determinación de la secuencia del sitio activo, ya que permiten la acumulación y estabilización de compuestos covalentes intermedios, aún frente a buenos sustratos²¹.

Los agentes empleados se marcan radioactivamente^{74, 80, 117}, por fluorescencia²¹ o mediante un grupo cromógeno (teniendo una absorción máxima a determinada longitud de onda)^{21, 75}. Entre estos agentes destacan los β -halogenopenicilinas, los cuales poseen un grupo cromógeno⁷⁵ o pueden marcarse con radioactividad (ácido β -iodo [β -metil- H^3] penicilánico o [H^3] β -IP). Mediante el uso de estos inhibidores, ha sido posible relacionar el comportamiento de las β -lactamasas frente a estos agentes, con sus clases estructurales.

De Meester³⁵, predijo la estructura de algunas enzimas con base en su comportamiento con el β -IP, demostrando que las clases A, B y C difieren marcadamente en su interacción con este agente, por lo que lo propone como un parámetro para la clasificación de las β -lactamasas. Demostró que los halogenopenicilinas son sustratos para las metaloenzimas, mientras que inactivan a las enzimas de las clases A y C siendo la clase A la más sensible a dicha inactivación.

Por otro lado, Emanuel (&) aisló el péptido alrededor del sitio activo de la β -lactamasa K1 de *K. aerogenes* sin necesidad de marcarlo; esto fué posible tomando en cuenta los aminoácidos característicos de las clases estructurales, por lo que la escisión del péptido se realizó específicamente, siendo rápido el procedimiento⁴². La desventaja de este procedimiento la señalan los estudios efectuados por Joris⁷³, los cuales sugieren la posibilidad de la existencia de secuencias casi idénticas a la del sitio activo, invalidando el procedimiento de Emanuel como un método práctico.

En general, el estudio estructural de las proteínas ha mejorado mediante el uso de métodos rápidos de secuenciación de ADN sustituyendo la determinación ardua de la secuencia de aminoácidos de proteínas con PM mayor de 40,000, si el gen (o ARNm) que codifica dicha proteína es accesible. Asimismo, mediante este método ha sido posible la elucidación de la secuencia de genes que codifican a las β -lactamasas.

Debe tomarse en cuenta que puede existir homología entre las secuencias aminoácidas de dos β -lactamasas y el estudio de hibridización de ADN puede ser negativo, esto puede deberse a la fluctuación del código genético, el cual permite flexibilidad en la tercera base del triplete²⁰.

Finalmente, la secuencia de aminoácidos y nucleótidos proporciona información acerca del origen y relación filogenética de las β -lactamasas. El estudio cristalográfico también indica relaciones moleculares; sin embargo, en la práctica, estos métodos son tardados y laboriosos, no recomendables en la rutina de un laboratorio. No obstante, una combinación de los resultados de la electroforesis, pI y curvas de titulación propuestas

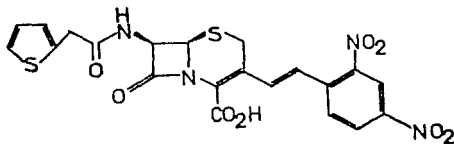
por Vedel (&), proporcionan una aproximación menos complicada de la estructura de nuevas β -lactamasas y una rápida identificación¹⁴⁰.

4.4 Determinación de la actividad de las β -lactamasas

Debido al grave problema clínico que representa la producción de β -lactamasas, ha surgido como respuesta la búsqueda de nuevos métodos que permitan una determinación más completa de la actividad y del fenómeno de resistencia de estas enzimas en un mínimo de tiempo.

Métodos cualitativos y semi-cuantitativos

Los métodos cualitativos se basan en el uso de cefalosporinas cromógenas, las cuales desarrollan color al ser hidrolizadas por las β -lactamasas que se agregan al medio de cultivo. Los cromógenos más empleados son la nitrocefina y el PADAC² (Estructuras 4.3



Estructura 4.3

Estructura del PADAC.

-
- 2 PADAC: Piridina-2-AZO-p-Dimetilanilina-Cromóforo

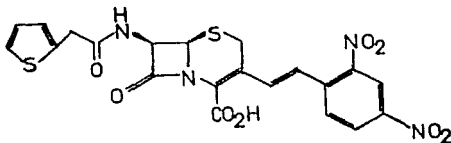
por Vedel (&), proporcionan una aproximación menos complicada de la estructura de nuevas β -lactamasas y una rápida identificación¹⁴⁰.

4.4 Determinación de la actividad de las β -lactamasas

Debido al grave problema clínico que representa la producción de β -lactamasas, ha surgido como respuesta la búsqueda de nuevos métodos que permitan una determinación más completa de la actividad y del fenómeno de resistencia de estas enzimas en un mínimo de tiempo.

Métodos cualitativos y semi-cuantitativos

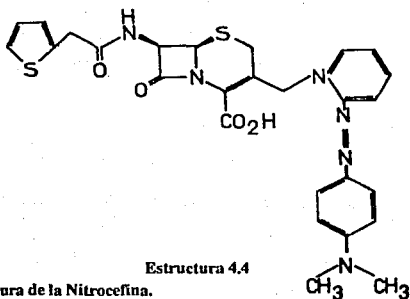
Los métodos cualitativos se basan en el uso de cefalosporinas cromógenas, las cuales desarrollan color al ser hidrolizadas por las β -lactamasas que se agregan al medio de cultivo. Los cromógenos más empleados son la nitrocefina y el PADAC² (Estructuras 4.3



Estructura 4.3

Estructura del PADAC.

2 PADAC: Piridina-2-AZO-p-Dimetilanilina-Cromóforo



y 4.4, respectivamente), siendo el último el de mayor uso por su gran sensibilidad, debido a su alto coeficiente de extinción molar, sirviendo también agente revelador en los corrimientos electroforéticos^{9, 74, 96}.

El PADAC y la nitrocefina se comportan como diferentes sustratos²², el primero pierde el grupo 3' de sustitución durante la hidrólisis, por lo que se comporta como verdadera cefalosporina. La nitrocefina no pierde el grupo 3' y se comporta más parecido a una penicilina frente a diversas β -lactamasas de clase A, en las que el K_{cat} es mayor con la nitrocefina que frente a las cefalosporinas típicas.

El PADAC no es una cefalosporina cromógena selectiva, es hidrolizada tanto por penicilinasas como por cefalosporinasas.

Debido a que la técnica anterior es solo una determinación de tipo cualitativo, mientras que los métodos cuantitativos requieren procesos laboriosos, incluyendo el aislamiento

de la enzima y su purificación, Kobayashi (&), desarrolló un método simple y fácil de realizar en placas de agar con PADAC⁸³.

El método se basa en la determinación del diámetro de la zona de hidrólisis del PADAC, formada alrededor de las colonias de bacterias Gram negativas productoras de β -lactamasas, proporcionando datos semicuantitativos de la actividad enzimática mediante el empleo de curvas estándar, donde se grafica la actividad de β -lactamasa contra el diámetro de hidrólisis. Este investigador demostró la correlación entre la zona de hidrólisis con la actividad periplasmática de la β -lactamasa, determinada espectrofotométricamente.

Las desventajas principales de este método son que su uso está limitado solo a bacterias Gram negativas debido a la actividad antibacteriana del PADAC frente a las bacterias Gram positivas y que también debe prepararse una curva estándar para cada especie bacteriana, resultando un poco tedioso; sin embargo, el método es muy simple y práctico especialmente cuando las muestras a determinar son numerosas.

Finalmente, este método puede emplearse para investigar inhibidores de β -lactamasas y estimar su actividad inhibitoria. Por otro lado, se puede incrementar la sensibilidad del método al emplear inhibidores selectivos de β -lactamasas, ayudando a una clasificación preliminar del tipo de enzima⁸³.

Métodos cuantitativos

En la actualidad, los métodos cuantitativos más empleados son el iodométrico y, principalmente, la espectrofotometría en ultravioleta¹³⁷.

Los primeros ensayos para determinar la actividad en una forma cuantitativa fueron los empleados para las penicilinas¹⁰⁹; el método iodométrico se basa en la reducción del yodo por el ácido penicilico (producto de la hidrólisis de la penicilina por la β -lactamasa). La velocidad de reacción se determina calculando la cantidad de yodo que reaccionó con el ácido peniciloico por titulación con tiosulfato de sodio o para determinaciones más precisas, mediante mediciones espectrofotométricas, comprendiendo la determinación del ion I_3^- presente en mezclas de I_2 / KI o el grado de decoloración del complejo almidón-yodo en la mezcla de reacción^{109, 120}.

El método es ideal para el estudio de la cinética enzimática frente a la mayoría de las penicilinas; sin embargo, la determinación iodométrica ha demostrado ser menos segura en la determinación frente a las cefalosporinas, debido principalmente al patrón de rompimiento de éstas¹²⁰.

Los métodos espectrofotométricos determinan la desaparición del sustrato, ya sea por la aparición de color (nitrocefina y PADAC) o disminución en la absorción máxima característica de cada compuesto β -lactámico en la región del $uv^{2, 3, 22, 23, 117, 93}$.

No todos los sustratos cromógenos pueden emplearse para una determinación cinética, depende del tipo de β -lactamasa; por ejemplo, la nitrocefina no emplearse como sustrato frente a las enzimas de *K. pneumoniae* y *S. aureus* debido a que el valor de K_m es demasiado bajo o para la enzima de *P. aeruginosa*, debido a que se ha observado inactivación inducida por el sustrato.

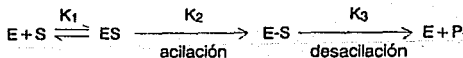
La inactivación inducida por el sustrato parece ser un fenómeno general en las β -lactamasas de las clases A y C⁷⁴. Esta inducción se puede presentar con sustratos pobres y

buenos. No se conoce el origen molecular de este fenómeno, un sustrato dado puede presentar comportamiento normal frente a algunas enzimas e inducir una inactivación progresiva e irreversible con otras. Esto puede deberse a la formación de un intermediario inerte a través de una ruta ramificada, cuya hidrólisis es muy lenta.

Blake II (&), desarrolló un método enzimático general para la determinación de K_m y V_{max} frente a sustratos no cromógenos, aplicable a la β -lactamasa; se basa en la competencia de un sustrato cromógeno y uno no cromógeno por el mismo sitio activo de la enzima, midiendo el efecto del primero sobre la interacción enzimática con el segundo¹⁰.

En general, la actividad de una enzima se puede determinar por aparición de un producto o desaparición del sustrato; sin embargo, en las β -lactamasas deben considerarse los productos intermedios de la reacción, ya que no es necesaria una hidrólisis total para inactivar los antibióticos β -lactámicos, medir solo el producto, sería subestimar su actividad enzimática.

La reacción catalizada por las β -lactamasas serfínicas es la siguiente:



Donde ES, E-S como P son biológicamente inactivos; de acuerdo a esto, Sanders¹²⁴, señala que el índice aparente de la reacción no solo depende de la concentración de E y S, sino también del método empleado para monitorear la reacción.

El método iodométrico mide solamente el producto P; de esta manera, las determinaciones basadas en este método no medirán la cantidad total del antibiótico biológicamente inactivo si K_2 y K_3 son mucho más pequeñas que K_1 , ya que predominan de esta manera ES y E-S.

Las determinaciones espectrofotométricas en uv que miden el antibiótico químicamente inalterado (S y ES), no serán indicativas del antibiótico biológicamente inactivo si K_{+1} es mucho mayor que K_{-1} o K_2 .

Solo el bioensayo, que es un método que en la actualidad no se emplea por ser difícil de manejar¹⁰⁹, determina correctamente el antibiótico biológicamente inactivo, aunque no se distinga entre ES, E-S o P.

Lo anterior explicaría el porqué los estudios que involucran el bioensayo, especialmente aquellos de incubación prolongada, muestran una mayor inactivación frente a los nuevos antibióticos β -lactámicos que la de otros estudios que involucran otros métodos.

Cuando se trata de antibióticos que son hidrolizados rápidamente, los resultados obtenidos no se encuentran tan influenciados por el método empleado, ya que la reacción se lleva a cabo con gran rapidez. En este caso, la medición de S o P solamente, daría resultados similares de la velocidad de reacción.

Debido a que las cefalosporinas de primera generación son hidrolizadas rápidamente por las cefalosporinasas cromosómicas de los microorganismos Gram negativos, los resultados que se han obtenido en diferentes estudios son comparables y generalmente

predicen la actividad o inactividad del antibiótico frente a los microorganismos que poseen tales enzimas.

Las cefalosporinas de tercera generación no son hidrolizadas rápidamente por dichas enzimas (V_{max} baja), por lo que los resultados obtenidos con los diferentes métodos pueden ser contradictorios.

La literatura señala que no se puede predecir la susceptibilidad de las cefalosporinas recientes y compuestos monobactámicos frente a las cefalosporinasas cromosómicas de los microorganismos Gram negativos debido a la gran afinidad de las enzimas por tales antibióticos junto con un índice muy bajo de hidrólisis. De esta manera, puede ser significativa la cantidad de antibiótico presente como ES y E-S a un tiempo dado de la reacción.

De acuerdo a lo anterior, los métodos que determinan solo P o S + ES no estiman realmente la capacidad total de las enzimas para inactivar estos antibióticos.

Sanders señala que, al menos hasta 1987, no se ha desarrollado ningún método que permita determinar selectivamente y con precisión al antibiótico activo (S) o al antibiótico inactivo (ES + E-S + P), bajo las posibles condiciones a las que se encuentra la célula después de una inducción o derepresión estable¹²⁴.

Este problema se ve aunado a la necesidad de llevar a cabo estudios *in vitro* bajo condiciones no fisiológicas de exceso de antibiótico debido a la incapacidad de detección de los sistemas para una medición precisa de bajas concentraciones de S o P.

Además, debe tomarse en cuenta que los resultados observados en estudios *in vitro* con los antibióticos β -lactámicos no son del todo indicativos de su actividad real en la célula intacta, ya que no se están tomando en cuenta parámetros tan importantes como la velocidad de penetración del antibiótico, con lo que se obtendría una determinación real de la interacción del antibiótico con el microorganismo, permitiendo definir la eficiencia de los antibióticos frente a éste.

Actualmente se ha incrementado el desarrollo de procedimientos que permitan trabajar con la célula intacta. Se han desarrollado ecuaciones que describen el cambio de la concentración del antibiótico β -lactámico respecto al tiempo, en células intactas de bacterias Gram negativas. Son aplicables para cualquier sustrato sobre el cual actúe una enzima que se encuentre solamente en el espacio periplasmático y sigue la cinética de Michaelis-Menten^{107, 108}.

Por otro lado, se ha desarrollado una teoría cinética que relaciona el valor de CIM del antibiótico β -lactámico, la permeabilidad externa y la actividad del espacio periplasmático, pero la teoría requiere también el análisis del grado de inactividad de las PBP's (Proteínas que se unen a las penicilinas), para una correcta predicción sobre la inhibición del crecimiento bacteriano por los antibióticos β -lactámicos¹⁰⁷.

Mobashery (&), monitoreó *in vivo* la actividad de dos tipos de β -lactamasas periplásmicas mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR)⁹⁶. Marcó con C^{13} una cadena lateral de la cefalotina y el curso de la hidrólisis lo determinó midiendo la disminución de la resonancia del sustrato y el aumento de la resonancia de la cadena liberada durante la hidrólisis; a pesar de que la eficiencia de este procedimiento *in vivo*

es limitado, es la primera demostración de que la espectroscopía NMR puede constituir una herramienta útil para seguir el curso de la hidrólisis de las β -lactamasas en las células viables. Su utilidad como método cuantitativo es limitada debido a la necesidad de emplear exceso de sustrato por la baja sensibilidad del C^{13} .

Si se llegan a perfeccionar y desarrollar tales procedimientos, tomando en cuenta los parámetros fisiológicos de manera global y la determinación precisa de la forma en que se encuentra el antibiótico, se podrá obtener una determinación directa y precisa que permitirá delinear el mecanismo responsable de la resistencia frente a cada uno de los antibióticos y, por lo tanto, definir la eficacia de estos frente a los microorganismos resistentes.

Este tipo de procedimiento ayudaría posiblemente a aclarar las discrepancias obtenidas en algunos estudios comparativos, donde los parámetros cinéticos calculados (determinación *in vitro*) no concuerdan con los valores de CIM (determinación *in vivo*)¹³⁸.

CAPITULO V. INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

5.1 Antecedentes

Los primeros inhibidores considerados potencialmente útiles, fueron los antibióticos β -lactámicos con estabilidad frente a las β -lactamasas.

Abraham y Newton en 1956 describieron la actividad inhibitoria de la cefalosporina C; pero el primer paso práctico sobre este estudio fué la descripción de la actividad inhibitoria de la meticilina, descubierta por Rolinson (&), en 1960, quien encontró que actúa como inhibidor de la penicilinas de *Bacillus cereus*.

El primer uso clínico de la meticilina como inhibidor fué hecho por Shirley y Moore en 1965. Ellos trataron, con una mezcla de bencilpenicilina y meticilina, una infección persistente de *Pseudomonas aeruginosa* en el tracto urinario que había resistido la terapia con otras drogas (kanamicina, tetraciclina y colistina).

Como la meticilina y las penicilinas derivadas del isoxazolil (como cloxacilina y flucloxacilina) son muy estables a un amplio rango de β -lactamasas, es entendible que se estudiaran como inhibidores potencialmente útiles.

Hamilton-Miller y Smith, Sutherland y Batchelor, Sabath y Abraham, en 1964¹⁴⁵, estudiaron una extensa gama de β -lactamasas utilizando bencilpenicilina o ampicilina en combinación con oxacilina o cloxacilina. La incidencia de un sinergismo clínicamente relevante (como sería la reducción del valor de CIM de ampicilina por debajo de los 5 mg/l) fué mas baja de lo esperado. De las 133 cepas Gram negativas resistentes a la

ampicilina, estudiadas por Sutherland y Batchelor, solo 5 mostraron la reducción esperada de CIM. Para obtener en el resto el sinergismo deseado, el nivel de antibiótico, actuando como inhibidor, debe ser en cantidades extremadamente altas (excediendo los 100 mg/l).

Como las combinaciones fueron efectivas solo contra ciertas cepas de bacterias Gram negativas, se concluyó que no tienen una aplicación clínica útil.

Sin embargo, las cefalosporinas tienen un espectro de actividad antibacteriana mayor que las penicilinas y, por ser estables a las β -lactamasas, se investigó también su actividad inhibitoria.

El único compuesto que se ha utilizado en pruebas clínicas fue el cefoxazol que, combinado con penicilina, (cefoxilina) se utiliza exitosamente para el tratamiento de la mastitis bovina.

También está la cefoxitina; cefalosporina muy estable a las β -lactamasas y un inhibidor poderoso, pero es improbable que su uso tenga significado clínico, por sus propiedades farmacocinéticas y efectos secundarios¹²⁸.

Tipos de Inhibición

Se ha reportado un número considerable de inhibidores de origen sintético o natural, e igualmente se han investigado sus mecanismos de acción; observando que por ejemplo, los compuestos que proporcionan un complejo acil-enzima estable pueden ser candidatos para inhibidores de estas enzimas¹³⁴.

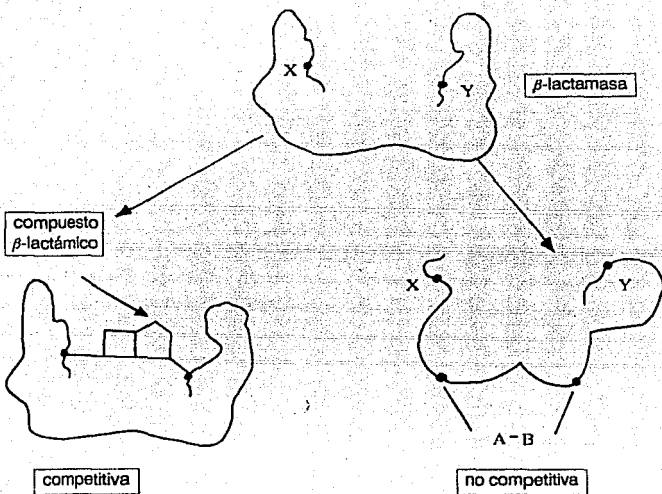


Fig. 5.1

Mecanismos de inhibición de las β -lactamasas.

Dependiendo del tipo de mecanismo utilizado, los inhibidores pueden ser competitivos o no competitivos (fig. 5.1).

Competitivos:

- a) Reversibles: El inhibidor y el sustrato (el antibiótico susceptible) compiten por el sitio activo de la β -lactamasas. No tiene lugar una interacción química y si

el inhibidor es removido (por diálisis) la enzima actúa sobre el sustrato.

Ejemplos de estos son las penicilinas del isoxacil.

b) Irreversibles: Una interacción irreversible tiene lugar entre la enzima y el inhibidor, inactivando la enzima. El remover los restos del inhibidor no permite la regeneración de la enzima. Los inhibidores de este tipo son inevitablemente autodestruidos en este proceso y por esta causa se les llama inhibidores suicidas. También se les llama inhibidores progresivos ya que conforme pasa el tiempo se observa mejor efecto. El ácido clavulánico y el sulbactam son ejemplos de esto¹⁴⁵.

No-competitivos:

Al contrario de los inhibidores competitivos, estos compuestos no compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima. Este tipo de inhibidores se unen a la enzima en un punto lejano al sitio activo, distorcionando la estructura de la enzima e impidiendo así su función. Aunque no existen muchos casos de inhibidores de este tipo, se ha encontrado esta acción en compuestos como la cefaloglicina y cefamandol sobre la β -lactamasa de *Enterobacter cloacae* cuando se utiliza nitrocefina como sustrato.

La meticilina es altamente estable a la hidrólisis de la β -lactamasa y tiene la característica de poder actuar con los dos mecanismos de inhibición: funciona como inhibidor competitivo a bajas concentraciones y en altas concentraciones como inhibidor no-competitivo.

Características de un buen inhibidor:

1) Debe ser activo a niveles permisibles en los fluidos corporales.

- 2) Debe ser activo sobre una amplia gama de β -lactamasas de bacterias Gram positivas, Gram negativas, aerobias o anaerobias.
- 3) Su farmacología debe ser similar a la del antibiótico con el que se asocia. (vida media, distribución en los tejidos y capacidad de penetración)¹⁴⁶.
- 4) Debe estar libre de toxicidad.
- 5) Su costo no debe ser muy elevado puesto que va a usarse junto con un antibiótico.

5.2 Inhibidores de mayor importancia

Actualmente los principales inhibidores son el ácido clavulánico, el sulbactam y, recientemente, el tazobactam.

El inhibidor más estudiado y utilizado es el ácido clavulánico (o su sal, el clavulanato); pero existen otros efectivos como son los derivados del ácido penicilánico sulfonado que, por ser substratos pobres, pueden funcionar como potentes inactivadores⁴⁸. A este segundo bloque pertenecen el sulbactam y el prometedor tazobactam.

La información sobre estos tres inhibidores es extensa y varía mucho dependiendo de las condiciones con las que trabaja cada investigador; por esta razón, en este trabajo se presentará la información más actualizada sobre cada inhibidor y los trabajos de varios investigadores, que llevan a cabo un estudio comparativo de su actividad cuando se combinan con diferentes antibióticos.

5.2.1 Acido clavulánico

Es un metabolito producido por *Streptomyces clavuligerus* que, a diferencia de las penicilinas, tiene un anillo de oxazolidina en vez del anillo de tiazolidina y un sustituyente inusual en la posición C2 en vez de los dos grupos metilo encontrados comunmente en los penicilánicos (fig. 5.2).

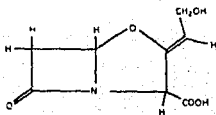


Fig. 5.2

Estructura del ácido clavulánico.

Este compuesto tiene una débil actividad bactericida, sin embargo, puede inactivar especies de *Neisseria* y algunas de *Bacteroides* a concentraciones clínicamente aceptadas; mas su importancia radica en la propiedad inhibitoria que ejerce sobre un amplio espectro de β -lactamasas, provenientes tanto de bacterias Gram positivas como de Gram negativas^{105, 145}.

Es un potente inhibidor progresivo o suicida de la β -lactamasa estafilocócica, de la de *Bacteroides fragilis* y de las β -lactamasas HMS-1, SHV-1, PSE-1 y PSE-4.

Jacobs (&), con el fin de evaluar la actividad de diferentes inhibidores combinados con ampicilina y penicilinas de amplio espectro, hizo un estudio implantando plásmidos bien caracterizados, que codifican para la producción de diferentes β -lactamasas, en

CAPITULO V. INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* e hizo la comparación con cepas de otros bacilos Gram negativos que se aislaron de muestras clínicas y que producen enzimas caracterizadas cromosómicas o mediadas por plásmidos o ambas⁶⁹.

Encontró que el clavulanato es el único inhibidor efectivo contra la enzima OXA-6 implantada en *P. aeruginosa*, especialmente cuando se combina con ticarcilina y piperacilina; mas no fué un buen inhibidor frente a las enzimas PSE-2 y PSE-3 (tabla 5.1).

Combinado con ampicilina, es el único inhibidor efectivo contra la β -lactamasa producida por *Aeromonas hydrofila* y, combinado con otros antibióticos, es el inhibidor que produce el mayor grado de sinergismo.

También es efectivo contra las enzimas OHIO-1 y TEM-1 producidas por *Enterobacter* especialmente cuando se combina con mezlocilina; pero no mostró efecto sinérgico frente a las β -lactamasas de *S. marcescens* y de *C. freundii*, tanto las cromosómicas como las mediadas por plásmidos además de llegar a presentar antagonismo en algunos casos (tabla 5.2). Solo cuando se combina con azlocilina logra reducir los valores de CIM de la enzima TEM-1 de *C. freundii*.

Thomson (&), encontró que actualmente un gran número de cepas de *E. coli* que producen TEM-1 son resistentes, especialmente cuando se combina con ticarcilina¹³⁶; se relaciona con los valores elevados de CIM, encontrados por Jacobs, que se presentaron al usar ticarcilina que, aunque siguió siendo una mezcla efectiva, fue la que presentó menor grado de sinergismo (tabla 5.3). Esto puede deberse a que Thomson utilizó una concentración de inhibidor de 2 mg/l, mientras que Jacobs utilizó 8

Cepa	β -lactamasa	CIM (μ g/ml)																								
		Ampicilina				Ticarcilina				Azlocilina				Meslocilina				Piperacilina				Apalcilina				
		Solo	Clavulanato	Sulbactam	YTR 830	Solo	Clavulanato	Sulbactam	YTR 830	Solo	Clavulanato	Sulbactam	YTR 830	Solo	Clavulanato	Sulbactam	YTR 830	Solo	Clavulanato	Sulbactam	YTR 830	Solo	Clavulanato	Sulbactam	YTR 830	
1937-RP11	PSE-1	>512	>512	>512	>512	>512	64	512	>512	16	64*	8	8	512	64	128*	128*	128	16	32	32	32	2	8	8	8
Pu21-R151	PSE-2	>512	>512	>512	>512	256	256	256	128	64	64	64	256	256	256	256	64	32	32	32	16	8	8	8	16	16
Pu21-RMS149	PSE-3	>512	>512	>512	>512	32	32	64	64	32	8	8	256	64	64	64	64	16	8	8	16	2	2	2	2	2
Pu21-pMG19	PSE-4	>512	>512	>512	>512	>512	64	>512	>512	256	32	32	32	512	64	128*	128*	128*	128	32	32	32	128	2	8	16
PA038-pMG329	OXA-6	>512	>512	>512	>512	256	64	256	256	128	64	128	128	128	64	128	128	64	16	64	32	8	4	8	8	8
<i>A. hydrophila</i> ^a	AER-1	>512	16	512	256*	256	1	32	4	32	1	16	4	8	<1	8	2	8	<1	2	<1	8	<1	2	1	1

a. Las cifras oscuras indican sinergismo

b. Combinación Antagonista

c. CIM dentro del intervalo de resistencia a pesar del sinergismo

Tabla 5.1

CIM de los antibióticos β -lactámicos solos y con inhibidores frente a 5 cepas de *P. aeruginosa* y una de *A. hydrophila* AER-1.

En estas cepas se implantaron los plásmidos que codifican para las β -lactamasas⁶⁹.

Organismo	Cepa	pI	Plásmido	CIM (μ g/ml)																								
				Ampicilina			Ticarcilina			Axicilina			Maxilicina			Piperacilina			Apeclina									
				Solo	Cl- vu- lanato	Sul- bac- lam	YTR	Solo	Cl- vu- lanato	Sul- bac- lam	YTR	Solo	Cl- vu- lanato	Sul- bac- lam	YTR	Solo	Cl- vu- lanato	Sul- bac- lam	YTR	Solo	Cl- vu- lanato	Sul- bac- lam	YTR					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	83120208	7.82	Ninguno	>512	>512	>512	>512	64	64	64	128	>512	128 ^a	256 ^b	512	64	8	16	32	128	16	16	32	64	16	16	32	
	83120220	7.82	TEM-1, OHIO-1	>512	>512	>512	>512	>512	64	>512	128 ^a	>512	128 ^a	>512	128 ^a	>512	8	>512	16	>512	16	>512	16	>512	16	>512	16	>512
	83120210	7.9	TEM-1	>512	>512	>512	>512	>512	64	>512	64	>512	256	256	2	64	8	256	8	64	32	256	8	64	16	64	16	
<i>Enterobacter cloacae</i>	83120216	7.66	Ninguno	>512	>512	>512	>512	128	256	128	128	>512	>512	512	256 ^b	64	32	32	16	512	128	32	16	256	256	64	32	
	83120218	8.2	OHIO-1	>512	>512	>512	>512	>512	64	>512	512	>512	128 ^a	512	128 ^a	128	8	32	16	128	8	64	8	128	8	64	16	
	83120223	8.0	TEM-1	>512	>512	>512	>512	>512	256 ^b	>512	>512	>512	>512	512	512	32	512	32	>512	128 ^a	512	256 ^b	>512	256 ^b	>512	256 ^b	>512	
<i>Citrobacter freundii</i>	83120221	8.10	Ninguno	>512	>512	>512	>512	128	128	64	32	>512	>512	256 ^b	64	32	16	8	4	64	64	16	8	64	64	8	2	
	83120211	8.10	TEM-1	>512	>512	>512	>512	>512	128 ^a	128 ^a	64	>512	>512	512	128 ^a	128	16	16	8	128	64	32	8	128	64	32	8	
<i>Serratia marcescens</i>	83120230	8.5	Ninguno	256	512	256	256	64	64	16	32	>512	>512	256 ^b	256 ^b	64	128	32	64	64	128	16	32	128	128	32	32	
	83120212	8.3	TEM-1	>512	>512	>512	>512	>512	256 ^b	>512	128 ^a	>512	>512	>512	512	512	256	256	64	256	128	128	32	>512	256 ^b	512	64	
	83120202	8.3	TEM-1, OXA-2	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	256 ^b	>512	512	512	512	512	

a Las cifras obcuras indican sinergismo

b Combinación Antagonista

c CIM dentro del intervalo de resistencia a pesar del sinergismo

Tabla 5.2

CIM de los antibióticos β -lactámicos solos y con inhibidores frente a 11 cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de β -lactamasas cromosómicas, con y sin β -lactamasas codificadas por plásmidos⁶⁹.

Cepa	β-lactamasa	CIM (µg/ml)																							
		Ampicilina				Ticarciclina			Azlocilina			Mezlociclina			Piperacilina			Apolcilina							
		Solo	Clavulánico	Sulbactam	YTR #10	Solo	Clavulánico	Sulbactam	YTR #10	Solo	Clavulánico	Sulbactam	YTR #10	Solo	Clavulánico	Sulbactam	YTR #10	Solo	Clavulánico	Sulbactam	YTR #10				
ATCC 35218	TEM-1	512	2	2	2	>512	2	8	2	128	2	2	4	64	<1	<1	<1	32	<1	<1	<1	32	<1	<1	<1
R6K-R	TEM-1	>512	4	>512	4	>512	16	>512	8	512	4	64	8	128	1	16	2	64	1	8	1	128	<1	16	1
C600-pHR322	TEM-1	>512	8	>512	8	>512	64	>512	64	>512	2	>512	2	512	2	512	4	128	1	128	1	>512	1	>512	2
C600-RP1	TEM-2	>512	4	>512	4	>512	16	>512	16	>512	4	256*	4	512	1	64	2	64	1	32	2	512	<1	256	1
1725-RP1	TEM-2	>512	8	>512	8	>512	32	>512	32	>512	8	>512	8	256	1	128	1	64	1	64	1	512	1	512	1
153-R497	HMS-1	>512	8	>512	4	>512	64	>512	64	>512	4	>512	8	128	<1	64	<1	64	<1	32	<1	256	<1	64	<1
153-R1010	SHV-1	>512	1	256*	2	>512	4	>512	8	512	2	32	4	64	1	4	1	32	<1	4	<1	64	<1	8	<1
1527-RGN238	OXA-1	512	8	64*	64*	256	8	16	16	256	8	8	32	16	1	1	2	16	1	2	1	64	2	<1	2
1573-R46	OXA-2	32	<1	1	64	<1	<1	2	16	2	1	2	8	<1	<1	4	<1	<1	<1	<1	8	<1	<1	<1	<1
1894E-R576	OXA-3	128	2	2	128	4	1	1	32	2	2	4	4	<1	<1	4	<1	<1	<1	4	4	<1	<1	2	4
7529-pMG203	OXA-4	512	16	32*	64*	256	8	32	32	256	8	16	16	2	4	4	16	2	4	1	16	1	2	4	1
C600-R198	OXA-5	256	16	64*	16	>512	32	128*	32	128	4	16	8	16	<1	2	2	16	<1	2	1	16	<1	1	<1
7181-pMG202	OXA-7	512	4	64*	16	512	4	64	16	256	1	16	8	16	<1	2	1	16	<1	2	1	16	<1	2	<1
C600-pD5075	OHI0-1	>512	8	>512	32*	>512	16	>512	64	>512	16	512	32	256	2	128	2	64	1	64	1	256	1	64	1
C600-pD5076	OHI0-1	512	2	8	4	>512	2	32	4	128	4	4	4	16	<1	1	1	16	<1	<1	<1	32	<1	<1	<1
7044-clV	TLE-1	>512	2	4	2	>512	2	8	2	256	2	8	8	32	<1	2	2	32	<1	1	1	32	<1	<1	1

* Las cifras oscuras indican sinérgico

† CIM dentro del intervalo de resistencia a poseer del sinérgico

Tabla 5.3

CIM de los antibióticos β-lactámicos solos y con inhibidores frente a 16 cepas de *E. coli*.

En estas cepas se implantaron los plásmidos que codifican para las β-lactamasas⁶⁹.

mg/l, concentración que representa los niveles séricos tolerables de clavulanato y sulbactam cuando se administran por vía intravenosa⁶⁹.

De los 16 plásmidos implantados por Jacobs (&) en *E. coli*, se observa que el clavulanato fué un buen inhibidor de las enzimas OXA. Presentó su mayor grado de sinergismo al combinarlo con ampicilina y CIM's muy bajos combinado con apalcilina, piperacilina y mezlocilina. En general, en todas las combinaciones, el clavulanato mostró ser el mejor de los tres inhibidores para la mayoría de estas enzimas, especialmente con azlocilina y mezlocilina (tabla 5.3).

La mayoría de las enzimas del tipo Ia de Richmond y Sykes (grupo 1 de Bush) que se encuentran en *E. cloacae*, *C. freundii* y la β -lactamasa ampC de *E. coli* son inhibidas únicamente a concentraciones muy elevadas de clavulanato; también lo son las β -lactamasas de especies de *Bacteroides*, de *Legionella* y *Branhamella*, pero no puede inhibir las β -lactamasas inducibles de microorganismos como *Alcaligenes faecalis* o *Flavobacterium* (grupos 3 y 4 respectivamente)¹⁰⁵.

Kobayashi (&), encuentra que el ácido clavulánico disminuye la resistencia bacteriana a la penicilina G y a la cefazolina, que son antibióticos relativamente susceptibles a la hidrólisis de la β -lactamasa estafilocócica, mas no afecta la sensibilidad de estas bacterias cuando se utiliza meticilina, oxacilina o cefalotina⁸². Una de las ventajas importantes que tiene el ácido clavulánico es su alta capacidad de penetración al espacio periplasmático, que es mayor a la que presenta el sulbactam o los iodopenicilatos, como lo comenta Neu (&), en los estudios efectuados en cepas de *E. coli* productoras de TEM-1¹⁰⁵.

Amoxicilina/Clavulanato

Esta combinación, también conocida como augmentin¹⁰⁴, es utilizada efectivamente en infecciones leves de tejidos y del tracto urinario¹⁴⁵.

Es efectiva contra las enzimas TEM-1, TEM-2 y ROB-1 de *Haemophilus influenzae* (cuando se utiliza una concentración de clavulanato de 2 mg/l) aunque no se produce una reducción de CIM tan eficiente como cuando se utiliza como inhibidor el tazobactam¹³¹.

Es la única combinación efectiva contra *K. oxytoca* 46, que además de poseer una β -lactamasa de amplio espectro, la produce a una cantidad 300 veces mayor que otras cepas⁶⁰.

Cefoperazona/Clavulanato

Esta combinación resultó ser efectiva contra la enzima TEM producida por 7 cepas diferentes de *E. coli* y contra la enzima SHV producida por 9 cepas diferentes de *K. aerogenes* que son resistentes al antibiótico solo.

La combinación con la proporción 1xCIM de cefoperazona / 1 mg/l clavulanato, mostró sinergismo contra todas las cepas. Al aumentar la concentración de cefoperazona (2xCIM), la mezcla resultó ser bactericida para todas las cepas; tanto para las sensibles como para las resistentes al antibiótico, a diferencia de la mezcla cefoperazona/sulbactam, que resultó ser bacteriostática para todos los casos aunque se aumentara la concentración del inhibidor¹⁰⁴; por lo que podemos decir que el clavulanato es más efectivo que el sulbactam para estas enzimas.

Ticarcilina/Clavulanato

Estudios recientes reportan la aparición de resistencia a la mezcla ticarcilina/clavulanato (timetin)¹³² y a la amoxicilina/clavulanato en aislamientos clínicos de enterobacterias que previamente se pensaba serían inhibidas por el clavulanato.

En un experimento llevado a cabo por Thomson (&)¹³⁶, utilizando 74 cepas de enterobacterias, encontró que el 32% fueron resistentes a la ticarcilina/clavulanato cuando se utiliza una concentración de inhibidor de 2 mg/l; mientras que otras combinaciones (piperacilina/tazobactam, cefoperazona/sulbactam) mostraron ser más efectivas (tabla 5.4).

AGENTE	No. DE CEPAS (%)		
	Susceptible	Moderadamente susceptible	Resistente
Ticarcilina	3 (4)	2 (3)	69 (93)
Ticarcilina/clavulanato	28 (38)	22 (30)	24 (32)
Piperacilina	15 (20)	5 (7)	54 (73)
Piperacilina/tazobactam	55 (74)	6 (8)	13 (18)
Cefoperazona	54 (73)	6 (8)	14 (19)
Cefoperazona/sulbactam	65 (88)	3 (4)	6 (8)

Tabla 5.4

Comparación de la susceptibilidad de 74 cepas de enterobacterias frente a antibióticos β -lactámicos solos y combinados con un inhibidor¹³⁶.

Cultivos productores de PSE-1 fueron resistentes o moderadamente susceptibles a esta combinación sin importar la cantidad de enzima producida; también presentaron

CAPITULO V. INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

resistencia las cepas productoras de HMS-1, OHIO-1 y las cepas de *Klebsiella oxytoca* que producen altos niveles de la enzima clase IV.

De 42 cepas de *E. coli* productoras de la enzima TEM-1, 26% mostraron resistencia (tabla 5.5) y de 13 cepas de *K. pneumoniae* productoras de SHV-1 el 77% mostraron ser resistentes (tabla 5.6).

AGENTE	No. DE CEPAS (%)		
	Susceptible	Moderadamente susceptible	Resistente
Ticarcilina	1 (2)	0 (0)	41 (98)
Ticarcilina/clavulanato	14 (33)	17 (41)	11 (26)
Piperacilina	7 (17)	2 (5)	33 (78)
Piperacilina/tazobactam	34 (80)	4 (10)	4 (10)
Cefoperazona	32 (76)	3 (7)	7 (17)
Cefoperazona/sulbactam	41 (98)	1 (2)	0 (0)

Tabla 5.5

Comparación de la susceptibilidad de 42 cepas de *E. coli* productoras de TEM-1 frente a antibióticos β -lactámicos solos y combinados con un inhibidor¹³⁶.

AGENTE	No. DE CEPAS (%)		
	Susceptible	Moderadamente susceptible	Resistente
Ticarcilina	0 (0)	0 (0)	13 (100)
Ticarcilina/clavulanato	1 (8)	2 (15)	10 (77)
Piperacilina	1 (8)	2 (15)	10 (77)
Piperacilina/tazobactam	7 (54)	0 (0)	6 (46)
Cefoperazona	7 (54)	1 (8)	5 (38)
Cefoperazona/sulbactam	8 (61)	1 (8)	4 (31)

Tabla 5.6

Comparación de la susceptibilidad de 13 cepas productoras de SHV-1 frente a antibióticos β -lactámicos solos y combinados con un inhibidor¹³⁶.

El aumento de resistencia se asoció al incremento en la producción de ciertas β -lactamasas, como es el caso de las enzimas TEM-1 de *E. coli*, la SHV-1 de *K. pneumoniae* y la enzima clase IV de *K. oxytoca*; sin embargo, puede deberse a otros factores como son la permeabilidad de la membrana y la afinidad a las PBP's (ver: Otros factores de resistencia asociadas a los inhibidores).

Piperacilina/Clavulanato

Higashitani (&), estudió la combinación de varios inhibidores con la piperacilina frente a cepas productoras de penicilinasas, cefalosporinasas y oximino-cefalosporinasas.

A una concentración de 5 mg/l el clavulanato combinado con la piperacilina mostró tener una gran efectividad sobre cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* productoras de penicilinasas, ya sean cromosómicas o mediadas por plásmidos.

Frente a las cepas de *E. coli* productoras de una oximino-cefalosporinasa constitutiva no hubo sinergismo en la mezcla, dando una reducción muy baja o nula de CIM.

Frente a las cefalosporinasas inducibles el clavulanato mostró ser antagonista a la piperacilina provocando un incremento de CIM en la mayoría de las cepas^{60, 65}.

Esto permite concluir que el clavulanato es un excelente inhibidor de las penicilinasas, mas con las cefalosporinasas llega a ser muchas veces hasta un inductor.

Mecanismo general de inhibición del Clavulanato

La acilación de la β -lactamasa en el residuo de serina del sitio activo, puede llevarse a cabo con un sustrato o con los inhibidores que actúan como sustrato^{105, 115}.

La acilación de la enzima por un sustrato análogo, como es el ácido clavulánico, comienza por el rompimiento del anillo β -lactámico, conduciendo a la formación de un compuesto intermediario (fig. 5.3). Este compuesto, la acil-enzima (EA), es la forma inicial que se presenta, junto con la imina correspondiente, como resultado de la ruptura del enlace C-O. La rápida pérdida de la actividad catalítica, refleja la acumulación de EA.

La acil-enzima puede tomar dos caminos:

- 1) La hidrólisis (desacilación).
- 2) Formación de la enamina (a partir del rompimiento del enlace C5-O y la tautomerización de la imina resultante).

Ambas reacciones son mucho más lentas que la formación de la acil-enzima.

La enamina formada inicialmente es la conformación *cis*, cuya isomerización a la formación *trans* es más estable, aunque el proceso sea más lento.

La forma de enamina de la acil-enzima es más estable a la hidrólisis que la acil-enzima normal, debido a la conjugación entre el enlace éster y el doble enlace de la enamina. También es probable que las formas *cis trans* difieran en su resistencia a la desacilación como resultado de un efecto estérico¹²¹.

En la enzima TEM de *E. coli*, la reacción final involucra la inactivación irreversible de la enzima después de llevar a cabo un gran número de movimientos (115) dentro de este proceso; a diferencia de ésta, la β -lactamasa de *S. aureus* se inactiva sin ningún movimiento del inhibidor, para formar una especie cuya inhibición únicamente es transitoria.

5.2.2 Sulbactam

El sulbactam es un derivado del ácido penicilánico sulfonado¹⁴⁵, también conocido como CP 45899 (fig. 5.4).

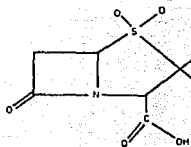


Fig. 5.4

Estructura del sulbactam.

Su único uso clínico, por sí solo, se ha reportado contra *N. gonorrhoeae* y *Acinetobacter*; también actúa, aunque más débilmente, contra cocos Gram positivos, enterobacterias, *Pseudomonas* y algunas especies de *Bacteroides*¹⁰⁵.

Con las β -lactamasas aisladas, se ha demostrado que inhibe la de *S. aureus* y las de muchas enterobacterias.

Fu y Neu (1979) demostraron que frente a las enzimas que exhiben una actividad primaria de cefalosporinasa, el sulbactam sólo las inhibe débilmente.

La combinación de ampicilina/sulbactam, conocida como unacyn⁴⁶, se utiliza con gran frecuencia; se ha reportado un alto grado de sinergismo de esta combinación contra cepas de *H. influenzae* cuando se utiliza una concentración de inhibidor de 8 mg/l; sin embargo, no se observan los mismos resultados cuando se combinan 2 mg/l de sulbactam con moxicilina; pues el sinergismo observado es mucho menor cuando este antibiótico se combina con otros inhibidores como el clavulanato o el tazobactam, que producen una reducción mayor de CIM y a concentraciones aún menores¹³¹.

Cuando se combina con cefpiroma, cefotaxíma, cefazolina, metilicina y penicilina G a una concentración de inhibidor de 10 mg/l muestra un notable sinergismo contra la β -lactamasa de *S. aureus*, especialmente con cefpiroma y cefotaxíma⁸².

Jacobs (&), ha reportado la actividad de la combinación del sulbactam con ampicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina, piperacilina y apalcilina contra diferentes plásmidos implantados en cepas de *E. coli* (tabla 5.3) y en *P. aeruginosa* (tabla 5.1) además de las cepas de *Enterobacter*, *C. freundii* y *S. marcescens* que producen β -lactamasas bien caracterizadas (Tabla 5.2).

En general, con todas las cepas el sulbactam mostró un sinergismo muy bajo y en pocas ocasiones llegó a ser comparable su actividad con la de otros inhibidores más efectivos, como son el clavulanato y el tazobactam¹⁰⁴.

CAPITULO V. INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

En las únicas cepas donde mostró una mejor actividad fue en las de *E. coli* productoras de la enzima OXA-1 y OXA-2 cuando se combina con apalcilina y azlocilina respectivamente (tabla 5.3)⁶⁴ y las cepas de *E. coli* GN14930 y *E. cloacae* GN7471 cuando se combinan con piperacilina⁶⁵.

Donde destacó la actividad del sulbactam, fué frente a la β -lactamasa cromosómica de *S. marcescens*; especialmente cuando se combinan 8 mg/l de este inhibidor con ticarcilina o piperacilina (tabla 5.2).

Cefoperazona/sulbactam

En un estudio llevado a cabo con 74 cepas de enterobacterias se encontró que sólo el 19% fueron resistentes a la cefoperazona por sí sola, siendo el antibiótico que dió mejores resultados al comparar su actividad con la ticarcilina y la piperacilina (tabla 5.4)¹³⁶.

Cuando se agregó el inhibidor a una concentración de 2 mg/l el porcentaje de cepas resistentes fué unicamente del 8% .

Posteriormente el estudio se enfocó al análisis de la enzima TEM-1 de *E. coli*. Se encontró que esta combinación fué la única que logró producir el 0% de cepas resistentes (tabla 5.5).

Al efectuar el mismo experimento comparativo, pero ahora con la enzima SHV-1 de *K. pneumoniae*, el porcentaje de cepas resistentes no fué tan exitoso como el obtenido con la TEM-1, pero logró obtener el porcentaje más bajo de las tres combinaciones experimentadas (tabla 5.6).

Este incremento en la resistencia se atribuye a la producción de altos niveles de enzima.

Ceftriaxona/sulbactam

Fantin (&)⁴⁴, hizo experimentos *in vivo* e *in vitro* de esta combinación, contra una β -lactamasa descubierta recientemente en cultivos de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a la cefotaxima y ceftriaxona.

In vitro encontraron que la actividad de la ceftriaxona y el sulbactam solos es inefectiva contra un inóculo de 5×10^7 UFC/ml; pero al mezclarlos, se observó un sinergismo, dependiente de la concentración del sulbactam.

También se estudió al sulbactam con una combinación de ceftriaxona-netilmicina, puesto que la combinación de una cefalosporina de amplio espectro con un antibiótico aminoglucósido es aun muy utilizada en el tratamiento de serias infecciones producidas por enterobacterias.

La netilmicina sola o en combinación con la ceftriaxona produjo una reducción de 1 a $1.5 \log_{10}$ UFC/ml después de 24 horas de incubación frente a un inóculo de 5×10^7 UFC/ml. Al agregar el sulbactam a esta combinación y bajo las mismas condiciones, se logró una reducción hasta de $4.3 \log_{10}$ UFC/ml.

En el experimento *in vivo*, de una endocarditis provocada en conejos, se observó que el mejor tratamiento fué el de la combinación de 30 mg/kg de ceftriaxona con 100 mg/kg de sulbactam que redujo hasta $5 \log_{10}$ UFC/g ; son valores comparables a los obtenidos por la combinación de ceftriaxona-netilmicina/sulbactam (6 mg/kg, 15 mg/kg, 100

mg/kg respectivamente) a diferencia de que la combinación de ceftriaxona/sulbactam además produce un 65.5% de efecto bacteriostático.

Estos resultados permiten visualizar la posibilidad de prescindir del aminoglucósido en futuros tratamientos.

5.2.3 Tazobactam

Es un derivado del ácido penicilánico sulfonado⁶⁸ también conocido como YTR 830 (fig. 5.5) que ha mostrado ser muy efectivo contra las β -lactamasas mediadas por

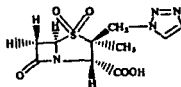


Fig. 5.5

Estructura del Tazobactam.

plásmidos y algunas β -lactamasas cromosómicas como son la de *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *M. organii*.⁶⁵

Amoxicilina/Tazobactam

En combinación con amoxicilina resulta ser un excelente inhibidor de las enzimas TEM-1 TEM-2 y ROB-1 de *H. influenzae*, mostrando un efecto inhibitorio aún mayor

que el observado con el clavulanato (0.5 mg/l de tazobactam producen los mismos resultados que los observados con 2 mg/l de clavulanato)¹³¹.

Piperacilina/Tazobactam

En un estudio realizado por Diver (&)³⁷, el tazobactam mostró tener una capacidad de inhibición muy alta (en combinación con piperacilina o ticarcilina) sobre las penicilinasas cromosómicas y mediadas por plásmidos de *S. aureus* y la enzima TEM-1 de *E. coli* respectivamente. Estos resultados fueron comparables a los obtenidos con el clavulanato.

Los mejores resultados obtenidos de esta mezcla antibiótico/inhibidor fueron frente a las cepas productoras de cefalosporinasas inducibles, donde se comprobó la ineficiencia del clavulanato y la buena actividad, pero superable, del sulbactam; especialmente con las cepas de *P. aeruginosa* GN10367 y *C. freundii* GN346⁶⁵.

Tazobactam / otros antibióticos

El tazobactam, en combinación con otros antibióticos, también llegó a mostrar mejor actividad que el sulbactam y el clavulanato, especialmente frente a las enzimas TEM-1 y HMS-1 codificadas por los plásmidos R y R997 implantados en *E. coli*⁶⁹ cuando se combina con ticarcilina y ampicilina respectivamente (tabla 5.3)

Algunas cepas de *C. freundii*, la enzima cromosómica de *E. cloacae* y cepas *S. marcescens* productoras de TEM-1 (tabla 5.2), son principalmente inhibidas cuando el tazobactam se combina con mezlocilina, piperacilina y apalcilina.

5.3 Otros inhibidores

Carbapenems

Incluyen a los ácidos olivánicos, compuestos de tienamicina y carpetimicinas; muchos de estos compuestos son potentes antibióticos con una considerable estabilidad ante las β -lactamasas (fig: 5.6).

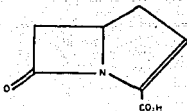


Fig. 5.6
Estructura general de los carbapenems.

El MM4550, MM13902 y MM17880 son buenos inhibidores; pero por tener también actividad antibacteriana, su evaluación como inhibidores se dificulta¹⁴⁵.

El imipenem es un carbapenem que se está estudiando por haber sido comprobada su actividad inhibitoria; especialmente sobre la β -lactamasa I de *B. cereus*. Su uso clínico aún no se ha establecido⁹⁷.

Ácidos Halopenicilánicos

Al igual que otros inhibidores, son derivados directos del ácido penicilánico (fig: 5.7); R es un halógeno en posición β . Las alfa-halo-sustituciones en esa posición han mostrado tener un menor grado de inhibición que las β .

Los ácidos halopenicilánicos más utilizados son los 6- β -bromó y 6- β -iodo¹⁴⁵.

El primero de éstos es un potente inhibidor, comparable con el ácido clavulánico; se ha estudiado la cinética de su actividad inhibitoria sobre la β -lactamasa I de *B. cereus* 569⁸¹.

Estos agentes no son muy tolerados por el organismo, por lo que son más bien empleados para caracterizar a las β -lactamasas⁷⁹ (pag. 156).



Fig. 5.7
Estructura general de los ácidos halopenicilánicos.

Acidos b6ricos

Son inhibidores competitivos reversibles de las β -lactamasas serfnicas y los 6nicos inhibidores cuya estructura no tiene semejanza con los sustratos de las β -lactamasas (no tienen anillo β -lact6mico).

Act6an sobre el sitio activo de las enzimas; sin embargo, m6s bien son conocidos como inhibidores de las proteasas serfnicas e inhiben a las β -lactamasas por la semejanza entre sus sitios activos³⁹.

Se utilizan principalmente para efectuar estudios cristalogr6ficos de la enzima por tener la ventaja de que no son hidrolizados durante el proceso, a diferencia de los compuestos β -lact6micos. Su alta capacidad de difusi6n a trav6s de la membrana, hace que en un futuro estos inhibidores puedan llegar a tener un uso clfnico²⁵.

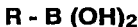


Fig. 5.8
Estructura general de los 6cidos b6ricos.

Existen otros compuestos que han mostrado tener actividad inhibitoria frente a las β -lactamasas serfnicas, pero como a6n no se ha definido claramente su espectro de actividad y su farmacocin6tica, todavfa no es posible establecer si existe un uso clfnico efectivo para estos compuestos.

El aztreonam es un antibiótico monobactámico que, aunque su actividad principal es bactericida¹²⁹, se ha comprobado que es un potente inhibidor progresivo de las cefalosporinas. Este efecto inhibitorio fué comprobado por Bush (&) en la β -lactamasa producida por *E. cloacae* P99^{17, 19}. La diferencia en la capacidad inhibitoria entre el clavulanato y el aztreonam son significativas, ya que las cefalosporinas son más fuertemente inhibidas por el aztreonam; comportamiento inverso frente a las β -lactamasas de amplio espectro y las penicilinas¹⁴.

Se han comprobado las cualidades inhibitorias de los compuestos análogos al diketene, sobre la β -lactamasa I de *B. cereus*; aunque su actividad inhibitoria ha sido satisfactoria se consideran compuestos poco estables, por lo que su utilidad aún es discutida¹³⁴.

Los monofosfams son antibióticos β -lactámicos monocíclicos cuya actividad sobre las cefalosporinas es semejante a la de los monobactams. Aunque su actividad bactericida es pobre, su actividad inhibitoria es muy elevada¹⁷.

El moxalactam es un antibiótico oxa- β -lactámico (oxa-cefalosporina) que se ha distinguido por ser un antibiótico que ha mostrado poseer la propiedad de inactivar eficientemente las β -lactamasas como un inhibidor suicida, además de demostrar su buena actividad bactericida⁸⁶.

Algunas modificaciones a las cadenas laterales de los β -lactámicos pueden dar lugar a nuevos tipos de inhibidores, como es el caso de las 1-oxacefalosporinas, que con un sustituyente 7α -formilamino, aumenta la potencia de inactivación de las β -lactamasas¹⁰⁰.

Bayer (&), estudió la actividad inhibitoria de la dicloxacilina combinándola con ceftazidima sobre la cepa de *P. aeruginosa* PA-48 que produce una cefalosporinasa resistente al antibiótico solo. Aunque ha llegado a mostrar mayor sinergismo con este antibiótico que otros inhibidores (clavulanato y sulbactam), aún es necesario efectuar más estudios sobre este inhibidor⁵.

También se ha descubierto que *S. clavuligerus* produce, además de ácido clavulánico, otra protefna con características inhibitorias de las β -lactamasas (BLIP) capaz de inhibir la bacterenasa, que es una penicilinasa producida por *B. cereus*³⁹.

5.4 Factores de resistencia asociados a los inhibidores

En todos los estudios realizados sobre diferentes β -lactamasas frente a una combinación antibiótico/inhibidor, han existido tal diversidad entre los valores obtenidos de CIM que se hace imposible poder generalizar la efectividad de una combinación, no solo frente a diferentes especies de microorganismos, sino hasta entre una cepa y otra^{65, 69}.

Esto confirma que la resistencia de los microorganismos no está dada únicamente por la presencia de las β -lactamasas (cap. III); por lo tanto, fué necesario que los investigadores analizaran otros factores que confirieran resistencia y que, interactuando con las β -lactamasas, disminuyan la susceptibilidad de los microorganismos⁸².

Actividad enzimática

Debido a que la resistencia de los microorganismos a los antibióticos y a las combinaciones antibiótico/inhibidor muchas veces va íntimamente ligada a una sobreproducción de

CAPITULO V. INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

β -lactamasas, Thomson (&), hizo un estudio en donde trata la relación entre la cantidad de enzima producida, su tipo y su susceptibilidad a las 3 combinaciones antibiótico/inhibidor más utilizadas. Estas combinaciones son: ticarcilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam y cefoperazona/sulbactam¹³⁶.

Este investigador encontró que la β -lactamasa de clase IV de *K. oxytoca*, la SHV-1 de *K. pneumoniae* y la enzima TEM-1 de *E. coli* que se producen en cantidades elevadas, presentan mayor resistencia a las tres combinaciones; mientras que las cepas que producen bajos niveles de dichas enzimas sí fueron susceptibles.

Esta sobreproducción de enzima puede deberse a la existencia de cepas mutantes Gram negativas, productoras de β -lactamasas cromosómicas, que se ha demostrado sufren una derrepresión^{38, 137}.

Afinidad de las PBPs por los β -lactámicos

Las características de las PBPs (proteínas que se unen a las penicilinas) y su afinidad por los antibióticos β -lactámicos, se trata en el capítulo III; pero como algunos inhibidores tienen propiedades bactericidas, por resultar afines a ciertos tipos de PBPs, dan lugar a que una combinación antibiótico/inhibidor puede llegar a ser más efectiva que otra.

Por esta razón, Moosdeen (&), hace un estudio comparativo de la afinidad de las PBPs de cinco bacterias Gram negativas (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. aerogenes*, *C. freundii* y *E. cloacae*) por los tres inhibidores de mayor importancia: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Este investigador mostró que el primer blanco del clavulanato fueron las PBP2 de todas las cepas; en cambio, el primer blanco del tazobactam fueron las PBP1 de *K. aerogenes* y

CAPITULO V. INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

P. mirabilis y las PBP2 en *E. coli*, *C. freundii* y *E. cloacae*. Sulbactam se une primeramente a las PBP1 de *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. aerogenes* y a las PBP2 de *C. freundii* y *E. cloacae*⁹⁸.

Esto permite concluir que el grado de susceptibilidad de un microorganismo frente a una combinación antibiótico/inhibidor depende del tipo, número y localización de las PBPs pero también depende del grado de afinidad que ellas ejerzan, ya no solo hacia el antibiótico si no también hacia el inhibidor.

Características antibiótico/inhibidor

No cualquier antibiótico puede utilizarse con cualquier inhibidor; es indispensable que las características farmacocinéticas sean similares entre ambos para que pueda haber sinergismo en su combinación.

Woodnutt (&), hizo el estudio farmacocinético para el timetín (ticarcilina/clavulanato), en el que se toma en cuenta:

- a) Vida media de eliminación
- b) Distribución en los tejidos
- c) Valores de penetración (fluido pleural, peritoneal y subcutáneo).

Cuando estos parámetros son similares para ambos (como lo fué para la ticarcilina y el clavulanato) es cuando se puede concluir que hay afinidad entre el antibiótico y el inhibidor y saber que se presentarán juntos en el sitio de infección¹⁴⁶.

Dentro del estudio cinético del inhibidor, se debe determinar la velocidad y grado de penetración al interior de la célula⁶⁵, la concentración ideal a la que debe presentarse dependiendo del antibiótico con el que se combina⁷¹, así como el grado de afinidad entre el inhibidor y la β -lactamasa.

La información cinética obtenida de estas determinaciones es de gran importancia, pues mientras más precisa sea, será mayor la efectividad del inhibidor.

Es importante analizar la estructura de los antibióticos, pues de ella depende que haya mayor o menor sinergismo con el inhibidor; el sulbactam, por ejemplo, muestra mayor sinergismo cuando se combina con cefpiroma y cefotaxima (que tienen un grupo metoxi-imino en la posición 7) que con moxalactam o cefmetazol (que tienen un grupo metoxi en la posición 7)⁸².

Inducción de las β -lactamasas por los inhibidores

Muchos investigadores han comprobado la efectividad de los inhibidores más comunes, como son el clavulanato, sulbactam y tazobactam, frente a las β -lactamasas mediadas por plásmidos; sin embargo, estos mismos resultados no se observan cuando los inhibidores se utilizan frente a ciertas enzimas cromosómicas; llegando a mostrar una actividad antagonista¹⁴³.

En la actualidad se ha comprobado que algunos compuestos β -lactámicos tienen la capacidad de actuar como potentes inductores de las β -lactamasas cromosómicas de la clase 1 de Richmond y Sykes (cap. VI), encontradas en la familia *enterobacteriácea* y en *P. aeruginosa*¹⁴³.

Weber (&)¹⁴³, hizo estudios sobre la capacidad de inducción de los inhibidores, encontrando que a una concentración de 100 mg/l el clavulanato actúa como un fuerte inductor de las β -lactamasas cromosómicas de tipo I¹⁰⁵; el sulbactam en menor grado que el clavulanato y el tazobactam prácticamente no muestra inducción; también demostró que la inducción es reversible y que solo ocurre durante la exposición al inductor, lapso en el que se le confiere resistencia al microorganismo¹²⁹.

Farmer (&), postuló que el menor efecto de inducción mostrado por el sulbactam, se deba a que tiene un poder de inhibición mayor que el clavulanato sobre este tipo de enzimas; pero también indica la importancia de tomar en cuenta la concentración utilizada en el experimento. Farmer demuestra que a concentraciones terapéuticas (10 mg/l) tanto el clavulanato como el sulbactam son inductores pobres; sin dejar de tomar en cuenta que existen muchas variaciones a la susceptibilidad de inducción ante un cepa y otra lo que no hace imposible que algunas enzimas puedan ser inducidas aún a estas concentraciones⁴⁶.

Este tipo de información sobre la inducción de los inhibidores le permite a Stobberingh¹³² dilucidar varios factores involucrados en este mecanismo, que deben tomarse en cuenta cuando se trata de elegir la mejor combinación antibiótico/inhibidor:

- 1) Efectuar los estudios de la capacidad de inducción de un agente antimicrobiano a concentraciones clínicamente tolerables.
- 2) Tomar en cuenta los diferentes grados de inducibilidad entre diferentes especies y dentro de una misma especie.

- 3) Tomar en cuenta la sensibilidad del microorganismo a la inducción por los antibióticos solos y por los antibióticos combinados con el inhibidor.**
- 4) Tomar en cuenta la capacidad de los agentes antimicrobianos para seleccionar las mutantes estables deprimidas.**

Este investigador también indica que existen otros factores en el medio de cultivo, que no se han determinado y que tienen la facultad de fungir como inductores de las β -lactamasas.

CAPITULO VI. CLASIFICACION DE LAS β -LACTAMASAS

6.1 Antecedentes

Con el propósito de un mejor estudio de las β -lactamasas y en vista del gran incremento de éstas, se han propuesto diversos métodos para su clasificación. Uno de los primeros métodos fué propuesto en 1973 por Richmond y Sykes¹²⁰ (donde las principales clases se denotan con números romanos), el cual se basa en los perfiles de sustrato, de inhibidores y reacción con antisuero. Con este criterio, dividieron las β -lactamasas en cinco clases: La clase I comprende a las cefalosporinas. Esta clase (que se subdivide en Ia, Ib, Ic y Id), incluye a las β -lactamasas mediadas por cromosomas de la mayoría de las enterobacterias y pseudomonas, excepto para las del género *Proteus* y *Klebsiella*, las cuales son más activas frente a las penicilinas constituyendo las clases II y IV respectivamente. La clase III comprende a las β -lactamasas tipo TEM, codificadas por plásmidos y la clase V esta constituida por un grupo heterogéneo, comprendiendo β -lactamasas que hidrolizan oxacilina y carbenicilina.

La heterogeneidad entre algunas de estas clases y los problemas en la determinación de parámetros tales como inhibición enzimática por pCMB (β -cloromercurobenzato), empleándose preparaciones de enzimas sin purificar, son factores que Medeiros menciona como desventajas para utilizar esta clasificación, especialmente cuando no está incluida información adicional como la inducción en la producción de las β -lactamasas o la localización del gen que las codifica (cromosoma o plásmido)⁹⁴.

Sykes y Mattew en 1976, complementan esta clasificación al incluir el punto isoeléctrico como criterio principal en la identificación de las β -lactamasas^{14, 94}; sin embargo, debido a que cada día se descubren una gran cantidad de enzimas y el desarrollo de nuevos antibióticos se ha incrementado, dicha clasificación ya no es representativa⁵⁴, aunque constituyó la primera clasificación útil para las β -lactamasas⁹⁴.

Por lo anterior, fué necesario reevaluar las propiedades para caracterizarlas, al incluir a los perfiles de sustratos e inhibidores, compuestos que no se habían empleado en las primeras evaluaciones como la cefotaxima y el ácido clavulánico.

En 1988, Galleni realizó un estudio cinético completo con varias β -lactamasas de clase C⁵⁴ y de acuerdo a los resultados obtenidos, señaló que no era conveniente la distribución de las enzimas en sub-clases como la clase I de Richmond y Sykes, ya que no sería sorprendente encontrar valores intermedios al estudiar otras enzimas y, a la larga, cada una de éstas podría constituir una sub-clase.

El descubrimiento de nuevas enzimas ha enfatizado las dificultades de la clasificación, nomenclatura e información filogénica. Los métodos clásicos para su caracterización con base en el perfil de sustrato, inhibidor, pI y PM revelan similitudes entre las enzimas pero no son adecuados para una comparación filogénica¹⁴⁰.

En 1980, Ambler¹ propone una clasificación con base en la secuencia aminoácida de las β -lactamasas y aunque este tipo de clasificación es la más fundamental proporcionando información filogénica, a menudo se prefiere la clasificación funcional de Sykes⁴².

CAPITULO VI. CLASIFICACION DE LAS β -LACTAMASAS

En 1988, Bush propone una modificación a los métodos señalados por Richmond y Sykes para una nueva clasificación, basada principalmente en características bioquímicas, tomando en cuenta la clase estructural. Agrupó a las β -lactamasas codificadas por cromosomas o plásmidos, de acuerdo a sus propiedades físicas y perfil de sustrato e inhibidor. Cabe señalar que a pesar de que se ha publicado mucho sobre las β -lactamasas mediadas por cromosomas¹²⁴ o plásmidos, es la primera investigadora en proponer una tabulación completa que incluye las características de ambos tipos de enzimas.

6.2 Clasificación general

En la tabla 6.1 se presentan los grupos propuestos, dependiendo de su especificidad por el sustrato y su inhibición por el ácido clavulánico. En esta clasificación se ha hecho el intento de incluir en grupos específicos, a aquellas enzimas de clase molecular con-

Grupo	Subtítulo	Sustratos preferidos	Inhibido por:		Enzimas representativas
			CA*	EDTA	
1	CEP-N	Cefalosporinas	No	No	Enzimas cromosómicas de bacterias Gram (-)
2a	PEN-Y	Penicilinas	Si	No	Penicilinasas de bacterias Gram (+)
2b	BDS-Y	Cefalosporinas, Penicilinas	Si	No	TEM-1, TEM-2
2b'	EBS-Y	Cefalosporinas, Penicilinas, Cefotaxima	Si	No	TEM-3, TEM-5
2c	CAR-Y	Penicilinas, Carbenicilina	Si	No	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	CLX-Y	Penicilinas, Cloxacilina	Si	No	OXA-1, PSE-2
2d	CEP-Y	Cefalosporinas	Si	No	<i>Proteus vulgaris</i>
3	MET-N	Variable	No	Si	<i>B. cereus</i> II <i>P. maltophilia</i> L1
4	PEN-4	Penicilinas	No	?	<i>P. cepacia</i>

*Acido clavulánico

Tabla 6.1

Esquema general de clasificación para las β -lactamasas.

CAPITULO VI. CLASIFICACION DE LAS β -LACTAMASAS

ocida, ya que se espera, siguiendo el mismo lineamiento, que las futuras enzimas relacionadas puedan ajustarse dentro de estas categorías.

El grupo 1, subtítulo CEP-N, incluye a las enzimas que hidrolizan preferentemente las cefalosporinas y no se inhiben con 10 μ M de clavulanato.

El grupo 2 incluye una variedad de enzimas que sí se inhiben con el clavulanato y se subdivide en: El grupo 2a, subtítulo PEN-Y, que incluye las penicilinasas clásicas; el grupo 2b, subtítulo BDS-Y, que incluye las β -lactamasas de amplio espectro tradicionales; el grupo 2b, subtítulo EBS-Y, que incluye muchas β -lactamasas relacionadas con el grupo 2b pero con la capacidad de hidrolizar a los antibióticos β -lactámicos de amplio espectro extendido, tales como la cefotaxima, ceftazidima o aztreonam. El grupo 2c (CAR-Y) y 2d (CLX-Y) incluyen a aquellas penicilinasas que además hidrolizan la carbenicilina y la cloxacilina respectivamente. El grupo 2e (CEP-Y) incluye un grupo único de cefalosporinasas con propiedades inmunológicas semejantes a las penicilinasas.

El grupo 3, MET-N, incluye las β -lactamasas que requieren un ion metálico para su actividad enzimática; todas ellas aparentemente no son inhibidas por el clavulanato.

El grupo 4, PEN-N, se ha agregado a la clasificación original de Bush propuesta en 1988 e incluye una variedad de penicilinasas no inhibidas por el clavulanato.

Los parámetros empleados en esta clasificación son los siguientes:

Si una enzima ya se ha nombrado, tanto el nombre original como la designación posterior (si es el caso), aparecen en la columna 1 de las tablas de clasificación (pag 207). Cuando

se observan diferencias considerables entre las enzimas constitutivas provenientes de la misma especie, se mencionan todas las enzimas. La columna 2 indica si la producción de la β -lactamasa es mediada por cromosoma o por plásmido, incluyendo el nombre del plásmido (si es el caso); no se dan indicaciones en esta columna cuando el mecanismo de producción no se ha determinado, cuando se conoce, el hospedador original para la enzima se nombra con su número de cepa.

Los perfiles de sustrato se recopilaron usando los siguientes antibióticos, las penicilinas: Bencil-penicilina, ampicilina, carbenicilina, cloxacilina; las cefalosporinas: Cefaloridina, cefalotina, ceftazidima; el aztreonam y el imipenem. Cuando fué posible, los valores de V_{max} se nombraron preferentemente a los valores relativos de hidrólisis. Cuando los datos de la literatura no se reportaron en términos de parámetros cinéticos puros, la concentración de los sustratos y el método empleado se indica en las tablas. En pocos casos se presentó más de un valor para un solo parámetro.

6.3 Nomenclatura

Se ha generado algo de confusión en la nomenclatura debido a los métodos de clasificación propuestos, a la falta de conocimiento estructural de la enzima así como a la distribución de un solo tipo enzimático en diversos géneros bacterianos^{14, 94, 105, 124}.

La denominación de la clase I de Richmond y Sykes (con la que se designa comúnmente a las cefalosporinas), se confunde fácilmente con la propuesta por Mitsuhashi donde las β -lactamasas mediadas por plásmidos se dividen en tipo Ia y Ib o con la enzima tipo I de *B. cereus*¹²⁴.

A menos que la información estructural pueda ser determinada para cada β -lactamasa recién descubierta, los nombres son asignados de acuerdo mas bien a preferencias indivi-

Matthew	Mitsuhashi	Pitton	Labia & Phillippon	Richmond & Sykes
TEM-1 (Temoniera: nombre del paciente)	Tipo 1a	TEM-1, tipo 1		Illa
TEM-2	Tipo 1b			Illa
SHV-1 (Sulfidril-variable)		TEM-1, tipo 2 (PIT-2)		1V
HMS-1 (Hedges, Matthew & Smith)				
OXA-1 (Hidroliza la Oxacilina)	Tipo II			Va
OXA-2	Tipo III			Vb
OXA-3				V
PSE-1 (Específica de <i>Pseudomonas</i>)	Tipo IV		CARB-2	V
PSE-2				V
PSE-3			CARB-4	V
PSE-4			CARB-1	V

Tabla 6.2
Diferencias en la nomenclatura de algunas β -lactamasas⁹⁴.

duales que a un procedimiento sistemático⁹⁴. Esto ha originado la existencia de diferentes denominaciones para un solo tipo de enzima, como se aprecia en la tabla 6.2⁹⁴.

Algunos investigadores denominaron a la enzima de acuerdo al microorganismo en que fué aislada por vez primera; sin embargo, este criterio es poco recomendable debido a la creciente distribución de un solo tipo de β -lactamasa entre los diferentes géneros bacterianos. Esto se ejemplifica con el gen que codifica para PSE-1, el cual se encontró originalmente en un plásmido restringido al género *Pseudomonas*, pero que actualmente

se encuentra en muestras clínicas de *E. coli*, *Salmonella*, *Serratia liquenifaciens* y *P. mirabilis*⁹⁴.

En la actualidad, se han establecido relaciones estructurales entre las enzimas estudiadas y las descubiertas recientemente, encontrándose gran similitud en algunas de ellas. Debido a esto, ha sido necesario cambiar el nombre de algunas de éstas, como el caso de CTX-1 y CAZ-1, denominadas posteriormente TEM-3 y TEM-5¹⁴.

6.4 Tablas

Consta de nueve grupos:

GRUPO 1: Este grupo incluye a las cefalosporinas no inhibidas por el clavulanato (tabla 6.3). Estas enzimas se correlacionaron primeramente con las clases de β -lactamasa Ia, Ib y Id de Richmond y Sykes; son casi exclusivamente enzimas cromosómicas y a pesar de que frecuentemente se manifiestan como inducibles, se ha incrementado el número de cepas que sufren de represión (pag.20). Estas enzimas hidrolizan la cefaloridina y la cefalotina más rápidamente que cualquier otra de la familia de las penicilinasas. El clavulanato y el sulbactam las inhiben pobremente; en cambio, lo son potencialmente por el aztreonam y la cloxacilina. Los PM son generalmente mayores de 30,000 y los pI están dentro del intervalo alcalino. Todas las enzimas de este grupo, que se han estudiado a nivel molecular, son de clase C.

GRUPO 2: Incluye varias sub-clases por haberse observado diversidad en sus perfiles de sustrato aunque a menudo muestran similitud en determinaciones inmunológicas y de hibridación genética. Hasta ahora, todas las enzimas de clase A pertenecen a este

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis								Constante de Inhibición (μ M)				Inhibida por		P.M.	pI	Clase Molecular		
			LOR	LOT	PEN	AMP	CARB	CLOX	TAX	TAZ	AZI	IMP	CA	SUL	AZI	CLOX				cCMB	FDTA
Chr	Chr	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NC TC 744	100	ND	1	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	30,000	ND	ND	
		<i>Bacteroides fragilis</i> GN1437	100	81	1.0	0.80	0.2	0.2	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	ND	ND	12,000	5.2	ND
ND	Chr	<i>B. intermedius</i> G14874	100	80	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-10	-10	ND	-10	ND	ND	ND	ND	ND
		<i>Chromobacterium violaceum</i>	100	60	12	1.1	1.9	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-1	-	ND	ND	ND	ND
U2	Chr	<i>Citrobacter freundii</i> GN7391	100	27	2.8	0.67	0.01	ND	-0.01	ND	ND	ND	59	3.8	ND	0.001	-	ND	38,000	8.6	ND
		<i>Enterobacter cloacae</i> 208	100	3.0	20	0.1	ND	ND	-0.1	0.01	-0.01	-0.01	ND	-100	0.0012	-100	ND	ND	32,000	8.8	ND
P99	Chr	<i>E. cloacae</i> P99	100	18	1.5	0.02	0.01	0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-100	0.0024	-100	ND	-	ND	39,000	8.2, 8.7	8
		<i>Escherichia coli</i> K 12	100	47	0.1	1.5	ND	0.1	ND	ND	ND	ND	190	ND	ND	-	-	ND	39,600	9.2	C
ampC	Chr	<i>Morganella morganii</i> G58407	100	46	16	1	1	1	ND	ND	ND	ND	-100	-100	ND	0.101	-	ND	41,000	8.7	ND
		<i>Proteus mirabilis</i> 22	100	ND	31	1.8	ND	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	-	ND	37,500	ND	ND
CFP1	ND	<i>P. rettgeri</i> GN4481	100	8.5	3.3	0.7	0.1	0.1	0.1	ND	ND	ND	-10	-10	ND	0.30	+	ND	42,000	8.7	ND
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GN10362	100	140	29	1	1	1	1	ND	ND	-1	-100	ND	0.009	-	ND	34,000	8.7	ND	
NA A	Chr	<i>P. aeruginosa</i> NC TC 8203	100	60	14	2.0	-0.1	0.1	-1	-1	ND	ND	ND	ND	ND	0.028	+	ND	29,000	7.7	C
		<i>Actinobaculum sensu lato</i> SC 824	100	100	6.8	ND	-0.1	-0.1	0.2	0.1	2	ND	ND	ND	-0.01	ND	ND	ND	37,000	9.56	C

Abreviaciones: LOR, cefaloridina; LOT, cefalotina; PEN, benzilpenicilina; AMP, ampicilina; CARB, carbendolina; CLOX, cloxacilina; TAX, cefotaxima; TAZ, cefazidima; AZT, aztreonam; IMP, imipenem; CA, ácido clavulánico; SUL, sulbactam; pCMB, p-cloromercuribenzoato; Chr, cromosómica; ND no determinado.

Tabla 6.3

GRUPO 1: β -lactamasas que no son inhibidas por el clavulanato e hidrolizan a las cefalosporinas (CEP-N)¹⁵.

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis									Constante de Inhibición (μ M)				Inhibida por		P.M.	pI	Clase Molecular		
			PEN	AMP	CARB	CLOX	LOR	LOT	TAX	TAZ	AZT	IMP	CA	SUL	AZT	CLOX	CMB				EDTA	
I	Chr	<i>Acetivibrodora strain R19</i>	100	520	ND	30	ND	ND	ND	ND	ND	<0.01	1	ND	ND	ND	420	ND	-	15,200	5.0	ND
	Chr	<i>Staphylococcus aureus 509</i>	100	300	22	2	<0.1	<0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	27,000	8.8	A
	Chr	<i>B. licheniformis 509 H9</i>	100	71	ND	0.3	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>1,000	ND	ND	31,500	6.8	ND
MJ-2	Chr	<i>Citrobacter amalonaticus HB29</i>	100	79	21	ND	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21,000	ND	A
	ND		100	8	13	<0.2	0.2	9	10	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	+	+	ND	25,000	5.55	ND
SPN-1	ND	<i>Enterobacter aerogenes strain F-21</i>	100	420	50	ND	4.9	0.25	ND	ND	ND	0.03	<10	8,200	ND	390	-	ND	26,000	4.8	ND	
	P	<i>Pseudomonas aeruginosa M302</i>	100	220	18	49	3	ND	<1	<0.1	<0.1	<1	ND	ND	ND	>190	-	ND	25,000	6.5	ND	
Exo	IC1	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	130	ND	ND	0.12	0.02	ND	ND	0.01	ND	0.03	ND	350	ND	ND	ND	28,800	ND	A	
	ND	<i>Streptococcus albus 44</i>	100	120	10	1.7	ND	2.5	ND	ND	ND	0.04	20	ND	ND	250	ND	-	30,500	8.0-6.5	A	
	ND	<i>Staphylococcus aureus KAU 0352</i>	100	18	66	34	1.1	0.7	ND	ND	ND	ND	0.11	0.62	ND	86	-	-	34,000	4.7	A	

Tabla 6.4

GRUPO 2a: β -lactamasas que son inhibidas por el clavulanato e hidrolizan a las penicilinas (PEN-Y).

grupo. Estas enzimas son más fuertemente inhibidas por el clavulanato que por el aztreonam.

GRUPO 2a: Penicilinasas inhibidas por el clavulanato. Incluye muchas de las penicilinasas de los microorganismos Gram positivos (tabla 6.4). Estas enzimas representan muchos de los miembros originales de la clase molecular A. Los grados de hidrólisis para las penicilinas son mucho más altos que para las cefalosporinas. La cloxacilina no es un inhibidor efectivo frente a estas enzimas.

GRUPO 2b: Enzimas que hidrolizan tanto penicilinas como cefalosporinas (amplio espectro), pero son inhibidas por el clavulanato (tabla 6.5). Las enzimas ampliamente diseminadas mediadas por plásmidos: TEM y SHV-1 están en esta clase. Estas enzimas son inhibidas más por el clavulanato que por el aztreonam y la cloxacilina; tienden a tener PM menores que 30,000. En este grupo se observa una hidrólisis pobre frente a las cefalosporinas de amplio espectro: aztreonam e imipenem. Bush incluyó en este grupo a la β -lactamasa CEP-2 que, aunque se describió originalmente como una cefalosporinasa, hidroliza la bencil-penicilina tan bien como lo hace con la cefaloridina o la cefalotina y efectivamente a la carbenicilina (aunque en menor grado). Ciertamente su perfil de sustratos es el de una enzima de amplio espectro.

GRUPO 2b': β -lactamasas que son capaces de hidrolizar a las metoximino-cefalosporinas (ceftazidima y cefotaxima) o antibióticos de amplio espectro extendido, a grados de hidrólisis de por lo menos el 10% con respecto a la bencil-penicilina y que son fuertemente inhibidas por el clavulanato (tabla 6.6). En este grupo se encuentran las enzimas tipo TEM y SHV descubiertas recientemente. Las β -lactamasas cromosómicas tipo K1 se incluyen

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis										Constante de inhibición (μ M)			Inhibida por:			P.M.	pI	Clase Molecular	
			PEN	AMP	CARB	CLOX	LOX	LOT	TAX	TAZ	AZI	IMP	CA	SUL	AZI	ClON	pMB	LDIA				
TEM-1	R7 ^a	<i>Salmonella paratyphi</i> R7298	100	110	10	27	140	20	0.07	0.01	0.29	-0.01	0.06	0.9	5.400	ND	-	-	28,900	5.4	A	
TEM-2	RP1	<i>Escherichia coli</i> TEM	100	100	6.0	3.8	120	9.4	0.08	<0.01	0.39	-0.01	0.13	1.6	2,900	ND	-	-	29,500	5.6	A	
SHV-1	p453	<i>E. coli</i> p453	100	150	6.3	0.90	48	6.5	0.18	0.02	0.18	-0.01	0.8	ND	2,500	2.0	-	ND	17,000	7.6	A	
OH1-2	R997	<i>E. coli</i> J93-2	107	250	14	2	260	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-100	-	ND	21,000	5.2	ND	
HIS-1	pLQ3	<i>Acetobacter</i> sp. strain ML1B 908	100	-1	48	-1	108	114	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-100	-	ND	36,200	8.1	ND	
ROB-1	R ₁₀₀	<i>Haemophilus influenzae</i> 1963	100	110	19	-0.2	37	4.4	ND	ND	ND	ND	-6	ND	ND	-100	ND	ND	ND	8.1	ND	
OH10-1	pDS975	<i>Enterobacter cloacae</i> p75	100	140	11	-0.8	76	7.7	ND	ND	ND	ND	-6	75	-1,200	1,300	ND	ND	22,000	7.0	ND	
OH10-3	pDS976	<i>Streptococcus faecalis</i> p76	100	21	70	0.01	160	11	ND	ND	-1	0.003	-80	ND	4.2	-100	-	-	29,000	6.8	A	
Form 1	Chr	<i>Citrobacter diversus</i> U1A27	100	140	13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	ND	-80	27	ND	19,000	6.5	ND	
TLB-2	pUK702 ^a	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 175	100	100	40	-1	120	45	-1	ND	ND	ND	100	ND	ND	-100	ND	ND	24,000	6.7	ND	
LXA-1	Mt	<i>Acetobacter</i> F172	100	ND	ND	-1	77	22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-80	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Chr	<i>Psuedomonas cepacia</i> GS11184	100	200	22	-1	62	200	110	ND	ND	ND	1.72	1.62	ND	ND	-	ND	24,000	9.3	ND	

Tabla 6.5

GRUPO 2b: β -lactamasas de amplio espectro que son inhibidas por el clavulanato (BDS-Y).

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis									Concentración de Inhibición (μ M)				Inhibida por:		P.M.	pI	Clase Molecular	
			PEN	AMP	CARB	CLOX	LOR	LOT	TAX	TAZ	AZT	IMP	CA	SUL	AZT	CLOX	CMB				EDTA
CIX 1 (11M-3)	pl 104	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CI 104	100	100	85	0.97	120	31	170	8.3	0.36	0.01	0.004	0.012	18	<100	-	ND	29,000	6.3	A
CAZ 1 (11M-5)	pl 114	<i>K. pneumoniae</i> CF 104	100	ND	91	-10	310	50	34	78	47	-2	0.012	0.12	100	ND	*	-	29,000	5.6	ND
HEM 7	P	<i>Citrobacter freundii</i> M2	100	93	20	5.7	120	18	1.9	1.7	ND	ND	0.05	0.25	ND	ND	ND	ND	ND	5.41	ND
HEM 10	pH 21101	<i>K. pneumoniae</i> K12	100	100	76	6	140	37	3.7	150	21	-0.1	0.004	0.94	31	50	*	-	29,000	5.57	ND
HE 1	pM ₁ 2548	<i>Escherichia coli</i> 7040	100	68	13	6.3	83	15	15	ND	ND	ND	<20	ND	ND	100	ND	ND	19,000	5.54	ND
RH11	P	<i>K. pneumoniae</i> MS96	ND	ND	120	ND	100	ND	30	16	24	ND	ND	ND	ND	ND	*	-	ND	5.5	ND
MI 1	ND	<i>K. oxytoca</i>	100	72	14	15	95	80	39	ND	ND	ND	*	ND	ND	*	-	ND	24,000	5.35	ND
SHV 2	pH 961	<i>K. oxytoca</i> 2180	100	100	ND	-0.6	32	8.1	4.2	ND	1.4	ND	0.1	0.15	10	<100	*	-	ND	7.6	A
			100	ND	19	ND	ND	110	71	6.5	1.0	-0.01									
SHV 3	P	<i>K. pneumoniae</i> 96-4	100	ND	19	11	370	ND	67	<1	<1	-1	-1.0	<1.0	ND	<100	ND	ND	ND	6.98	ND
K1	6 hr	<i>K. oxytoca</i> NC 10436	100	81	20	10	36	16	1.8	0.01	15	-0.01	0.007	1.8	800	300	ND	ND	27,000	6.5	A
K1	6 hr	<i>K. aerogenes</i> K1082E	100	100	9.4	14	59	32	ND	ND	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	26,500	ND	A

Tabla 6.6

GRUPO 2b: β -lactamasas de amplio espectro extendido que son inhibidas por el clavulanato (EBS-Y).

CAPÍTULO VI. CLASIFICACION DE LAS β -LACTAMASAS

en este grupo por su capacidad de hidrolizar el aztreonam. Muchas de estas enzimas parecen estar relacionadas con el grupo 2b; sin embargo, varias tienen gran afinidad por el clavulanato, sulbactam y aztreonam.

Recientemente se identificaron dos nuevas enzimas denominadas SHV-4 y SHV-5⁵⁹, las cuales no se encuentran incluidas en esta clasificación general. SHV-5 se aisló por primera vez en la cepa de *K. pneumoniae* 160 y de acuerdo a las propiedades reportadas por Gutmann (&), esta enzima podría clasificarse tentativamente en este grupo: Hidroliza penicilinas, cefalosporinas (entre ellas la cefotaxima) y es inhibida por el clavulanato. Entre sus propiedades destaca su mayor facilidad de hidrólisis frente a la ceftazidima y compuestos monobactámicos (a diferencia de SHV-2 y SHV-3).

GRUPO 2c: β -lactamasas que hidrolizan la carbenicilina a un grado mínimo del 75% con respecto a la bencil-penicilina (tabla 6.7). En este grupo se encuentran incluidas las β -lactamasas PSE-1, PSE-3 y PSE-4, enzimas que tienden a hidrolizar las cefalosporinas mucho más lentamente que las penicilinas y que tienen generalmente grados de hidrólisis bajos frente a la cloxacilina. Aunque PSE-2 parece ser un candidato para incluirse en este grupo, la hidrólisis que presenta frente a la cloxacilina es una característica significativa que coloca a esta enzima en el siguiente grupo (2d). El grupo 2c tiene poca afinidad por la cloxacilina o aztreonam. Los pI tienden a caer por debajo de la neutralidad. Aún no se conoce la secuencia aminoácida de estas enzimas; sin embargo, se puede predecir que este grupo pertenece a la clase molecular A.

GRUPO 2d: β -lactamasas que hidrolizan a la cloxacilina más rápidamente que a la bencil-penicilina y que generalmente las inhibe el clavulanato (tabla 6.8). Es interesante

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis										Constante de Michaelis (uM)				Inhibida por		P.M.	pI	Clase Molecular
			PI-N	AMP	CAR-B	CLOX	LOX	LOT	TAX	TAZ	AZI	IMP	CA	SDI	AZI	CLOX	pCAH	EDTA			
ALR-1	Chr	<i>Aeromonas hydrophila</i> VI.7111	100	39	100	<1	26	79	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22,000	5.9	ND
	Inducible ND	<i>A. hydrophila</i> 872 <i>Branhamella catarrhalis</i> Ravasio	100 100	1,700 78	100 95	ND ND	1,200 13	ND ND	<10 ND	ND ND	ND ND	9,200 ND	ND 0.04	ND ND	ND ND	ND >50	ND ND	ND ND	ND ND	7.1 5.45	ND ND
HRO-1	ND	<i>B. catarrhalis</i>	100	100	76	5	23	24	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	SDI	82	ND	ND	ND	5.6	ND
	Chr	<i>Proteus mirabilis</i> GN79	100	140	100	<2	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SDI	120	ND	ND	27,000	6.6	ND
PSI-1	pCS229	<i>P. mirabilis</i> N-29	100	120	130	<2	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SDI	86	ND	ND	22,000	6.9	ND
	RPL11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PU21	100	90	97	<2	18	<2	0.13	0.05	0.09	0.09	ND	ND	200	>100	+	-	28,500	5.7	ND
PSI-3	Rms149	<i>P. aeruginosa</i> Ps142	100	100	250	3	10	ND	16	0.91	3.0	0.67	ND	SD	170	>1,000	-	-	12,000	6.9	ND
PSI-4	pMG19	<i>P. aeruginosa</i> Daigleish	100	85	150	0.4	40	4	0.02	0.02	0.10	0.01	0.4	ND	230	50	-	-	32,000	5.3	ND
CARI-3	ND	<i>P. aeruginosa</i> C103c	100	100	150	0.5	44	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31,000	5.75	ND
CARI-4	InclP-2	<i>P. aeruginosa</i> PAU303	100	130	79	<1	18	3	ND	ND	ND	ND	<4	4"	ND	>100	+	ND	22,000	4.3	ND
SAR-1	pUK657	<i>Vibrio cholerae</i> DT 136	100	63	120	ND	21	ND	ND	ND	ND	ND	0.005	ND	SDI	7	-	ND	34,000	4.9	ND

Tabla 6.7

GRUPO 2c: β -lactamasas que hidrolizan la carbenicilina y que son inhibidas por el clavulanato (CAR-Y).

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis										Constante de Inhibición (μ M)				Inhibida por		P.M.	pI	Clase Molecular
			PEN	AMP	CARB	CLOX	LOR	LOT	TAX	TAZ	AZT	IMP	CA	SUL	AZT	CLOX	pCMB	EDTA			
	ND	<i>Bacteroides fragilis</i> GN11494	100	360	44	280	91	60	ND	ND	ND	ND	<0.1	<0.1	ND	ND	+	ND	41,500	6.9	ND
OXA-1	RGN238	<i>Escherichia coli</i>	100	380	ND	180	30	ND	ND	ND	ND	ND	0.60	ND	>100	ND	+	ND	23,300	7.4	ND
OXA-2	R46	<i>Salmonella typhimurium</i> type 1a	100	180	ND	650	37	ND	0.4	<0.5	3.6	ND	0.47	ND	1,400	>100	-	ND	29,600	8.65	ND
OXA-3	R57b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	180	ND	340	44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	42,800	7.1	ND
OXA-4	pMG203	<i>E. coli</i> 7529	100	440	38	63	190	83	64	ND	ND	ND	>20	ND	ND	>100	ND	ND	23,000	7.5	ND
OXA-5	pMG54	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 76072601	100	190	41	240	91	180	50	ND	ND	ND	>20	ND	ND	>100	ND	ND	27,000	7.62	ND
OXA-6	pMG39	<i>P. aeruginosa</i> Ming	100	600	46	300	150	24	28	ND	ND	ND	>20	ND	ND	<100	ND	ND	40,000	7.68	ND
OXA-7	pMG202	<i>E. coli</i> 7181	100	540	47	490	135	51	31	ND	ND	ND	>20	ND	ND	>100	ND	ND	25,300	7.65	ND
PSE-2	R151	<i>P. aeruginosa</i> PU21 R151	100	270	120	370	32	<2	12	0.12	6.1	0.05	<40	40	>1,000	>100	+	ND	27,500	6.1	ND

Tabla 6.8

GRUPO 2d: β -lactamasas que hidrolizan la cloxacilina y que son inhibidas por el clavulanato (CLX-Y).

CAPITULO VI. CLASIFICACION DE LAS β -LACTAMASAS

notar que muchas enzimas OXA hidrolizan la cefaloridina a mayor velocidad que a la bencil-penicilina, como se muestra en la tabla 6.8, una excepción a este criterio es la enzima OXA-4. A estas enzimas no las inhibe el clavulanato como a las sub-classes anteriores; sin embargo, poseen una pobre afinidad frente al aztreonam y a la cloxacilina. Todas las β -lactamasas OXA y PSE-2 son inhibidas por 100mM de NaCl, haciendo de esta inhibición una característica diferencial de las β -lactamasas que hidrolizan la oxacilina. Los puntos isoeléctricos tienden a estar entre el intervalo de 6.1 a 7.7.

Las secuencias de aminoácidos de OXA-2 y PSE-2 son diferentes al resto de las β -lactamasas por lo que establecen una nueva clase molecular (la clase D). Mediante técnicas inmunológicas no se encontró reacción cruzada entre el suero anti-OXA-1 con anti-OXA-2 y anti-OXA-3; así mismo el suero anti-PSE-2 no reaccionó con ninguno de los tipos⁹⁴.

GRUPO 2e: Cefalosporinasas que difieren de las del grupo 1 porque las inhibe el clavulanato a bajas concentraciones (tabla 6.9). En 1968 Sawai (&), describió un grupo de cefalosporinasas inducibles sintetizadas por el género *Proteus*, que inmunológicamente reaccionaban de una manera más parecida a las penicilinasas que a las otras cefalosporinasas. Desafortunadamente no se cuenta con perfiles bien establecidos para muchas β -lactamasas de *Proteus* descritas en las primeras publicaciones. La β -lactamasa descrita para *Proteus penneri* es otra candidata para esta categoría de cefalosporinasas, como son algunas cuantas cefalosporinasas inducibles que se ven más inhibidas por el clavulanato que por el aztreonam. Posiblemente estas enzimas pertenecen a la clase molecular A.

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis									Constante de inhibición (μ M)				Inhibida por		P.M.	pl	Clase Molecular	
			LOR	LOT	PEN	AMP	CARB	CLOX	TAX	TAZ	AZT	IMP	CA	SUL	AZI	Cl.OX	pCMB				EDTA
Form II	ND	<i>Bacteroides fragilis</i> G-242	100	40	1.9	<1	<1	<1	4.0	ND	ND	<1	<1.0	<1.0	ND	0.6	+	ND	32,000	4.7	ND
	Chr	<i>Citrobacter diversus</i> ULA-27	100	5.9	14	5.9	3.1	<0.01	ND	ND	<1	0.01	<0.01	ND	6.7	<100	+	-	29,000	6.2	ND
FEC-1	pFCX1	<i>Escherichia coli</i> FP1546	100	200	ND	17	ND	ND	23	0.13	ND	ND	0.0093	0.020	ND	ND	ND	ND	48,000	8.2	ND
	ND	<i>Proteus pennae</i> Wy 1001	100	50	3.4	8.5	<1	ND	48	<1	<1	ND	1.2	2.4	5.400	ND	ND	ND	30,000	6.8	ND
	ND	<i>P. vulgaris</i> GN76 C-1	100	120	14	15	2	<0.1	ND	ND	ND	0.01	0.35	2.1	ND	11.54	ND	ND	ND	6.7	ND
	ND	<i>P. vulgaris</i> SC 10950	100	ND	9.6	24	ND	ND	87	-0.1	0.83	0.05	0.035	ND	26	ND	ND	ND	ND	7.4	ND
1.2	ND	<i>Pseudomonas multi-philis</i> HD1275, GN12873	100	7.0	32	26	3.0	4.0	2.0	ND	4.6	25	0.58	1.87	25.6	23.5	+	-	26,000	9.2	ND

Tabla 6.9
GRUPO 2e: Cefalosporinas que son inhibidas por el clavulanato (CEP-Y).

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis										Constante de Inhibición (μ M)				Inhibida por		P.M.	pI	Clase Molecular
			IOK	IOI	PLN	AMP	CARB	CLIK	TAX	TAZ	AZI	IMP	CA	SUL	AZI	CLOX	pCMH	LDTA			
II	Chr	<i>Bacillus cereus</i>	100	220	240	160	ND	220	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,300	ND	+	22,500	8,3	B	
	Chr	<i>Flavobacterium odoratum</i> GN14053	100	690	210	480	150	ND	1,100	<1	<1	1,060	>100	>100	>100	ND	+	26,000	5,8	ND	
	ND	<i>Legionella gormanii</i> ATCC 33297	100	160	7	69	19	17	45	ND	<1	5	>100	>100	ND	+	+	25,000	10,5	ND	
I.1	ND	<i>Pseudomonas multiphila</i> GN12873	100	83	1,700	970	770	700	120	ND	ND	400	>100	24,5	ND	229	-	+	116,000	6,9	ND

Tabla 6.10
GRUPO 3: Metalo- β -lactamasas (MET-N).

Enzima	Producción	Hospedador Original	Porcentaje de hidrólisis										Constante de Inhibición (μ M)				Inhibida por		P.M.	pI	Clase Molecular
			PLN	AMP	CARB	CLOX	CLIK	IOI	TAX	TAZ	AZI	IMP	CA	SUL	AZI	CLOX	pCMH	LDTA			
LCR-1	Chr	<i>Alcaligenes faecalis</i> GN14061	100	94	64	69	<1	<1	<1	ND	<1	1	>100	>100	>100	154	ND	+	29,000	5,9	ND
	Chr	<i>Bacteroides fragilis</i> G-237	100	120	130	120	38	42	31	ND	ND	180	>100	>100	ND	46	+	ND	26,000	4,8	ND
	Chr	<i>Clostridium butyricum</i>	100 ^a	91	97	8	20	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	>1,000	+	ND	85,000	4,4-4,5	ND
	Chr	<i>Pseudomonas cepacia</i> 249	100	ND	83	54	3,9	<0,1	ND	<0,1	<0,1	<0,1	>50	>400	ND	>100	-	ND	33,500	ND	ND
	pMG76	<i>P. aeruginosa</i> 2293E	100 ^a	150	4	3	55	24	ND	9	ND	ND	100	ND	ND	<100	-	ND	44,000	5,85, 6,5	ND

Tabla 6.11
GRUPO 4: Penicinasas que no son inhibidas por el clavulanato (PEN-N)

Se ha reportado la presencia de Zn en la cefalosporinasa L2 de *P. maltophilia*; sin embargo, su inhibición con ácidos bóricos sugiere que es una enzima serfínica, por lo que se incluye en este grupo y no en el de las metaloenzimas.

GRUPO 3: Metaloenzimas que son inhibidas por EDTA, restaurándose su actividad con la adición de un catión divalente, usualmente Zn^{2+} (tabla 6.10). Ninguna de las enzimas hasta ahora descritas en este grupo, son inhibidas por el clavulanato, ni parecen tener un sitio serfínico. Las enzimas de *Flavobacterium* y L1 de *P. maltophilia* se caracterizan en esta clase por su fuerte hidrólisis sobre el imipenem.

No obstante que la β -lactamasa II de *B. cereus* se ha estudiado extensamente como un prototipo de este grupo, es posible que sea el único miembro de la clase molecular B. Hasta ahora, parece que cada metaloenzima tiene propiedades moleculares muy diferentes, por lo que es improbable un origen común.

GRUPO 4: Penicilinasas que no son inhibidas por el clavulanato (penicilinasas no usuales). Cuatro de estas enzimas presentan alto grado de hidrólisis con carbenicilina y oxacilina (tabla 6.11). Debido a las características presentes en algunas de ellas se cree que pertenecen a una clase molecular aún no establecida.

Esta clasificación comprende tanto el aspecto funcional como el estructural. Es una recopilación muy completa de datos aislados obtenidos por diferentes métodos bajo diferentes condiciones y, aunque posiblemente podrían existir algunos cambios en la clasificación al ser examinadas más a fondo estas enzimas, representa una base para evaluaciones de β -lactamasas aún no descubiertas.

CONCLUSIONES

- 1) Todo parece indicar que las β -lactamasas se originaron a partir de una transpeptidasa.
- 2) Las nuevas β -lactamasas provienen de mutaciones puntuales ocurridas en los genes originales.
- 3) Hasta ahora se han propuesto cuatro clases estructurales de β -lactamasas; pero, en un futuro se espera la incorporación de otras que incluyan a las β -lactamasas no catalogadas.
- 4) Hacen falta estudios para determinar la función de cada uno de los aminoácidos que constituyen el sitio activo de las β -lactamasas.
- 5) Es evidente la necesidad de estandarizar los métodos de estudio asociados al análisis de las β -lactamasas para que la comparación de los resultados sea representativa.
- 6) Es recomendable delimitar todos los factores involucrados en la resistencia de los microorganismos para hacer posible el desarrollo de nuevos antibióticos y estrategias de ataque más eficaces.
- 7) Es indispensable desarrollar métodos más efectivos para determinar con mayor exactitud la capacidad de los agentes que inactivan a las β -lactamasas frente a los antibióticos de las nuevas generaciones.
- 8) Si se lograra una represión estable, los antibióticos existentes en la actualidad serían suficientes para resolver el problema clínico que representa la derrepresión de las cefalosporinas cromosomales.

9) Aunque aún no existe el inhibidor ideal, ya se cuenta con algunos cuya actividad es complementaria; cabe señalar que el papel de dichos inhibidores es el de neutralizar la acción de un extenso grupo de β -lactamasas y darle uso nuevamente a numerosos antibióticos que, por ser actualmente ineficaces, han dejado de emplearse como tratamiento.

10) Aún no se ha podido encontrar un inhibidor adecuado para las metalo- β -lactamasas, las cuales poseen mecanismos de acción diferentes a las enzimas serínicas.

11) Es necesario llevar a cabo estudios epidemiológicos en nuestro país para determinar que tipo de microorganismos y β -lactamasas causan mayores problemas.

12) La realización de antibiogramas cuantitativos es suficiente para establecer tratamientos eficaces; lo anterior implica que, en el laboratorio clínico, no es indispensable la caracterización de las β -lactamasas involucradas en cada caso.

BIBLIOGRAFIA

1. Ambler R.P. (1980) The structure of β -lactamases. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 289:321-331.
2. Amicosante G., Oratore A., Franceschini N., Maccarrone M., Strom R., Galleni M. and Frere J.M. (1988) *C. diversus* ULA 27 β -lactamases. Biochem. J. 254:885-890.
3. Amicosante G., Marinuci M.C., Franceschini N., Tizzani M.I. and Oliva B. (1987) Fractionation and characterization of two β -lactamases in *C. diversus* ULA 27 strain by chromatofocusing. J. Chromatography. 403:366-372.
4. Barthélé M. y M., Peduzzi J. and Labia R. (1988) Complete aminoacid sequence of p453-plasmid-mediated PIT-2 β -lactamase (SHV-1) Biochem J. 251:73-79.
5. Bayer A.S., Selecky M., Babel K., Hirano L., Yih J. and Parr T.R. (1987) Bactericidal interactions of a β -lactam and β -lactamase inhibitors in experimental *P. aeruginosa* endocarditis caused by a constitutive overproducer of type Id β -lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 31(11):1750-755.
6. Bellido F., Vladoian I.R., Auckenthaler R., Juter S., Ivacker P., Then R.L. and Pechere J.C. (1989) Permeability and Penicillin-Binding Protein alterations in *Salmonella muenchen*: Stepwise resistance acquired during β -lactam therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 33(7):1113-1115.
7. Bicknell R., Schoffer A., Waley S.G. and Auld D.S. (1986) Changes in the coordination geometry of the active-site metal during catalysis of benzylpenicillin hydrolysis by *B. cereus* β -lactamase. Biochemistry. 25:7208-7215.
8. Bicknell R., Emanuel E.L., Gagnon J. and Waley S.G. (1985) The production and molecular properties of the zinc β -lactamase of *Pseudomonas maltophilia* 11D 1275. Biochem. J. 229:791-797.
9. Bicknell R. and Waley S.G. (1985) Crioenzymology of *B. cereus* β -lactamase. Biochemistry. 24:6876-6887.
10. Blake II R.C., Vassal R.F. and Blake D.A. (1989) The Michaelis constants of a nonchromogenic substrate may be determined using chromogenic substrate. Archives of Biochem. and Biophysics. 272(1):52-68.
11. Bowden G. (1990) Folding and aggregation of β -lactamase in the periplasmic space of *E. coli*. J. Biol. Chem. 265(28),16760-16766.

BIBLIOGRAFIA

12. Brock T. (1978)
BIOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS.
Ed. Omega
Segunda Edición
(Barcelona, España).
13. Brown J., Yang Y. and Livermore D.M. (1989) *In vitro* activity of tigemonam, an oral monobactam, against Gram negative rods, including variants in β -lactamase-production. J. Antimicrob. Chemother. 23:201-207.
14. Bush K. (1989) Characterization of β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 33:259-263.
15. Bush K. (1989) Clasificación de β -lactamases: Groups 1, 2a, 2b and 2b'. Antimicrob. Agents Chemother. 33:264-270.
16. Bush K. (1989) Clasificación de β -lactamases: Groups 2a, 2d 2c, 3 and 4. Antimicrob. Agents Chemother. 33:271-276.
17. Bush K., Smith S.A., Tanaka S.K. and Bonner D.P. (1988) Inactivation of β -lactamases from *E. cloacae* by monophosphams. J. Antimicrob. Chemoter. 22:801-809.
18. Bush K., Tanaka S.K., Bonner D.F. and Sykes R.B. (1985) Penetration of β -lactam-antibiotics into *E. cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 27:555-560.
19. Bush K., Freudenberg J.S. and Sykes R.B. (1982) Interaction of aztreonam and related monobactams with β -lactamases from Gram negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 22:414-420.
20. Campbell J.L.A., Seahill S., Gison T. and Ambler R.P. (1989) The phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* sp108 encodes an indigenous class A β -lactamase. Biochem. J. 260:803-812.
21. Cartwright S.J., Tan A.K. and Fink A.L. (1989) Trapping the acyl-enzyme intermediate in β -lactamase I catalysis. Biochem. J. 263:905-912.
22. Cartwright S.J. and Waley S.G. (1987) Cryoenzymology of β -lactamases. Biochemistry. 26:5329-5337.
23. Cartwright S.J. and Waley S.G. (1984) Purification of β -lactamases by affinity chromatography on phenylboronic acid-agarose. Biochem. J. 221:505-512.
24. Collatz E., Than Van Nhieu G., Billot-Klein D., Williamson R. and Gutmann L. (1989) Substitution of serine for arginine in position 162 of TEM-type β -lactamases extends the

BIBLIOGRAFIA

substrate profile of mutants enzymes, TEM-7 and TEM-101 to ceftazidime and aztreonam. *Gene*. 78:349-354.

25. Crompton E., Cuthbert B.K., Lowe G. and Waley S.G. (1988) β -lactamase inhibitors. The inhibition of serine β -lactamases by specific boronic acids. *Biochem. J.* 251:453-359.

26. Curtis A.C.N., Eisentadt, Rudd Ch. and White A.J. (1986) Inducible tipe I β -lactamases of Gram negative bacteria and resistance to β -lactam antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother.* 17:51-61.

27. Charnas R.L. and Knowles J.A. (1981) Inhibition of RTEM β -lactamase from *E. coli* interaction of the enzyme with derivatives of olivanic acid. *Biochemistry*. 20:2732-2737.

28. Chopra I. (1984) Antibiotic resistance resulting from decreased drug accumulation. *British Med. Bull.* 40(1):11-17.

29. Christensen H., Martin M.T. and Waley S.G. (1990) β -lactamases as fully efficient enzymes. *Biochem. J.* 266:853-861.

30. Citri N., Samuni A. and Zyk N. (1976) Acquisition of substrate-specific parameters during the catalytic reaction of penicillinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:1048-1052

31. Dale J.W., Godwin D., Mossakow D., Stephenson P. and Wall S. (1985) Sequence of the OXA-2 β -lactamase: Comparison with other penicillin-reactive enzymes. *FEBS Lett.* 191(1):39-42.

32. Daum R.S., Murphey-Corb M., Shapira E. and Dipp S. (1988) Epidemiology of ROB β -lactamase among ampicillin resistant *H. influenzae* isolates in United States. *J. Infect. Dis.* 157(3):450-455.

33. Davies R.B. and Abraham E.P. (1974) Metal cofactor requirements of β -lactamase I. *Biochem. J.* 143:129-135.

34. De Meester F., Joris B., Lenzini M.B., Dehottay P., Erpicium T., Dusart J., Klein D., Ghuysen J.M., Frere J.M. and Betumen J. (1987) The active sites of the β -lactamases of *S. cacaoi* and *S. albus G*. *Biochem. J.* 244:427-432.

35. De Meester F., Frere J.M., Waley S.G., Cartwright S.J., Virden R. and Lindberg F. (1986) 6- β -iodopenicillanate as probe for the classification of β -lactamases. *Biochem. J.* 239:575-580.

36. Dideberg O., Charlier P., Wery J.P., Dehottay P., Dusart J., Erpicium T., Frere J.M. and Ghuysen J.M. (1987) The crystal structure of the β -lactamase of *S. albus G* at 0.3mm resolution. *Biochem. J.* 245:911-913.

BIBLIOGRAFIA

37. Diver J.M., Thornber D. and Wise R. (1989) Protection of piperacillin and ticarcillin from β -lactamase hydrolysis by tazobactam (YTR 830) and clavulanic acid. 24(1):89-92.
38. Doern G.V., Daum G.S. and Tubert T.A.. (1987) Ampicillin disk diffusion susceptibility testing of *H. influenzae*. J. Clin. Microbiol. 25:1675-1678.
39. Doran J., Leskiw K.B., Aippersbach S. and Jensen J. (1990) Isolation and characterization of a β -lactamase inhibitory protein from *S. clavuligerus* cloning and analysis of the corresponding gene. J. Bacteriol. 172(9):4909-4918.
40. Duez C., Frere J.M., Klein D., Noel M. and Ghuyssen J.M. (1981) The exocellular β -lactamase of *Streptomyces albus* G. Biochem. J. 193:75-82.
41. Eliasson I., Holst E., Molstad S. and Kamme C. (1990) Emergence and persistence of β -lactamase producing bacteria in the upper respiratory tract in children treated with β -lactam antibiotics. Amer. J. Med. 88(5A):51-55.
42. Emanuel E.L., Gagnon J. and Waley S.G. (1986) Structural and kinetic studies on β -lactamase K1 from *Klebsiella aerogenes*. Biochem. J. 234:343-347.
43. Everett R. (1990) Induction of the *C. freundii* group-1 β -lactamase in *E. coli* is not dependent on entry of β -lactam into the cytoplasm. Antimicrob. Agents Chemother. 34(12):2429-2432.
44. Fantin B., Pangon B., Petel G., Caron F., Vallee E., Vallois J.M., Mohler J., Phillipon A. and Carbon C. (1990) Activity of sulbactam in combination with ceftriaxone *in vitro* and in experimental endocarditis caused by *E. coli* producing SHV-2-like β -lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 34:581-586.
45. Faraci W.S. and Pratt R.F. (1987) Nucleophilic reactivation of the PC1 β -lactamase of *S. aureus* and the DD-peptidase of *Streptomyces* R61 after their inactivation by cephalosporins and cephamycins. Biochem. J. 246:651-658.
46. Farmer T.H. Reading C. (1988) The effects of clavulanic acid and sulbactam on β -lactamase biosynthesis. J. Antimicrob. Chem. 22:105-111.
47. Fink A.L., Behner K.M. and Than A.K. (1987) Kinetic and structural characterization of reversibly inactivated β -lactamase. Biochemistry. 26:4248-4258.
48. Fisher J., Charnas R.L., Bradley S.M. and Knowles J.R. (1981) Inactivation of the RTEM β -lactamase from *E. coli*. Interaction of penam sulfones with the enzyme. Biochemistry. 20:2726-2731.
49. Freere J.M. and Joris B. (1988) β -lactamases as the main resistance factor penicillin-related antibiotics. Ann. Biol. Clin. 46(2):151-156.

BIBLIOGRAFIA

50. Fung-Tome J., Dougherty T.J., Deorio F.J., Simich-Jacobson V. and Kessler R.E. (1989) Activity of cefepime against ceftazidime and cefotaxime-resistant Gram negative bacteria and its relationship to β -lactamase levels. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(4):498-502.
51. Gal S., Tar A., Frommer-Filep M., Toth-Martinez B.L., Hernadi F.J. and Kiss L. (1987) Use of chromatofocusing for separation of β -lactamasas. *J. Chromatog.* 403:217-224.
52. Galdes A., Hill A.O., Waley S.G. and Abraham E.P. (1980) The H-Nuclear-Magnetic Resonance spectroscopy of cobalt (II)- β -lactamase II. *Biochem. J.* 187:789-795.
53. Galleni M. and Frere J.M. (1988) A survey of the kinetic parameters of class C β -lactamases (penicillins). *Biochem. J.* 255:119-122.
54. Galleni M. and Frere J.M. (1988) A survey of the kinetic parameters of class C β -lactamases (cephalosporins and other β -lactam compounds) *Biochem. J.* 255:123-129.
55. Galleni M., Lindberg F., Normark S., Cole S., Honore N., Joris B. and Frere J.M. (1988) Sequence and comparative analysis of three *E. cloacae* ampC β -lactamase genes and their products. *Biochem. J.* 250:753-760.
56. Goto Y. and Fink A.L. (1989) Conformational states of β -lactamase: Molten-globule states acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry.* 28:945-952.
57. Govardhan Ch.P. and Pratt R.F. (1987) Kinetics and mechanism of the serine β -lactamase catalyzed hidrolisis of depsipectides. *Biochemistry.* 26:3385-3395.
58. Graham M.N. and Mantle T.J. (1989) Purification of class A-type β -lactamase from a derepressed strain of *E. cloacae*. *Biochem. J.* 260:705-710.
59. Gutmann L., Ferre B., Goldstein F.W., Rizk N., Pinto-Schuster E. and Collatz E. (1989) SHV-S, a novel SHV-type β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:951-956.
60. Gutmann L., Kitzis M.D., Yamabe S. and Acar J.F. (1986) Comparative evaluation of a new β -lactamase inhibitor YTR 830, combined with different β -lactam antibiotics against bacteria arboring known β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29(5):955-957.
61. Hackbarth C.J. and Chambers H.F. (1989) Meticillin-resistant staphylococci detection methods and treatment of infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(70):995-999.
62. Hakenbeck R., Ellerbrok H., Briese T., Handwerker S. and Tomasz A. (1986) PBP_s of penicillin-susceptible and Penicillin-resistant *Pneumococci*. *Agents Chemother.* 30(4):553-558.

BIBLIOGRAFIA

63. Hamilton-Miller J.M.T. (1982) β -lactamases and their clinical significance. *J. Antimicrob. Chemother.* 9,suppl.B:11-19.
64. Herzberg O. and Moulton J. (1987) Bacterial resistance to β -lactam antibiotics. Crystal structure of β -lactamase from *S. aureus* PC1 at 2.5 Å resolution. *Science.* 236:694-701.
65. Higashitani F., Hyodo A., Ishida N., Inoue M. and Mitsuhashi S. (1990) Inhibition of β -lactamases by tazobactam and *in vitro* antibacterial activity of tazobactam combined with piperacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 25:567-574.
66. Hiraoka M., Okamoto R., Inoue M. and Mitsuhashi S. (1989) Effects of β -lactamases and omp mutation on susceptibility to β -lactam antibiotics in *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:382-386.
67. Huovinen P., Havinen S. and Jacoby G. (1988) Sequence of PSE-2 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(1):134-136.
68. Jacob J., Joris B., Lepage S., Dusart J. and Frere J.M. (1990) Role of the conserved amino acids of the "SDN" loop (Ser 130, Asp131 and Asn132) in a class A β -lactamase studied by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 271:399-406.
69. Jacobs M.R., Aronoff S.C., Shlaes D.M. and Yamabe S. (1986) Comparative activities of the β -lactamase inhibitors YTR 830, clavulanate and sulbactam combined with ampicillin and broad-spectrum penicillins against defined β -lactamase-producing aerobic gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:980-985.
70. Jaurin B. and Grundstrom T. (1981) ampC cephalosporinase of *E. coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(8):4897-4901.
71. Jones R.N., Barry A.J., Packer P.R., Gregory W.W. and Thornsberry C. (1987) *in vitro* antimicrobial spectrum, occurrence of synergy and recommendations for dilution susceptibility testing concentrations of the cefoperazone-sulbactam combination. *J. Clin. Microbiol.* 25:1725-1729.
72. Joris B., Ghuyens J.M., Dive G., Renard A., Dideberg O., Charlier P., Frere J.M., Kelly J.A. and Boyinton J.C. (1988) The active-site-serine penicillin recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. *Biochem. J.* 250:313-324.
73. Joris B., De Meester F., Galleni M., Frere J.M. and Van Beeumen J. (1987) The K1 β -lactamase of *K. pneumoniae* Biochem. J. 243:561-567.
74. Joris B., De Meester F., Galleni M., Masson S., Dusart J., Frere J.M., Van Beeumen J., Bush K. and Sykes R. (1986) Properties of class A β -lactamase from *S. marcescens*. *Biochem. J.* 239:581-586.

BIBLIOGRAFIA

75. Joris B., De Meester F., Galleni M., Reckinger G., Coyette J. and Frere J.M. (1985) The β -lactamase of *E. cloacae* P99. *Biochem. J.* 228:241-248.
76. Joris B., Dusart J., Frere J.M., Van Daeunen J., Emanuel E.L., Petursson S., Gagnon J. and Waley S.G. (1984) The active site of the P99 β -lactamase from *E. cloacae*. *Biochem. J.* 223:271-274.
77. Kernodle D.S., Stratton Ch.W., Mc Murray L.W., Chipley J.R. and Mc Graw P.A. (1989) Differentiation of β -lactamase variants of *S. aureus* by substrate hydrolysis profiles. *J. Infect. Dis.* 159(1):103-108
78. Kitzis M.D., Billot-Klein D., Goldstein F.W., Williamson R., Tran Van Nhieu G., Charlet J., Acar J.F. and Gutmann F. (1988) Dissemination of the novel plasmid-mediated β -lactamase CTX-1 which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins and its inhibition by β -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(1):9-14.
79. Knap K.A. and Pratt R.F. (1987) Inactivation of the thiol RTEM-1 β -lactamase by 6- β -bromopenicillanic acid. *Biochem. J.* 247:29-33.
80. Knott-Hunziker V., Peterson S., Jayatilake G.S., Waley S.G., Jaurin B. and Grundstrom T. (1982) Active sites of β -lactamases. *Biochem. J.* 201:621-627.
81. Knott-Hunziker V., Orlek B.S., Sammes P.G. and Waley S.G. (1980) Kinetics of inactivation of β -lactamase I by 6-bromopenicillanic acid. *Biochem. J.* 187:797-802.
82. Kobayashi S., Arai S., Hayashi S. and Sakaguchi T. (1989) *in vitro* effects of β -lactams combined with β -lactamase inhibitors against methicillin resistant *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:331-335.
83. Kobayashi S., Arai S., Hayashi S. and Sakaguchi T. (1988) Simple assay of β -lactamases with agar medium containing a chromogenic cephalosporin, pyridinium-2-azo-p-dimethylaniline Chromofore (PADAC). *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1040-1045.
84. Kraut J. (1977) Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:331-358.
85. Labia R., Morand A., Tiwari K., Pitton J.S., Sirot D. and Sirot J. (1988) Kinetic properties of two plasmid mediated β -lactamase from *K. pneumoniae* with strong activity against third-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 21:301-307.
86. Labia R. (1982) Moxalactam: An oxa- β -lactam antibiotic that inactivates β -lactamases. *Rev. Infect. Dis.* 4(supl.):5529-5535.
87. Lamiet A.A. and Pluckthun A. (1989) The precursor of β -lactamase: purification properties and folding kinetics. *EMBO J.* 8(5):1469-1477.

BIBLIOGRAFIA

88. Lenfant F., Labia R. and Masson J.M. (1990) Probing the active site of β -lactamase RTEM-1 by informational suppression. *Biochimie*. 72:495-503.
89. Leonard F., Andremont A., Leclercq B., Labia R. and Tancrede C. (1989) Use of β -lactamase-producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization. *J. infect. Dis.* 160(2):274-280.
90. Little C., Emanuel L., Gagnon J. and Waley S. (1986) Identification to an essential glutamic acid residue in β -lactamase II from *B. cereus*. *Biochem. J.* 223:465-469.
91. Livrelli V.O., Darfeuille-Richaud A., Rich CH.D., Joly B.H. and Martel J.L. (1988) Genetic determinant of the ROB-1 β -lactamase in bovine and porcine *Pasteurella* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1282-1284.
92. Magwick P.J. and Waley S.G. (1987) β -lactamase I from *Bacillus cereus*. *Biochem. J.* 248:657-667.
93. Martin M.T. and Waley S.G. (1988) Kinetics characterization of the acyl-enzyme mechanism for β -lactamase I. *Biochem. J.* 254:923-925.
94. Medeiros A. (1984) β -lactamases. *British Med. Bull.* 40(1):18-27.
95. Mett H., Schacher B. and Wegmann L. (1988) Ultrasonic desintegration of bacteria may lead to irreversible inactivation of β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 22:293-298.
96. Mobashery S., Lerner S.A. and Jhonston M. (1988) Monitoring β -lactamase activity *in vivo* By ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 32:1196-1203.
97. Monks J. and Waley SG (1988) Imipenem as substrate and inhibitor of β -lactamases. *Biochem. J.* 253:323-328.
98. Moosden F., Williams J.D. and Yamabe (1988) Antibacterial characteristics of YTR 830 a sulfone β -lactamase inhibitor compared with those of clavulanate and sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(6):925-927.
99. Moosden F., Keeble J. and Williams J.D. (1986) Induction/inhibition of chromosomal β -lactamases by β -lactamase inhibitors. *Rev. Infect. Dis.* 8(5):562-567.
100. Murakami K., Masayoshi D. and Yoshida T. (1986) 7- α -formylamino substituent confers β -lactamase-inactivating potency on 1-oxacephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:447-452.

BIBLIOGRAFIA

101. Murphy B.P. and Pratt R.F. (1989) A tiono- β -lactam substrate for the β -lactamase II of *B. cereus*. *Biochem. J.* 258:765-768.
102. Murphy B.P. and Pratt R.F. (1988) Evidence for an oxyanion hole in serine β -lactamases and DD-peptidases. *Biochem. J.* 256:669-672.
103. Myers J.L. and Shaw R.W. (1989) Production, purification and spectral properties of metal-dependent β -lactamases of *B. cereus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 995:264-272.
104. Nagy E., Hajdu E. and Foldes J. (1988) Antimicrobial activity of cefoperazone with clavulanic acid of sulbactam against *Enterobacteriaceae* 21:701-703.
105. Neu H.C. (1985) The role of β -lactamase inhibitors in chemotherapy. *Pharma. Ther.* 30:1-18.
106. Nichols W.W. and Hewinson R.G. (1989) Sonication can reduce β -lactamase activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 24(1):81-82.
107. Nichols W.W. (1987) The time course of hydrolysis of β -lactam antibiotic by intact Gram negative bacteria possessing a periplasmic β -lactamase. *Biochem. J.* 224:509-513.
108. Nikaido H. and Normark S. (1987) Sensitivity of *E.coli* to various β -lactams: A quantitative predictive treatment. *Mol. Microbiol.* 1(1):29-36.
109. Novik R.P. (1962) Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83:236-240.
110. Oefner C., D'arcy A.D., Daly J.J., Gubernator K., Charnas R.L., Heinze I., Ubschwerlen C. and Winkler F.K. (1990) Refined crystal structure of β -lactamase from *C. freundii* indicates a mechanism for β -lactam hydrolysis. *Nature* 343:284-288
111. Oliva B., Benett P.M. and Chopra I. (1989) Penicillin- Binding Protein 2 is required for induction of the *C. freundii* class I chromosomal β -lactamase in *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(7):1116-1117.
112. Ouellette M., Paul G.C., Philippon A.M. and Roy P.H. (1988) Oligonucleotide probes (TEM-1,OXA-1) vs. isoelectric focusing in β -lactamase characterization of 114 resistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:397-399.
113. Patterson J.E. and Zervos M.J. (1989) Susceptibility and bactericidal activity studies of four β -lactamase-producing enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(2):251-253.
114. Pedersen S.S., Koch Ch., Hoby N. and Rosendal K. (1986) An epidemic spread of multiresistance *P. aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *J. Antimicrob. Chemother.* 17:505-516.

BIBLIOGRAFIA

115. Pollock M.R. (1965) Purification and properties of penicillinases from two strains of *Bacillus licheniformis*: A chemical, physicochemical and physiological comparison. *Biochem. J.* 94:666-675.
116. Pratt R.F. and Govardhan Ch.P. (1984) β -lactamase-catalysed hydrolysis of acyclic depsipeptides and acyltransfer to specific amino acid acceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1302-1306.
117. Pratt R.F., McConnell T.S. and Murphy S.J. Accumulation of acyl-enzyme intermediates during turnover of penicillins by the class A β -lactamase of *S. aureus* PC1. *Biochem. J.* 254:919-922.
118. Prince A., Wood M.S., Cacalano G.S. and Chin N.X. (1988) Isolation and characterization of a penicillinase from *P. cepacea* 249. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(6):838-843.
119. Reneberg J. and Walder M. (1989) The role of β -lactamase in mixed infection in mice in relation to treatment with ampicillin. *J. Infect. Dis.* 160(2):337-341.
120. Richmond M.H. and Sykes R.B. (1973) The β -lactamases of G (-) bacteria and the possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* 9:31-88.
121. Rizwi R., Tan K.A., Fink A.L. and Virden R. (1989) Clavulanate inactivation of *S. aureus* β -lactamase. *Biochem. J.* 258:205-209.
122. Sabath L.D. and Abraham E.P. (1966) Zinc as cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem. J.* 98:11c-13c.
123. Sanchez-Pescador R., Stempien M.S. and Urdea M.S. (1988) Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1 β -lactamase-mediated penicillin resistance in *N. gonorrhoeae* and other bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 26(10):1934-1938.
124. Sanders C.C. (1987) Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:573-593.
125. Sanders C.C., Iaconis J.P., Bodey G.P. and Samonis G. (1988) Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(9):1365-1369.
126. Sanders C.C. (1984) Inducible β -lactamases and non-hydrolytic resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 13:1-3.
127. Sauer M.J., Foulkes J.A. and O'Neil P.M. (1989) A comparison of alkaline phosphatase, β -galactosidase, penicillinase and peroxidase used as labels for progesterone

determination in milk by heterologous microtitre plate Enzyme Immuno Assay. *J. Steroid. Biochem.* 33(3):423-431.

128. Selwyn S. (1980)

THE β -LACTAM ANTIBIOTICS: PENICILLINS AND CEPHALOSPORINS IN PERSPECTIVE.

Ed. Hooper & Stoughton
(London, G.B.)

129. Shlaes D.M. and Little J.R. (1988) Cefoxitin-aztreonam antagonism: Lack of correlation with induction of β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 21:673-686.

130. Shu-Shyang K. and Teng-Yung F. (1989) Iodometric method for detection of β -lactamase activity in yeast cell carrying ampicillin resistance gene in chimeric plasmids. *Anal. Biochem.* 177:165-167.

131. Simonet M., Moittle D., Philippon A., Descamps Ph. and Veron M. (1989) Synergy of clavulanic acid, sulbactam and tazobactam (YTR 830) with amoxycillin against 50 β -lactamase-producing strains of *H. influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 23(5):798-800.

132. Stobbering E.E. (1988) Induction of chromosomal β -lactamase by different concentration of clavulanate in combination with ticarcillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 21:9-16.

133. Sutton B.J., Artymiuk P.J., Cordero-Borboa A.E., Little C., Phillips D.C. and Waley S.G. (1987) An x-ray-crystallographic study of β -lactamase II from *B. cereus* at 0.35 nm resolution. *Biochem. J.* 248:181-188.

134. Tanizawua K., Santoh K. and Kanaoka Y. (1989) Diketene analogs as β -lactamase inhibitor. *Chem. Pharm. Bull.* 37(3):824-825.

135. Then R.L. and Angehrn P. (1982) Trapping of non-hydrolysable cephalosporins by cephalosporinases in *E. cloacae* and *P. aeruginosa* as possible resistance mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21(5):711-717.

136. Thomson K.S., Weber D.A., Sanders Ch.C. and Sanders W.E. (1990) β -lactamase production in members of the family *Enterobacteriaceae* and resistance to β -lactam-enzyme inhibitor combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(4):622-627.

137. Tsukamoto K., Tashibana K., Yamazaki N., Ishii Y., Ujiie K., Nishida N. and Sauai T. (1990) Role of lysine-67 in the active site of class C β -lactamase from *C. freundii* GN346. *Eur. J. Biochem.* 188:15-22.

138. Tsukamoto K., Nishida N., Teuruoka M. and Tetsuo S. (1990) Function of the conserved triad residues in the class C β -lactamase from *C. freundii* GN346. FEBS. 271(1,2):243-246.
139. Todd-Sanford (Quinta edición)
DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO.
Ed. Salvat Editores S.A
(España)
140. Vedel G., Picard B., Paul G., Philippon A., Gilly L., Krishnamoorthy and Nevot P. (1989) Analysis of the molecular relatedness of four extended spectrum β -lactamases (SHV-2, SHV-3, SHV-4 and SHV-5) by comparative protein titration curves. J. Antimicrob. Chemother. 24:9-17.
141. Vu H. and Nikaido H. (1985) Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of the a β -lactamase-constitutive *E. cloacae* strain to expended-spectrum β -lactams. Antimicrob. Agents Chemother. 27(3):393-398.
142. Walton D.T. (1989) Fluorescent-antibody-negative penicillinase-producing *N. gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 27(8):1885-1886.
143. Weber A.D. and Sanders C.C. (1990) Diverse potential of β -lactamase inhibitors to induced class I enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 34(1):156-158.
144. Weinbren M.J. and Perinpanayagam R.M. (1985) Test for β -lactamase production. LANCET. 2:673-674.
145. Wise R. (1982) β -lactamase inhibitors. J. Antimicrob. Chemother. 9(suppl.B):31-40.
146. Woodnutt G., Kernutt I. and Mizen L. (1987) Pharmacokinetics and distribution of ticarcillin-clavulanic acid (timetin) in experimental animals. Antimicrob. Agents Chemother. 31(11):1826-1830.
147. Yotsuji A., Mitsuyama J., Hori R., Yasuda T., Saikawa I., Inove M. and Mitsuhashi S. (1988) Mechanism of action of cephalosporins and resistance caused by decreased affinity for Penicillin-Binding-Proteins in *B. fragilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 32(12):1848-1853.