



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA BETALACTAMASA TLA-1 EN COMPLEJO CON TAZOBACTAM

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

CÉSAR ALBERTO GONZÁLEZ GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL

**DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

COMITÉ TUTOR

**DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM
DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

CUERNAVACA, MORELOS. SEPTIEMBRE, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

El presente trabajo se realizó en el grupo de Bioquímica Estructural perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Enrique Rudiño Piñera. El presente trabajo fue apoyado con una beca de maestría por CONACyT (número 431647), y apoyo financiero por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM (proyecto IN209920).

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a mi familia, porque siempre creyeron que lo lograría, y, a pesar de todas las adversidades, siempre estuvieron alentándome. Los amo.

A Jess, el amor de mi vida. No pude tener una mejor compañera de vida. No existen palabras para expresar lo agradecido que estoy contigo.

Agradecimientos

A mi *alma mater*, la UNAM, por haberme brindado las herramientas y facilidades para poderme desarrollar profesionalmente.

Al Instituto de Biotecnología, donde he entablado amistad y he aprendido mucho de personas con una gran calidad profesional y humana.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por la confianza que me tuvo al aceptarme, las grandes enseñanzas que me dejó, la libertad para trabajar sobre mi proyecto y los consejos tanto académicos como personales.

Al Dr. Lorenzo Segovia Forcella y la Dra. Nina Pastor Colón por haber sido parte de mi comité de tutores y por las sugerencias y retroalimentación obtenida en beneficio del proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Jesús Silva Sánchez, Dra. Liliana Pardo López, Dra. Lilián González Segura, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dr. Víctor Bustamante Santillán, por haber aceptado ser mis sinodales y por las correcciones y sugerencias muy oportunas que pulieron el escrito.

Al M. en C. Francisco Murphy Pérez (*aka* Murpholino Peligro) por «todo» ... (él sabe que es «todo»).

A la M. en C. Lizbeth García Villegas y la M. en C. Arisbeth Almeida Juárez porque fueron quienes me animaron a seguir adelante y me contactaron con el Dr. Enrique.

A la M. en C. Arisbeth por su ayuda en la parte de purificación de proteínas y en general sus excelentes consejos en beneficio del proyecto.

A los miembros del grupo de Bioquímica Estructural por las sugerencias y comentarios que me dieron en los seminarios de mi proyecto.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero y el Dr. Ricardo Miranda Blancas por la ayuda en la colecta de datos.

A CONACyT por haberme apoyado con la beca de estudios de maestría.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	6
Los antibióticos a través de la historia	6
Tipos de antibióticos	7
Antibióticos betalactámicos.....	8
Frecuencia de consumo de los betalactámicos	10
Resistencia a agentes antimicrobianos	11
Tipos de resistencia a antibióticos	13
Betalactamasas	15
Clasificación de las betalactamasas	16
Sistema Ambler (clasificación molecular)	16
Sistema Bush-Medeiros-Jacoby (clasificación por grupos funcionales).....	17
Serinobetalactamasas	17
Betalactamasas de clase A	18
Betalactamasas de espectro extendido (ESBL).....	20
Inhibidores de betalactamasas	21
TLA-1: ESBL de interés en México.....	23
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
General	29
Específicos	29
MÉTODOS	30
Diseño del plásmido.....	30
Transformación bacteriana	30
Condiciones de cultivo para la expresión de TLA-1.....	31
Purificación de TLA-1	31
Concentración de TLA-1 y cambio de amortiguador.....	32
Cristalización de TLA-1	32

Remojado de los cristales de TLA-1 en tazobactam.....	33
Determinación de la estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam	33
Análisis de la estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Expresión y Lisis Celular	36
Cristalización de TLA-1 en complejo con tazobactam	38
Remojado de los cristales de TLA-1 con el inhibidor tazobactam	40
Determinación de la estructura de TLA-1 – tazobactam en LANEM y ALBA.....	40
Comparación de las estructuras determinadas en el LANEM y ALBA	44
Modelado del inhibidor tazobactam en el sitio activo de TLA-1	44
Modelo estructural de TLA-1 en complejo tazobactam	47
Interacciones entre TLA-1– TZB	48
Comparación entre TLA-1– TZB y TLA-1 <i>apo</i>	49
Comparación entre las interacciones TLA-1 – TZB con otras estructuras depositadas en el PDB de betalactamasas con tazobactam	51
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	55
REFERENCIAS.....	56

RESUMEN

Las betalactamasas son uno mecanismos de resistencia de mayor interés a nivel mundial debido al aumento de enfermedades causadas por microorganismos multirresistentes. En México se aisló una cepa de *Escherichia coli* que expresa una betalactamasa que hidroliza una amplia gama de antibióticos (TLA-1). Previo a esta tesis, se determinó el modelo cristalográfico de TLA-1 silvestre y en complejo con ácido clavulánico, el cual mostró 2 moléculas del inhibidor aciladas en Ser70 y Ser237, fenómeno no reportado previamente. También se determinó la estructura de la mutante en la serina catalítica (S70G) en complejo con sulbactam, y se observó el intermediario *trans*-enamino, lo que indica la presencia de una serina catalítica diferente a la serina «canónica». El objetivo de este proyecto consistió en la determinación estructural por cristalografía de TLA-1 en complejo con tazobactam, un inhibidor más voluminoso y eficiente en términos de K_i que el sulbactam y el ácido clavulánico. Se obtuvo el modelo cristalográfico con resolución de 2.22 Å y R / R_{free} de 19.39 / 23.40. En el modelo se observa una prolongación de la densidad electrónica sobre la Ser70, lo cual sugiere la presencia del inhibidor covalentemente unido en su forma *trans*-enamino. Sobre la Ser237, el único cúmulo de densidad electrónica se ajustó a una molécula de sulfato. Posiblemente el tazobactam no tenga afinidad sobre la Ser237 o el sulfato presente en las condiciones de cristalización podría tener más afinidad que el tazobactam (pero no más que el ácido clavulánico). La orientación del tazobactam en su forma *trans*-enamino es similar a las encontradas en otras estructuras de betalactamasas reportadas en el PDB. Las únicas diferencias encontradas son las siguientes: 1) el grupo sulfonilo, que, a pesar de encontrarse en una posición diferente, contiene interacciones con residuos similares; y 2) el grupo triazol, que contiene una interacción π - π con la cadena lateral de la His170, que no se observa en otras betalactamasas en complejo con tazobactam reportadas en el PDB. Por otra parte, el grupo sulfonilo del tazobactam se encuentra interaccionando con los residuos Trp105, Arg132 y His170, por lo que se sugiere que son importantes para el reconocimiento del inhibidor con la betalactamasa.

ABSTRACT

β -lactamases are one of the most globally significant mechanisms of resistance due to the dramatic increase in diseases caused by multidrug-resistant microorganisms. In Mexico, a strain of *Escherichia coli* that expresses TLA-1, a β -lactamase that hydrolyzes a broad range of antibiotics, was isolated. Prior to this thesis, the crystallographic model of wild-type TLA-1 and with clavulanic acid was determined, revealing two acylated inhibitor intermediates at Ser70 and Ser237, a phenomenon not reported before. The structure of the catalytic serine mutant (S70G) in complex with sulbactam was also determined, and the *trans*-enamine intermediate was observed, indicating the presence of a non-canonical catalytic serine. The objective of this project was to determine the crystallographic structure of TLA-1 in complex with tazobactam, a bulkier and more efficient inhibitor in terms of K_i than sulbactam and clavulanic acid. A crystallographic model was obtained with a resolution of 2.22 Å and R/Rfree of 19.39/23.40. In the crystallographic model, an extension of electron density is observed that extends over Ser70, suggesting the presence of the covalently bound inhibitor in its *trans*-enamine form. On Ser237, the only electron density cluster fitted a sulfate molecule. Possibly, tazobactam does not have affinity for Ser237, or the sulfate present under the crystallization conditions could have higher affinity than tazobactam (but not higher than clavulanic acid). Nevertheless, the results of this work do not rule out the possibility of tazobactam binding to the second catalytic serine, although other crystallization conditions allowing it should be explored. Regarding Ser70, the orientation of tazobactam in its *trans*-enamine form is similar to those found in other β -lactamase structures reported in the PDB. The only differences found are as follows: 1) the sulfonamide group, which despite being in a different position, has interactions with similar residues, and 2) the triazole group, which has a π - π interaction with the side chain of His170, an interaction not observed in other β -lactamases in complex with tazobactam reported in the PDB. On the other hand, the sulfonamide group of tazobactam interacts with Trp105, Arg132, and His170 residues, suggesting their importance in inhibitor recognition by this β -lactamase.

INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos son probablemente una de las formas de terapia química más importantes en la historia de la medicina. Históricamente, los antimicrobianos han salvado muchas vidas, contribuyendo significativamente al control de enfermedades infecciosas, que han sido una de las principales causas de morbilidad y mortalidad durante la mayor parte de la existencia humana (Aminov, 2010). Desde mediados del siglo XX, grandes avances en el desarrollo de fármacos han inclinado la balanza en favor de los humanos. Con respecto a las infecciones bacterianas, uno de los avances con mayor impacto fue la síntesis y distribución masiva de la penicilina en la década de los 40s, que disminuyó en gran medida la tasa de mortalidad por infecciones bacterianas (Gaynes, 2017). No obstante, la gran capacidad de supervivencia de los microorganismos, acelerada por la presión de selección ocasionada por el uso indebido de los fármacos, entre otras causas, ha provocado que la humanidad se encuentre enfrentando uno de los más grandes retos en cuanto a la guerra contra microorganismos patógenos: la resistencia a antimicrobianos. La resistencia a antimicrobianos surge cuando los microorganismos cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos, lo que hace más difícil el tratamiento de las infecciones, aumenta el riesgo de propagación de enfermedades, la aparición de formas graves de éstas y como consecuencia del número de muertes (OMS, 2020).

Las bacterias pueden manifestar resistencia a antibióticos a través de mecanismos que se pueden (Bush, 2013a; Cifuentes-Castro *et al.*, 2020)propagar rápidamente en una gran variedad de géneros bacterianos (Reygaert, 2018; Tenover, 2006). Unos de los principales mecanismos de resistencia a antibióticos es la adquisición de genes que codifican enzimas que destruyen el agente antibacteriano antes de que pueda realizar su acción, tal es el caso de las betalactamasas. Las betalactamasas son enzimas cuyo mecanismo de acción, como su nombre lo indica, consiste en inactivar los antibióticos betalactámicos. El estudio de las betalactamasas es de gran importancia puesto que los antibióticos betalactámicos son los más utilizados en la práctica clínica. Además, existe una gran cantidad de

betalactamasas reportadas en pacientes con infecciones bacterianas multirresistentes (Bush, 2013).

A inicios de los 90s, en la Ciudad de México se aisló una cepa multirresistente de *Escherichia coli* en un paciente con infección en vías urinarias (Silva *et al.*, 1999). La cepa contiene un plásmido que codifica para una betalactamasa no caracterizada previamente, a la cual se le denominó TLA-1 (en honor a los Tlahuicas, civilización prehispánica que habitó en Morelos, lugar donde se encuentra el grupo de investigación que caracterizó esta betalactamasa). TLA-1 se agrupó dentro de la familia betalactamasas de espectro extendido (ESBL, por sus siglas en inglés), ya que fue capaz de hidrolizar betalactámicos voluminosos como las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima, entre otros) (Silva *et al.*, 2000). Además, Silva y colaboradores determinaron los parámetros de inhibición de TLA-1 con ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, y se encontró que la constante de inhibición, (K_i , concentración requerida para producir la mitad de la inhibición máxima) para tazobactam tiene valores más bajos comparados con el sulbactam y ácido clavulánico, lo cual indica que TLA-1 es inhibida más fuertemente por tazobactam que por sulbactam y ácido clavulánico.

La determinación estructural de TLA-1 se realizó en el grupo de Bioquímica Estructural del Instituto de Biotecnología de la UNAM, utilizando la técnica de cristalografía de proteínas por difracción de rayos X (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020). El análisis estructural de TLA-1 mostró resultados peculiares, como la conformación *trans* del enlace peptídico 166-167, característico de las betalactamasas de subclase A2, lo que sumado a una inserción entre las horquillas β_3 y β_4 aumentan el tamaño del bolsillo catalítico, lo cual podría explicar la capacidad de degradar cefalosporinas más voluminosas (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2000). Por otra parte, la determinación estructural del complejo TLA-1 con ácido clavulánico mostró dos intermediarios del inhibidor covalentemente unidos en diferentes residuos: Ser70 —la serina catalítica «canónica»— y Ser237. Este sorprendente hallazgo muestra la presencia de un probable segundo sitio de acilación en TLA-1, fenómeno que no se había

reportado previamente para ninguna betalactamasa (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020).

Gallardo (2020), en su tesis de maestría, determinó el complejo de la mutante de TLA-1 en la serina catalítica (S70G) con sulbactam, y observó el intermediario *trans*-enamino del sulbactam, lo cual indica la presencia de una serina catalítica a pesar de no tener la serina catalítica «canónica». No obstante, este último resultado difiere con el reportado por Cifuentes y colaboradores, quienes al determinar la estructura de la mutante S70G en complejo con ácido clavulánico, no encontraron ningún intermediario de ácido clavulánico cercano al sitio activo, aunque S70G sí tuvo actividad residual de betalactamasa (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020). Además, en el modelo estructural de la mutante S70G en complejo con sulbactam obtenido por Gallardo, la serina más cercana al carbonilo del betalactámico donde se llevaría a cabo el ataque nucleofílico no es la Ser237, como se presupondría, sino Ser130.

Estos resultados contrastantes dejan abierta la interrogante de cómo los inhibidores de betalactamasa se estarían posando en el sitio activo en ausencia y presencia de Ser70, lo que nos motiva a realizar la determinación estructural de TLA-1 silvestre en complejo con otros inhibidores de betalactamasa como el tazobactam, un inhibidor más voluminoso y eficiente para TLA-1. Con la obtención de la estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam podría ser posible comparar las interacciones entre los residuos de TLA-1 con los grupos funcionales de los distintos inhibidores de betalactamasas y tener un panorama más claro de los residuos que participan en la inhibición enzimática de TLA-1.

ANTECEDENTES

Los antibióticos a través de la historia

Los antibióticos son probablemente una de las formas más exitosas de terapia química en la historia de la medicina (Aminov, 2010). Incluso, antes de la producción y distribución masiva de antibióticos en todo el mundo, ya existían indicios de su utilización por la población humana desde hace más de mil años. Por ejemplo, se han encontrado restos de tetraciclina en los huesos de habitantes de la antigua Nubia sudanesa que se remontan a 350–550 d. C. (Bassett *et al.*, 1980), o la artemisina aislada de las plantas de Artemisia, recurrentemente usada por la medicina tradicional china desde hace miles de años (Cui & Su, 2009).

El paso determinante en la era moderna de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por parte de Alexander Fleming, quien sentó las bases para la producción y distribución masiva de la penicilina a mediados de los años 40s (Gaynes, 2017). La era dorada de los antibióticos comenzó entonces entre la década de los 40s y 60s con el descubrimiento de nuevos antibióticos provenientes de distintas fuentes (Tabla 1). Después de ese tiempo, comenzó una franca disminución en la obtención de nuevas clases de antibióticos (Aminov, 2010; Chopra *et al.*, 2002; Powers, 2004).

Tabla 1. Introducción de las principales clases de fármacos antibacterianos (Hutchings *et al.*, 2019; Powers, 2004).

	Año de introducción	Clase de fármaco
«Edad de oro» de los antibióticos	1935	Sulfonamidas
	1941	Betalactámicos
	1944	Aminoglucósidos
	1949	Cloranfenicol
	1950	Tetraciclinas
	1952	Macrólidos/Lincosamidas/Estreptograminas
	1956	Glicopéptidos
	1957	Rifamicinas
	1959	Nitroimidazoles
	1962	Quinolonas
	1968	Trimetroprima

2000	Oxazolidinonas
2003	Lipopéptidos
2011	Lipiarmicinas
2012	Diarilquinolinas

Tipos de antibióticos

La mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas puede categorizarse de acuerdo con su mecanismo de acción (Tenover, 2006). Existen 4 mecanismos de acción principales (Figura 1).

1. *Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos*: las quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacino) inhiben a la DNA girasa y topoisomerasa IV bacterianas, impidiendo que las hebras de DNA se vuelvan a unir después del paso de apertura del DNA. Las rifampicinas son una categoría amplia de antibióticos que se unen con alta afinidad a la RNA polimerasa procarionte e inhiben la transcripción.
2. *Inhibición de la síntesis de proteínas*: los macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina), estreptograminas (dalfopristina), fenicoles (cloranfenicol) y oxazolidinonas (linezolida) inhiben actuando sobre la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo el inicio de la traducción. Las tetraciclinas bloquean la subunidad 30S del ribosoma impidiendo el acceso del aminoacil-tRNA al ribosoma y los aminociclitoles se unen al componente 16S del rRNA.
3. *Inhibición de vías metabólicas*: Las sulfonamidas (sulfametoxazol) y los análogos de ácido fólico (trimetoprima) bloquean la vía de síntesis de ácido fólico, lo que resulta en la incapacidad de las bacterias para sintetizar purinas (Carpenter *et al.*, 2019; Drawz & Bonomo, 2010).
4. *Inhibición de la síntesis de pared celular*: los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas) y glicopéptidos (vancomicina) interfieren con pasos específicos en la síntesis de la pared celular. En específico, estos antibióticos interfieren con la acción de las transpeptidasas, o a través de la unión de las unidades de d-alanil-d-alanina e inhibiendo la síntesis de peptidoglicano. Los

betalactámicos suelen ser efectivos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, mientras que los glicopéptidos son más efectivos únicamente contra bacterias Gram positivas debido a la baja permeabilidad de la membrana externa hacia los glicopéptidos (Esmatabadi *et al.*, 2017; Tenover, 2006).

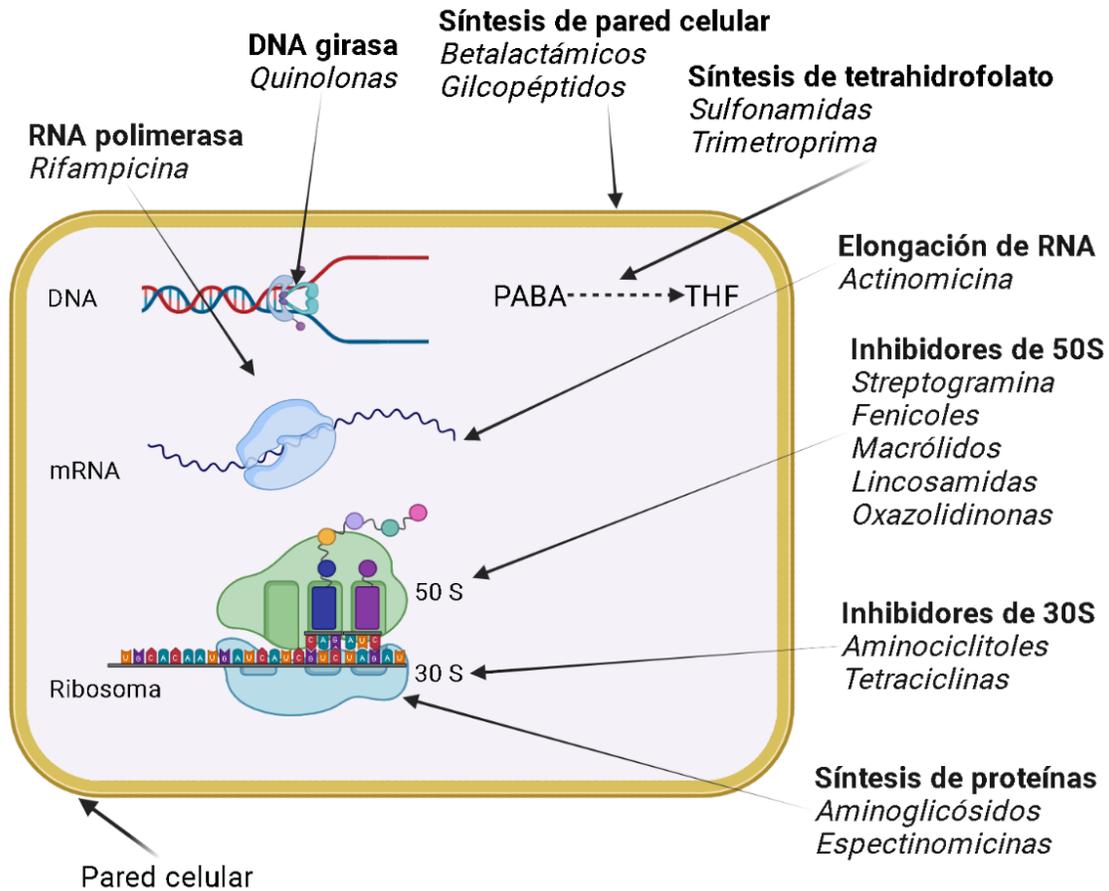


Figura 1. Mecanismos de acción de los antibióticos y fármacos representativos (modificado de Kapoor *et al.*, 2017; Peterson & Kaur, 2018). Figura realizada en BioRender.

Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Durante las etapas terminales de la biosíntesis de pared celular, las proteínas de unión a penicilina (PBP) son inhibidas por los antibióticos betalactámicos y con esto son incapaces

de efectuar el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas para formar peptidoglicano, resultando en la inhibición de la formación de la pared celular con la concomitante muerte de la bacteria por un aumento de presión osmótica. Esta inhibición se da mediante unión covalente del betalactámico en la serina catalítica de las PBP bacterianas (Suárez & Gudiol, 2009).

La presencia del anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos (Figura 2). No obstante, para que el anillo betalactámico sea activo, necesita contar con un grupo radical que suele ser un anillo secundario. La asociación de los diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias del esqueleto de los dos anillos (el betalactámico y el anillo secundario), definen a los compuestos resultantes y da lugar a los diferentes tipos de antibióticos (Suárez & Gudiol, 2009).

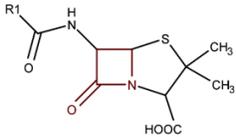
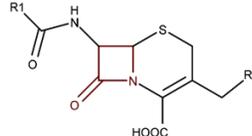
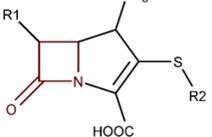
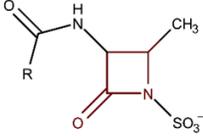
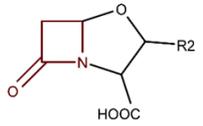
Estructura	Anillo secundario	Núcleo del betalactámico	Grupo antibiótico
	Anillo tiazolidínico	Ácido-6-aminopenicilánico	Penicilinas
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido -7- α -cefalosporínico	Cefalosporinas
	Anillo pirrolínico	Carbapenema	Carbapenémicos
	Ninguno	Monobactamo	Monobactámicos
	Anillo oxazolidínico	Clavama	Ácido clavulánico*

Figura 2. Estructura química de los distintos tipos de betalactámicos. En rojo se observa el anillo betalactámico que da el nombre al grupo de estos antibióticos. *El ácido clavulánico es un inhibidor de betalactamasas, no es un antibiótico (Suárez & Gudiol, 2009).

Frecuencia de consumo de los betalactámicos

Los betalactámicos siguen siendo los antibióticos más prescritos, tanto en atención primaria como en hospitales. En países como España y Estados Unidos, por citar unos ejemplos, reportan que los antibióticos betalactámicos representan más de la mitad del consumo de antibióticos totales (Bush & Bradford, 2016; Suárez & Gudiol, 2009). En México, los reportes del Plan Universitario contra la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) muestran que las cefalosporinas son los antibióticos de mayor consumo seguido por los carbapenémicos, ambos pertenecientes a la clase de los betalactámicos (PUIS, 2021) (Figura 3). Por otra parte, el uso de las penicilinas ha disminuido drásticamente, pues una gran cantidad de microorganismos han desarrollado resistencia a este antibiótico (Tabla 2) (López *et al.*, 2019).

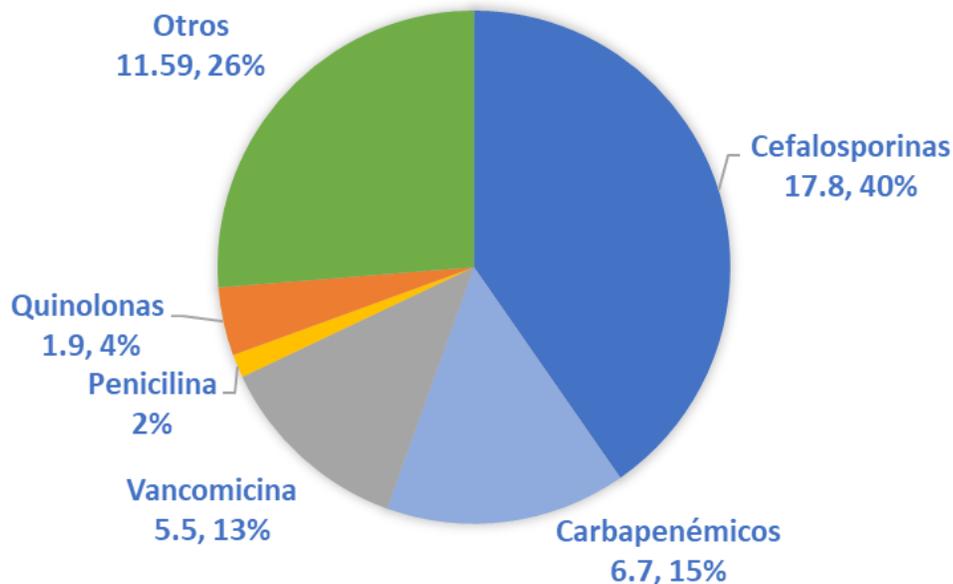


Figura 3. Consumo de antimicrobianos (Dosis definida diaria/100 estancias) reportada en los hospitales de la red PUCRA en 2020. En total, se reportaron 44.14 dosis ajustadas de antimicrobianos por cada 100 estancias.

Tabla 2. Porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos de aislados obtenidos en los hospitales de la red PUCRA. Pip/Tazo: piperacilina/tazobactam, Amp/Sulb: ampicilina/sulbactam (PUIS, 2021).

	% Resistencia (2017-2020)						
	Hemocultivo					Urocultivo	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter spp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	n= 5 922	n= 3 818	n= 1 741	n= 2 367	n= 1 320	n=118 448	n= 13 446
Ampicilina	85	—	—	—	—	80	—
Amikacina	3	4	36	17	0	3	3
Pip/Tazo	16	22	66	18	16	—	—
Cefepima	67	66	69	24	16	50	50
Ceftriaxona	67	66	—	24	32	50	50
Ertapenem	1	2	—	—	2	—	—
Meropenem	1	2	60	30	1	1	3
Ciprofloxacina	69	43	68	22	9	63	62
Tigeciclina	0	1	9	—	0	0	3
Colistina	0	0	0	0	0	0	0
Amp/Sulb	—	48	—	—	—	—	—

Resistencia a agentes antimicrobianos

A pesar de que la resistencia a antimicrobianos es un fenómeno que aparece de forma natural, los tiempos de aparición de la resistencia se han acortado de manera alarmante. Entre los principales factores de la resistencia a los antimicrobianos se encuentra: el uso indebido y excesivo de antibióticos; el uso de medidas deficientes de prevención y control de infecciones en los centros de salud; y el acceso deficiente a medicamentos, vacunas y medios de diagnóstico eficaces (OMS, 2020). Durante la pandemia por COVID-19, el uso indebido de antibióticos para tratar este padecimiento puede conducir a la aparición y propagación aceleradas de resistencia a los antimicrobianos (OPS, 2022). Es importante destacar que en el sector veterinario se utiliza una gran cantidad de antibióticos, lo que puede generar la aparición de microorganismos resistentes en los animales, y estos a su vez, pueden aumentar el riesgo de transmisión zoonótica de enfermedades causadas por microorganismos resistentes hacia la población humana (Teuber, 2001).

Los incrementos continuos en la resistencia a antimicrobianos disminuyen de sobremanera las opciones de tratamientos para los pacientes, y aumentan considerablemente los índices de morbilidad y mortalidad. El resultado es que ahora enfrentamos infecciones más severas que necesitan un tratamiento más extensivo y cursos más prolongados de la enfermedad, que a menudo requieren una hospitalización prolongada (Rodríguez *et al.*, 2019).

Por esta situación, la resistencia a antimicrobianos se ha vuelto una amenaza de alcance global. La OMS considera que, si los países no toman acciones para combatir la resistencia a antimicrobianos, para el 2050 el gasto adicional en salud ocasionado por el aumento de la resistencia a antimicrobianos ascenderá a 1.2 billones de dólares, y las muertes relacionadas con la resistencia antimicrobiana se estiman en 10 millones al año (actualmente 700 000 personas mueren por enfermedades farmacorresistentes). Con estas proyecciones, las muertes por resistencia a antimicrobianos superarán los fallecimientos por cáncer y se convertirán en la primera causa de fallecimiento por enfermedad (OMS, 2019).

Por las proyecciones comentadas anteriormente se considera que es importante la vigilancia global y local de microorganismos resistentes para la implementación de medidas de control de infección adecuadas y manejo de la enfermedad, sobre todo en los microorganismos resistentes a antibióticos que pertenecen al grupo ESKAPE (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*) con especies productoras de ESBL o carbapenemasas recibiendo consideración especial (Garza-González *et al.*, 2019).

En 2015 se aprobó un plan de acción mundial para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos, principalmente a antibióticos (OMS, 2016). En este plan se establecieron 5 objetivos: 1) mejorar el conocimiento y la comprensión acerca de la resistencia a los antimicrobianos a través de educación y formación efectivas; 2) reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación de la resistencia a antimicrobianos; 3) reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de la infección; 4) utilizar

de forma óptima los agentes antimicrobianos en la salud humana y animal; y 5) preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas entre otras intervenciones.

En México se publicó la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos, de aplicación obligatoria para todas las instituciones que integran el Sistema Nacional de Salud (DOF, 2018). En esta estrategia se establecen objetivos y líneas de acción encaminadas a controlar, reducir o en su caso, eliminar el riesgo que implica la resistencia a los antimicrobianos.

Asimismo, el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) es otra de las iniciativas más importantes en el país en el combate a los microorganismos multirresistentes. Este plan, liderado por la UNAM, cuenta con una red de varios institutos y hospitales representativos en el país. PUCRA considera la resistencia a antimicrobianos como un problema prioritario de salud pública y una amenaza al desarrollo humano y la seguridad nacional, y tiene como objetivo concientizar a la sociedad mexicana sobre el uso indebido de los antibióticos, además de disminuir hasta un 30 % el uso de antibióticos en 2024 en la Ciudad de México (López *et al.*, 2019).

Tipos de resistencia a antibióticos

Los mecanismos por los cuales las bacterias desarrollan resistencia a antimicrobianos se clasifican en cuatro categorías principales (Figura 4):

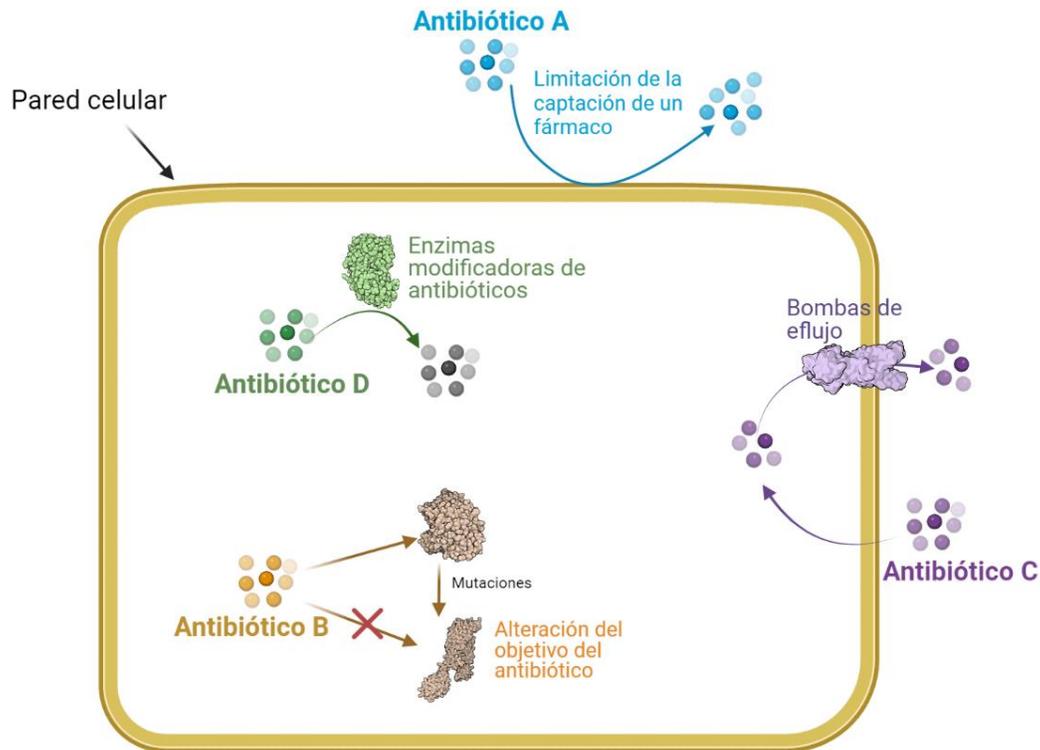


Figura 4. Principales tipos de resistencia a antimicrobianos (modificado de Reygaert, 2018). Figura realizada en BioRender.

Limitación de la captación del fármaco. La estructura de la capa del lipopolisacárido (LPS) en bacterias Gram negativas provee una barrera para ciertos tipos de moléculas que proporciona a las bacterias resistencia innata a ciertos grupos de antimicrobianos. Otro mecanismo que limita la captación de los fármacos es la disminución o cambio en la selectividad de las porinas, que son los canales proteicos responsables de introducir muchos compuestos (Kapoor *et al.*, 2017). Además, algunos microorganismos limitan la entrada de diversos compuestos formando una biopelícula que los protege no solo del sistema inmune del hospedero, sino que, además, proporciona protección contra los antimicrobianos.

Eflujo de antibióticos. Las bombas de eflujo son proteínas de membrana que exportan antibióticos desde la célula y mantienen concentraciones intracelulares de antibióticos en bajos niveles (Džidić *et al.*, 2008). Este mecanismo es común en

bacterias que presentan autorresistencia, y generalmente se da en conjunto con otros mecanismos de resistencia a antibióticos, como la modificación del antibiótico (Peterson & Kaur, 2018).

Alteración del objetivo farmacológico. Existen muchos componentes en las bacterias que son blanco de los antibióticos. Sin embargo, algunos de estos componentes pueden ser modificados por la bacteria, de tal manera que los antibióticos ya no son capaces de realizar su acción. Un ejemplo de este mecanismo de resistencia (sobre todo en bacterias Gram negativas) es mediante la alteración del número o la estructura de las PBP (enzima que ayuda a la formación de la pared celular, y blanco de los betalactámicos), lo que ocasiona que los betalactámicos sean incapaces de inactivar a estas enzimas «modificadas» (Reygaert, 2018). Otros componentes modificados por la bacteria y causantes de resistencia son las subunidades 30S y 50S, RNA polimerasa, y precursores de la pared celular, entre otros (Kapoor *et al.*, 2017).

Inactivación del fármaco. Algunas bacterias pueden contener enzimas que modifican covalentemente a los antibióticos y consecuentemente los inactiva. Este fenómeno de inactivación se da por dos vías principales: 1) agregando covalentemente grupos funcionales al antibiótico, tal es el caso de las aciltransferasas, fosfotransferasas, tioltransferasas, entre otras y 2) hidrolizando al antibiótico, tal es el caso de las esterasas de macrólidos, las epoxidasas y las betalactamasas (Wright, 2005).

Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas que se caracterizan por la capacidad para hidrolizar compuestos químicos que contienen el anillo betalactámico (Bush, 2018). Las betalactamasas constituyen una de las principales causas de resistencia a antibióticos. Su impacto clínico es particularmente crítico debido a que muchos tipos de infecciones suelen ser tratados con cefalosporinas y

carbapenémicos, dos betalactámicos que pueden ser inactivados por algunas familias de betalactamasas (Figura 3).

Clasificación de las betalactamasas

Existen dos principales esquemas de clasificación para categorizar las betalactamasas: el sistema Ambler y el sistema Bush-Medeiros-Jacoby (Figura 5) (Bonomo, 2017; Bush, 2018).

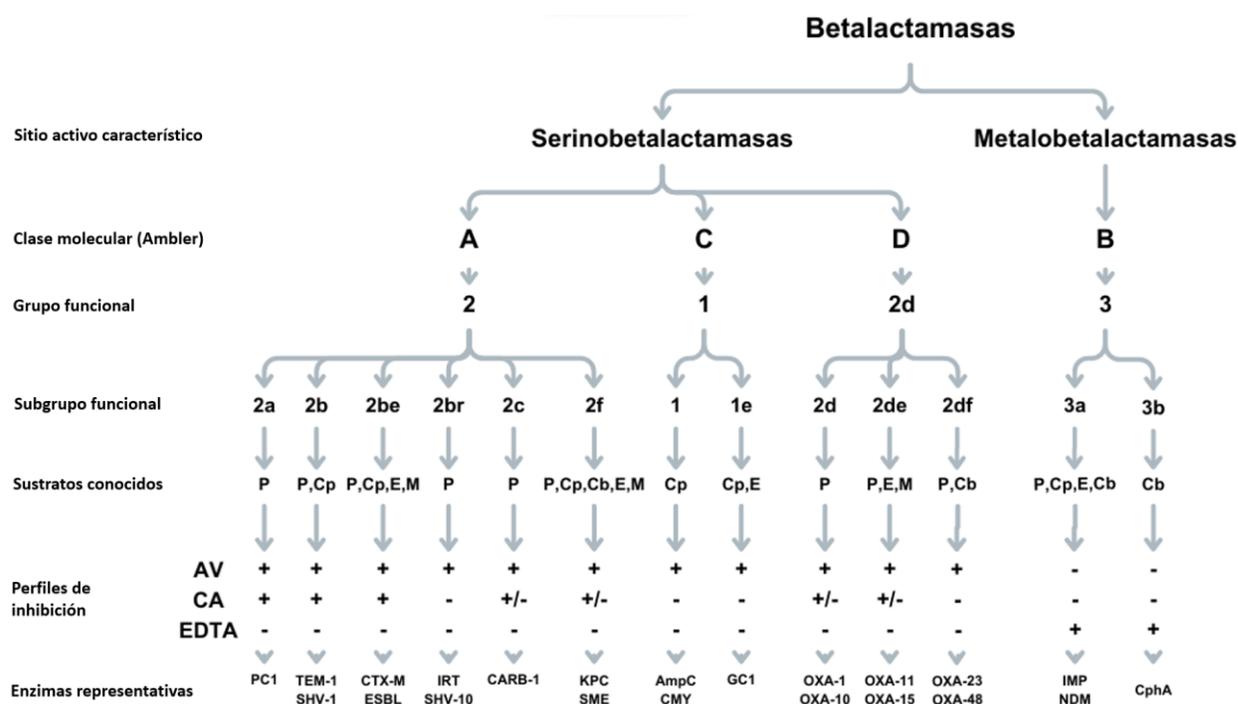


Figura 5. Relaciones moleculares y funcionales entre las betalactamasas. Relación entre las clasificaciones más utilizadas de las betalactamasas (Sitio activo, molecular y funcional) AV, avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, Carbapenemas; Cp, cefalosporinas; E, cefalosporinas de amplio espectro; M, monobactam; P, penicilina (Tomada y modificada de Bush, 2018).

Sistema Ambler (clasificación molecular)

El sistema Ambler, propuesto desde los 80s, se basa en la secuencia de aminoácidos y presencia de motivos conservados. En este sistema se establecen 4 clases moleculares: A, B, C y D. Bajo esta clasificación, las betalactamasas se

distinguen bioquímicamente en dos grandes divisiones de acuerdo al mecanismo de hidrólisis: las clases A, C y D son serinobetalactamasas, cuya característica principal es la formación un aducto acil-enzima con una serina en el sitio activo, mientras que la clase B comprende las metalobetalactamasas, estas últimas llevan a cabo la hidrólisis facilitada por uno o dos iones zinc esenciales en los sitios activos de la enzima (Ambler, 1980).

Sistema Bush-Medeiros-Jacoby (clasificación por grupos funcionales)

El sistema de clasificación Bush-Medeiros-Jacoby abarca una nomenclatura en la que los grupos funcionales se asocian con las clases moleculares (del sistema Ambler), aunque también toma en cuenta las características funcionales, basadas en sustratos betalactámicos clave y perfiles de inhibición para cada grupo de enzimas. Entre los sustratos utilizados para realizar esta clasificación se encuentran penicilinas y cefalosporinas de primera generación; mientras que para el perfil de inhibición se encuentra el EDTA y el ácido clavulánico (Bush *et al.*, 1995).

En la Figura 5 se puede observar la relación entre las diferentes clasificaciones de betalactamasas. La clase A pertenece al grupo funcional 2 (con excepción del grupo 2d); la clase B pertenece al grupo funcional 3; las cefalosporinasas de la clase C están alineadas con el grupo funcional 1; y por último la clase D pertenece al subgrupo 2d, definido originalmente como oxacilinasas por ser enzimas capaces de hidrolizar eficientemente la oxacilina o la cloxacilina (Bush, 2013).

Serinobetalactamasas

El mecanismo catalítico de las serinobetalactamasas comienza con la acilación del antibiótico betalactámico en la serina del sitio activo para dar un intermediario acil-enzima (con la posterior ruptura del anillo betalactámico). Posteriormente, el intermediario es deacilado mediante hidrólisis para completar el recambio enzimático, que culmina con el antibiótico betalactámico inactivado y el sitio activo disponible para acilar otra molécula de antibiótico betalactámico (Figura 6). El

paso de hidrólisis diferencia el mecanismo de las serinobetalactamasas de las PBP —estrechamente relacionadas evolutivamente, pero las PBP son pobremente capaces de la deacilación hidrolítica (Bush & Fisher, 2011).

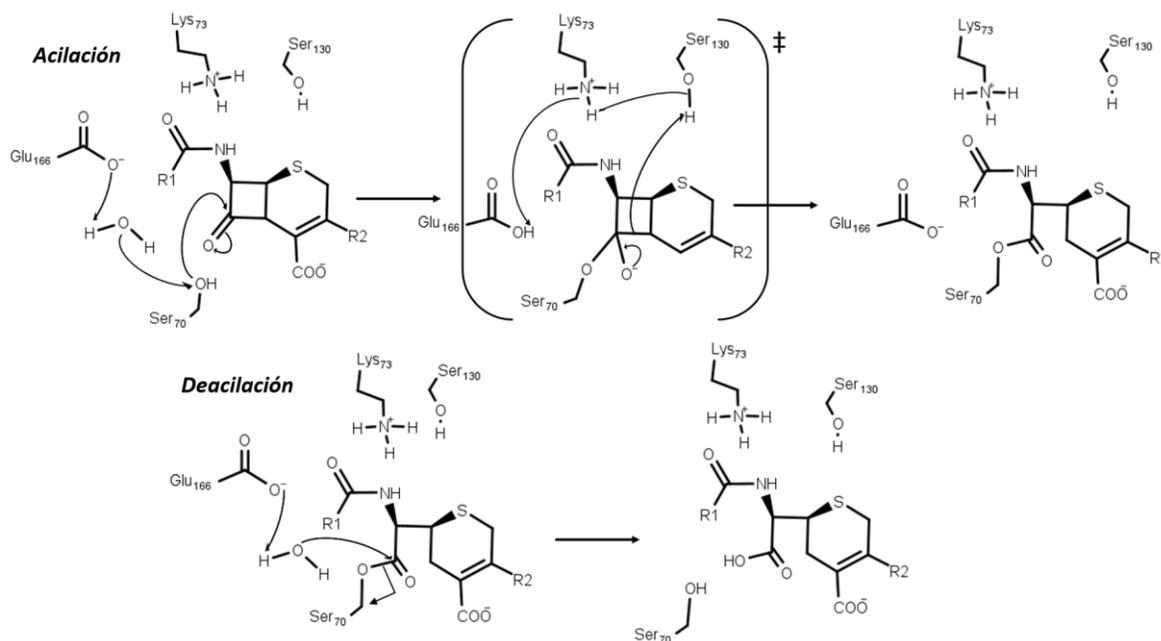


Figura 6. Mecanismo catalítico propuesto de una serinobetalactamasa de clase A con un betalactámico (cefalosporina) como sustrato (Cifuentes-Castro, 2018; Drawz & Bonomo, 2010). Figura realizada en el programa MarvinSketch.

Betalactamasas de clase A

Las betalactamasas de clase molecular A son el tipo de serinobetalactamasas más importante de resistencia a los betalactámicos, particularmente en bacterias gramnegativas (Philippon *et al.*, 2019). Su estructura general (al igual que las betalactamasas de clase C y las proteínas de unión a penicilina) comprende un dominio todo- α y un dominio α/β con el sitio activo situado en la intercara entre ambos dominios (Matagne & Frère, 1995).

Se han encontrado varios elementos en la vecindad del sitio activo que ayudan directa o indirectamente en el proceso catalítico o de reconocimiento del sustrato (Matagne & Frère, 1995). El esquema base de las betalactamasas de clase A consiste en enzimas que contienen los siguientes motivos de secuencia: 70Ser-X-

X-Lys, 130Ser-Asp-Asn, 234Lys-Thr-Gly y el residuo Glu166 (Figura 7). El primer motivo contiene la serina que participa en la catálisis (Ser70), y un giro de hélice después, se encuentra una lisina (Lys73) que apunta hacia el sitio activo y que se ha propuesto como base general para la deprotonación de Ser70. El segundo motivo, consta de un asa en el dominio todo- α , siendo los residuos 130Ser-Asp-Asn (para las betalactamasas de clases C y D los residuos más frecuentes son Tyr-X-Asn), Ser130 y Asn132 apuntan al sitio activo y parecen tener un rol en el proceso catalítico, mientras que Asp131 se encuentra enterrado en la proteína y parece tener un rol más estructural. Por último, el Glu166 es un residuo conservado que pertenece al asa omega y se cree que también participa activando una molécula de agua que posteriormente se encarga de la deprotonación de Ser70, este residuo solo se encuentra conservado únicamente en las betalactamasas de clase A (Matagne & Frère, 1995).

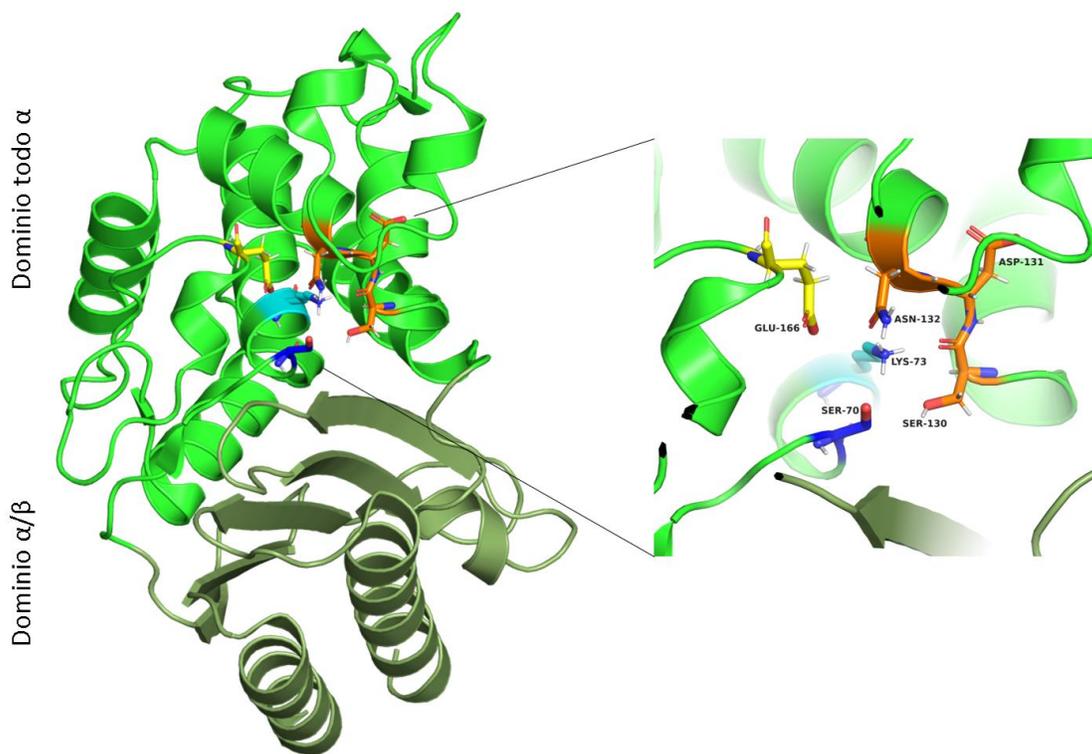


Figura 7. Representación de la estructura terciaria de una betalactamasa de clase A (TEM-1, PDB: 1M40). Se encuentran resaltados algunos de los residuos importantes $S_{70}XXK_{73}$ (azul y cian), el motivo SDN (naranja), y E166 (amarillo). Figura realizada en PyMOL.

Con más de 2000 enzimas identificadas, la diversidad de betalactamasas de clase A es muy vasta. Debido a la amplia variedad de betalactamasas de clase A, Phillipon y colaboradores han realizado una subclasificación de la clase A en 2 subtipos (A1 y A2) clasificando las proteínas con base en la presencia de otros residuos y motivos conservados (Phillipon *et al.*, 2016, 2019). Entre las betalactamasas de clase A más representativas encontradas en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* se encuentran las TEM, SHV y CTX-M (Bonomo, 2017).

Mecanismo de las betalactamasas de clase A

Una vez ubicado el antibiótico betalactámico en el sitio activo de la enzima, el primer paso para la hidrólisis es la activación del grupo hidroxilo de la serina catalítica, Ser70, por un residuo que actúa como base general ya sea Lys73 o la molécula de agua activada previamente por Glu166. En las β -lactamasas de clase A, Ser70 después de deprotonarse, realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del anillo betalactámico dando como resultado un intermediario tetraédrico acilado de alta energía. El siguiente paso es la protonación del nitrógeno del anillo β -lactámico que conduce a ruptura del enlace C-N y a la formación de la enzima acilada covalentemente, que adopta un estado de baja energía. El ataque por una molécula de agua catalítica lleva a un intermediario de deacilación de alta energía. con la consecuente hidrólisis de la unión del carbonilo betalactámico y el oxígeno de la Ser70. La deacilación regenera la enzima activa y libera el betalactámico inactivo (Matagne & Frère, 1995).

Betalactamasas de espectro extendido (ESBL)

En los últimos años ha existido aumento constante en la aparición de enfermedades resistentes a antimicrobianos causados por *E. coli* y *K. pneumoniae* cuya resistencia es mediada por betalactamasas. El aumento en la resistencia a betalactámicos de primeras generaciones ha propiciado el desarrollo de cefalosporinas de tercera y cuarta generación que cuentan con cadenas laterales más voluminosas (Drawz & Bonomo, 2010). No obstante, existen betalactamasas

que han desarrollado la capacidad de hidrolizar este tipo de antibióticos. Estas enzimas se denominan betalactamasas de espectro extendido (ESBL, por sus siglas en inglés: *Extended Spectrum Beta-Lactamases*).

Bush categorizó las ESBL en el grupo funcional 2be, donde se encuentran las betalactamasas capaces de hidrolizar los betalactámicos con el grupo aminotiazoleoxima (conocidos como «antibióticos de espectro extendido») y que son inhibidas por clavulanato (aunque este requisito parece ser menos importante) (Bush, 2020). La mayoría de ESBL son de clase A (o grupo 2 de la clasificación de Bush), aunque también existen ESBL de otras clases, como las oxacilinasas de la clase D. Las ESBL más comunes son variantes de betalactamasas tipo TEM, SHV y CTX-M, aunque existen otras ESBL encontradas en menor proporción como las betalactamasas PER, VEB, BES, BEL, SFO y TLA. Estas variantes resistentes a antibióticos de amplio espectro representan un grave peligro para la salud pública, puesto que suelen ser variantes de gran diseminación y poca capacidad de contención.

Inhibidores de betalactamasas

Una de las estrategias principales para combatir la resistencia mediada por betalactamasas es el uso de agentes diseñados para unirse al sitio activo. Este enfoque puede llevarse a cabo de dos formas: 1) crear sustratos que reversible o irreversiblemente se unan a la enzima con alta afinidad y que formen interacciones estéricas desfavorables acil-enzima o 2) desarrollar «inhibidores suicidas» (también llamados inhibidores basados en mecanismo) capaces inactivar permanentemente a las betalactamasas a través de interacciones covalentes en el sitio activo de la enzima (Drawz & Bonomo, 2010).

Los inhibidores suicidas con mayor disponibilidad comercialmente en el mercado son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y son administrados en combinación con betalactámicos (Figura 8) (Bush & Bradford, 2019; Drawz & Bonomo, 2010). El ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam comparten

similitudes estructurales con la penicilina; son efectivos contra algunas enzimas de clase A susceptibles, incluyendo ciertos ESBL; y son generalmente menos efectivos para las betalactamasas de clase B, C y D (Drawz & Bonomo, 2010).

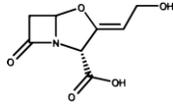
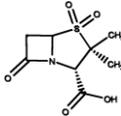
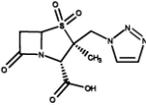
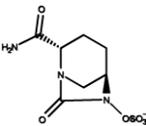
Estructura	Nombre	Subclase	Combinación con betalactámico	Fecha de aprobación
	Ácido clavulánico	Clavamo	Amoxicilina	1984
	Sulbactam	Sulfona de ácido penicilánico	Ampicilina	1986
	Tazobactam	Sulfona de ácido penicilánico	Piperacilina Ceftolozano	1993 2014
	Avibactam	DBO	Ceftazidima	2015

Figura 8. Inhibidores de betalactamasas disponibles comercialmente. DBO: diazabicyclooctano.

Los inhibidores suicidas de betalactamasas realizan este proceso a través de la formación del complejo acil-enzima estabilizado (Biondi *et al.*, 2011). Posterior al paso de asociación no covalente, S70 es acilado abriendo el anillo betalactámico del inhibidor. Esto continúa mediante la ruptura del enlace C–S abriendo el anillo oxazolidínico (ácido clavulánico) o tiazolidínico (sulbactam y tazobactam), con la formación de una especie imina (C=N). Posteriormente el intermediario imina se particiona en 3 vías: la tautomerización entre cis- y trans-enaminas; modificación covalente resultando en inhibición irreversible o hidrólisis que libera a la enzima (Figura 9) (Padayatti *et al.*, 2006).

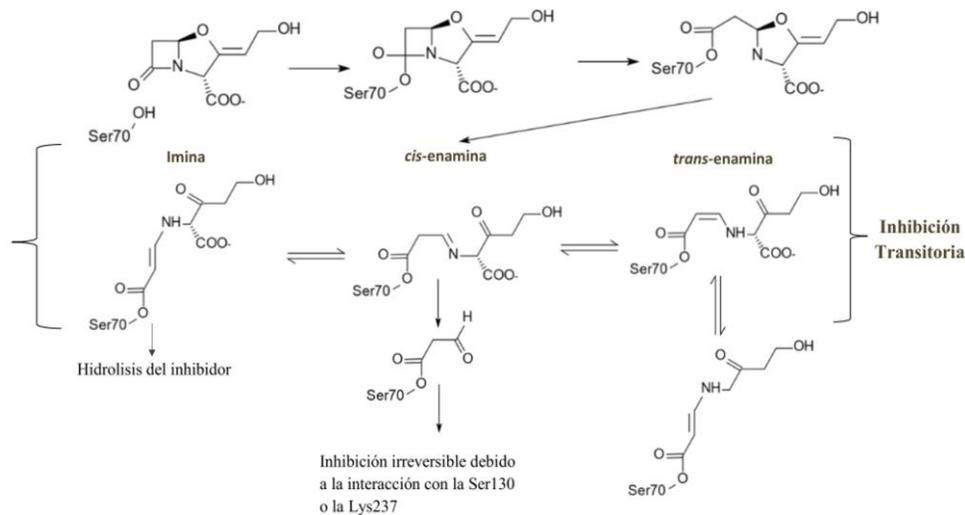


Figura 9. Mecanismo de inhibición de las betalactamasas por un inhibidor basado en mecanismo. Los resultados posibles son 3: inhibición transitoria, inhibición irreversible e hidrólisis del inhibidor y liberación de la enzima (Cifuentes-Castro, 2018; Padayatti et al., 2006).

El ácido clavulánico fue el primer inhibidor de betalactamasas introducido en la clínica. El clavulanato muestra baja actividad antimicrobiana *per se*, pero cuando se combina con amoxicilina disminuye los valores de concentración mínima inhibitoria contra varios microorganismos. El sulbactam y tazobactam son sulfonas de ácido penicilánico desarrolladas posteriormente por la industria farmacéutica en 1978 y 1980, respectivamente (Drawz & Bonomo, 2010). El sulbactam parece ser menos potente que el ácido clavulánico, aunque posee una actividad considerable contra microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Acinetobacter spp.* El tazobactam, por otra parte, contiene otro anillo de triazol (Figura 8). Este inhibidor tiene una potencia inhibitoria mayor que el sulbactam y un mecanismo de inhibición similar al del sulbactam y ácido clavulánico (Bush *et al.*, 1993).

TLA-1: ESBL de interés en México

Entre los años 1990 y 1993 se realizaron aislamientos de bacterias resistentes a cefalosporinas en diferentes hospitales de la Ciudad de México. En los aislados

bacterianos, se encontraron principalmente a las ESBL como principales causantes de la resistencia a cefalosporinas (Silva *et al.*, 1999). Las ESBL más frecuentes fueron las derivadas de SHV (una de las betalactamasas más diseminadas en todo el mundo), sin embargo, cerca del 25% de las cepas aisladas fueron cepas no relacionadas a TEM/SHV (las dos familias de betalactamasas más comunes). Entre estas cepas resistentes no relacionadas a las cepas más comunes, se aisló una cepa de *E. coli* en un paciente con infección en vías urinarias. La cepa fue resistente a fármacos como aztreonam, ciprofloxacino, ofloxacino y a cefalosporinas de amplio espectro. Al tratar de descubrir la causa de la multirresistencia de esta cepa, Silva y colaboradores encontraron un plásmido que codifica para una betalactamasa no reportada ni caracterizada previamente, a la que se le denominó TLA-1 (Silva *et al.*, 2000).

TLA-1 es una enzima con masa atómica de 31.4 kDa y pI de 9. TLA-1, se agrupó dentro de la familia betalactamasas de espectro extendido (ESBL) ya que fue capaz de hidrolizar betalactámicos voluminosos como las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima, entre otros) (Silva *et al.*, 2000).

La estructura se determinó en el grupo de bioquímica estructural de la UNAM (PDB ID: 6NVT, resolución: 2.2 Å). Esta consistió en dos dominios, un dominio todo- α y el dominio α/β que contiene 5 hebras beta antiparalelas. El sitio activo se alojó en la intercara de los dos dominios y los motivos conservados y la molécula de agua deaciladora se encuentra en la misma posición relativa a otras betalactamasas de clase A.

También se observó una red de enlaces de hidrógeno que conectan la Arg220 al sitio activo idénticas a la betalactamasa PER-2, que es una betalactamasa de espectro extendido, con la excepción de la Ser237 que en PER2 es Thr237 (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020; Ruggiero *et al.*, 2014). Otros hallazgos importantes fueron una inserción entre las horquillas β_3 y β_4 , además de la conformación *trans* del enlace peptídico entre los residuos 166 y 167 lo que aumenta el tamaño del bolsillo catalítico y podría explicar la capacidad de TLA-1 de degradar

cefalosporinas más voluminosas (Figura 10) (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2000).

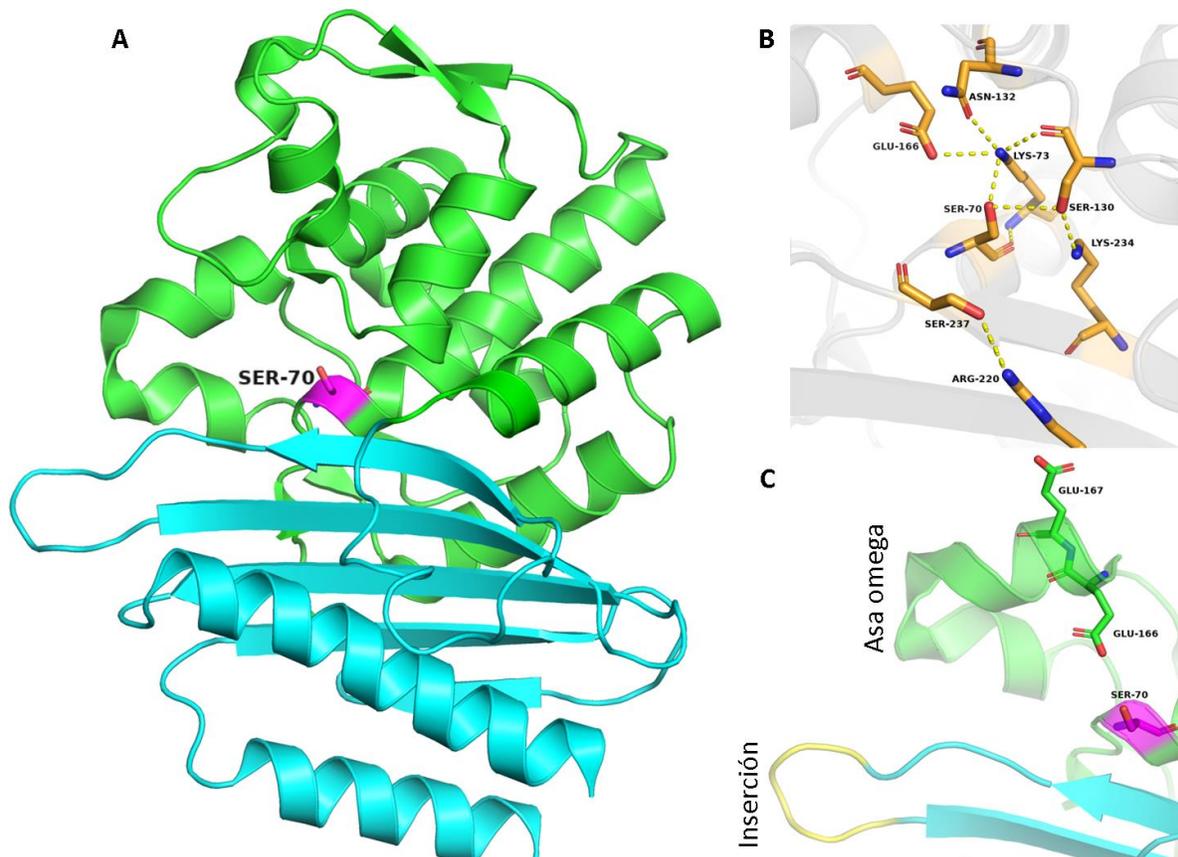


Figura 10. Modelo estructural de TLA-1 (PDB:6NVT). A) Dominio todas α (verde), dominio α/β (cian) y el residuo catalítico que se ubica entre ambos dominios Ser70(morado). B) Red de puentes de hidrógeno en el sitio activo de TLA-1. C) La inserción entre las hebras $\beta 3$ y $\beta 4$ (amarillo), sumado a la configuración *trans* entre los residuos 166 y 167 podrían provocar un aumento en el bolsillo catalítico. Figura realizada en PyMOL.

También en el grupo de Bioquímica estructural se determinó la estructura cristalográfica de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico a una resolución de 2.5 Å, en la que se observaron 4 moléculas de ácido clavulánico, dos de estas unidas covalentemente a TLA-1 (Figura 11) (PDB ID: 6NVU). La primera molécula de ácido clavulánico unida se encontró en forma del intermediario *trans*-enamina decarboxilada, y formando enlaces de hidrógeno con los nitrógenos de la cadena

principal de Ser70, Ser237; un anión sulfato y dos moléculas de agua. La segunda molécula de ácido clavulánico unida covalentemente se encontró en forma de otro intermediario, con el enlace oximinio ya roto, formando el aducto con la Ser237 y teniendo enlaces de hidrógeno con Arg220, y con una molécula de agua (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020).

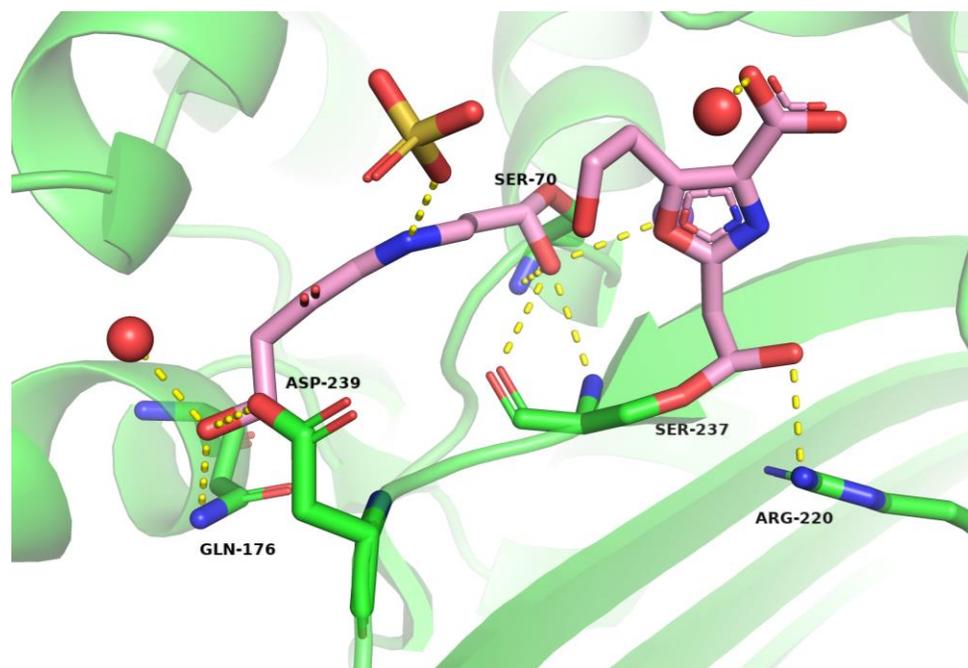


Figura 11. Observación de dos intermediarios de ácido clavulánico acilados covalentemente en Ser70 y Ser237 (rosado) en TLA-1 (PDB:6NVU). Figura realizada en PyMOL.

Comparando la posición del ácido clavulánico en el bolsillo catalítico en TLA-1 con modelos de acoplamiento molecular con la enzima PER-2 y la molécula de avibactam que se encuentra en la estructura cristalográfica de TLA-3 (Jin *et al.*, 2017; Ruggiero *et al.*, 2014), se encontró que al no tener una fracción R1 (como la cefotaxima, cefoxitina y avibactam) el ácido clavulánico sí podría posarse y permitir la formación del aducto con el sitio segundo sitio de acilación que se encuentra en TLA-1, es decir, con Ser237 (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020).

Se obtuvo también el modelo cristalográfico de la mutante en S70G, el residuo catalítico «canónico». Contrario a lo que se esperaba, no se encontró ningún

enlace covalente entre el inhibidor y la betalactamasa, aunque la mutante tenía actividad de betalactamasa (aunque muy baja). (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020) Posteriormente, en otro trabajo de maestría en el grupo de investigación, se obtuvo el modelo cristalográfico de la mutante S70G en complejo con sulbactam esperando obtener la unión covalente solamente en Ser237. No obstante, tampoco se encontró ninguna unión covalente entre TLA-1 y el sulbactam, aunque se observó el intermediario *trans*-enamino del sulbactam, sin embargo, en la estructura determinada por Gallardo, el residuo Ser130 se encuentra más cercano al carbono del carbonilo del sulbactam que el residuo Ser237 (Gallardo-Navarro, 2020).

Los resultados obtenidos en el grupo dejan abierta la interrogante sobre cómo se está uniendo TLA-1 con los inhibidores de betalactamasas. Esto nos motiva a realizar la determinación estructural de TLA-1 en complejo con tazobactam, que es un inhibidor más voluminoso que sulbactam y ácido clavulánico, y a su vez más eficiente.

JUSTIFICACIÓN

La creciente aparición de enfermedades causadas por microorganismos resistentes a antimicrobianos se ha vuelto motivo de gran preocupación en todo el mundo. De hecho, la OMS proyecta que para 2050, el gasto por las infecciones de microorganismos resistentes a antimicrobianos superará al gasto por enfermedades como el cáncer. Las betalactamasas han demostrado ser por mucho las principales causantes de resistencia bacteriana. En este sentido, los estudios de caracterización de diferentes betalactamasas permitirán obtener una mayor comprensión sobre el mecanismo de acción e inhibición de estas enzimas. También es importante realizar la caracterización bioquímica y el análisis estructural de betalactamasas que sean importantes en el país. Tal es el caso de la enzima TLA-1, una betalactamasa de espectro extendido que se ha expandido en varios hospitales en México. La obtención de la estructura de TLA-1 en complejo con todos los inhibidores clásicos proporcionará un mejor panorama sobre las interacciones que tienen estos inhibidores con la enzima, lo cual podría sentar bases para el desarrollo de nuevos fármacos, en caso de alguna eventual mutación que haga a la enzima resistente a los inhibidores de betalactamasas, y también nos puede ayudar a entender los mecanismos de resistencia a inhibidores (o como contienden las betalactamasas a inhibidores).

HIPÓTESIS

La estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam contendrá dos moléculas de inhibidor unidos covalentemente en el bolsillo catalítico de TLA-1.

OBJETIVOS

General

Determinación de la estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam mediante cristalografía por difracción de rayos X.

Específicos

- Purificación de la proteína TLA-1.
- Obtención cristales de TLA-1 y remojo con el inhibidor tazobactam.
- Obtención de los patrones de difracción de TLA-1 con resolución adecuada para analizar su estructura.
- Identificación y análisis de las diferencias estructurales entre las estructuras de TLA-1 en complejo con tazobactam.

MÉTODOS

Diseño del plásmido

En el grupo de Bioquímica Estructural del Instituto de Biotecnología de la UNAM se cuenta con el plásmido de expresión de TLA-1 (pJ411 + TLA-1, Figura 12) (Cifuentes-Castro, 2018; Cifuentes-Castro *et al.*, 2020). Este plásmido es de alto número de copias (ori pUC) y tiene un tamaño de 4848 pb. El plásmido contiene el gen que codifica para la betalactamasa TLA-1 sin péptido señal, bajo la influencia de un promotor fuerte (T7) y regulado por LacI. Además, el plásmido contiene un gen de resistencia a kanamicina para el mantenimiento por presión de selección (ATUM 2.0; Newak, California).



Figura 12. Esquema del plásmido de expresión de TLA-1.

Transformación bacteriana

Con la finalidad de obtener la cepa de *E. coli* sobreproductora de TLA-1 se realizó la transformación bacteriana. Se utilizaron células de la *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes y se agregó 1 μ l (~30 ng) del DNA del plásmido pJ411+TLA-1. Posteriormente, la muestra se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 mm preenfriada. Se realizó la electroporación utilizando un pulso de 2500 V, se transfirió el contenido de la cubeta a un tubo de ensayo con 1 mL de medio LB sin antibiótico, y se incubó 1 h a 37 °C. Por último, se plaquearon 100 μ l en medio LB

con kanamicina a 30 µg/mL y se seleccionaron las colonias resistentes al antibiótico.

Condiciones de cultivo para la expresión de TLA-1

El protocolo de expresión de TLA-1 se basó en el trabajo de Cifuentes *et al.*, 2020. El inóculo se preparó a partir de una asada de la cepa criopreservada BL21/TLA-1 en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB y 30 µg/mL de kanamicina, y se incubó toda la noche a 37 °C y 250 rpm. A continuación, se agregaron 25 mL del inóculo a un matraz Fernbach que contenía 500 mL de LB con 30 µg/mL de kanamicina y se incubó a 37°C y 200 rpm. Una vez alcanzada la fase exponencial temprana (~0.6 DO a 600 nm, ~2 horas) se adicionó al cultivo el inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM y se incubó 48 h a 18 °C y 200 rpm. Las células se centrifugaron a 4,600 rpm (~3,700 g) y 4°C por 20 min utilizando una centrífuga Beckman J2-MI con un rotor JA10. Se descartó el sobrenadante y se almacenó la pastilla celular a -20 °C hasta su utilización.

Purificación de TLA-1

La pastilla celular se resuspendió con amortiguador de lisis que contiene 30 mM de Tris-HCl y 50mM de NaCl a pH 8. Las células fueron sonicadas a 30% de amplitud, en 15 ciclos de 20 s de sonicación y 1 min de descanso. Una vez lisadas las células se centrifugaron a 10 000 rpm por 40 min a 4°C utilizando una centrífuga Eppendorf 5804 R, se transfirió el sobrenadante a un nuevo envase y se descartó la pastilla. Es importante mencionar que todo el proceso de purificación se realizó en un baño de hielo, esto con el fin de evitar la precipitación de la proteína. El sobrenadante se dializó contra el amortiguador ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 50 mM a pH 6.4. a 4 °C, utilizando una membrana con tamaño de corte de 10 kDa. Se realizaron dos recambios de 250 mL con el mismo amortiguador cada 3 h.

Después de la diálisis, la muestra se centrifugó a 7 000 rpm a 4 °C por 10 min y se descartó el precipitado. La proteína soluble se purificó por cromatografía de intercambio catiónico con flujo por gravedad. Se utilizó la resina de carboximetil-

sefarosa CL6B, previamente equilibrada con MES 50 mM pH=6.7. Se realizaron eluciones utilizando 5 volúmenes de columna en un gradiente escalonado de NaCl (20, 50, 100, 150, 200, 300, 500 mM de NaCl). La purificación de TLA-1 se evaluó por SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) al 12%, teñido con azul de Coomasie.

Concentración de TLA-1 y cambio de amortiguador

Posterior a la cromatografía de intercambio catiónico, las fracciones donde se encontraba la proteína TLA.1 se concentraron utilizando un tubo Amicon de 15 mL con un corte de 10 kDa. Se centrifugó la muestra a 4500 rpm hasta alcanzar un volumen aproximado a 500 μ l y se agregó 10 mL de amortiguador Tris-HCl 30 mM + NaCl 10 mM pH= 7.4. Se repitió el paso anterior dos veces más y se concentró la proteína hasta llegar a la concentración adecuada para las pruebas de cristalización (aprox. 20 mg/mL). La concentración de TLA-1 utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 y el coeficiente de extinción molar de la TLA-1 ($36900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y se obtuvo a partir de su secuencia con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy.

Cristalización de TLA-1

Las pruebas de cristalización de TLA-1 fueron realizadas utilizando el método de difusión de vapor en gota sedente, como lo reportaron Cifuentes (2020) y Gallardo (2021). Se añadió 1 mL de la condición de cristalización en el pocillo de las placas Cryschem (Hampton Research). El procedimiento de adición de reactivos fue el siguiente: primero, se añadió 1 mL de la condición de cristalización en el reservorio circular; posteriormente, en el poste elevado se añadió (en el siguiente orden y con puntas diferentes) 2 μ l de la proteína purificada y 2 μ l de la condición de cristalización (tomada del mililitro previamente depositado en el reservorio circular), y se mezcló con la pipeta dos veces; por último, se selló el pozo con un cubreobjetos siliconado y grasa de vacío.

La condición de cristalización utilizada para TLA-1 fue la previamente reportada por (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020), y está basada en la condición 9 del *kit Wizard Classic 2*, que consiste en 2.4 M de sulfato de amonio (agente precipitante), 100

mM de fosfato de sodio dibásico (amortiguador) y ácido cítrico a pH 4.5. Para obtener cristales de mejor calidad, se realizaron matrices en las que se varió el pH (4 – 4.8) y la concentración de la proteína (8.2 – 16.4 mg/mL).

Remojado de los cristales de TLA-1 en tazobactam

Para obtener la estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam se remojaron los cristales con el inhibidor tazobactam. Se preparó una disolución de remojado, que es equivalente a la condición de cristalización, y agregándose el inhibidor a saturación (una concentración 10x de la K_d sería más preciso, pero no fue posible debido a la baja solubilidad del inhibidor por la alta concentración de sulfato de amonio presente en la condición de cristalización). Se agregó la disolución de remojado al cristal (aproximadamente 5 μ L) y se dejó remojando aproximadamente 1 min para el cristal difractado en el LANEM y 3 min para el cristal difractado en ALBA. Por último, los cristales remojados se sobreenfriaron con nitrógeno líquido a 77 K.

Determinación de la estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam

El conjunto de datos obtenidos en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) de la UNAM se indexó, integró y escaló utilizando el software HKL3000 (Minor *et al.*, 2006). Este procesamiento de datos fue realizado por los operadores del ánodo rotatorio del LANEM. Por otra parte, el conjunto de datos obtenidos en la línea BL13-XALOC del sincrotrón ALBA (Barcelona, España) se indexó, integró y escaló utilizando la *suite XDS* que contiene los programas *XDS*, *XSCALE* y *XDSCONV* (Kabsch, 2010). El programa *XDS* genera una lista de intensidades integradas de las reflexiones de cada imagen y sugiere el grupo espacial, así como la resolución máxima. Posteriormente, el archivo de reflexiones generado a partir de *XDS*, «*XDS_ASCII.HKL*», se emplea para alimentar al programa *XSCALE*, que realiza un escalamiento de datos, combina las reflexiones de varias imágenes en un solo conjunto de datos y reporta una multitud de parámetros que permiten decidir con respeto a diversos valores como la calidad de los datos y la resolución de estos, arrojando un archivo de salida con terminación «*.hkl*». Por último, *XDSCONV* modifica el formato para que los datos

procesados puedan ser leídos por los programas de la *suite CCP4* (Kabsch, 2010).

Para resolver el problema de fases se utilizó el programa *Phaser* en su versión implementada en *CCP4*, que utiliza la técnica de reemplazo molecular (McCoy *et al.*, 2007). Esta técnica utiliza un modelo o las coordenadas de una proteína parecida a la proteína cristalizada, e intenta reconstruir el patrón de difracción de la proteína de interés, en particular con respecto sus amplitudes e intensidades de cada reflexión medida mediante la rototraslación del modelo de búsqueda, tanto en espacio real como recíproco. Para este caso, se utilizaron las coordenadas de la apoenzima TLA-1 (código PDB: 6NVT) como modelo para realizar el reemplazo molecular.

Posterior al reemplazo molecular, el modelo resultante se llevó al programa *Refmac5* (Murshudov *et al.*, 1997), donde se realizó un afinamiento de cuerpo rígido y se generó el mapa de densidad electrónica, que representa a la distribución de electrones dentro de la red cristalina, para ajustar el modelo y a su vez generar un grupo de reflexiones construidas a partir del modelo y compararlas con los datos experimentales medidos tras la difracción del cristal. El mapa de densidad electrónica se generó calculando las series de Fourier del set de amplitudes observadas y sus fases. El programa utiliza la ecuación $\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{-\infty}^{+\infty} hkl |F(hkl)| \cdot e^{-2\pi[hx+ky+lz-\phi(hkl)]}$, donde los parámetros x , y , z son las coordenadas espaciales en espacio real y h , k , l son los índices de Miller, es decir los planos cristalinos en el espacio recíproco (Winn *et al*, 2011).

A partir de este punto se realiza una cantidad determinada de afinamientos con el programa *Phenix* (Adams *et al.*, 2010), variando los parámetros del modelo generado en *Refmac5*, en específico, las coordenadas, los valores B y la ocupación de cada átomo, para lograr la mejor correlación entre las amplitudes observadas (F_{obs}) y las calculadas a partir del modelo (F_{calc}). Esta correlación es medida por el valor llamado R-factor, el cual en teoría y en un modelo perfecto daría valores de 0, pero como más del 45% del cristal es disolvente, estos valores

rara vez bajan tanto (Liebschner *et al.*, 2019). En cada afinamiento la estructura y su mapa de densidad electrónica se visualizan con el programa COOT (Emsley *et al.*, 2010).

Análisis de la estructura de TLA-1 en complejo con tazobactam

Para el análisis de las estructuras, se utilizaron los siguientes programas: COOT, para la visualización de las densidades electrónicas, obtención de los valores de RMSD para carbonos alfa y análisis del arreglo cristalino; y PyMOL (Schrodinger) para la superposición de estructuras; visualización de las estructuras, análisis de contactos polares y obtención de las representaciones de superficie.

Para la comparación con otras estructuras de betalactamasas en complejo con tazobactam en el PDB, se realizó una búsqueda sistemática en esta base de datos, la cual contuviera la palabra «tazobactam» en el título de la búsqueda, se excluyeron aquellas que no incluyeran una publicación, y, por último, cuando existían dos o más estructuras reportadas con tazobactam en la misma publicación, se elegía la que contuviera un intermediario reversible (imina o enamina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión y Lisis Celular

Se realizó la expresión de la proteína bajo las condiciones previamente descritas (Cifuentes-Castro *et al.*, 2020). Después de la sonicación y diálisis se corrió un SDS-PAGE con las fracciones insolubles y solubles para identificar la presencia de TLA-1 que tiene un peso aproximado de 30 kDa (Figura 13). Aparentemente TLA-1 se encuentra principalmente en la fracción insoluble, no obstante, también se encontró en la fracción soluble y permaneció allí después del proceso de diálisis, tanto en la pastilla como en el sobrenadante.

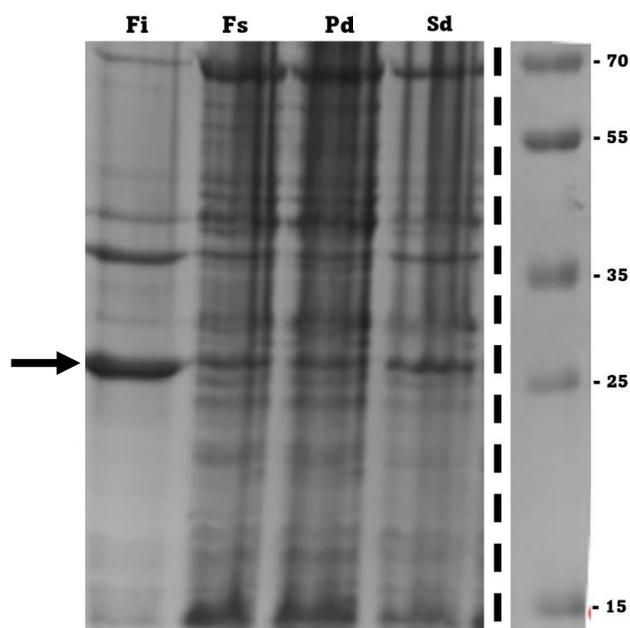


Figura 13. SDS-PAGE al 12% de la expresión de TLA-1. Se observan las proteínas expresadas en el cultivo de E. coli sobreproductora de TLA-1. Fi: Fracción insoluble; Fs: fracción soluble; Pd: Pastilla después de la diálisis; Sd: sobrenadante después de la diálisis. La flecha azul indica la banda de TLA-1. Gel teñido con azul de Coomasie.

Posteriormente, se realizó un SDS-PAGE al 12 % para observar la elución de la proteína purificada posterior a la cromatografía de intercambio catiónico (Figura 14). Se tomaron 5 fracciones de 5 mL (1 volumen de columna) por cada escalón utilizado (cada escalón contiene MES 50 mM + «x» mM de NaCl). En el gel, se

puede observar que en el volumen no retenido y el escalón de 20 mM de NaCl eluyen la mayoría de las proteínas contaminantes. La banda enriquecida de la proteína TLA-1 comenzó a eluir en el escalón que contiene una concentración de NaCl 150 mM (tal como lo reportado previamente en nuestro grupo de investigación), y continuó eluyendo hasta el escalón de NaCl 200 mM.

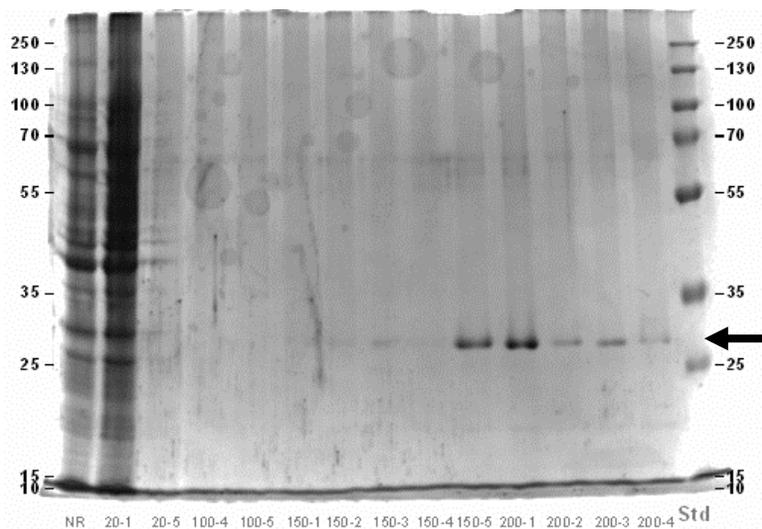


Figura 14. SDS-PAGE al 12% de la purificación de TLA-1. Se observa la aparición de la banda correspondiente a TLA-1 (flecha negra) en la segunda fracción del escalón de NaCl 150 mM (150-2) y la proteína continúa eluyendo hasta la penúltima fracción del escalón de NaCl 200 mM (200-4). NR: No retenido. Gel teñido con azul de Coomassie.

Al concentrar la proteína se puede apreciar la aparición de bandas tenues (Figura 15); sin embargo, la banda concentrada que corresponde a la proteína TLA-1 es mayoritaria. Estas bandas ya se habían observado previamente (Cifuentes-Castro, 2018), sin que esto altere el proceso de cristalización. El rendimiento obtenido fue de 3 mg de proteína por cada litro de cultivo.

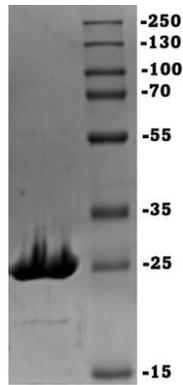


Figura 15. SDS-PAGE al 12 % de la banda concentrada de TLA-1 obtenida al concentrar las fracciones de 150 y 200 mM de NaCl. Gel teñido con azul de Coomasie.

Cristalización de TLA-1 en complejo con tazobactam

Para la obtención de cristales se utilizó como base la condición 9 del kit Wizard Classic 2, que contiene 2.4 M de sulfato de amonio (agente precipitante), encontrada por Cifuentes en su tesis de maestría (2019). Puesto que la cristalografía es una técnica sensible al experimentador, se realizaron matrices variando las concentraciones de la proteína y el pH. Las matrices de cristalización mostraron dos condiciones en las cuales se favorece la cristalización de la proteína (Figura 16).

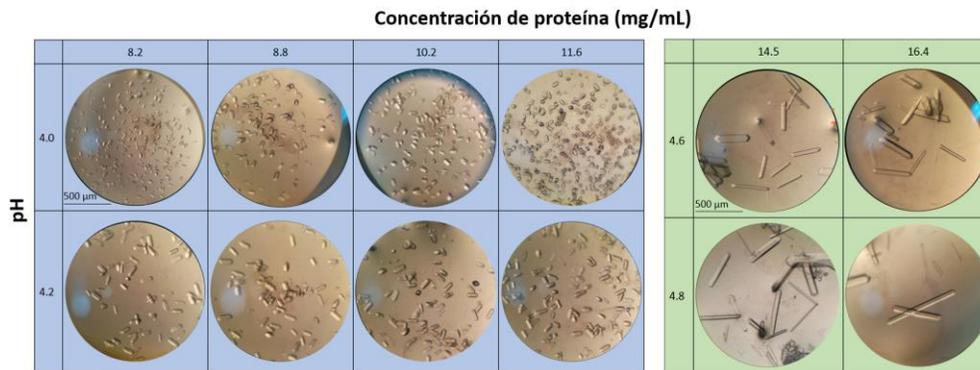


Figura 16. Matriz de cristalización de TLA-1. Se realizó una matriz en la cual se variaron las condiciones de pH y concentración de proteína. En el primer grupo (menor pH y menor concentración de proteína, azul) se observaron cristales a los 3 días, mientras que en el segundo grupo (mayor pH y mayor concentración de proteína, verde) se observaron cristales a las 4 semanas (Condiciones base de cristalización: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2.4 M, Na_2HPO_4 100 mM / Ácido cítrico).

En la primera condición (Figura 16, recuadros azules) se observa la aparición de cristales en un lapso aproximado de 3 días, pero esta condición favorece la nucleación, por lo que aparecen muchos cristales relativamente pequeños. Por otra parte, en la segunda condición (Figura 16, recuadros verdes), el tiempo de aparición de los cristales fue mayor (~30 días), sin embargo, los cristales fueron más grandes, esto representaba una ventaja para la obtención de patrones de difracción en el ánodo rotatorio, que necesita de cristales más grandes para obtener una mejor calidad en los patrones de difracción. El pH puede favorecer interacciones por el cambio en la ionización de los residuos y alterar la solubilidad del compuesto de forma que se favorezca el proceso de cristalización, incluso existen reportes de que cambios en 0.1 unidades de pH pueden alterar significativamente la solubilidad y por ende el proceso de cristalización (Chen *et al.*, 2017).

Para confirmar que los cristales eran de proteína y no de sal, los cristales se tiñeron con Izt (azul de metileno, Hampton Research), molécula capaz de penetrar en los canales de disolvente presentes en cristales de macromoléculas biológicas, y ausentes en cristales inorgánicos, el cual le otorga una coloración azul al cristal. En la Figura 17 se puede observar que los cristales sí están teñidos tanto para los crecidos en la condición «rápida» y con mucha nucleación (circulo izquierdo), así como los crecidos en la condición «lenta» y con poca nucleación (circulo derecho).

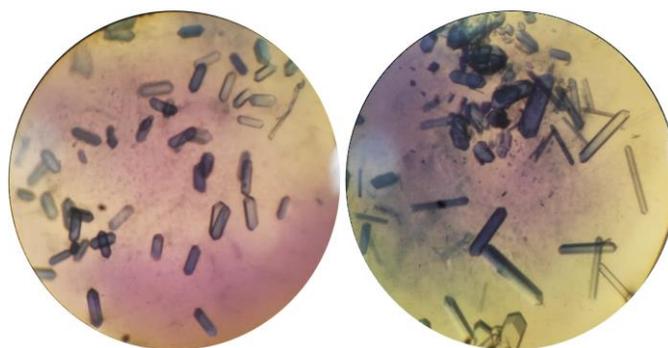


Figura 17. Tinción de los cristales de TLA-1 de la condición rápida (izquierda, pH = 4.4 y [proteína]= 10.2 mg/mL) y de la condición lenta (derecha, pH = 4.8 y [proteína]= 14.5 mg/mL) con Izt (azul de metileno). Condiciones base de cristalización: (NH₄)₂SO₄: 2.4 M, Na₂HPO₄ 100 mM / Ácido cítrico.

Remojado de los cristales de TLA-1 con el inhibidor tazobactam

Para obtener la estructura de TLA-1 en complejo con el inhibidor tazobactam es necesario permitir que se forme el complejo ligante-proteína. Por cuestiones de simplicidad, se optó por la técnica de remojado (Müller, 2017), que consiste en la adición de una disolución que contiene la condición de cristalización y el ligante (tazobactam) al cristal ya formado. Desafortunadamente, la condición de cristalización presenta dos inconvenientes: 1) la solubilidad del inhibidor en la condición del remojado es muy baja, por lo que solo se pudo preparar la solución para remojar el cristal a saturación del inhibidor, dando probablemente una concentración baja de tazobactam (se postula que una concentración adecuada debería ser 10 veces la K_d o de 20 a 50 mM si no se conoce la afinidad del ligante (Müller, 2017)); y 2) al momento de retirar el cubreobjetos que tapa el pozo donde se encuentra el cristal para realizar el proceso de remojado y pesca del cristal, comienza la formación de cristales de sulfato de amonio, los cuales destruyen los cristales de TLA-1. Estos inconvenientes impidieron un remojado de mayor tiempo, el cual podría ayudar a que se difundiera más el ligante, y con ello se mejore la calidad de los datos de difracción en términos de ocupación del ligante.

Una vez remojados los cristales y teniendo en cuenta las dificultades mencionadas anteriormente, se sobreenfriaron en nitrógeno líquido y se almacenaron para ser llevados a difractar a una fuente de rayos X (ánodo rotatorio y sincrotrón). No fue necesario agregar un crioprotector a los cristales, ya que la alta concentración de sulfato de amonio actuó como crioprotector (Rubinson *et al.*, 2000).

Determinación de la estructura de TLA-1 – tazobactam en LANEM y ALBA

Con los cristales obtenidos se colectaron dos conjuntos de datos (Tabla 3). El primer conjunto de datos se obtuvo en el ánodo rotatorio ubicado en el LANEM (IQ-UNAM). La reducción e integración de los datos arrojaron un grupo espacial C2 con parámetros de celda de $a, b, c = 140.37 \text{ \AA}, 140.34 \text{ \AA}, 99.44 \text{ \AA}$ y $\alpha, \beta, \gamma = 90.00^\circ, 89.98^\circ, 90.0^\circ$. Se resolvieron las fases utilizando el método de remplazo

molecular con el modelo de TLA-1 con código PDB 6NVT. Se obtuvo un modelo inicial con resolución máxima de 2.53 Å y valores $R=0.2098$ y $R_{free}=0.2670$.

Llama la atención que el conjunto de datos procesados en el LANEM presenta un grupo espacial C2, con lo cual sería el tercer grupo espacial de las estructuras de TLA-1 remojadas con el ligante en condiciones similares y generadas por nuestro grupo de investigación. Comparando las estructuras que presentan a los diferentes grupos espaciales $P2_1$ (TLA-1 *apo*, Cifuentes-Castro, 2020) $p4_12_12$ (TLA-1 + ácido clavulánico y TLA-1 + tazobactam, Cifuentes y este estudio con datos de ALBA, respectivamente) y C2 (TLA-1 + tazobactam con datos del ánodo rotatorio), es posible observar que solo existen cambios sutiles en el arreglo cristalino, y aunque en el grupo espacial C2, los parámetros de la celda unitaria son diferentes, el arreglo de las moléculas en la matriz cristalina es muy similar (Figura 18).

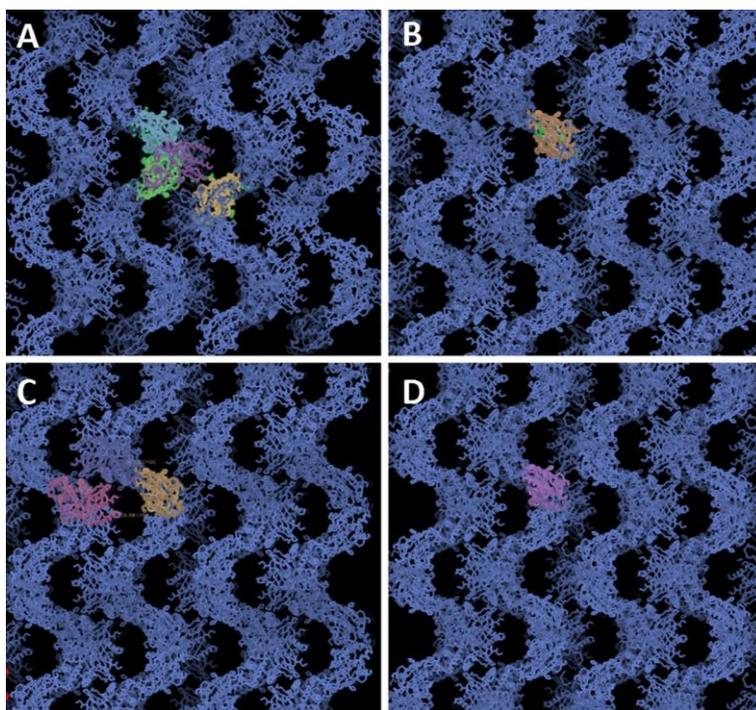


Figura 18. Comparación entre las simetrías de los grupos espaciales entre las diferentes estructuras obtenidas de A) TLA-1 apo, (PDB ID: 6NVT), B) TLA-1 + ácido clavulánico (PDB ID: 6NVU), C) TLA-1 + tazobactam (LANEM) y D) TLA-1 + tazobactam (ALBA) (los modelos que representan las imágenes de C) y D) se obtuvieron en este trabajo). Figura realizada con el programa Coot.

El segundo conjunto de datos se obtuvo en la línea BL13 – XALOC del sincrotrón ALBA (Barcelona, España). Para analizar las reflexiones y encontrar el grupo espacial se utilizó el paquete de programas “XDS”, que contiene los programas XDS, XSCALE y XDSCONV. El programa XDS dio por resultado el grupo Laue $4/mmm$, y propuso como solución el grupo espacial P422, que es el grupo espacial de menor simetría en ese grupo Laue. Al analizar las reflexiones axiales a h ($h00$; $h=2n$) y a l ($00l$; $l=4n$) se concluyó que el grupo espacial más probable era el enantiopar P4₁2₁2 o P4₃2₁2.

Habiendo obtenido los datos escalados, se continuó con el remplazo molecular para encontrar las fases y verificar el grupo espacial correcto. Para este procedimiento se utilizó el programa *Phaser* que se encuentra en la *suite* de CCP4. Para el remplazo molecular se utilizó el modelo de TLA-1 *apo* (PDB: 6NVT) como molde y se confirmó que el grupo espacial correcto era P4₁2₁2. Posteriormente se realizó un afinamiento de cuerpo rígido con Refmac, un afinamiento restringido con el programa *Phenix*, y un ajuste manual con el programa Coot. El ciclo *Phenix/Coot* se repitió hasta obtener los mejores parámetros de afinamiento, que fueron: R_{work}/R_{free} de 0.19/0.23.

La siguiente tabla contiene un resumen de los datos cristalográficos obtenidos de TLA-1 remojado con el inhibidor tazobactam tanto del ánodo rotatorio del LANEM como de la línea BL13 – XALOC del sincrotrón ALBA.

Tabla 3. Tabla cristalográfica de las estructuras de TLA-1 en complejo con tazobactam.

Proteína	TLA-1 + tazobactam (LANEM)	TLA-1+ tazobactam (ALBA)
Fuente de rayos X	LANEM (IQ-UNAM)	BL13 – XALOC (ALBA)
Longitud de onda (Å)	1.54	0.97
Grupo espacial	C2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Parámetros de celda unitaria		
• a (Å) / α (°)	140.37/90	99.14 / 90.00
• b (Å) / β (°)	140.34/89.98	99.14 / 90.00
• c (Å) / γ (°)	99.44/90	99.48 / 90.00
Mosaicidad (°)	0.80 – 1.27	0.15

Resolución (Å)	50.00 – 2.53 (2.57 – 2.53)	40.00 – 2.22 (2.32 – 2.22)
Rmerge (%)	14.90 (80.70)	11.10 (168.20)
Rmeas (%)		11.50 (174.80)
I/σ(I)	13.4 (2.3)	14.36 (1.98)
CC_{1/2} (%)	(78.30)	99.80 (76.10)
Integridad (%)	88.1 (99.3)	99.90 (99.90)
Multiplicidad	4.6 (4.7)	12.92 (13.45)
No. de reflexiones totales	263623	324660 (40878)
No. de reflexiones únicas	56816	25108 (3039)
Factor B de Wilson (Å²)	31.80	49.64
Contenido de disolvente (%)	68.83	68.40
Coficiente Mathews (Å³/Da)	3.95	3.89
Factor R (%)	20.98	19.39
Factor R_{free} (%)	26.70	23.40
RMSD distancia enlaces (Å)	0.008	0.008
RMSD ángulos de enlace (Å)	1.002	1.004
Error de coordenadas (maximum likelihood, Å)	0.31	0.36
No. de reflexiones en el cálculo de R	250442	23837
No. de reflexiones en el cálculo de R_{free}	13181	1271
Valor medio del valor B (Å)		
• Proteína	34.28	51.32
• MES Y SO4	76.85	72.76
• TBE	-	66.15
• H2O	34.15	60.38
• Total	35.53	53.15
Gráfico de Ramachandran*		
• Permitidos (%)	96.09	97.82
• Permitidos adicionales (%)	3.73	2.18
• No permitidos (%)	0.18	0.00

Los valores obtenidos en la última faja de resolución se muestran entre paréntesis.

**Valores obtenidos de MolProbity*

Comparación de las estructuras determinadas en el LANEM y ALBA

Se obtuvo un modelo inicial de las estructuras obtenidas tanto del LANEM como de BL13 – XALOC (ALBA). Al observar la cavidad del sitio activo, la estructura determinada en el LANEM parece no tener densidad electrónica a la altura del oxígeno γ (OG) de Ser70 (el residuo catalítico) en ninguna de las cuatro moléculas de la unidad asimétrica (Figura 19), mientras que la estructura determinada en BL13 – XALOC sí cuenta con una prolongación de la densidad electrónica que se extiende sobre el OG de Ser70, que se discutirá más adelante (Figura 20).

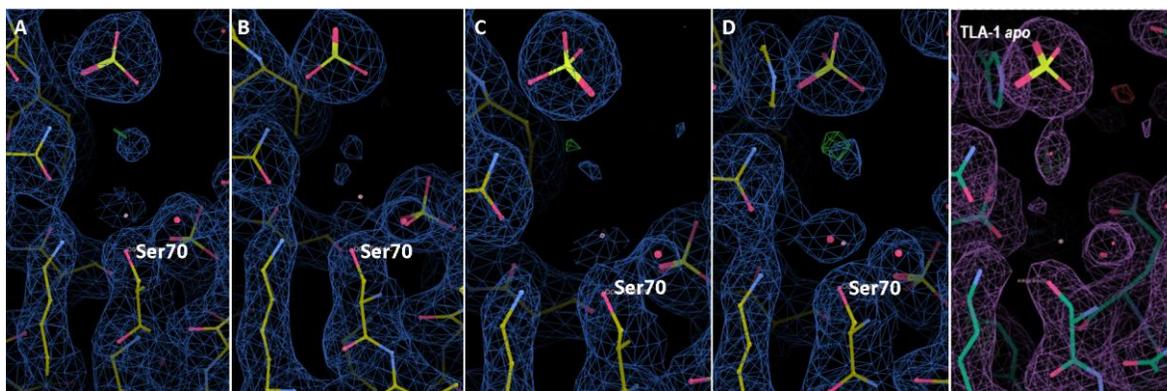


Figura 19. El modelo estructural de TLA-1 + tazobactam obtenido del LANEM no contiene tazobactam unido covalentemente. No se observa densidad electrónica que continúe sobre el oxígeno gamma de Ser70 en los mapas $2Fo-Fc$ (1σ) y $Fo-Fc$, ($\pm 3.5\sigma$) de los 4 monómeros de la unidad asimétrica (A, B, C y D). Figura realizada con el programa Coot.

Probablemente la estructura determinada en LANEM no contó con suficiente tiempo de remojado, lo que pudo afectar la ocupación del ligante, o quizás el nivel de resolución no fue suficiente para ver el intermediario unido. Por lo tanto, el modelo de TLA-1+ tazobactam obtenido de BL13 – XALOC (ALBA) se eligió para realizar un análisis más exhaustivo.

Modelado del inhibidor tazobactam en el sitio activo de TLA-1

En la Figura 20 se puede observar dentro del sitio activo la presencia de densidad electrónica que se prolonga a partir de la cadena lateral de la Ser70, lo cual sugiere fuertemente la presencia del inhibidor unido covalentemente. Se decidió modelar el intermediario *trans*-enamino con una ocupación de 77 %, debido a que

probablemente no se encuentre presente en todas las copias de la proteína dentro del cristal. Además, se eligió este intermediario (*trans*-enamino) ya que se ha reportado como el más estable, aunque con la resolución de este mapa no puede diferenciarse de otros intermediarios como imina o *cis*-enamino, para ello sería necesario realizar otro tipo de experimentos, como espectrometría de masas para la detección de los intermediarios de la reacción, espectroscopía UV o de fluorescencia para la detección de las especies de enamino y cristalografía de Raman para la diferenciación entre las poblaciones de imina, *cis* y *trans*-enamino. (Frase *et al.*, 2011; Grigorenko *et al.*, 2022; Kalp *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014).

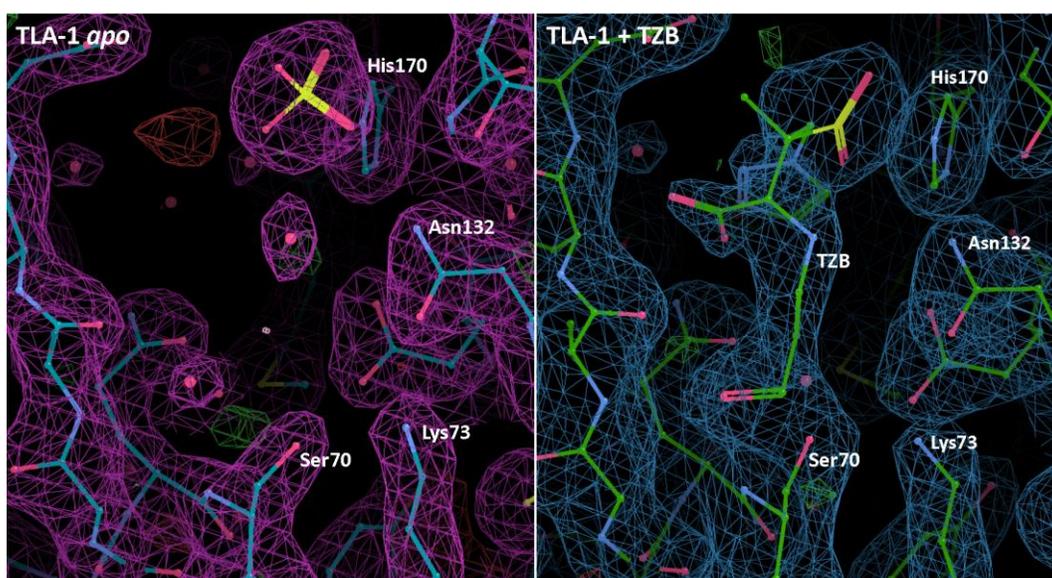


Figura 20. Comparación entre los mapas de densidad electrónica ($2F_o - F_c$, 1σ) y de omisión ($F_o - F_c$, $\pm 3.5 \sigma$) entre el modelo «apo» (izquierda, PDB:6NVT) y el modelo en complejo con tazobactam (derecha) obtenido de los datos de ALBA. Figura realizada con el programa Coot.

Al analizar la estructura de TLA-1 – TZB no se observó densidad electrónica en la vecindad de Ser237, que es el segundo residuo catalítico propuesto a partir de la estructura de TLA-1 – ácido clavulánico (PDB:6NVU), solo se observó un cúmulo de densidad electrónica cercano a los residuos Ser237 y Ser130, en el cual se modeló una molécula de sulfato. Por lo tanto, no se justificó el modelado de otra

molécula de tazobactam sobre Ser237 como sí se observó en la estructura de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico (Figura 21).

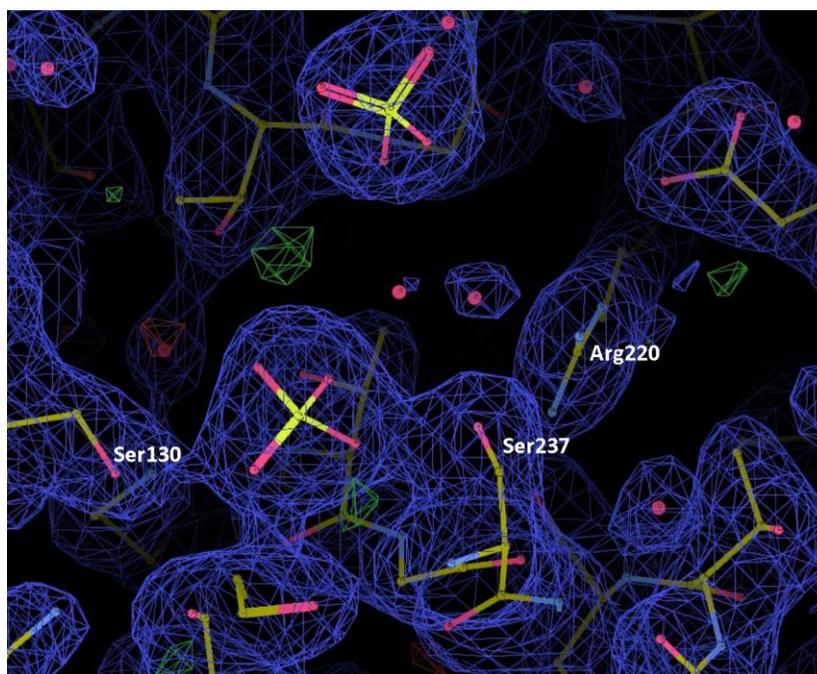


Figura 21. La ausencia de densidad electrónica ($2F_o-F_c = 1 \sigma$, $F_o-F_c = \pm 3.5 \sigma$) sobre el OG de Ser237 indica que no se aciló ninguna molécula de tazobactam sobre esta serina. Figura realizada con el programa Coot.

Esto sugiere que la enzima solo es capaz de capturar una molécula de tazobactam en las condiciones de cristalización, aunque no lo descarta, puesto que el espacio del sitio catalítico es lo suficientemente amplio para la entrada de otra molécula de inhibidor y no existe un impedimento estérico aparente con el tazobactam acilado en la Ser70 (Figura 22).

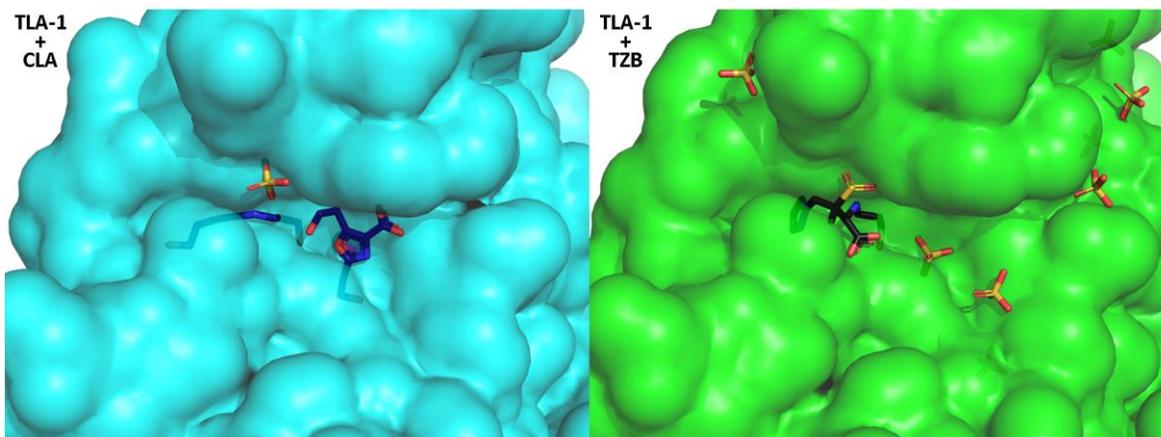


Figura 22. Representación de superficie de los modelos de TLA-1 con los inhibidores ácido clavulánico (izquierda) y tazobactam (derecha). Las moléculas de inhibidor están representadas como varillas (ácido clavulánico, azul marino; tazobactam, negro). Figura realizada en PyMOL.

Modelo estructural de TLA-1 en complejo tazobactam

En el modelo estructural de TLA-1 + tazobactam obtenido en ALBA se pueden observar 2 dominios, el dominio «todas α » y el dominio « α/β », que son los dominios previamente observados por Cifuentes *et al* (2020) y Gallardo (2021), siendo estos dominios característicos de las betalactamasas (Figura 23A). De igual manera, el sitio activo se localiza en medio de los dos dominios, proyectándose el inhibidor modelado hacia el exterior de la enzima. El cálculo de RMSD (para carbonos alfa) entre el modelo generado en este trabajo y la apoenzima es de 0.178 Å (considerando 276 carbonos alfa), lo cual indica un mínimo desplazamiento de la cadena principal comparado con la estructura sin inhibidor (Figura 23B).

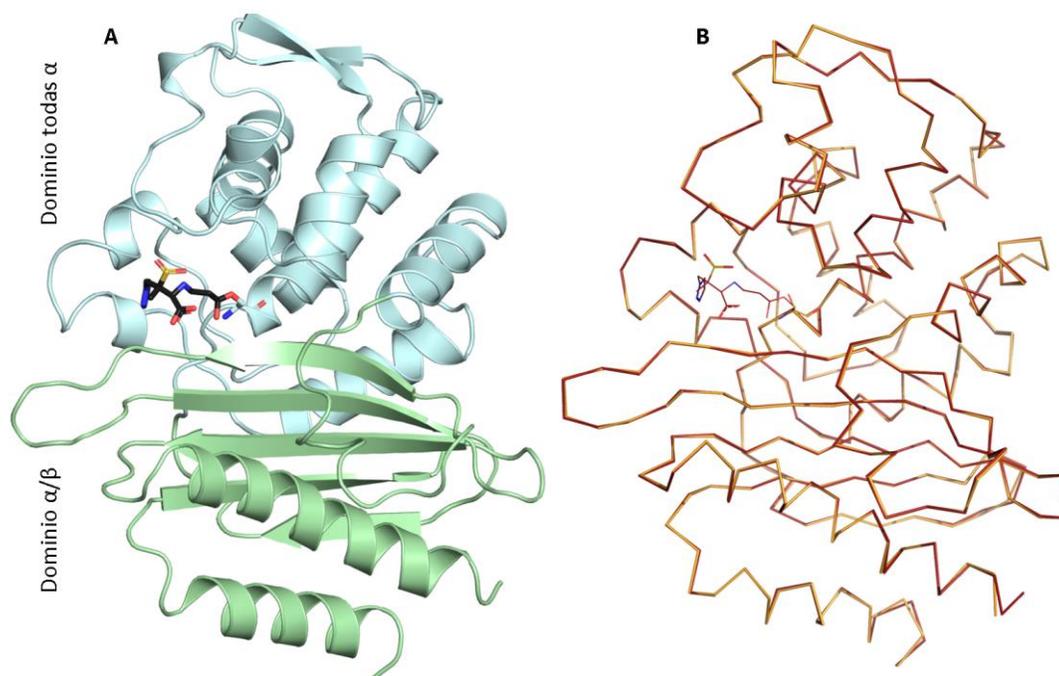


Figura 23. A) Modelo de TLA-1 en complejo con tazobactam representado en forma de listones. En la imagen se aprecian los dominios de TLA1 y el tazobactam modelado (varillas negras) se encuentra ubicado en la intercara de ambos dominios. B) Superposición entre la estructura de TLA-1 silvestre (amarillo) y en complejo con tazobactam (rojo). Figura realizada en PyMOL.

Interacciones entre TLA-1– TZB

Entre las interacciones entre TLA-1 con el inhibidor tazobactam se encuentran las siguientes: se muestran dos puentes de hidrógeno entre el carbonilo del tazobactam con los nitrógenos de la cadena principal de las Ser70 y Ser237. Cabe mencionar que estas interacciones ya han sido previamente reportadas para muchas betalactamasas y son muy importantes, puesto que son las que estabilizan al intermediario tetraédrico en el estado de transición durante el paso de acilación. También existe un puente de hidrógeno entre el carboxilo del intermediario *trans*-enamino y una molécula de H₂O, que a su vez está conectada por medio de un puente de hidrógeno al oxígeno de la cadena lateral de la Ser238. El oxígeno del grupo sulfonilo del tazobactam contiene un puente de hidrógeno con el nitrógeno de la Asn132. Por último, en el anillo triazol se pueden observar la

formación de puentes de hidrógeno entre los nitrógenos del anillo con una molécula de agua y con la cadena lateral de la Gln69 (Figura 24).

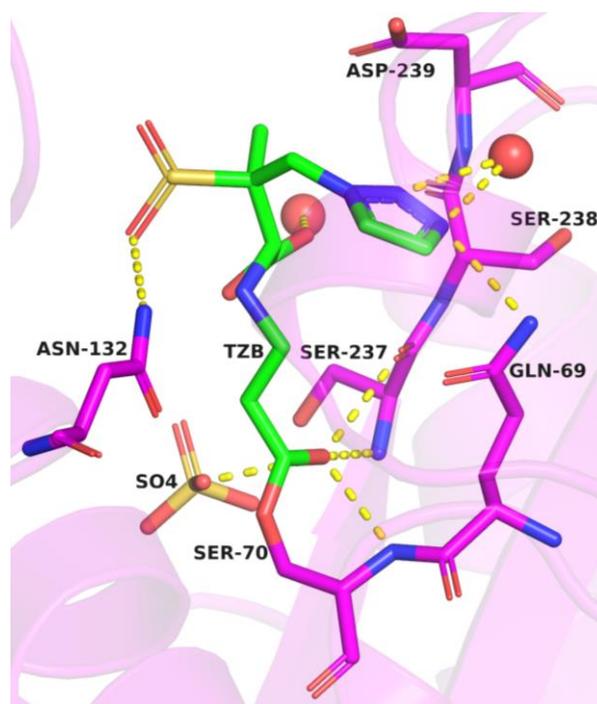


Figura 24. Representación de las interacciones entre los grupos funcionales del tazobactam (verde) con TLA-1 (magenta). Las líneas discontinuas amarillas representan puentes de hidrógeno con un corte de 3.5 Å. (H₂O, esferas rojas). Figura realizada en PyMOL.

Comparación entre TLA-1– TZB y TLA-1 *apo*

En la Figura 25 se pueden observar las estructuras superpuestas de TLA-1 en su forma *apo* (cian) y en complejo con tazobactam (azul). A pesar de que las estructuras se superponen muy bien con base en el valor de RMSD, llama la atención la presencia de un grupo sulfato (SO₄) que se encuentra en la estructura de TLA-1 en su forma *apo*, mientras que en la estructura con el tazobactam modelado se observa el grupo sulfonilo, lo cual hace pensar que es una zona con preferencia por este tipo de grupos funcionales.

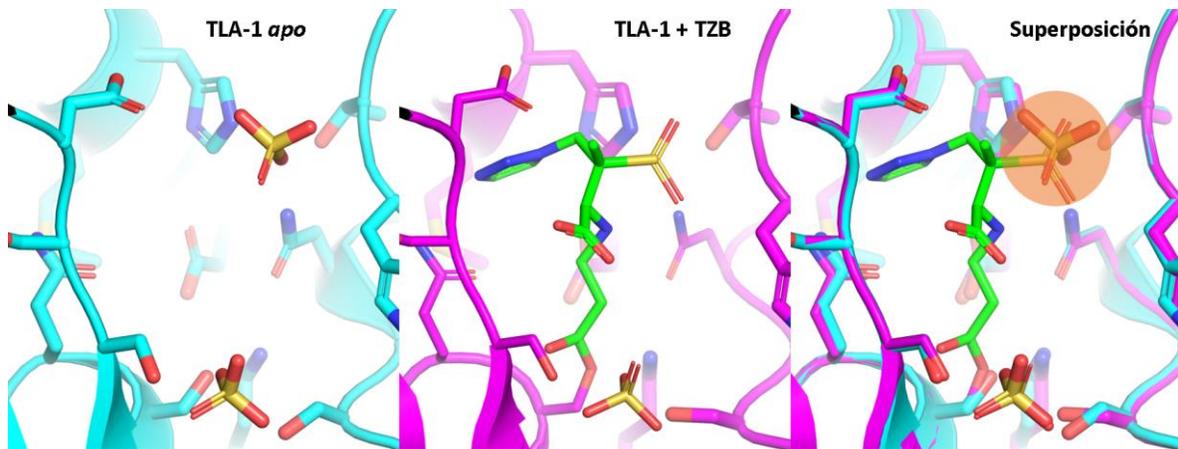


Figura 25. Superposición en el sitio activo de los modelos de TLA-1 en su forma apo (cian) y en complejo con tazobactam (el tazobactam se visualiza en color verde). Se puede observar la ubicación del sulfato en la forma apo en la misma ubicación que el grupo sulfonilo de la molécula de tazobactam (círculo naranja). Figura realizada en PyMOL.

Es posible observar que los residuos Trp105, Asn132 y His170 de la forma apo se encuentran realizando interacciones con la molécula de sulfato (aproximadamente a 3 Å de distancia), mientras que la estructura con el tazobactam modelado se encuentra aproximadamente 0.5 Å más lejano entre los 3 mismos residuos (Figura 26), cabe mencionar que la interacción con Trp105 se da con el nitrógeno de la cadena principal. Esto nos podría indicar que estos tres residuos pudieran participar en el reconocimiento del inhibidor (específicamente para sulfonas como el tazobactam y sulbactam), no obstante, una vez acilado el inhibidor, estas interacciones ya no son tan importantes, puesto que existe un intercambio entre los diferentes intermediarios antes de que se pueda dar la inhibición irreversible. Ya existe evidencia sobre que el residuo Asn132 presenta puentes de hidrógeno con el carbonilo de la cadena lateral del antibiótico, y con esto contribuye al adecuado posicionamiento del sustrato, así que no sorprendería que también contribuya al adecuado posicionamiento del inhibidor (sulbactam y tazobactam) estableciendo un puente de hidrógeno con el grupo sulfonilo correspondiente (Matagne & Frère, 1995).

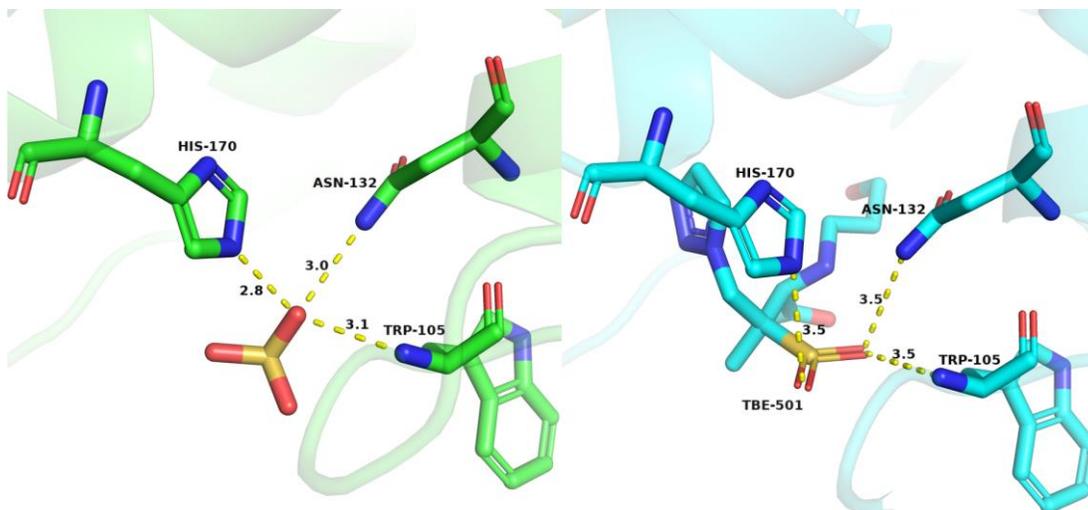


Figura 26. Residuos de TLA-1 cercanos con el sulfato de la forma «apo» (izquierda) y el sulfonilo de la estructura en complejo con tazobactam (TBE-501, derecha). Puentes de hidrógeno con un corte de 3.5 Å. Figura realizada en PyMOL.

Comparación entre las interacciones TLA-1 – TZB con otras estructuras depositadas en el PDB de betalactamasas con tazobactam

Se realizó la comparación estructural entre TLA-1 – TZB y otras betalactamasas que tuvieran el intermediario de tazobactam unido covalentemente. Las estructuras utilizadas para la comparación fueron las siguientes: GES-2 (PDB: 3NIA), BlaC de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: 6H2I), CTX-M-15 (PDB: 6Z7K) y TEM-171 (PDB: 7QLP).

Al comparar TLA-1 – TZB con otras estructuras depositadas en el PDB de betalactamasas con tazobactam, se puede observar que donde se encuentra la molécula de sulfato en el sitio de TLA-1 – TZB (que es la zona del segundo probable sitio activo de TLA-1 – CLA), se superponen varias moléculas que están presentes en las condiciones de cristalización (p. ej. sulfato, acetato, entre otras) (Figura 27). Incluso la estructura de la carbapenemasa (un tipo de betalactamasa) GES-2 en complejo con tazobactam con código PDB 3NIA, muestra lo que parece ser una segunda molécula de tazobactam. Sin embargo (Frase *et al.*, 2011) sugieren que es un subproducto de la inhibición irreversible. Tomando en cuenta la evidencia de la preferencia de esta zona por moléculas de las condiciones de

cristalización, probablemente si TLA-1 tuviera la capacidad de acilar otra molécula de tazobactam, tendría el inconveniente de que el inhibidor no desplazaría al sulfato u otros subproductos porque tendría más afinidad que el tazobactam — aunque no más que el ácido clavulánico—, por lo que sería conveniente explorar otras condiciones de cristalización que no tengan estas moléculas, y con esto conseguir que el tazobactam tenga vía libre para ser acilado por la Ser237 como lo reportado por Cifuentes con el ácido clavulánico.

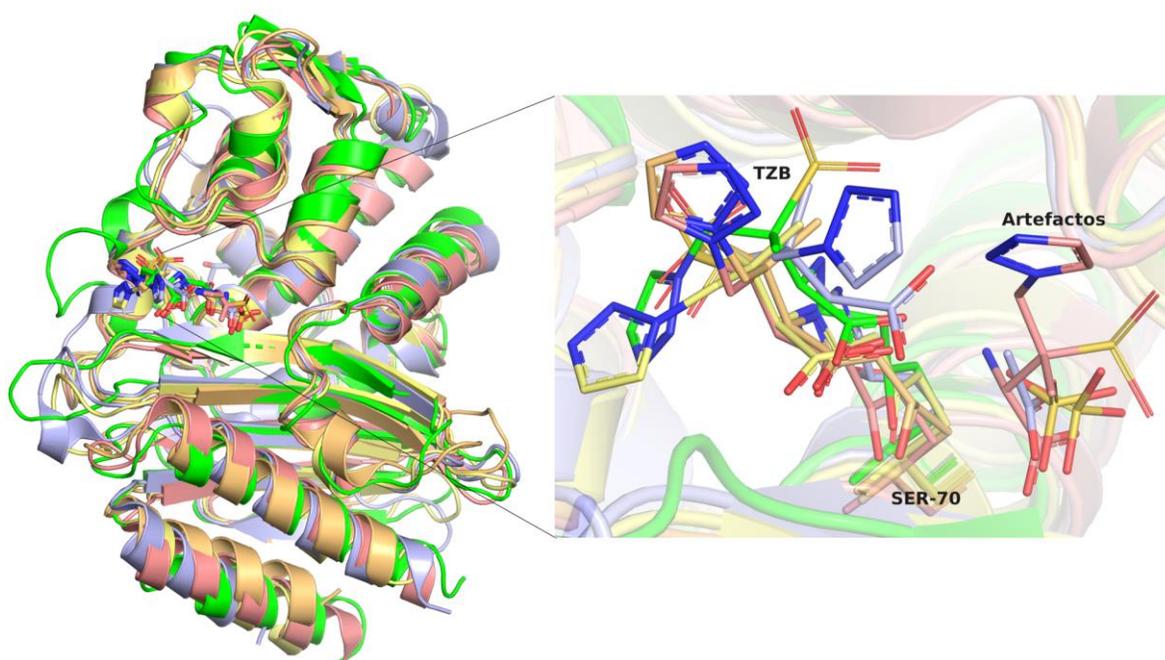


Figura 27. Superposición entre TLA-1- TZB (verde) con las diferentes estructuras con tazobactam depositadas en el PDB (3NIA, salmón; 6H2I, azul; 6Z7K, amarillo; 7LQP, naranja). El tazobactam está unido covalentemente a la Ser70 en forma imina/enamina. Se observa una zona de “artefactos” donde se posan moléculas como acetato, sulfato y un subproducto del tazobactam. Figura realizada en PyMOL.

Por otra parte, la comparación muestra que todas las moléculas de tazobactam se prolongan en una dirección similar (Figura 28A), incluso el grupo carboxilo del inhibidor apunta hacia la misma dirección, las diferencias principales radican en que el grupo sulfonilo de TLA-1- TZB parece estar en una posición diferente; sin embargo las estructuras de otras betalactamasas en complejo con tazobactam (GES-2, CTX-M-15 y TEM-171) también muestran interacción por puente de

hidrógeno con la Asn132, mientras que BlaC de *Mycobacterium tuberculosis* lo hace con el grupo guanidina de un residuo de arginina (Figura 28B).

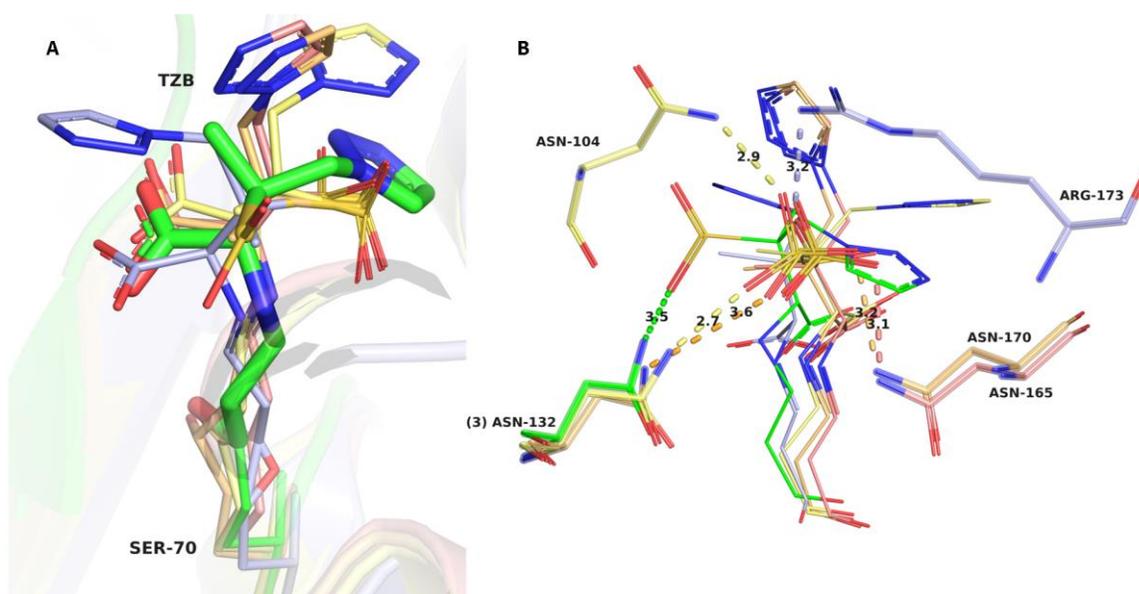


Figura 28. A) Superposición del tazobactam en el complejo TLA-1–TZB (verde) con otras betalactamasas en complejo con tazobactam depositadas en el PDB (3NIA, salmón; 6H2I, azul; 6Z7K, amarillo; 7LQP, naranja). La molécula de tazobactam de este trabajo se enfatiza con varillas de mayor grosor. B) Interacción del grupo sulfonilo con los residuos de las betalactamasas en complejo con tazobactam depositadas en el PDB. Figura realizada en PyMOL.

El grupo triazol también parece estar ligeramente desviado de la conformación más común. Al analizar los residuos cercanos al grupo triazol del tazobactam se encuentra cercana la cadena lateral de la His170. Probablemente TLA-1–TZB esté realizando una interacción de tipo π - π en forma de T entre el grupo triazol del tazobactam y la His170 (Figura 29). Revisando la estructura de las otras betalactamasas unidas covalentemente a tazobactam, no se encuentra ningún residuo aromático en las cercanías de este grupo funcional, por lo que esta interacción propuesta podría ser importante solo para TLA-1.

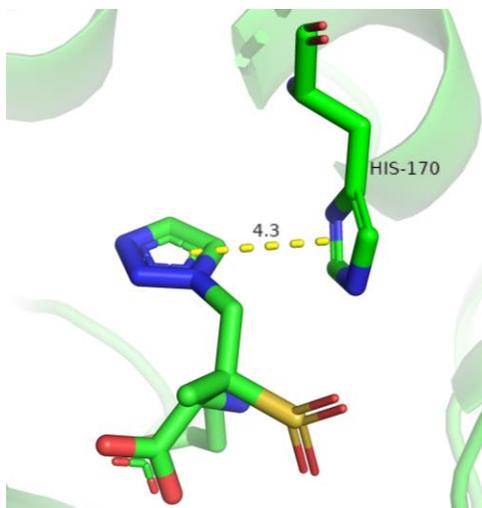


Figura 29. Interacción de tipo π - π entre el grupo triazol del tazobactam y el residuo His170 de TLA-1. Figura realizada en PyMOL.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con los resultados de este proyecto se obtuvo el modelo cristalográfico del complejo de TLA-1 con tazobactam, en el que se observa el intermediario *trans*-enamino del tazobactam solamente en la posición vecina a la Ser70, y no en la vecindad de la Ser237 ni de la Ser130. La estructura obtenida muestra evidencia de que podría existir una mayor afinidad por una molécula de sulfato que por el tazobactam en el segundo sitio activo, por lo que no se descarta que Ser237 pueda ser capaz de acilar otra molécula de inhibidor. Sería conveniente buscar una condición de cristalización que no contenga sulfatos, ni ninguna otra molécula que pudiera competir por el segundo sitio activo de TLA-1.

Se propone que el grupo sulfonilo del tazobactam, y los residuos Trp105, Arg132 y His170, son importantes para el reconocimiento del inhibidor con la betalactamasa. Sería interesante obtener la estructura de TLA-1 en complejo con sulbactam a fin de confirmar si el grupo sulfonilo —también presente también en el sulbactam— presenta un posicionamiento similar con la observada con el grupo sulfonilo del tazobactam reportada en esta tesis.

REFERENCIAS

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., & Zwart, P. H. (2010). PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *66*(2), 213–221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *289*(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, *1*(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Bassett, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L., & Villanueva, A. R. (1980). Tetracycline-Labeled Human Bone from Ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*, *209*(4464), 1532–1534. <https://doi.org/10.1126/science.7001623>
- Biondi, S., Long, S., Panunzio, M., & L. Qin, W. (2011). Current Trends in β -Lactam Based β -Lactamases Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, *18*(27), 4223–4236. <https://doi.org/10.2174/092986711797189655>
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A focus on current challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>
- Bush, K. (2013a). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *19*(4), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>
- Bush, K. (2013b). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *19*(4), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>
- Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(10), 1–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). *b -Lactams and b -Lactamase Inhibitors: An Overview. Table 1.*

- Bush, K., & Bradford, P. A. (2019). Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 295–306. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>
- Bush, K., & Fisher, J. F. (2011). Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 455–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211–1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
- Bush, K., Macalintal, C., Rasmussen, B. A., Lee, V. J., & Yang, Y. (1993). Kinetic interactions of tazobactam with β -lactamases from all major structural classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(4), 851–858. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.4.851>
- Carpenter, J., Neidig, N., Campbell, A., Thornsberry, T., Truex, T., Fortney, T., Zhang, Y., & Bush, K. (2019). Activity of imipenem/relebactam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high colistin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3260–3263. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz354>
- Chen, R. Q., Cheng, Q. Di, Chen, J. J., Sun, D. S., Ao, L. B., Li, D. W., Lu, Q. Q., & Yin, D. C. (2017). An investigation of the effects of varying pH on protein crystallization screening. *CrystEngComm*, 19(5), 860–867. <https://doi.org/10.1039/C6CE02136K>
- Chopra, I., Hesse, L., & Neill, A. O. (2002). Discovery and Development of New Anti-Bacterial Drugs Ian Chopra, Lars Hesse and Alexander O'Neill. *Elsevier Science*, 213–225.
- Cifuentes-Castro, V. (2018). *Estudio estructural de la β -lactamasa de espectro extendido TLA-1 mediante cristalografía de rayos X*. UNAM.
- Cifuentes-Castro, V., Rodríguez-Almazán, C., Silva-Sánchez, J., & Rudiño-Piñera, E. (2020). The crystal structure of ESBL TLA-1 in complex with clavulanic acid reveals a second acylation site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(2), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.138>
- Cui, L., & Su, X. Z. (2009). Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(8), 999–1013. <https://doi.org/10.1586/ERI.09.68>

- DOF. (2018). Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. In *Consejo de Salubridad General* (p. 22).
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Frase, H., Smith, C. A., Toth, M., Champion, M. M., Mobashery, S., & Vakulenko, S. B. (2011). Identification of products of inhibition of GES-2 β -lactamase by tazobactam by X-ray crystallography and spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 286(16), 14396–14409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208744>
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., ... Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>
- Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Grigorenko, V. G., Petrova, T. E., Carolan, C., Rubtsova, M. Y., Uporov, I. V., Pereira, J., Chojnowski, G., Samygina, V. R., Lamzin, V. S., & Egorov, A. M. (2022). Crystal structures of the molecular class A β -lactamase TEM-171 and its complexes with tazobactam. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 78, 825–834. <https://doi.org/10.1107/S2059798322004879>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(Figure 1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Jin, W., Wachino, J. I., Yamaguchi, Y., Kimura, K., Kumar, A., Yamada, M., Morinaka, A., Sakamaki, Y., Yonezawa, M., Kurosaki, H., & Arakawa, Y. (2017). Structural insights into the TLA-3 extended-spectrum β -lactamase and its inhibition by avibactam and OP0595. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10), 2–39. <https://doi.org/10.1128/AAC.00501-17>
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>

- Kalp, M., Totir, M. A., Buynak, J. D., & Carey, P. R. (2010). *Raman crystallographic evidence*. 131(6), 2338–2347. <https://doi.org/10.1021/ja808311s>. Different
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Croll, T. I., Hintze, B., Hung, L. W., Jain, S., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Poon, B. K., Prisant, M. G., Read, R. J., Richardson, J. S., Richardson, D. C., Sammito, M. D., Sobolev, O. V., ... Adams, P. D. (2019). Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: Recent developments in Phenix. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75, 861–877. <https://doi.org/10.1107/S2059798319011471>
- López, S. Y., Ponce de León, S., & Novales, G. M. (2019). Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), Segundo Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antimicrobianos. Ciudad de México. In *Universidad Nacional Autónoma de México. PUIS*.
- Matagne, A., & Frère, J. M. (1995). Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: The case of class A β -lactamases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1246(2), 109–127. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00177-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00177-1)
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., & Chruszcz, M. (2006). HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution - From diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(8), 859–866. <https://doi.org/10.1107/S0907444906019949>
- Müller, I. (2017). Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 73(2), 79–92. <https://doi.org/10.1107/S2059798316020271>
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 53(3), 240–255. <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>
- OMS. (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos* (p. 30).

- OMS. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- OPS. (2022). *La resistencia a los antimicrobianos, acelerada por la pandemia de COVID-19*.
- Padayatti, P. S., Sheri, A., Totir, M. A., Helfand, M. S., Carey, M. P., Anderson, V. E., Carey, P. R., Bethel, C. R., Bonomo, R. A., Buynak, J. D., & Van Den Akker, F. (2006). Rational design of a β -lactamase inhibitor achieved via stabilization of the trans-enamine intermediate: 1.28 Å crystal structure of wt SHV-1 complex with a penam sulfone. *Journal of the American Chemical Society*, 128(40), 13235–13242. <https://doi.org/10.1021/ja063715w>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Philippon, A., Jacquier, H., Ruppé, E., & Labia, R. (2019). Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. *Current Research in Translational Medicine*, 67(4), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.05.003>
- Philippon, A., Slama, P., Dény, P., & Labia, R. (2016). A structure-based classification of class A β -Lactamases, a broadly diverse family of enzymes. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(1), 29–57. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-15>
- Powers, J. H. (2004). Antimicrobial drug development – the past , the present , and the future. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 23–31. <https://doi.org/10.1111/j.1465-0691.2004.1007.x>
- PUIS. (2021). *Simposio: Resistencia Antimicrobiana: enfoque integral. Día 1*. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=FpiyznSsYtY&t=2369s>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rodríguez Duque, R., Gómez Leyva, B., Rodríguez Moldón, Y., & Díaz Armas, M. T. (2019). Las reacciones adversas como causa de hospitalización. *Correo Científico Médico*, 23(1), 223–244.
- Rubinson, K. A., Ladner, J. E., Tordova, M., & Gilliland, G. L. (2000). Cryosalts: Suppression of ice formation in macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 56(8), 996–1001. <https://doi.org/10.1107/S0907444900007587>

- Ruggiero, M., Kerff, F., Herman, R., Sapunarić, F., Galleni, M., Gutkind, G., Charlier, P., Sauvage, E., & Power, P. (2014). Crystal structure of the extended-spectrum β -lactamase PER-2 and insights into the role of specific residues in the interaction with β -lactams and β -lactamase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5994–6002. <https://doi.org/10.1128/AAC.00089-14>
- Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Garza-Ramos, U., Lara-Lemus, R., & Ledezma, L. (2000). TLA-1 : a New Plasmid-Mediated Extended-Spectrum β -Lactamase from *Escherichia coli*. 44(4), 997–1003.
- Silva, J., Aguilar, C., Becerra, Z., López-Antuñano F., & García, R. (1999). Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteria in Mexico. *Microbial Drug Resistance*, 5(3), 189–193. <https://doi.org/http://doi.org/10.1089/mdr.1999.5.189>
- Suárez, C., & Gudíol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Medicine*, 119(6 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 493–499. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00241-1)
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>