

35 Principales mecanismos de resistencia antibiótica

R. Vignoli, V. Seija

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema amplio, que puede ser considerado desde distintos ángulos. Queremos resaltar tres perspectivas fundamentales, pues consideramos que el futuro médico debe saber en todo momento a que nos estamos refiriendo en cada uno de ellos, para darle la interpretación correcta a la información que habitualmente le llega a las manos, ya sea a través de las comunicaciones científicas, como de los informes del laboratorio. De este modo podemos referirnos a mecanismos de resistencia individuales, resistencia poblacional y resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección.

Resistencia individual: se refiere a la interacción molecular entre una célula bacteriana con todo su arsenal genético y metabólico, y un antibiótico determinado.

Se estudian aquí las distintas herramientas con que cuenta una bacteria para evitar la acción del antibiótico en cuestión. Al referirnos a arsenal genético y metabólico queremos señalar que no siempre es suficiente con que el microorganismo posea un gen que codifica un mecanismo de resistencia en particular. Ese gen o esos genes deben ser expresados en cantidad y calidad suficiente, y muchas veces deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la sobrevivencia bacteriana. Como ejemplo se puede destacar la expresión en *E. coli* de su betalactamasa de clase C (tipo Amp-C). El gen que codifica para esta enzima capaz de romper distintos antibióticos betalactámicos (ver más adelante) se encuentra naturalmente codificado en el cromosoma de dicha bacteria, sin embargo la expresión de esta enzima es mínima debido a que este microorganismo carece del promotor natural (Amp-R). De este modo, si bien *E. coli* posee un gen capaz de producir un efectivo mecanismo de resistencia, su escasa expresión (asociada a la acción residual de algún promotor que se encuentre corriente arriba en el cromosoma bacteriano) hace que el microorganismo pueda comportarse como sensible a ampicilina.

Resistencia poblacional: representa el comportamiento *in vitro* de un inóculo bacteriano preestablecido (una población bacteriana) enfrentado a determinada concentración de un antibiótico, por un período de tiempo determinado. Estos son los tipos de estudios que en general se realizan en el laboratorio clínico. Los resultados finales de estos estudios darán un informe de sensibilidad o resistencia, que son muy importantes para la orientación terapéutica del paciente, pero que no siempre coinciden con el éxito terapéutico. Así, en un paciente que presenta una infección urinaria baja (cistitis) producida por una cepa de *E. coli*, en ocasiones puede obtenerse un tratamiento eficaz con ampicilina, pese a que los estudios *in vitro* muestran que es resistente a la misma. Esto es debido a que los betalactámicos se concentran

más de 100 veces en la vejiga que en el plasma, por lo que alcanzan niveles que exceden las posibilidades de resistencia bacteriana. En el otro extremo, un coco grampositivo como *S. aureus* o *S. pneumoniae*, que in vitro es sensible a eritromicina, no puede ser combatido con este antibiótico si se encuentra produciendo una bacteriemia, debido a que los macrólidos alcanzan una concentración plasmática insuficiente.

Resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección: en este caso hablamos de eficacia terapéutica y juegan otros factores, como el sitio de infección, las propiedades farmacocinéticas del antibiótico (donde se encuentran incluidas la dosis y el fraccionamiento diario del mismo), el estado inmunológico del paciente, el tamaño del inóculo bacteriano, etc. La recuperación del estado de salud del paciente, es el parámetro que determina la efectividad del tratamiento.

Estos tres conceptos forman peldaños de una escalera que se debe transitar para alcanzar el objetivo final, que es la erradicación de una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, en un paciente en particular. Dado que los antibióticos van a actuar directamente sobre el microorganismo productor de la infección (y por defecto también contra la flora normal), parece lógico pretender que el estudiante de medicina deba entender las bases de la interacción antibiótico-microorganismo, para que más adelante en la carrera pueda diseñar planes terapéuticos con el menor costo posible. Solo por este capítulo vamos a considerar que el único costo en cuestión es la aparición de resistencia bacteriana.

Precisamente la interacción antibiótico-bacteria se refiere al juego entre los mecanismos de acción de los antibióticos y los mecanismos de resistencia bacterianos.

El primer componente de este binomio ya fue analizado en el capítulo 34, por lo que en esta instancia nos referiremos a los mecanismos de resistencia bacterianos a los antibióticos.

Tipos de resistencia

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes gramnegativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la metilicina. Esta resistencia adquirida es la que estudiamos en el laboratorio e informamos al clínico. La resistencia adquirida es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección.

Genética de la resistencia

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética.

Nuevos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos). Tener presente estos elementos tiene implicancias epidemiológicas e incluso en algunos casos terapéuticas, como se verá más adelante.

SISTEMATIZACIÓN

La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías.

- Inactivación enzimática: el principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas y los betalactámicos, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos.
- Modificaciones en el sitio blanco: existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo. Destacaremos algunas como ser: modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico, como por ejemplo las alteraciones en las PBP de *Streptococcus pneumoniae* que confiere resistencia a penicilina e incluso a ceftriaxona; la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales, como PBP2' en *Staphylococcus* spp. meticilinorresistentes o la dihidrofolato reductasa alternativa en las cepas resistentes a trimetoprim.
- Alteraciones de la permeabilidad: se pueden incluir aquí tres tipos.
 1. Alteraciones de las membranas bacterianas: se ve fundamentalmente en gramnegativos, donde la membrana externa de la envoltura celular rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembrana con función de porinas. Existen algunas moléculas de antibiótico, como penicilina y vancomicina, que por su tamaño son incapaces de pasar a través de las porinas de bacilos gramnegativos. La disminución de la expresión de dichas porinas puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico. Se considera que en este caso los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico. La ocurrencia simultánea de este mecanismo unido a otro, por ejemplo hidrólisis enzimática (aún en niveles discretos), sí puede conferir altos niveles de resistencia y ocasionar fallos terapéuticos.
 2. Alteraciones en la entrada de antibióticos dependiente de energía, como ocurre en la primera etapa de ingreso de los aminoglucósidos. (Ver más adelante)
 3. Aumento de la salida de antibióticos: la resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. En gramnegativos estos sistemas en general se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Dentro de los múltiples sistemas de eflujo, los más conocidos son Mex AB-Opr M, Mex CD-Opr J y Mex EF-OprN. Siendo Mex A, Mex C y Mex E proteínas homólogas de aproximadamente 110 kD asociadas a la membrana citoplasmática; Mex B, Mex D y Mex F proteínas de aproximadamente 40 kD, responsables de la fusión de ambas membranas y por último Opr M, J y N porinas de membrana externa de aproximadamente 50 kD. Estos sistemas así constituidos exportan moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa. En grampositivos se trata de una proteína transmembrana con función ATPasa que actúa como bomba de eflujo.

A continuación se considerarán los mecanismos de resistencia de los grupos de antibióticos más utilizados a nivel clínico.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARED BACTERIANA

La pared bacteriana presenta la doble característica de ser una estructura vital para los microorganismos que la poseen y exclusiva de estos. De manera que el diseño o hallazgo de moléculas

de antibióticos que actúan a este nivel, constituye una herramienta poderosa y segura para el combate de las infecciones bacterianas. Su principal función es de protección osmótica, permitiendo la supervivencia bacteriana en diversas condiciones de osmolaridad, incluyendo los cambios bruscos de un medio a otro. Esta función se lleva a cabo gracias al peptidoglicano, que actúa como una armadura o malla envolviendo la bacteria, ofreciéndole rigidez y estabilidad. Sin embargo, para entender tanto el mecanismo de acción de los betalactámicos como sus mecanismos de resistencia, es necesario considerar no solo la estructura del peptidoglicano, sino también todo el mecanismo biosintético del mismo, el cual se encuentra acoplado al crecimiento bacteriano y a la regulación de diversos mecanismos de resistencia.

Peptidoglican o mureína

Estructura: el peptidoglicano se puede dividir en dos regiones.

1. Un polímero de aminoazúcares orientado en sentido transversal, compuesto por la unión cíclica y repetitiva de un dímero de N acetilglucosamina (NacGlc) y ácido N acetilmurámico (NacMur), mediado por uniones β 1-4.
2. Una fracción peptídica que está formada por un pentapéptido que se encuentra unido covalentemente a la molécula del NacMur y que clásicamente se constituye por L-alanina (Lala)-D-glutámico-(Dglu) Ac mesodi aminopimélico(mDAP) (en bacilos gramnegativos) o L- Lysina(L-Lys) en grampositivos y un dipéptido terminal D alanil-D-alanina (Dala-Dala). La estructura compuesta como NacGlc-NacMur pentapéptido constituye el peptidoglicano precursor. (Figura 1)

Entre las unidades peptídicas se produce el entrecruzamiento longitudinal que le otorga funcionalidad al polímero. Este entrecruzamiento se da de modo tal, que en bacilos gramnegativos se realiza mayoritariamente entre la Dala ubicada en la posición cuatro y el mDAP. Mientras que los grampositivos utilizan un pentapéptido de glicina, para unir Dala a Lys. Este entrecruzamiento tridimensional, le da la rigidez a la molécula de peptidoglicano, le permite

Figura 1. Esquema de los Componentes del Peptidoglican

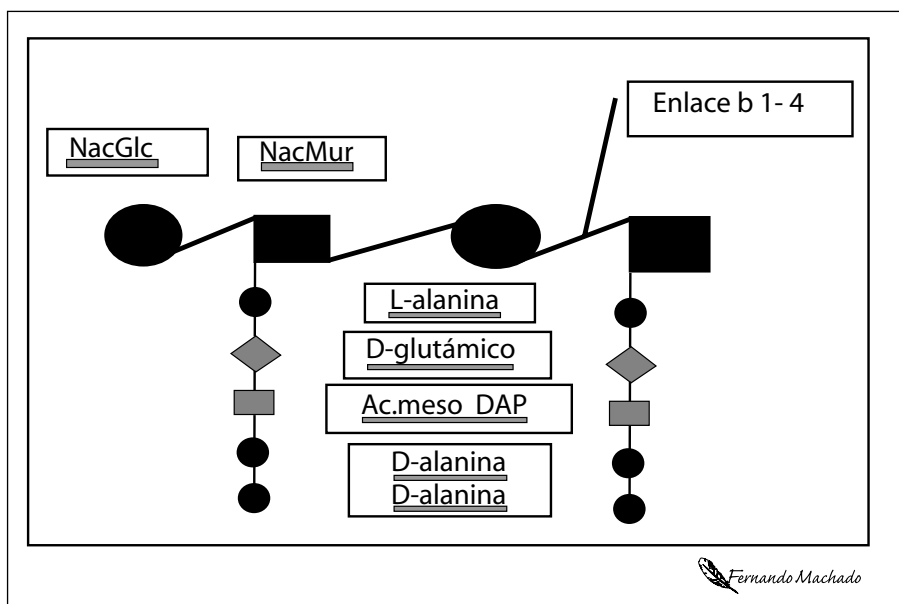
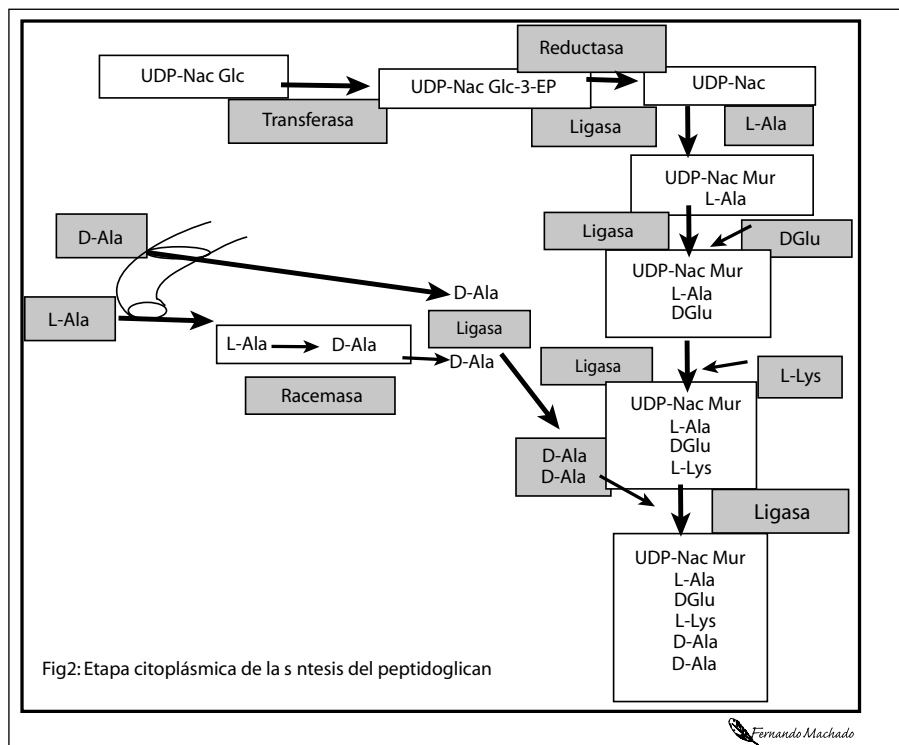


Figura 2. Esquema de los Componentes del Peptidoglican

cumplir con sus funciones principales (mantenimiento de la presión osmótica, determinación de la forma bacteriana y participación en la elongación y división celular).

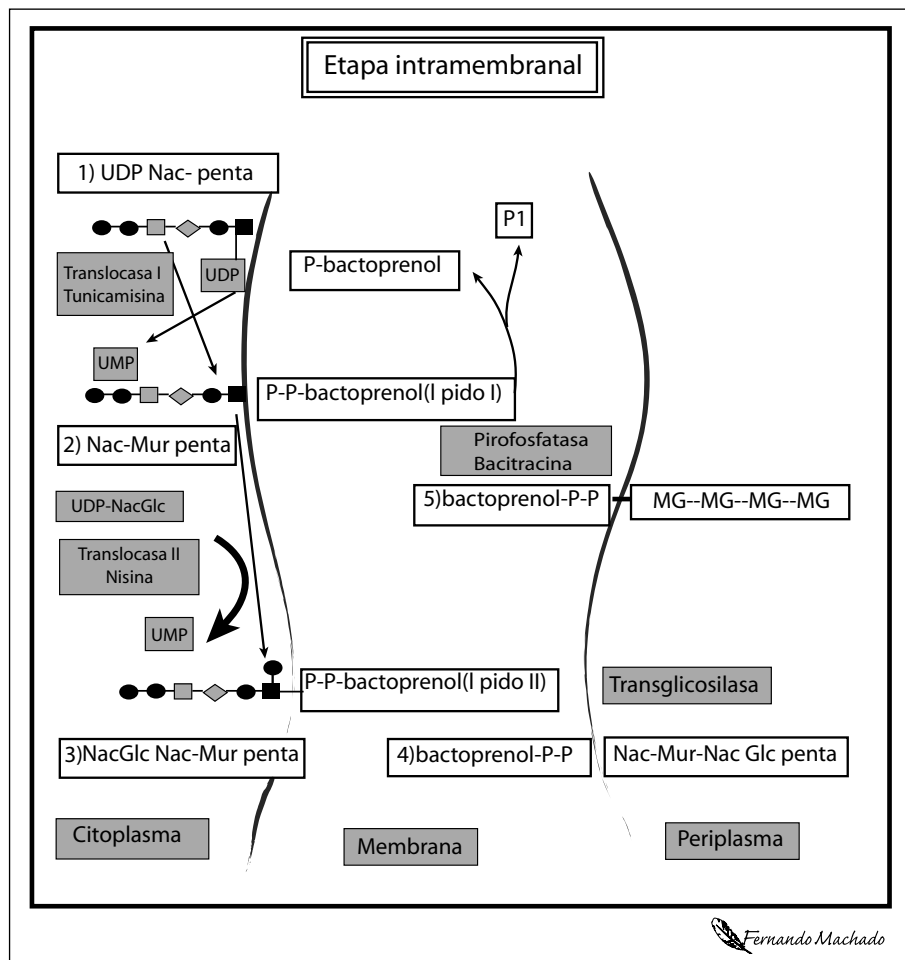
Biosíntesis: la síntesis de esta estructura, se puede dividir en tres grandes pasos.

1. Intracitoplásmico, dependiente de ATP donde se constituye el precursor NacGlc- NacMur pentapéptido unido a UDP (uridin di fosfato).
2. La segunda etapa es intramembranal y consiste en la unión mediante un enlace de pirofosfato del precursor, a un lípido transportador (bactoprenol) y la transposición hacia el espacio periplásmico.
3. La tercer y última etapa es periplásmica y consiste básicamente en dos pasos, la elongación del peptidoglicán preexistente y el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas.

Etapa citoplásmica: una vez sintetizado el UDP-Nac-Mur como producto derivado de la reducción del UDP-Nac-Glc, comienza la fase del ensamblaje del componente peptídico. Esto se produce mediante uniones secuenciales y consecutivas, mediadas por ligasas, que van agregando la L-alanina, luego el D-glutámico y como tercer paso el ácido mesodiaminopimélico o la L-lisina respectivamente, si se trata de gramnegativos o grampositivos (figura 2). El último dipéptido (D-alanil-D-alanina) se introduce ya preformado. Si bien esto parece un detalle insignificante, es este dipéptido el que interactúa con las transpeptidasas o proteínas de unión a penicilina (PBP) permitiendo el entrecruzamiento del peptidoglicán, es la estructura que simulan los betalactámicos para ejercer su efecto y es el sitio blanco de acción de los glicopéptidos, como vancomicina. (Ver figura 2)

El ingreso de alanina a la célula bacteriana se produce a través de porinas específicas para dicho aminoácido, que permiten el ingreso tanto de las formas D como L alanina. Una vez

Figura 3. Esquema de los Componentes del Peptidoglican



en el interior de la célula, una racemasa, convierte parte de las formas L en D, y finalmente una ligasa específica produce los dipéptidos D-ala-D-ala que completan el pentapéptido. Este compuesto (UDP-Nac-Mur-pentapéptido) que es hidrosoluble, se une a la cara interna de la membrana citoplasmática, y mediante una unión dependiente de energía mediada por una translocasa I, se relaciona al lípido transportador denominado bactoprenol, dando comienzo a la etapa transmembrana (figura 3).

Etapa transmembrana: de esta manera se genera el lípido I (que es la unión del bactoprenol a través de un enlace de pirofosfato al Nac-Mur-penta). Con esta unión se consigue enmascarar la hidrosolubilidad del peptidoglicán, de manera que pueda atravesar la bicapa lipídica. La translocasa II es responsable del agregado del Nac-Glc, constituyéndose así el lípido II (figura 3). La trasposición del lípido II ocurre entonces de un modo aún no dilucidado, promoviendo la colocación del precursor del peptidoglicano, ahora asomando hacia el espacio periplásmico.

Etapa periplásmica: fundamentalmente se producen tres pasos, la transglucosilación, la separación del lípido transportador y el entrecruzamiento peptídico (transpeptidación). La

primera y la última la realizan enzimas con actividad transglicosilasa y transpeptidasa (más conocidas como PBP de Penicilin Binding Protein), que se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática con su sitio activo hacia el espacio periplásmico. Las principales PBP denominadas en general PBP I, II y III (debido a que son las de mayor peso molecular), tienen en sus extremos carboxi y amino terminal las funciones transpeptidasas y transglicosilasas. Sin embargo, solo la función de transpeptidasa es inhibible por betalactámicos. La separación del lípido II se produce por acción de una pirofosfatasa que rompe el enlace pirofosfato, dejando al bactoprenol libre para comenzar otra vez el ciclo (figura 3).

Las transpeptidasas reconocen la estructura estereoquímica del dipéptido Dala-Dala, y mediante clivaje de la última alanina liberan la energía necesaria para realizar el entrecruzamiento con el mDAP en gramnegativos o el puente peptídico intermediario de los grampositivos. La regulación de este mecanismo de síntesis es de modo tal, que la inhibición de la transpeptidación inhibe todo el mecanismo de síntesis de pared.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

Los tres grandes mecanismos ya descritos pueden ponerse en juego; trastornos en la permeabilidad, alteración del sitio blanco de acción e hidrólisis enzimática.

Los trastornos de permeabilidad se corresponden fundamentalmente con la disminución de la expresión de porinas. Como ya se ha dicho, no es un mecanismo que por sí mismo promueva altos niveles de resistencia, pero puede ser muy importante en conjunción con distintos tipos de betalactamasas.

Modificación del sitio blanco de acción: como ya fue dicho, el sitio blanco de los betalactámicos son las diferentes PBP. La información genética de estas proteínas se encuentra codificada en el genoma bacteriano y no en plásmidos. Sin embargo, elementos que regulan la expresión de esos genes sí puede ser codificada en un plásmido. Pueden distinguirse distintas alternativas para que se produzca una PBP que presente menor afinidad por los antibióticos. La expresión de un gen alternativo, que codifique una PBP básicamente distinta a la existente, es el caso de *S. aureus* meticilinoresistente, donde la expresión del gen *mecA* produce una PBP alternativa PBP2' que es menos afín a la totalidad de los betalactámicos. Con esto se quiere decir que la expresión del gen *mecA* genera la resistencia a la totalidad de los betalactámicos, independientemente de los resultados in vitro. Este sería el típico caso donde la regulación es mediada por plásmidos.

Formación de genes mosaico, por incorporación de fragmentos de material genético de otro microorganismo: este proceso generado por transformación y recombinación homóloga, genera genes en parches, cuya secuencia queda constituida en parte por la información preexistente, y en parte por la recientemente adquirida. Ejemplos de esto son algunas de las PBP de *S. pneumoniae* resistente a penicilina y las PBP modificadas de *Neisseria gonorrhoeae*, donde se han detectado fragmentos con secuencias de alta homología con las PBP de *N. lactamica*.

Hidrólisis enzimática: este mecanismo implica la inactivación de los betalactámicos como consecuencia de la acción de enzimas que reciben el nombre de betalactamasas, y es el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos. Estas enzimas son un claro ejemplo de la plasticidad de la genética bacteriana. Probablemente originadas de un reducido grupo de enzimas cromosómicas, constituyen hoy una familia de proteínas de gran disimilitud, que ha requerido numerosas clasificaciones con el intento de poderlas agrupar. Las evidencias disponibles tienden a asignarle en un comienzo, alguna función particular en la síntesis de pared, sobre todo en bacterias gramnegativas. Estas hipótesis surgen de experimentos realizados en *Salmonella*, la cual no codifica en su cromosoma betalactamasas de clase C. Cuando se

introduce en una *Salmonella* un plásmido que codifica una betalactamasa de clase C (típicamente cromosómica), se observan en el microorganismo alteraciones morfológicas, retardo en la velocidad de crecimiento y disminución de su virulencia. Estas enzimas destruyen por hidrólisis, penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. La mayoría de estas enzimas actúan a través de la formación de un complejo acilpenicilina (merced a la presencia de una serina en la posición 70) que se hidroliza rápidamente, regenerando la enzima. Estas enzimas forman parte de un amplio grupo de proteínas denominadas serinproteasas.

Clasificación de las betalactamasas

Basándose en datos de secuencia parcial del ADN de las betalactamasas, Ambler en 1980 propone clasificarlas en cuatro clases: A, B, C y D. Las enzimas de clase A, cuyo prototipo es la enzima TEM-1, (actualmente presente en más del 50% de los aislamientos de enterobacterias en general), están codificadas en plásmidos y su peso molecular oscila entre 25 y 30 kD, al igual que las de clase B y D.

Las enzimas de clase C, están generalmente codificadas en el cromosoma bacteriano y son típicamente inducibles por betalactámicos. Se trata de proteínas que presentan unos 100 aminoácidos más que la de los otros grupos, por lo que su peso molecular suele rondar los 40 kD o más. En algunas especies, la región reguladora del gen ha desaparecido, y en consecuencia la enzima se expresa constitutivamente.

Las enzimas de clase B requieren zinc para su actividad y son consideradas por ello metalo betalactamasas. En general son plasmídicas, inhibibles por EDTA, incluyéndose aquí las enzimas que confieren resistencia a los carbapenemes.

Las enzimas de clase D constituyen un grupo reducido de enzimas plasmídicas, con actividad incrementada sobre oxacilina (OXA-1), inhibibles por iones cloruros y de forma variable por inhibidores del tipo ácido clavulánico o sulbactam. Estas enzimas, al igual que lo observado en las enzimas de clase A, han ampliado su espectro de acción mediado por mutaciones puntuales a partir de enzimas con actividad reducida a penicilinas como es el caso de las OXA derivadas. En 1995 Bush, Jacob y Medeiros proponen una clasificación funcional para las betalactamasas. Esta se basa en el peso molecular de la enzima, su punto isoeléctrico (pI), el perfil de sustrato y la propiedad de ser inhibidas por la presencia de ácido clavulánico o EDTA. En base a este esquema surgen cuatro grupos funcionales que se correlacionan bien con la clasificación de Ambler, denominándose: 1, 2, 3 y 4.

Las del grupo 1 corresponden a enzimas con acción cefalosporinasa, no inhibibles ni por ácido clavulánico ni por EDTA, y que se correlacionan con las enzimas cromosómicas de bacilos gramnegativos de tipo AmpC.

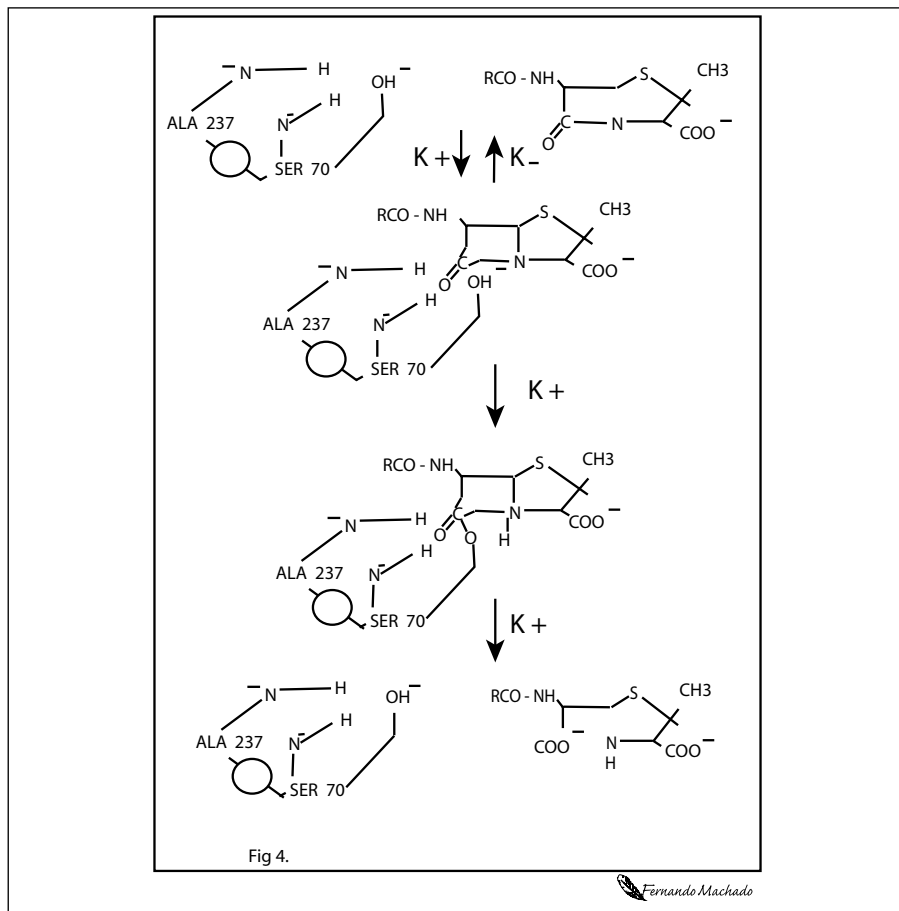
Las del grupo 2 están constituidas por penicilinasas y cefalosporinasas inhibibles por ácido clavulánico, y coinciden mayoritariamente con el tipo A de Ambler.

Las del grupo 3 son inhibibles por EDTA pero no por ácido clavulánico, se corresponden con las metaloenzimas de tipo B.

Por último, un grupo poco importante no descrito por Ambler, las del grupo 4, que incluye penicilinasas no inhibibles por ácido clavulánico encontradas en *Pseudomonas cepacia*.

Las betalactamasas son proteínas globulares que presentan una masa 100 veces superior a su sustrato. En este contexto, una vez que el antibiótico ingresa al sitio activo, son muchas las interacciones químicas que se producen entre ambas moléculas. Así, en las serin betalactamasas, el oxígeno con carga negativa del grupo carbonilo de los betalactámicos es atacado por los grupos amino (de carga positiva) de la serina 70 y una alanina que se encuentra

Figura 4. Esquematización de Funcionamiento de las Serin β -lactamasas. Se esquematiza la interacción β -lactamasa- β -lactámico. La enzima esta representada por los extremos amino de la alanina 273 y la serina 70, así como el grupo hidroxilo de esta última. La primera interacción E S es todavía reversible y se representa por $K+1$ y $K-1$. Una vez que se produce la acilación representado por $K+2$ la reacción es irreversible. Cuando la enzima es activa sobre el sustrato, la reacción culmina con la deacilación ($k+3$), con la consiguiente liberación del antibiótico hidrolizado y la recuperación de la actividad enzimática. Sin embargo cuando la enzima no es capaz de hidrolizar al sustrato, la reacción se detiene a este nivel, produciéndose la inactivación de la misma. Esto es lo que ocurre con los inhibidores del tipo del Sulbactam o ácido clavulánico



próxima. Se forma así mediante un enlace covalente irreversible, un complejo acilpenicilina (acilación). Estas interacciones generan un efecto de “tensión” sobre el grupo carbonilo, que tiende a romper el grupo amida del anillo betalactámico. La íntima proximidad que se genera entre el grupo hidroxilo de la serina 70 y el grupo amida del anillo culmina la acción, generando la hidrólisis del betalactámico. La presencia de una molécula de agua en el sitio activo de estas enzimas produce la liberación del antibiótico (deacilación), devolviendo la actividad enzimática (figura 4).

METALO BETALACTAMASAS (DE CLASE B)

Se trata de una familia de enzimas de gran diversidad genética, con porcentajes de identidad de secuencia de entre el 20% y 40%. Sin embargo, se encuentra un motivo conservado dado por cuatro residuos de histidina (H), una aspargina (D) y una cisteína (C), que se ubican según una secuencia consenso HXHXD(X)₅₅₋₇₄H(X)₁₈₋₂₄C(X)₃₇₋₄₁H, lo cual se corresponde a los ligandos con dos átomos de Zinc ++. El mecanismo de acción de estas enzimas difiere de las serin proteasas, ya que en este caso no se producen uniones covalentes entre la enzima y el sustrato. Aquí cada átomo de Zn ++ actúa polarizando distintas estructuras del anillo betalactámico. Así el Zn ++ (1) actúa polarizando el grupo carbonil de dicho anillo, produciendo un hueco oxianiónico que favorece la hidrólisis. El Zn ++ (2) queda dispuesto próximo al N del anillo, lo que sugiere que interactuaría con el grupo amida de modo de estabilizar el sustrato durante el ataque nucleofílico y favorecer luego el recambio de sustrato de la enzima.

Desde el punto de vista médico, existen dos aspectos importantes para clasificar las betalactamasas; ellos son la ubicación de los genes (cromosómicos o plasmídicos) y el espectro de acción. En base a esta información se pueden realizar ciertas generalizaciones.

Al referirnos a betalactamasas plasmídicas nos referiremos fundamentalmente a las de clase A, que son las serin enzimas que clásicamente se encuentran en plásmidos, mientras que las cromosómicas serán las de clase C. De todas maneras debe saberse que desde hace unos años atrás no es infrecuente la detección de betalactamasas de clase C en plásmidos.

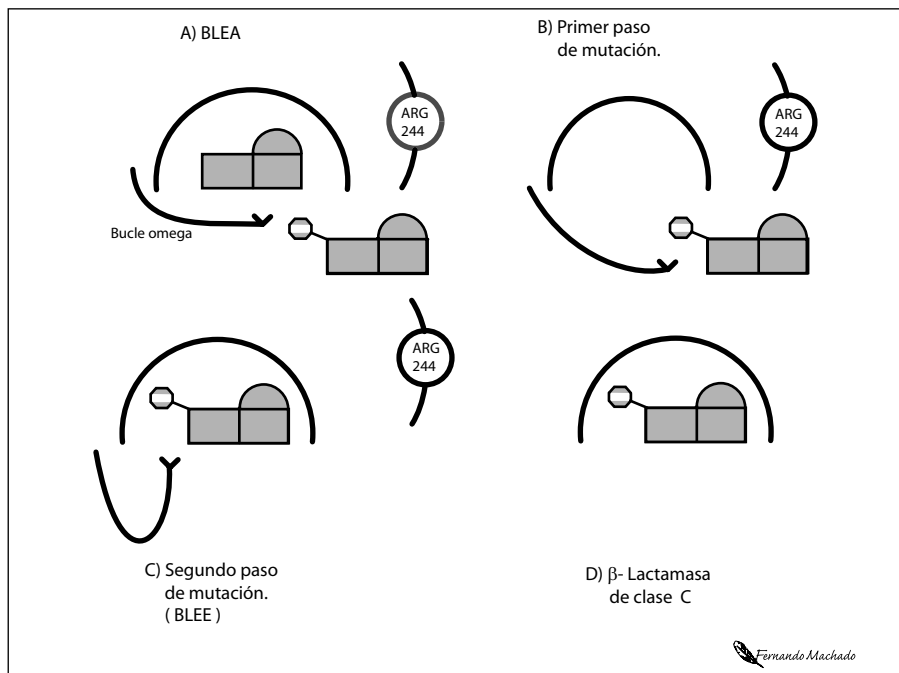
Principales betalactamasas plasmídicas

En los grampositivos son fundamentalmente penicilinasas, sin incluir acción sobre cefalosporinas. Las betalactamasas en bacilos gramnegativos, originalmente poseían un espectro más reducido de acción que las cromosómicas, pero eran más eficaces. La presencia de una estructura a manera de compuerta (denominado bucle omega) relacionada con el óptimo enfrentamiento entre el anillo betalactámico y la molécula de agua ya mencionada, restringía a su vez la llegada al sitio activo de moléculas más grandes. Estas primeras enzimas denominadas betalactamasas de espectro ampliado (BLEA), tienen acción sobre penicilinas y cefalosporinas de primera generación. El agregado de cadenas laterales grandes a nivel del carbono 7 del anillo cefalosporánico, evita la entrada de estos antibióticos al sitio activo de las (BLEA) y define a las cefalosporinas de tercera generación. Mutaciones generalmente en dos pasos, generaron la aparición de betalactamasas de espectro expandido (BLEE), con acción sobre cefalosporinas de tercera generación. (Ver figura 5) Para la generación de una BLEE a partir de una BLEA, una primer mutación implica la apertura del bucle omega, con la consiguiente pérdida de la eficacia (disminución de Vmax). Una segunda mutación reajusta la molécula de agua al anillo betalactámico. La sustitución de dos aminoácidos es suficiente para producir estos cambios.

Por lo dicho, las betalactamasas plasmídicas ofrecen al menos dos motivos de alerta: su fácil diseminación inter e intraespecie, y su alta variabilidad con el consiguiente aumento del espectro de acción. La mayoría de las transformaciones se dan a nivel intrahospitalario, donde las cepas pasan de paciente en paciente y las enzimas de germen en germen, hasta que las mutaciones ocurren.

Otro elemento importante de las betalactamasas plasmídicas es su capacidad de interactuar con los inhibidores de betalactamasas tipo sulbactam. Estas moléculas con anillo betalactámico pero casi sin actividad antibiótica, tienen la capacidad de una vez acilados, interactuar con residuos enzimáticos (arginina 244) que generan un total desenfoque entre la molécula de agua y el anillo betalactámico. El resultado es una actividad suicida donde se impide la

Figura 5. Representación esquemática de la estructura de diferentes tipos de β -lactamasas. A, B y C muestran una de las etapas evolutivas de una β -lactamasa de clase A desde una BLEA a una BLEE en dos eventos de mutaciones puntuales. D: β -lactamasa de clase C. La ausencia de bucle omega y de la estructura que contiene la arg 244, determinan su espectro de acción: cefalosporinas no inhibibles por sulbactam, ácido clavulánico o tazobactam.



deacilación. La estructura con la que actúan los inhibidores no se encuentra presente en las betalactamasas cromosómicas.

Betalactamasas cromosómicas: como ya se dijo no son inhibibles. La ausencia de bucle omega sella su perfil de actividad. No restringen la llegada de cefalosporinas, por lo tanto son cefalosporinas, pero por la misma razón no son altamente eficientes. Confieren resistencia a cefalosporinas de segunda generación, y dependiendo de su cantidad, también son capaces de conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Su mecanismo de expresión está estrechamente relacionado a la síntesis y reciclaje del peptidoglicán, que actúa a través de un promotor que en condiciones normales se encuentra inhibido. La ausencia de dicho promotor, impide la expresión de la betalactamasa y es lo que sucede con *E. coli*, donde aún teniendo el gen que la codifica, no es posible provocar su inducción.

Resistencia a glicopéptidos

Se trata de mecanismos complejos que involucran por lo menos cinco genes, algunos de ellos sobrepuestos parcialmente. El efecto final es la síntesis de un peptidoglicán que presenta un pentapéptido que culmina en Dala-Dlactato (Dlac) o Dala-Dserina (Dser).

Este producto no se une a vancomicina. Si bien las resistencias a vancomicina y teicoplanina pueden estar relacionadas, no se comprende tan bien la resistencia a este último. Se describirá por lo tanto la resistencia a vancomicina.

Se trata de un mecanismo inducible, que requiere la presencia de este antibiótico.

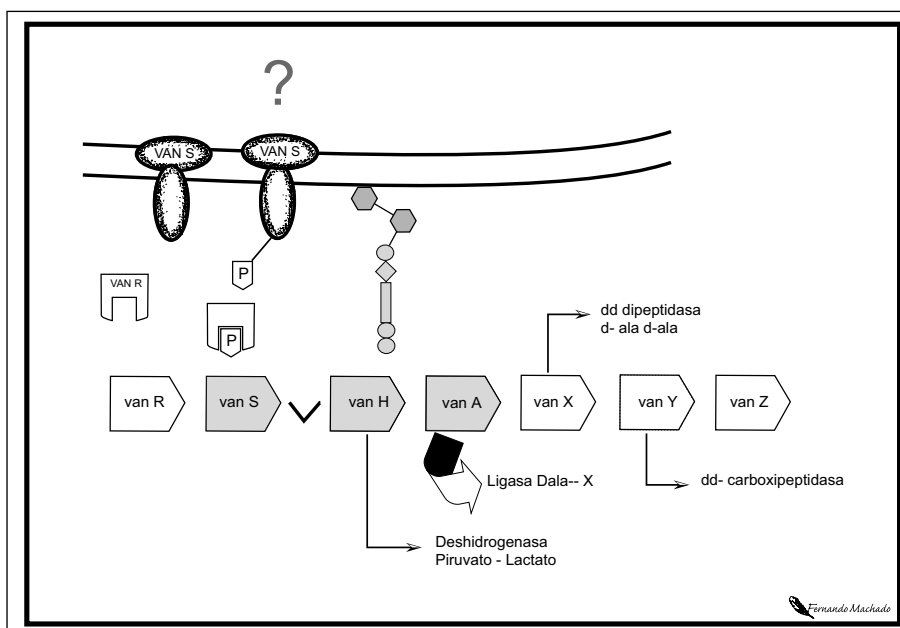
Hasta el momento se conocen cinco fenotipos de resistencia, correspondientes a cinco

grupos de genes distintos, denominados VanA a la E. Se explicará brevemente el funcionamiento del sistema vanA, por ser el más estudiado. Los otros fenotipos involucran algunas variantes menores.

El mecanismo se pone en funcionamiento mediante un sistema de traducción de señales de dos componentes: un péptido transmembrana denominado vanS y un segundo mensajero llamado vanR. vanS consiste en una histidinproteínquinasa, que contiene un residuo de histidina autofosforilable bajo un estímulo ambiental. No se sabe cual es el estímulo exacto, pero podría estar relacionado a la inactivación de las transpeptidasas y transglicosilasas. Por lo tanto la vancomicina actuaría de forma indirecta. Una vez fosforilada vanS, el grupo fosfato es traspasado a un residuo aspartato presente en vanR. VanR fosforilada posee un dominio de unión a ADN, donde actúa como promotor del conjunto completo de genes del fenotipo VanA (figura 6).

Además de vanR y vanS, son necesarias tres proteínas más relacionadas con otros tantos genes. Estos son vanA, vanH y vanX. El gen vanA codifica una ligasa alternativa a la que normalmente genera el dipéptido Dala-Dala. Esta nueva ligasa une Dala a un ligando inespecífico. Precisamente el gen vanH codifica una proteína con actividad deshidrogenasa que suministra el ligando para vanA. VanH genera D lactato a partir de piruvato. Para que la sustitución del dipéptido sea efectiva, deben eliminarse los dipéptidos Dala-Dala que continúan formándose por vía normal. VanX codifica una dd dipeptidasa que cliva los dipéptidos Dala-Dala antes que se incorporen al precursor del peptidoglicán, pero no Dala-Dlactato. Estos cinco genes vanS, vanR, vanA, vanH y vanX, son imprescindibles para la producción de la resistencia a vancomicina. Pueden encontrarse dos genes adicionales, vanY y vanZ. VanY codifica una ddcarboxipeptidasa que separa la última Dalanina del precursor ya formado, por lo que complementaría la acción de vanX.

Figura 7. Organización de los genes responsables del genotipo Van A y funciones de las proteínas correspondientes



Por último *vanZ* confiere resistencia a teicoplanina, por un mecanismo no dependiente de la modificación del pentapéptido, aún desconocido.

La codificación de estos genes esta asociada a un trasposón, y se la encuentra tanto en el cromosoma como en plásmidos. Este tipo de resistencia se corresponde con cambios en el sitio blanco.

QUINOLONAS E INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL ADN

Mecanismo de resistencia: básicamente son de dos tipos, por alteración del sitio blanco y por alteración de la permeabilidad. En los últimos años se ha descrito un mecanismo de resistencia plasmídico y trasmisible, que consiste en la acción de una proteína producto del gen *qnr*, que actuaría bloqueando el sitio blanco de acción. Las alteraciones del sitio blanco se producen por mutación espontánea a nivel cromosómico por alteración de una de las subunidades de la enzima denominada A (la ADN girasa está constituida por dos subunidades A y dos subunidades B). Estas enzimas mutadas tienen menor afinidad por el antibiótico. La aparición de una mutación puntual tiene una probabilidad de ocurrencia de 1×10^{-6} a 1×10^{-9} y es en sí un fenómeno estocástico, independiente de la presencia de antibióticos. La presión de selección que ejercen estos, favorecen la diseminación y prevalencia de aquellas cepas más adaptadas a las condiciones que le impone el fármaco.

Las alteraciones de permeabilidad incluyen la modificación de expresión de porinas y un sistema de bombas de eflujo que promueve la excreción del fármaco hacia el medio extracelular. Estas bombas descritas primero para grampositivos, también se hallan en gramnegativos asociadas a porinas de la membrana externa, lo que genera un canal directo entre el citoplasma y el exterior, evitando el espacio periplásmico. La energía de activación depende de un contratransporte de protones, y como ya se ha dicho, constituyen un mecanismo inespecífico de multiresistencia, que incluye resistencia a tetraciclinas, eritromicina, cloranfenicol y quinolonas. Este sistema es habitualmente utilizado por las bacterias para la exportación de diversas sustancias como toxinas (por ejemplo hemolisinas) y sideróforos.

AMINOGLUCÓSIDOS

Mecanismos de resistencia: los tres grandes mecanismos de resistencia ya nombrados son encontrados contra estos antibióticos. El más importante es la inactivación enzimática, seguido por alteración de la permeabilidad y lejos en tercer lugar, limitado a la estreptomycinina y la espectinomycinina, puede observarse una mutación puntual en el sitio de acción de estos agentes, la proteína de la subunidad 30s denominada proteína S12.

Inactivación enzimática: diversas enzimas pueden inactivar estos antibióticos por acción a distintos niveles. Así, pueden acetilar, adenilar o fosforilar, por intermedio de acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosforiltransferasas. Estas enzimas tienen un perfil diferente de aminoglucósidos sobre los que actúan, pero la presencia de más de una enzima dificulta este análisis, incluyendo la aparición de enzimas bifuncionales como las presentes en enterococos que poseen actividad de acetil y fosforiltransferasas. Las enzimas pueden ser cromosómicas o plasmídicas y se expresan constitutivamente, independientemente de la presencia de antibiótico.

La inactivación enzimática se produce en el proceso de transporte del antibiótico hacia el interior de la célula para alcanzar el ribosoma. La resistencia a cada aminoglucósido es el resultado del balance entre dos velocidades: la de captación intracelular y la de inactivación enzimática. La velocidad de inactivación depende de la afinidad de la enzima por el antibiótico. La resistencia a los aminoglucósidos tiene una incidencia variable a nivel mundial, debido al predominio diferente de las enzimas inactivantes como consecuencia de la presión

de selección ejercida por el uso de determinados aminoglucósidos. El predominio de enzimas que inactivan la estreptomicina y kanamicina ha llevado a desplazar el uso de estos fármacos. En general la mayor incidencia de resistencia se da en enterobacterias.

Alteraciones de la permeabilidad: los aminoglucósidos entran a la célula bacteriana por un mecanismo complejo que implica la adherencia a moléculas de carga negativa, como residuos del LPS, cabezas polares de fosfolípidos y proteínas aniónicas de membrana externa. Luego de esta adherencia por rearreglo del LPS se produce la entrada al espacio periplásmico del agente. Al llegar a la membrana citoplásmica se produce el ingreso al citoplasma, por un sistema de transporte acoplado al gradiente protónico. Dicho gradiente depende de la actividad de las cadenas respiratorias aerobias, lo cual explica la inactividad de estos agentes frente a anaerobios. Precisamente las modificaciones de este gradiente electroquímico, dificultan la entrada del agente a la célula. Mutaciones cromosómicas espontáneas, generan alteraciones de este potencial o de la cadena de electrones.

MACRÓLIDOS

Mecanismos de resistencia: básicamente implican los grandes mecanismos ya mencionados. En bacilos gramnegativos donde el fármaco no es muy activo, se observan trastornos en la permeabilidad. El mecanismo de eflujo activo ya ha sido mencionado y es mediado por plásmidos. Dos tipos de alteraciones del sitio blanco pueden producir resistencia a macrólidos: a) mutaciones puntuales a nivel cromosómico de la proteína L15; b) inducción de una enzima metilante que metila el ARNr 23s de la subunidad mayor, lo que altera la afinidad del receptor no solo por los macrólidos, sino también por lincomicinas y estreptograminas. Estos antibióticos son químicamente diferentes pero comparten mecanismos de acción y de resistencia, así como cierto espectro de acción. Este mecanismo puede encontrarse asociado a plásmidos y trasposones.

Por último, se ha detectado inactivación enzimática por estererasas o fosfotransferasas fundamentalmente en enterobacterias, aunque se desconoce su importancia clínica.

Bibliografía

- Ayala J. Genética molecular de la pared microbiana. Nuevos blancos susceptibles de inhibición. En: Vicente M, editor. Avances en Ingeniería Genética. Series Nuevas Tendencias. —. Madrid:CSIC; 1994;9191-224.
- Matagne A, Lamotte J, Frere J. Catalytic properties of Class A β lactamases: efficiency and diversity. *BiochemJ*. 1998;330:581-98.
- —. Mecanismos de resistencia. En: Madel, Douglas, Bennet, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4ta ed.—:—;—.
- Medeiros A. Quality and Resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. Update β -lactamases. 1997;3(sup 4):452-459.
- Rasmussen B, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases Antimicrob. Agents. *Chemotherm*. 1997 Feb;41(2):223-32.
- Wang Z, Fast W, Valentine A, Bencovic S. Metallo β lactamase: Structure and mechanism. *Current opinion in Chemical Biology*. 1999;3:614-22.