

REVISIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE NUEVA DELHI METALO- β -LACTAMASA-1 (NDM-1) Y SUS VARIANTES^a

REVIEW, CHARACTERIZATION AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF NEW DELHI METALLO- β -LACTAMASA-1 (NDM-1) AND ITS VARIANTS

EDUVAN VALENCIA^{b*} WILSON OLARTE^{c d} MAURICIO GALVIS^{b e} FERNANDA SASTOQUE^b

Recibido 19-08-2022, aceptado 11-11-2022, versión final 28-11-2022

Artículo Revisión

RESUMEN: Tanto la enzima NDM-1, como sus variantes reportadas, presentan multirresistencia a distintos antibióticos para el tratamiento de enfermedades de tipo infeccioso. El presente trabajo muestra una revisión del mecanismo hidrolítico que sigue la enzima, un análisis bioinformático de la NDM-1 a NDM-16, algunas características genéticas, mutaciones y estudio del sitio activo. Se encontró que las 16 variantes presentan 14 mutaciones, utilizando como plantilla, la secuencia aminoacídica de NDM-1; además se establece la posibilidad de tomar estructuras de medicamentos como D-captopril para diseñar prototipos de mayor actividad y biodisponibilidad, así como baja toxicidad.

PALABRAS CLAVE: NDM-1; PDB; PsiPred; SWISS-MODEL.

ABSTRACT: Both the NDM-1 enzyme and its reported variants present multiresistance to different antibiotics for the treatment of infectious diseases. The present work shows a review of the hydrolytic mechanism followed by the enzyme, a bioinformatic analysis of NDM-1 to NDM-16, some genetic characteristics, mutations and study of the active site. It was found that the 16 variants present 14 mutations, using the amino acid sequence of NDM-1 as a template; furthermore, the possibility of taking structures from drugs such as D-captopril to design prototypes with higher activity and bioavailability, as well as low toxicity, is established.

KEYWORDS: NDM-1; PDB; PsiPred; SWISS-MODEL.

^aValencia, E., Olarte, W., Galvis, M. & Sastoque, F. (2023). Revisión, caracterización y análisis bioinformático de nueva delhi metalo- β -lactamasa-1 (ndm-1) y sus variantes. *Rev. Fac. Cienc.*, 12 (1), 59–76. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v12n1.104338>

^bSecretaría de Educación Distrital de Bogotá. Área de Ciencias Naturales

* Autor para correspondencia: edvalenciac@unal.edu.co

^cSecretaría de Educación y Cultura de Soacha.

^dUniversidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.

^eUniversidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.

1. INTRODUCCIÓN

El hombre se ha visto en la necesidad de acudir a la naturaleza para obtener sustancias que le permitan tratar de mejor manera las enfermedades, es por ello que la invención de medicamentos para mitigar sus dolencias se remonta a los mismos orígenes de las diversas sociedades humanas (Escalona *et al.*, 2008), debido a esto, se ha establecido una lucha continua entre la humanidad y algunos seres vivos como las bacterias en busca de la supervivencia de cada especie (Pérez, 2009). Por ejemplo, el hombre ha obtenido compuestos como los antibióticos descubiertos por primera vez por el médico escocés Alexander Fleming en 1929, con el fin de establecer estrategias de defensa que les permita sobrevivir a las enfermedades de tipo infeccioso causadas por las bacterias. Por otra parte, no es desconocido que el uso indiscriminado de antibióticos (en algunos países) para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en personas como en animales, ha ocasionado que las bacterias en sus procesos de mutación y por consiguiente de evolución hayan creado mecanismos de resistencia, entre los cuales se encuentra con mayor frecuencia la producción de enzimas β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos de uso convencional, inhibiendo su acción como bactericida o bacteriostático (Suárez & Gudíol, 2009; Yacoby & Benhar, 2007; Cruz & Ramón, 2010; Yang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015).

Cuando los pacientes presentan infecciones por bacterias resistentes, se emplean antibióticos de amplio espectro como los carbapenémicos que son usados como último recurso (Ariza & León, 2013; Deshpande *et al.*, 2010), el inconveniente es que dichos fármacos han sido burlados por la aparición de enzimas del tipo carbapenemasas en los microorganismos que se especializan en la inactivación de los medicamentos ocasionando el bloqueo, por decirlo así, de su acción terapéutica (Morales-Moreno *et al.*, 2014). Algunas de las bacterias que han mostrado resistencia a la mayoría de los antibióticos por la producción de carbapenemasas adquiridas, son del tipo Gram negativas no fermentadoras como por ejemplo las publicadas por la OMS en febrero de 2017 como patógenos para ser priorizados y para los cuales se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Entre las bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella spp*, *Serratia*, *Proteus*, *E. coli* y *Enterobacter spp*, lo cual indudablemente y como se ha venido mencionando en líneas anteriores, plantean un preocupante problema de salud pública a nivel mundial debido a su rápida diseminación y alta resistencia en el ambiente hospitalario (Queenan & Bush, 2007; Papp-Wallace *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2015), siendo las causantes de aproximadamente 1.27 millones de muertes en 2019 asociadas con multirresistencia a los diversos antimicrobianos (Murray *et al.*, 2022). Por tal motivo, se han enfocado los esfuerzos en buscar nuevos medicamentos que burlen dichos mecanismos de defensa y que muestren un buen perfil de biodisponibilidad y toxicidad (Alcaide *et al.*, 2004; Valencia, 2014).

Uno de los primeros países en emitir una alerta sobre el incremento de cepas Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae* con resistencia a carbapenémicos en pacientes, fue el Reino Unido en el 2009 (Deshpande *et al.*, 2010). Varios de los pacientes habían tenido alguna experiencia de tratamientos hospita-

larios en la India y Pakistán y presentaban un nuevo tipo de M β L designada posteriormente como NDM-1 por el país donde se evidenció el primer foco de infección. Posteriormente este mecanismo también fue encontrado en Europa, Japón, Australia, Canadá y Estados Unidos, en Latinoamérica, solo hasta el año 2011 se reporta el primer caso en Guatemala, con el aislamiento de dos cepas portadoras de la NDM-1 prendiendo las alertas epidemiológicas en nuestro continente (Ariza & León, 2013). En 2012 se detectó en Colombia en *Klebsiella pneumoniae*, en Paraguay en *Acinetobacter pittii* y en Uruguay en *Providencia rettgeri*. En 2013 otros países habían reportado el hallazgo de la circulación de este mecanismo: Argentina en *P. rettgeri*, Brasil en *P. rettgeri*, Honduras en *A. baumannii*, México en *P. rettgeri*, Nicaragua en *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter Cloacae*; y recientemente, Costa Rica en *E. Coli* (Rojas *et al.*, 2017).

De acuerdo a lo expuesto, el presente escrito pretende dar una descripción en lo que respecta a enzimas del tipo carbapenemasas M β L (metalo β -lactamasas) de tipo NDM-1, abordando apartes como el mecanismo de resistencia, algunas características genéticas, estructura y mutaciones, revisión del sitio activo, análisis bioinformático de su estructura primaria, secundaria y terciaria, entre otros. Por ejemplo, las metaloenzimas que requieren de un ion metálico divalente como el Zn^{2+} para ejercer su actividad (Ackerman & Gatti, 2013), son una amenaza latente ya que hidrolizan todos los antibióticos β -lactámicos usados terapéuticamente, con la excepción de monobactámicos como el aztreonam, y no son bloqueadas por los inhibidores de β -lactamasa del tipo serina, tales como ácido clavulánico, tazobactam, y sulbactam (Hall *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2014). De las NDM-1, se tratarán tópicos como estudio estructural, características del gen que las produce, secuencia aminoacídica, mecanismo de acción, análisis bioinformático, entre otros, que servirán como punto de referencia para distintos grupos de investigación que estén trabajando sobre este tipo de proteínas ya que tienen una gran labor puesto que éstas MBL están evolucionando rápidamente y volviéndose cada vez más eficaces y especializadas frente a diferentes antibióticos (Bebrone, 2007; Bebrone *et al.*, 2010), y además se suma el hecho de que actualmente no están disponibles inhibidores clínicamente relevantes de estas enzimas (Ackerman & Gatti, 2013).

2. ¿POR QUÉ NDM-1?

Desde su primera aparición en Asia, NDM-1 ha sido uno de los objetivos terapéuticos con más relevancia y preocupación de los diferentes grupos de investigación que abordan el tratamiento de enfermedades infecciosas. La metalobetalactamasa mencionada, ha sido un dolor de cabeza principalmente en lo que respecta a los procedimientos seguidos en los diferentes hospitales para tratar infecciones ya que cuentan con variedad de mecanismos de resistencia frente a los diversos antibióticos β -lactámicos, excepto aztreonam, colistina y tigeciclina (Gonzalez *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014; OPS/OMS, 2014). La metaloenzima se encuentra codificada por el gen NDM-1 el cual pertenece a una gran familia codificadora de carbapenemasas que, y como se ha mencionado, los carbapenémicos son los antibióticos que se emplean como último recurso antimicrobiano, convirtiendo a éstos patógenos en un serio problema de salud (Lee *et al.*, 2001; Meini *et*

al., 2014). El gen se puede encontrar en diferentes plásmidos (un plásmido de 180 Kb de *K. pneumoniae* y un plásmido de 140 kb de *E. coli*) que se pueden transferir lateralmente con facilidad a otras cepas con una frecuencia alta (Zhang *et al.*, 2014), ocasionando un alto riesgo de pandemia mundial entre *Enterobacteriaceae* (Bebrone, 2007; Rolain *et al.*, 2010).

La propagación de NDM-1 ha planteado algunas problemáticas como: (a) la posible existencia de portadores que son asintomáticos y que aún no han sido detectados permitiendo una rápida propagación; (b) la falta de inhibidores altamente eficaces disponibles hasta la fecha; (c) la alta transferencia horizontal que existe entre las diferentes cepas bacterianas por medio de plásmidos que confieren multirresistencia (Ariza & León, 2013; Rolain *et al.*, 2010; Strynadka *et al.*, 1992), son interrogantes que sin duda alguna ponen en alerta a todos los sistemas de salud ya que el número de contactos de personas asintomáticas y la multiplicidad de zonas geográficas en riesgo y que carecen de protocolos robustos para la identificación de MβLs, podrían convertir el escenario en un problema casi imposible de tratar en un periodo de tiempo muy corto (Rolain *et al.*, 2010), en nuestro país, NDM ha sido detectada y actualmente su diseminación se ha incrementado en un número considerable de pacientes infectados de acuerdo con los datos del sistema de vigilancia del INS (instituto nacional de salud), lo que ha generado inquietud por la posibilidad de que en Colombia éste mecanismo de resistencia se vuelva de alta prevalencia, como ha ocurrido con otras carbapenemasas (Rojas *et al.*, 2017).

Es aquí donde se deben direccionar todos los esfuerzos hacia la prevención, control y detección temprana de los microorganismos que portan el gen NDM-1 con el fin de evitar que la transmisión de estos mecanismos de resistencia lleguen a niveles tan peligrosos que las infecciones no puedan ser tratadas (Ariza & León, 2013); además de seguir en el estudio y conocimiento tanto a nivel estructural como funcional de estas NDM, con el objetivo de proponer alguna alternativas de solución como lo es sin ninguna duda nuevos inhibidores con un efecto terapéutico significativo, que sean capaces de establecer un complejo acil-enzima estable parecido al que sigue el mecanismo propuesto para las serin β-lactamasas (Yang *et al.*, 2015), que presenten una alta biodisponibilidad, que no presenten toxicidad o sea mínima, serían algunos de los retos a trazarse.

3. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE NDM-1

Con el objetivo de garantizar su permanencia en la naturaleza, los microorganismos han sorteado hábilmente los efectos de los diferentes fármacos creando resistencia a éstos. Entre los mecanismos de resistencia más comunes en bacterias Gram negativas clínicamente importantes, se encuentra la producción de enzimas denominadas β-lactamasas, y en específico aquellas metaloenzimas como NDM-1, las cuales causan la hidrólisis del anillo β-lactámico de los antibióticos produciendo un compuesto carente de actividad antimicrobiana (Ariza & León, 2013; Papp-Wallace *et al.*, 2011; Meini *et al.*, 2014; Strynadka *et al.*, 1992; Bush & Jacoby, 2010), las mutaciones en las proteínas ligadoras o de anclaje de penicilina (PBP) y porinas alte-

ran su expresión y función (Gonzalez *et al.*, 2015), las bombas de eflujo, las modificaciones que impiden o reducen la entrada del antibiótico a la bacteria (impermeabilidad) y la pérdida de proteínas de membrana externas (Deshpande *et al.*, 2010), constituyen los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos que son usados en los esquemas de tratamiento de enfermedades de tipo infeccioso a nivel nosocomial.

Específicamente para los carbapenémicos, existen dos mecanismos de resistencia que son la adquisición de genes que codifican para carbapenemasas y la reducción en la captación del antibiótico por asociación entre modificación de las porinas (por deficiencias en la calidad o cantidad) y con sobreexpresión de β -lactamasas con débil afinidad sobre carbapenémicos (Gonzalez *et al.*, 2015). Es por lo anterior que se hace necesario la detección y caracterización casi inmediata de éste tipo de enzimas ya que juegan un papel crítico en el momento de seleccionar o plantear una terapia adecuada para paliar dicha infección.

4. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Los genes que codifican las MBL pueden tener su origen cromosómicos o extracromosómicos (Walsh *et al.*, 2005), aunque por su rápida diseminación se les relaciona con genes ubicados en plásmidos los cuales a su vez, están asociados a estructuras genéticas móviles (secuencias de inserción, integrones y transposones) (Ovalle *et al.*, 2013), lo que convierte a las β -lactamasas en general en un claro ejemplo de la plasticidad de la genética bacteriana (Vignoli & Seija, 2006).

La propagación de los genes de MBL, se piensa, fue impulsado por el consumo regional de cefalosporinas de amplio espectro y carbapenémicos (Walsh *et al.*, 2005). La mayoría, si no todos, los genes que codifican los tipos IMP y VIM así como GIM-1 fueron encontrados como genes cassettes en integrones de clase 1, aunque los genes IMP se han encontrado en integrones de clase 3 (Walsh *et al.*, 2005). Este no es el caso del gen NDM-1, lo cual puede ser un indicio de que su origen es distinto al de otras MBL (Ariza & León, 2013).

La mayoría de los genes que codifican las MBL se encuentran ubicados en plásmidos por lo general entre 120 y 180 kb, aunque el gen blaVIM-7 se ha encontrado en plásmidos de 24kb (Walsh *et al.*, 2005), en específico el gen NDM-1 está codificado dentro de una sección de ADN de 1350 pb con un contenido de Guanina-Citosina (GC) menor (57%) que el ADN circulante que posee entre 62% y 65% de GC. Corriente arriba, el gen posee 250 nucleótidos de ADN que contiene secuencias similares a las secuencias promotoras convencionales, demostrando la probabilidad de que el promotor del gen NDM-1 fuera adquirido junto con el gen (Walsh *et al.*, 2005).

El marco abierto de lectura del gen NDM-1 codifica para una proteína putativa de 269 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 27.5 kDa. Este gen comparte muy pocas características con otras MBL, y con el que se relaciona más estrechamente, la VIM-1/VIM-2, solo posee un 32.4% de identidad

(Yong *et al.*, 2009).

El gen NDM-1 se ha descrito en diferentes tipos de plásmidos (IncA/C, IncF, Inc L/M) y aunque un poco menos frecuente, está integrado al cromosoma bacteriano (Moncada, 2014). Varios de estos plásmidos se caracterizan por su capacidad de ser auto-transferibles por medio de la conjugación bacteriana, así como un amplio rango de hospederos entre especies gram negativas incluyendo *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Vibrionaceae* (Moncada, 2014).

De esta manera la diseminación de este gen con otros genes de resistencia a diferentes grupos de antibióticos como macrólidos, aminoglicósidos, rifampicina, sulfamethoxazol y aztreonam se ha informado, haciendo el panorama cada vez más alarmante. A diferencia de otras enzimas como KPC y OXA-48. Los aislamientos portadores del gen blaNDM presentan altas concentraciones mínimas inhibitorias a carbapenémicos (Moncada, 2014). Varios de los factores anteriormente mencionados hacen del control de la propagación del gen NDM-1 un importante tema de salud pública ya que su diseminación puede ocurrir a gran velocidad generando un importante problema en cuanto a control de enfermedades infecciosas (Ariza & León, 2013).

5. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y MUTACIONES ENCONTRADAS (NDM-1 A LA NDM-16)

Las MBL tienen dos familias representativas muy importantes, la VIM y la IMP, aunque en la actualidad la NDM hace parte relevante de este grupo por su amplia diseminación a nivel mundial. Como se ha venido mencionando, estas enzimas poseen baja homología en sus aminoácidos aproximadamente del 30%, pero sus propiedades son similares; son transferibles, la mayoría se encuentra en genes cassetes localizados en integrones tipo 1 y en ocasiones en plásmidos y transposones (Suárez *et al.*, 2006).

Las enzimas del tipo NDM, al igual que otras MBL son proteínas globulares, que presentan una masa 100 veces mayor que su sustrato. En este sentido, una vez que el antibiótico ingresa al sitio activo, son varias las interacciones químicas que se producen entre ambas moléculas (Vignoli & Seija, 2006). Desde el punto de vista químico, son hidrolasas con clasificación E.C. 3.5.2.6, donde una comparación entre las estructuras terciarias de las tres subclases de enzimas, revela un arreglo común α β - β α tipo sandwich (Ackerman & Gatti, 2013); contiene dos subdominios, cada uno separado por una α -hoja y un par de hélices que caen hacia el exterior de cada una de ellas (Abarca & Herrera, 2001). En las enzimas del tipo B1 como la NDM, el sitio activo contiene dos iones zinc (Zn^{2+}) los cuales están coordinados por el motivo altamente conservado (His, His, His, Asp). Estos iones zinc están relacionados con la coordinación de dos moléculas de agua necesarias para la hidrólisis de su sustrato (Dortet *et al.*, 2014).

A la fecha se han reportado 16 variantes de la enzima NDM, las cuales varían en algunas mutaciones de

Tabla 1: Mutaciones encontradas en las 16 variantes de la enzima NDM. Fuente: Elaboración propia.

Metalo Betalactamasa	Mutaciones	Metalo Betalactamasa	Mutaciones
NDM-1	No Aplica	NDM-9	E152K
NDM-2	P28A	NDM-10	R32S, G36D, G69S, A74T
NDM-3	P28A, A99T, L221P	NDM-11	M154V
NDM-4	M154L	NDM-12	M154L, G222D
NDM-5	V88L, M154L	NDM-13	D95N, M154L, D130G
NDM-6	A233V	NDM-14	M154L, A233V
NDM-7	D130N, M154L	NDM-15	M154L, A233V
NDM-8	D130G, M154L	NDM-16	V88L, M154L, A233V

sus aminoácidos (una o máximo dos mutaciones) y en su actividad hidrolítica. Los residuos conservados del sitio activo de esta serie de MBL reportados son: H120, A121, H122, D124, H189, D192, C208, H250 (Cortés, 2011). La mutación 154 Met-Leu, en el Loop L8, que se ha informado en las variantes NDM-4, NDM-5, NDM-7, NDM-8, NDM-11, NDM-12, NDM-13, NDM-14, NDM-15 y NDM-16, se considera crítica en la función hidrolítica de la enzima ya que se podría relacionar con un incremento de su actividad en comparación con otras variantes (Dortet *et al.*, 2014). En la Tabla 1 se muestra las mutaciones de 16 variantes del gen NDM.

Se puede evidenciar por comparación con NDM-1 catorce mutaciones que ha sufrido dicho gen desde su descubrimiento, aislamiento y elucidación lo cual ya completa más de una década y en donde el panorama sigue siendo incierto debido a que en este momento y en el futuro próximo no se esperan fármacos que puedan arrojar resultados clínicos significativos para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias que portan cualquiera de las variantes de NDM. Dichas mutaciones, en su mayoría ocasionadas por el uso inadecuado de los antibióticos, se encuentran en gran parte localizadas en las cadenas laterales de la metaloenzima (57.14%) alterando la función de expresión, que generalmente se refleja en un aumento de la actividad hidrolítica que presentan frente a dichos fármacos, además de pasar el rasgo mencionado a su descendencia, lo que dará lugar a una colonia totalmente resistente (Ariza & León, 2013; Ghafur, 2010; Cortés, 2011; Abhinav & Jaiswal, 2013; Meini *et al.*, 2014). Otro hecho que sustenta lo anteriormente mencionado, son los estudios de CMI (concentración mínima inhibitoria) en diferentes cepas de bacterias portadoras de NDM-1 a NDM-8 que han sido sometidas a diversos antibióticos como cefalosporinas (cefazidima, cefalotina y cefotaxima) y carbapenems (imipenem y meropenem), mostrando resistencia a dichas dosis y por consiguiente aumentado las CMI para los posibles tratamientos, hecho que se le ha atribuido a las mutaciones como por ejemplo M154L que se encuentra interactuando con el sitio en donde se localizan los equivalentes de metal Zinc (Meini *et al.*, 2014), de aquí la importancia de hacer un estudio detallado de las mutaciones presentes en cada una de las NMD conocidas con el fin de tener una mejor comprensión de su actividad enzimática y así poder proponer algunas estrategias *in silico*, *in vivo*, que sirvan como bases para el desarrollo de fármacos con potencial efecto clínico.

Estudios comparativos asistidos por ordenador, entre enzimas del tipo IMP-1, VIM-2 y NDM-1, ponen de manifiesto que la NDM-1 pueden tener un mayor perfil de droga y mayor eficiencia catalítica que las del tipo IMP-1 y VIM-2, debido a un "bolsillo" con mayor dimensión y una menor distancia entre los iones de Zn y el átomo de oxígeno de la betalactamasa (Dortet *et al.*, 2014).

6. SITIO ACTIVO

En cuanto a consideraciones más detalladas para la estructura del sitio activo de la enzima NDM-1, se ha reportado que se encuentra en torno a dos iones Zn^{2+} y que está rodeado por los aminoácidos His-120, His-122, Asp-124, His-189, Cys-208 y His-250. Uno de los ion zinc (Zn^{2+}) muestra coordinación tetraédrica formada por unión con los aminoácidos His-120, His-122, His-189 y uno los de los grupos hidroxilo del aminoácido Asp-124 (Bebrone, 2007; Guo *et al.*, 2011).

En cuanto al segundo catión de Zn^{2+} , se ha encontrado que forma una coordinación trigonal piramidal en la cual participa uno de los grupos hidroxilo de Asp-124 y los aminoácidos Cys-208 y His-250. En la Figura 1 se muestra una representación del sitio activo de la NDM-1, donde se resaltan la unión de los dos iones catalíticos de zinc, sus geometrías y las respectivas distancias de enlace entre estos, el solvente y los aminoácidos con los que coordina.

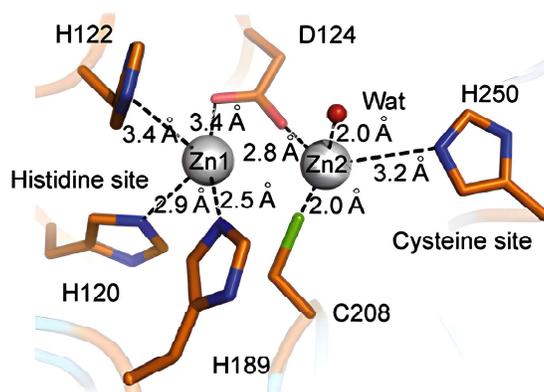


Figura 1: Vista del sitio activo de la enzima MBL NDM-1. Fuente: Guo *et al.* (2011).

Los dos iones de zinc interactúan uno con el otro a una distancia de 3.2 \AA y están puenteados a su vez por el aminoácido Asp-124. Un Zn^{2+} , en los alrededores del sitio denominado "sitio cisteína", y como se puede observar en la Figura 1, una distancia de 2 \AA entre el oxígeno de la molécula de disolvente y el ion Zn^{2+} , lo cual indica una unión hidróxido el cual podría servir como nucleófilo atacante en el carbono carbonilo del anillo β -lactámico (Guo *et al.*, 2011). Sin embargo, la elucidación del mecanismo de acción preciso de la NDM-1 requiere aún más investigación.

El sitio activo de la NDM-1 es una cavidad profunda que está formada por un bucle entre las regiones β 5- α 2 y β 10- α 4, en el cual se encuentran los iones zinc en la profundidad de este sitio. Esta cavidad se encuentra unida a un bucle en la región comprendida entre los aminoácidos Thr119-Met126 y Ser217-Asp225, mientras que el bucle Met67-Gly71 actúa como una especie de "puerta" para cerrar el sitio durante la unión con el sustrato y para abrirlo para la liberación del producto por medio de cambios conformacionales (Guo *et al.*, 2011).

Las MBL tipo B1 se caracterizan además por incluir un bucle en la zona N-terminal, entre los residuos 61 – 65, el cual no está presente en las enzimas subclase B2 y B3 (Guo *et al.*, 2011). Este bucle es de especial importancia en la actividad de las enzimas MBL B1 ya que estudios demuestran que esta región puede interactuar con sustratos e incluso moléculas inhibitoras que poseen cadenas laterales hidrofóbicas, forma una cavidad tipo túnel en la ranura del sitio activo y por lo tanto bloquea la molécula en el sitio activo (Bebrone, 2007; Guo *et al.*, 2011). Estudios biológicos demuestran que la eliminación de esta región bucle, afecta significativamente la actividad enzimática ya que la fuerza de unión con el sustrato se hace más débil (con excepción del Imipinem) (Guo *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que lo profundo que puede resultar la cavidad del sitio activo en la NDM-1, provee un mayor volumen que otras enzimas relacionadas como la VIM-4, con un extraordinario pozo hidrofílico que está rodeado por los aminoácidos Trp-93, Gln-123, Asp-124 e His-250, lo que en consecuencia podría proveer más espacio para contener el ligando en el sitio activo que otras enzimas reportadas (Guo *et al.*, 2011). Como se ha demostrado en otros informes, la NDM-1 presenta alta afinidad por la mayoría de las cefalosporinas, en particular cefuroxime, cefotaxime y cefalotin y a las penicilinas lo que se considera inusual para una MBL, se podría llegar a suponer que el amplio pozo con el que cuenta el sitio activo en la NDM-1, podría contribuir a su selectividad por los antibióticos de amplio espectro.

Un estudio relacionado respecto del papel de los residuos conservados en la actividad catalítica de NDM-1, se llevó a cabo para lo cual se generaron mutaciones en N193A, S217A, G219A y T262A, cerca del sitio activo con el fin de conocer el papel de los residuos conservados en la actividad catalítica (Ali *et al.*, 2019). La afinidad y propiedades catalíticas de los mutantes fueron reducidas considerablemente por imipenem, meropenem, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidimem, comparadas con la enzima original. Se concluyó que los residuos N193, S217, G219, y T262 juegan un papel importante en la orientación correcta del sitio activo de NDM y también participaron considerablemente en la estabilidad general de la enzima (Ali *et al.*, 2019).

Un trabajo donde se usa RMN, investiga la influencia de los iones Zn(II) en el comportamiento dinámico de NDM-1. El análisis del NDM-1 por RMN en ausencia y presencia de Zn(II), muestra que regiones específicas (los bucles ASL2, ASL3, ASL5 y L9 y la hélice α 2) de la proteína se vieron afectadas por la unión de dos Zn(II) (Rivière *et al.*, 2020). Se realizó el ensayo de actividades inhibitoras y la caracterización

estructural de los complejos de NDM-1 con flavonoles en presencia de Zn(II), el cual evidenció que la morina, la miricetina y la quercetina interactúan en el mismo sitio de unión que los antibióticos de referencia y que estas interacciones son impulsadas en gran medida por la interacción con los dos Zn(II), como en el caso del reconocimiento de sustratos en las metalobetalactamasas (Rivière *et al.*, 2020).

7. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS PARA DROGAS RESISTENTES A BACTERIAS PRODUCTORAS DE NDM-1

Algunos reactivos con potencial clínico que específicamente inhiben MBL han sido introducidos clínicamente, dentro de estos se incluyen derivados tioésteres, sulfonil hidrazonas, productos naturales tricíclicos, derivados de ácido succínico, derivados de penicilinas, productos derivados de la degradación de cefalosporinas, captopril, ácido tiomandélico, derivados del ácido benzo-hidroxámico y piridina carboxilatos (Bebrone, 2007; Guo *et al.*, 2011).

De los compuestos mencionados anteriormente, el captopril es ampliamente usado en la acción enzimática y como posible inhibidor. D-captopril se ha reportado por presentar buena concentración inhibitoria (IC₅₀ de 7.9micromol/litro) de la NDM-1. Por otro lado el L-captopril, que es ampliamente usado en el tratamiento de la hipertensión, presenta una IC₅₀ de 202.0micromol/litro. Las anteriores observaciones podrían indicar que el fragmento pirrolidina del L y D captopril, es crucial para la unión a la NDM-1. Por ejemplo, una extensión del grupo carboxilo del D-captopril podría incrementar la interacción con la NDM-1, así, el nuevo compuesto podría mejorar el efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la enzima (Guo *et al.*, 2011).

Trabajos recientes de cribado, acoplamiento molecular, dinámica molecular y alineamiento de proteínas han estudiado la inhibición de NDM-1 mediante compuestos naturales de la base de datos NPASSv1.0. En este trabajo se investiga los residuos del sitio activo y las interacciones de estos aminoácidos con los ligandos (Salari *et al.*, 2021). Se ha encontrado una energía de unión baja de -24.3 kcal/mol, incluso más baja que la informada por otros autores. En otro estudio basado en técnicas in-silico, tras un análisis comparativo con respecto a la puntuación de acoplamiento de los antibióticos clínicos estándar e inhibidores, así como análisis de simulaciones dinámica molecular para verificar la estabilidad global de los inhibidores en el sitio activo de la enzima (Rahman & Khan, 2019), se informan las evidencias necesarias para la consideración de la withaferina A, la diosgenina y el beta-sitosterol como posibles moléculas líderes para la inhibición de la NDM-1, sin embargo, se recomiendan más estudios in vitro e in vivo para establecer y confirmar la potencialidad de estas moléculas inhibitoras (Rahman & Khan, 2019).

8. REVISIÓN DE LAS PROPUESTAS DE MECANISMOS DE REACCIÓN

En cuanto a propuestas del mecanismo de hidrólisis de las MBL en general, las discusiones se han centrado en la molécula orientada de agua (ion hidróxido) identificada entre los dos iones de zinc, donde se presume que esta molécula servirá como el nucleófilo que inicia la reacción de hidrólisis (Kim *et al.*, 2013). El estudio del mecanismo ha llevado complicaciones debido a la ausencia de suficiente información respecto a estructuras de rayos X, que muestren la posición exacta del complejo enzima-sustrato. Básicamente el mecanismo de hidrólisis propuesto sugiere que el sitio activo orienta y polariza el enlace sustrato β -lactámico para facilitar el ataque nucleofílico del zinc-agua. Vale la pena aclarar que el mecanismo de hidrólisis puede variar de una MBL a otra. En la Figura 2, se muestra la reacción general de hidrólisis del meropenem.

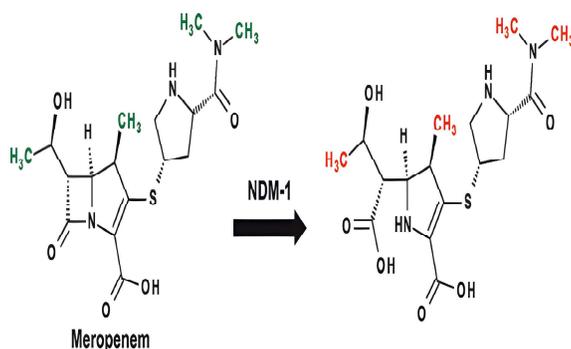


Figura 2: Hidrólisis de meropenem por la enzima NDM-1. Fuente: Ma *et al.* (2014).

Con base en estudios de dinámica y cuántica molecular, se plantea que la hidrólisis propuesta para la actividad de las MBL incluye la desprotonación de una molécula de agua en el Zn^{+2} de la segunda posición el cual actúa como ácido de Lewis que disminuye su pK, que resulta en la formación de un ion hidróxido que ataca el oxígeno carboxílico del anillo β -lactámico. Luego el enlace zinc-agua/hidróxido, se recupera por adición de otra molécula de solvente como se observa en la Figura 3.

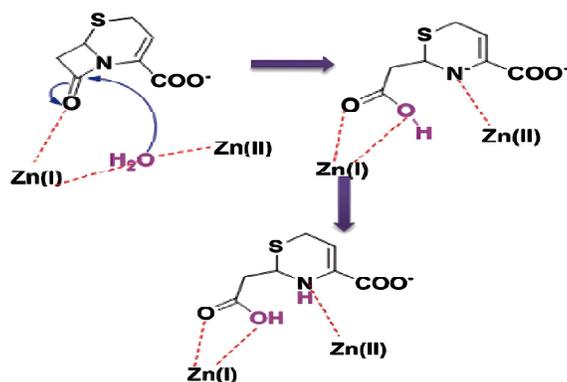


Figura 3: Propuesta de hidrólisis en forma bis-zinc de un fragmento de una cefalosporina mediado por la enzima NDM-1 de la subclase B1. Fuente: Liang *et al.* (2011)

9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La Bioinformática es de suma importancia ya que permite abordar tanto el almacenamiento como la extracción y el procesamiento conjunto de datos, además, del análisis estructural y funcional de genes y proteínas, así, como el modelado de sistemas y descubrimientos de fármacos (Pathak *et al.*, 2022). Los datos mencionados, incluyen información sobre el origen y los métodos utilizados para determinarlos; la información se recopila en bases de datos que se emplean actualmente, como por ejemplo NCBI (EEUU) para nucleótidos, PDB (Protein Data Bank) y Uniprot para proteínas (Lesk, 2019).

Con relación sobre el análisis de las diferentes variantes de NDM a partir de herramientas bioinformáticas como Uniprot, PDB, PsiPred y SWISS-MODEL, se puede establecer en cuanto a la estructura primaria que la proteína presenta una conformación monomérica con función hidrolasa constituida por 270 aminoácidos con una masa aproximada de 28,499 Da. El aminoácido más abundante es alanina con un porcentaje entre el 15 – 16% aproximadamente y como aminoácido menos abundante se halló la cisteína encontrándose en menos del 1% en las enzimas, de lo cual se puede inferir que la presencia de puentes disulfuro es casi nula. En cuanto a la estructura secundaria, se determinó que cerca del 50% de los aminoácidos están presentes en los pliegues que puede adoptar la proteína y el restante se encuentra de forma casi equitativa en las α -hélice y β -hojas, en cuanto a los aminoácidos que posiblemente interactúan con los iones metálicos divalentes, se encuentran localizados en su mayoría en los pliegues de las NDM lo que puede posibilitar una mayor tasa de mutación, hecho que se ha podido determinar mediante el examen estructural de enzimas como por ejemplo PBP a partir de bacterias resistentes que presentan mutaciones en los residuos cercanos a los motivos catalíticos (Zapun *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2000). Por otra parte en cuanto a la estructura terciaria, se observó por identidad de secuencia que las metaloenzimas presentan dos equivalentes de Zn^{2+} que se encuentran interactuando con aminoácidos como H120, H122, D124, H189, C208, H250, cabe mencionar que la única cisteína que se estableció en la cadena proteica hace parte de los aminoácidos del sitio catalítico. Así pues, se evidencia la relevancia que tiene el conocer las herramientas que la tecnología nos ofrece en la

actualidad, con el fin de realizar investigaciones que no dependan de un laboratorio físico en gran porcentaje y que sean en gran medida más racionales en tiempo y recursos físicos y humanos.

10. CONSIDERACIONES FINALES

Indudablemente queda bastante por hacer en el campo de investigación de enfermedades de tipo infeccioso por NDM como se ha podido mostrar en este escrito. Algunos de los retos a corto y mediano plazo serían:

Enfocar esfuerzos direccionados a la prevención, control y detección de NDM en los diferentes sistemas de salud de cada país es crucial, debido a escenarios como la portación del gen y sus variantes por personas que no presentan ningún síntoma permitiendo su rápida propagación y la aparente facilidad de transferencia de dicho gen entre cepas, presentan un panorama preocupante a nivel de salud pública que podría ser casi imposible de tratar.

Encontrar nuevos medicamentos que burlen los diferentes mecanismos de defensa de los microorganismos que han mostrado multirresistencia a casi todos los tipos de fármacos existentes, ya que en la actualidad no hay disponibilidad de alguno con efectos clínicos relevantes. Para ello se podría plantear nuevos prototipos inhibidores como por ejemplo estructuras que presenten fragmentos de pirrolidina podrían favorecer la unión con NDM-1 como se evidencia en los fármacos L-captopril y D-captopril, así como variantes que se puedan proponer como por ejemplo la extensión en el grupo carboxilo del D-captopril logrando incrementar interacción con NDM-1 y sus variantes. Por otro lado, también se encuentran estudios de compuestos derivados del ácido tiofenocarboxílico que han mostrado actividad antibacteriana sinérgica en combinación con meropenem (Shen *et al.*, 2013); ácidos mercaptoacarboxílicos también se encuentra dentro de las estructuras químicas más estudiadas como prominentes inhibidores de MBLs (Skagseth *et al.*, 2017). Otros estudios de acoplamiento ligando polarizado, usan estructuras derivadas de las cromonas las cuales mostraron amplio espectro de inhibición para carbapenemasas (Christopeit & Leiros, 2016). En los estudios de inhibición con compuestos derivados de Azoliltioacetamidas diaril sustituidas, se encontró que todas ellas presentaron inhibición de la MBL NDM-1(B3, L1), de *Stenotrofomas maltophilia* (Zhang *et al.*, 2014). Compuestos derivados del tiol han mostrado inhibición prometedora para MBL, como por ejemplo ésteres tiol del ácido mercaptoacético (Islam, 2013). Este mismo estudio menciona otra amplia gama de estructuras químicas importantes en el estudio de inhibidores de MBLs, tales como Fenazinas, derivados del ácido tiomandélico, derivados del mercaptofosfonatos (han mostrado buenos efectos inhibitorios en la subclase B2), bifenil tetrazoles (inhibidor competitivo), derivados del ácido succínico y ftálico, derivados Hidroxamatos, derivados de piridina dicarboxilatos, triazoles y tiosemicarbazidas N-acetiladas y derivados del ácido bórico así como del EDTA.

Por otra parte, se debe aprovechar el hecho estructural de NDM-1, ya que contiene un mayor volumen de cavidad en su sitio catalítico en comparación con otras enzimas (VIM-4) lo que puede permitir el diseño de

nuevos fármacos que en alguna medida y guardando las proporciones estructurales no sean restringidos por su tamaño, además de que puedan formar complejos acil-enzima estables similares a los que se dan en el mecanismo de inhibición de las PBP, que presenten una alta biodisponibilidad, que no presenten toxicidad o sea mínima, serían algunos de los retos a perseguir.

Finalmente se debe prestar atención a la cepa *P. rettgeri*, ya que en nuestro país los reportes de infección ocasionados por este microorganismos son los más altos en lo que se refiere a diseminación según los reportes de las diferentes instituciones competentes de salud en el territorio nacional (Rojas *et al.*, 2017).

Contribución de los autores

Eduvan Valencia. y Wilson Olate: Supervisión y conceptualización. Eduvan Valencia, Wilson Olate, Mauricio Galvis y Luisa Sastoque: revisión y escritura.

Referencias

- Abarca, G., & Herrera, M. L. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36, 77–104.
- Abhinav, K. & Jaiswal, A. (2013). NDM-1-New Delhi Metallo beta Lactamase: A Review. *Angewandten Biologie Forschung*, 1, 1.
- Ackerman, S. H., & Gatti, D. L. (2013). Biapenem inactivation by B2 metallo β -lactamases: energy landscape of the hydrolysis reaction. *PLoS one*, 8, e55136.
- Alcaide, B., de Murga, R. M., Pardo, C. & Rodríguez-Ranera, C. (2004). Access to enantiopure polycyclic β -lactams by Diels-Alder reaction of novel inner-outer-ring 2-(silyloxy) dienes with a carbacepham skeleton. *Tetrahedron letters*, 45, 7255–7259.
- Ali, A., Kumar, R., Iquebal, M. A., Jaiswal, S., Kumar, D. & Khan, A. U. (2019). Role of conserved residues in catalytic activity of NDM-1: an approach of site directed mutagenesis and molecular dynamics.
- Ariza, B. & León, A. (2013). Carbapenemasa Nueva Delhi tipo 1 (NDM): Descripción fenotípica, epidemiológica y tratamiento. *Laboratorio Actual*, 44.
- Bebrone, C. (2007). Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Pharmacology*, 74, 1686–1701.
- Bebrone, C., Lassaux, P., Vercheval, L., Sohier, J. S., Jehaes, A., Sauvage, E. & Galleni, M. (2010). Current challenges in antimicrobial chemotherapy. *Drugs*, 70, 651–679.

- Bush, K. & Jacoby, G. (2010). Updated functional classification of β lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, 969–976.
- Christopeit, T. & Leiros, H. K. S. (2016). Fragment-based discovery of inhibitor scaffolds targeting the metallo- β -lactamases NDM-1 and VIM-2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 1973–1977.
- Cortés, J. (2011). Resistencia en enterobacterias: evolución, enzimas y ambiente. *Infectio*, 15, 145–146.
- Cruz, E., & Ramón, G. (2010). Modelación molecular de antibióticos betalactámicos. *Medisur*, 8, 13–19.
- Deshpande, P., Rodrigues, C., Shetty, A., Kapadia, F., Hedge, A. & Soman, R. (2010). New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: treatment options with carbapenems compromised. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 58, 147–149.
- Dortet, L., Poirel, L. & Nordmann, P. (2014). Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed research international*, 2014.
- Escalona, J., Carrasco, R. & Padrón, J. (2008). Introducción al diseño racional de fármacos. Ciudad de La Habana. Editorial Universitaria. Ministerio de Educación Superior. 45p.
- Ghafur, A. (2010). An obituary-on the death of antibiotics!. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 58, 143-144.
- Gonzalez et al., (2015). Caracterización fenotípica y genotípica de perfiles de resistencia antimicrobiana de aislamientos bacterianos recuperados en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) septiembre 2012 - diciembre 2014. [En línea]. Instituto nacional de salud, Bogotá, Colombia. [Consultado en agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscar/Informacin%20de%20laboratorio/Informe%20Vigilancia%20por%20Laboratorio%20Resistencia%20Antimicrobiana%20IAAS%202012-2014.pdf>
- Gordon, E., Mouz, N., Duee, E. & Dideberg, O. (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *Journal of molecular biology*, 299, 477–485.
- Guo, Y., Wang, J., Niu, G., Shui, W., Sun, Y., Zhou, H., ... & Rao, Z. (2011). A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug. *Protein & cell*, 2, 384–394.
- Hall, B. G., Salipante, S. J. & Barlow, M. (2003). The metallo- β -lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. *Journal of molecular evolution*, 57, 249–254.
- Islam, N. U. (2013). An update on the status of potent inhibitors of metallo- β -lactamases. *Scientia pharmaceutica*, 81, 309-328.

- Kim, Y., Cunningham, M. A., Mire, J., Tesar, C., Sacchettini, J. & Joachimiak, A. (2013). NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism. *The FASEB Journal*, 27, 1917-1927.
- Lee, N. L., Yuen, K. Y. & Kumana, C. R. (2001). β -Lactam antibiotic and β -lactamase inhibitor combinations. *Jama*, 285, 386-388.
- Lesk, A. (2019). Introduction to bioinformatics. Oxford university press.
- Liang, Z., Li, L., Wang, Y., Chen, L., Kong, X., Hong, Y., ..., & Jiang, H. (2011). Molecular basis of NDM-1, a new antibiotic resistance determinant. *PLoS One*, 8, e23606.
- Liu, X. L., Shi, Y., Kang, J. S., Oelschlaeger, P. & Yang, K. W. (2015). Amino acid thioester derivatives: a highly promising scaffold for the development of metallo- β -lactamase L1 inhibitors. *ACS medicinal chemistry letters*, 6, 660-664.
- Ma, J., McLeod, S., MacCormack, K., Sriram, S., Gao, N., Breeze, A. L., & Hu, J. (2014). Real-Time Monitoring of New Delhi Metallo- β -Lactamase Activity in Living Bacterial Cells by ^1H NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 8, 2130-2133.
- Meini, M. R., Llarrull, L. I. & Vila, A. J. (2014). Evolution of metallo- β -lactamases: *trends revealed by natural diversity and in vitro evolution*. *Antibiotics*, 3, 285-316.
- Moncada, M. (2014). Caracterización molecular de aislamientos de klebsiella pneumoniae portadores del genbla NDM-1 procedentes de una unidad neonatal en un hospital de Bogotá. *Posgrado Interfacultades en Microbiología*.
- Morales-Moreno, Y., Medina-Marrero, R., Garcia-Bernal, M., Casanova-González, M., Rodríguez-Pérez, R., Fernández-López, N., ... & Rojas-Hernández, N. (2014). Actividad in vitro de furvina frente a bacterias Gram negativas multirresistentes. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 45, 052-057.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ..., & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399, 629-655.
- OPS/OMS. (2014). Actualización Epidemiológica. Carbapenemasas tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM). [En línea]. [Consultado en agosto de 2022]. Disponible en <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-mar-07-cha-carbapenemasas-actualizacion-epi.pdf>
- Ovalle M. et al. (2013). Vigilancia epidemiológica comunitaria en las entidades territoriales departamentales y distritales, Colombia, 2012, *IQEN*, 18, 111-120.

- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 4943–4960.
- Pathak, R. K., Singh, D. B. & Singh, R. (2022). Introduction to basics of bioinformatics. In *Bioinformatics* (pp. 1–15). Academic Press.
- Pérez, M. (2009). Uso de técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibióticos beta-lactámicos en fármacos, aguas y alimentos.
- Queenan, A. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20, 440–458.
- Rahman, M., & Khan, M. K. A. (2019). In silico based unraveling of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) inhibitors from natural compounds: a molecular docking and molecular dynamics simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.
- Rivière, G., Oueslati, S., Gayral, M., Créchet, J. B., Nhiri, N., Jacquet, E., ... & Morellet, N. (2020). NMR Characterization of the Influence of Zinc (II) Ions on the Structural and Dynamic Behavior of the New Delhi Metallo-Lactamase-1 and on the Binding with Flavonols as Inhibitors. *omega*, 5, 10466-10480.
- Rojas, S. Y. S., Duarte, C., de Arias, M. N. G. & Ovalle, M. V. (2017). Emergencia de Providencia rettgeri NDM-1 en dos departamentos de Colombia, 2012-2013. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35, 358–358.
- Rolain, J. M., Parola, P., & Cornaglia, G. (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemia? *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 1699–1701.
- Salari-Jazi, A., Mahnam, K., Sadeghi, P., Damavandi, M. S., & Faghri, J. (2021). Discovery of potential inhibitors against New Delhi metallo-lactamase-1 from natural compounds: *In silico-based methods*. *Scientific reports*, 11, 1–20.
- Shen, B., Yu, Y., Chen, H., Cao, X., Lao, X., Fang, Y., ... & Zheng, H. (2013). Inhibitor discovery of full-length New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1). *PloS one*, 8, e62955.
- Skagseth, S., Akhter, S., Paulsen, M. H., Muhammad, Z., Lauksund, S., Samuelsen, Ø., ... & Bayer, A. (2017). Metallo- β -lactamase inhibitors by bioisosteric replacement: Preparation, activity and binding. *European journal of medicinal chemistry*, 135, 159–173.
- Strynadka, N. C., Adachi, H., Jensen, S. E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., ... & James, M. N. (1992). Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature*, 359, 700–705.
- Suárez, C. & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27, 116-129.

- Suárez, C. J., Kattán, J. N., GUZMÁN, A., & Villegas, M. V. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10, 85-93.
- Valencia, E. (2014). Diseño racional de compuestos espirotiazolidónicos, pirazolotiazolidónicos y pirazolo β -lactámicos con potencial actividad antimicrobiana. Departamento de Química.
- Vignoli, R. & Seija, V. (2006). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Temas de bacteriología y Virología. *Instituto de Higiene*, 649–662.
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. & Nordmann, P. (2005). Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical microbiology reviews*, 18, 306–325.
- Yacoby, I. & Benhar, I. (2007). Targeted anti bacterial therapy. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 7, 221–229.
- Yang, S. K., Kang, J. S., Oelschlaeger, P., & Yang, K. W. (2015). Azolythioacetamide: a highly promising scaffold for the development of metallo- β -lactamase inhibitors. *ACS medicinal chemistry letters*, 6, 455–460.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K. & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 5046–5054.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C. & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS microbiology reviews*, 32, 361–385.
- Zhang, Y. L., Yang, K. W., Zhou, Y. J., LaCuran, A. E., Oelschlaeger, P. & Crowder, M. W. (2014). Diaryl-substituted azolythioacetamides: inhibitor discovery of New Delhi Metallo- β -Lactamase-1 (NDM-1). *ChemMedChem*, 9, 2445–2448.