

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS



**INTERACCIONES MOLECULARES CARBAPENÉMICOS Y BETALACTAMÁSA DE
TIPO A: DESCRIPCIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA
POR QUÍMICA COMPUTACIONAL**

Ana Paola Leyva Aizpuru

TESIS QUE PRESENTA PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FORMACIÓN BIOMÉDICA



INTERACCIONES MOLECULARES CARBAPENÉMICOS Y β -LACTAMÁSA DE TIPO A: DESCRIPCIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA POR QUÍMICA COMPUTACIONAL

Tesis presentada para obtener el grado de:

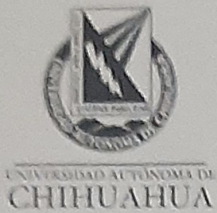
**MAESTRO EN FORMACIÓN
BIOMÉDICA**

Nombre del tesista:
Ana Paola Leyva Aizpuru

Nombre del director (a):
D.C. Javier Camarillo Cisneros

Nombre del Co director (a):
D.C. Graciela María de Jesús Ramírez Alonso

Asesores:
D.C. Luz María Rodríguez Valdez
Dr. Abimael Guzmán Pando
Dr. Hugo Varela Rodríguez



Chihuahua, Chih. A 17 de diciembre de 2023

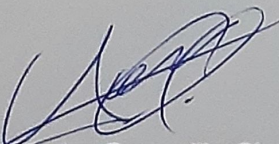
Dr. Saíd Alejandro de la Cruz
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
PRESENTE:

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que la C. ANA PAOLA LEYVA AIZPURU con número de matrícula 309232, ha concluido la elaboración de la tesis "INTERACCIONES MOLECULARES CARBAPENÉMICOS Y BETALACTAMÁSA DE TIPO A: DESCRIPCIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA POR QUÍMICA COMPUTACIONAL", como requisito para obtener el grado de: **Maestro en Formación Biomédica.**

Así mismo, manifestamos que la tesis ha sido revisada y aprobada por los abajo firmantes, miembros del Comité de Grado.

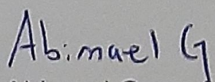
Sin otro particular, quedamos de usted.

ATENTAMENTE


Dr. Javier Camarillo Cisneros


Dra. Graciela Ramírez Alonso


Dr. Hugo Varela Rodríguez


Dr. Abimael Guzmán Pando

Línea de investigación: Salud

Sublínea de investigación: Química Computacional

Equipo de investigación: D.C. Javier Camarillo Cisneros, D.C. Graciela María de Jesús Ramírez Alonso

Facultad de Medicina de la

UACH México

Web: www.fm.uach.mx

Correo: p309232@uach.mx

Chihuahua, México, 2021

© Universidad Autónoma de Chihuahua

© Los autores

Todos los derechos reservados. Se permite la distribución, uso y copia citando la fuente completa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que por medio de su aporte científico y/o humano han colaborado en el desarrollo de este trabajo.

Para comenzar, quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible la realización y presentación de esta memoria de investigación. Gracias por el apoyo económico brindado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Coordinación de la Maestría en formación Biomédica y cuerpo de docentes por la ayuda y confianza depositada en mi para concluir mis estudios.

De manera especial agradezco al equipo del laboratorio de Física Química Computacional de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH, por las pláticas con café, las tardes de trabajo y por contestar mis dudas a lo largo del desarrollo de mi tesis. Gracias por compartirme sus experiencias y conocimiento.

Mi más sincero agradecimiento a mi director y tutor de tesis, el Dr. Javier Camarillo Cisneros, por la acertada orientación, motivación y discusión crítica que me permitió un buen aprovechamiento y desempeño durante los cuatro semestres de esta maestría, y que esta tesis llegó a buen término. Espero que aun tengamos más artículos, congresos y proyectos para colaborar a futuro.

Agradezco a mis amigos, por encontrar el tiempo para acompañarme en episodios de angustia y celebrar los momentos de alegría. Gracias a mi familia, mis padres y hermano por enseñarme que todos los cambios son buenos y que siempre puedo contar con ellos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	2
Resistencia a antibióticos	2
Antibióticos carbapenémicos	9
Química computacional y sus herramientas	15
Técnicas sobre el diseño de fármacos asistido por computadora	17
III. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO	22
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA PREGUNTA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	
22	
3.2 HIPÓTESIS	22
3.3 OBJETIVOS	23
3.3.1 OBJETIVO GENERAL	23
3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
IV. JUSTIFICACIÓN	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	27
5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	27
5.3 DEFINICIÓN DE VARIABLES	28
5.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	31
	6

5.5	CONSIDERACIONES ÉTICAS	35
VI.	RESULTADOS	36
6.1	TESIS	43
VII.	DISCUSIÓN	44
VIII.	CONCLUSIONES	46
IX.	REFERENCIAS	47

I. INTRODUCCIÓN

La acelerada aparición de cepas bacterianas fármaco-resistentes aumenta la demanda global por nuevos antibióticos. Los hábitos de una población en constante crecimiento contribuyen al incremento de la resistencia bacteriana. Si bien, los departamentos de epidemiología de cada región se encargan de reportar los antibióticos a los que mejor responde la población, al pasar el tiempo la eficacia de los fármacos disminuye. Este fenómeno se debe a que los patógenos sobrevivientes al tratamiento adquieren resistencia a uno o más antibióticos mediante mecanismos de evolución y adaptación (1). Ejemplos de bacterias multirresistentes son *Actinobacter*, *Pseudomonas* y *Enterobacterias* las cuales son reportadas como amenaza a nivel global por los hospitales. Esta situación pone en peligro la eficacia del tratamiento y prevención de enfermedades (2). En pleno 2022, factores como la falta de normatividad, el uso indebido y abusivo de antibióticos, y la falta de metodologías que aceleren el desarrollo de nuevos fármacos contribuyen a que la población este en desventaja en la batalla contra bacterias fármaco-resistentes. Sin embargo, existe una alternativa al proceso de desarrollo de fármacos que podría hacerlo más rápido y menos costoso: El diseño de fármacos asistido por computadora. Mediante este método se busca optimizar la selección de moléculas con actividad biológica (3). A través de técnicas como el modelado molecular, es posible obtener información estructural de los posibles candidatos a nuevos fármacos. Otra técnica útil son los estudios de tipo “docking” o de acoplamiento los cuales, tienen como objetivo predecir las interacciones que dan origen al modo de unión entre al menos 2 moléculas (4). Cuando ambas técnicas trabajan en conjunto, se procede a llevar a cabo una evaluación de alto rendimiento de manera virtual en bases de datos moleculares para identificar los mejores candidatos a fármacos antes de iniciar la síntesis in vitro en el laboratorio. Esta estrategia puede dar como resultado un mejor aprovechamiento de los recursos en la búsqueda de nuevos antibióticos. Al implementar la caracterización de las propiedades fisicoquímicas del fármaco candidato y las interacciones posibles con su blanco, se obtienen datos de referencia que aportan información sobre cómo las enzimas bacterianas contribuyen a la generación de resistencia hacia las distintas clases de antibióticos, en este caso los carbapenémicos, y como diseñar nuevos fármacos capaces de combatirlas a partir de su estructura.

II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

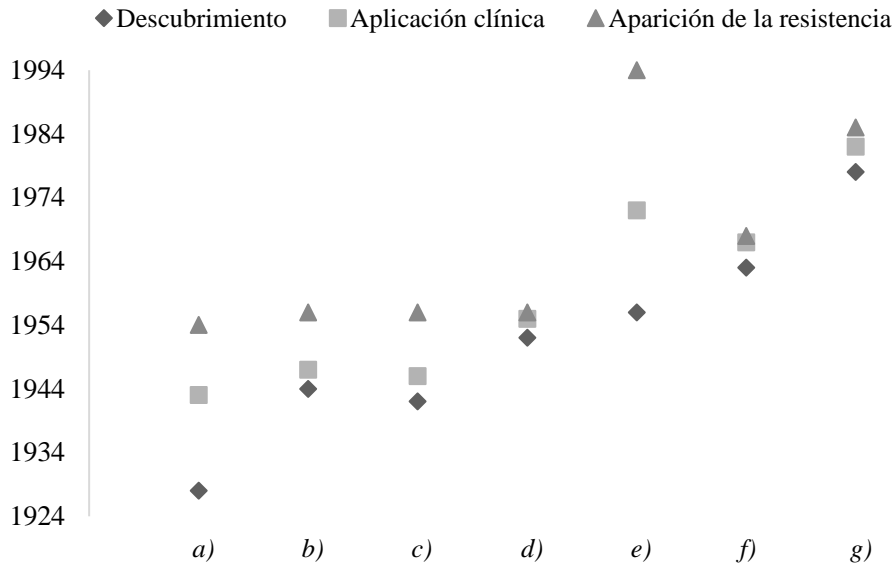
A continuación, el presente marco teórico permite conocer la teoría y conceptos básicos necesarios para entender el desarrollo de este trabajo de investigación. Comienza con las definiciones de los conceptos clave y antecedentes en torno al problema de investigación: La resistencia bacteriana a antibióticos. Posteriormente se describirá la estructura, uso y mecanismos de resistencia contra los antibióticos de interés: Los carbapenémicos. Por último, se definirá la teoría que fundamenta las herramientas seleccionadas para aportar en el diseño de antibióticos por computadora: La química computacional.

Resistencia a antibióticos

La selección natural es un mecanismo propio de la evolución. Aquellas especies capaces de adaptarse al entorno, a través de mutaciones aleatorias, logran sobrevivir y reproducirse para continuar el linaje (5). Las bacterias no son la excepción a la regla. Ya sea en el medio natural o actuando como patógenos, solo aquellas cepas que contengan la mutación que permita inhibir la situación de peligro, sobrevivirán y posteriormente heredarán esta mutación a las siguientes generaciones, otorgando protección ante la amenaza (6). Aunque este fenómeno siempre ha estado presente en la naturaleza, la introducción de los antibióticos a la práctica clínica aceleró la tasa de aparición de cepas resistentes a los antibióticos que eran expuestas. En 2004, Jorge O. Errecalde presentó un estudio sobre la incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública durante la reunión de la Organización de las Naciones Unidas, ONU, en Roma. En su informe menciona que desde 1950 se tiene evidencia sobre la generación de cepas resistentes a antibióticos al poco tiempo del inicio del uso terapéutico debido a la presión selectiva de la terapia antibiótica (1) los resultados se muestran en la **Grafica 1**. La resistencia a antibióticos reduce la eficacia de los tratamientos para pacientes, esta situación prolonga el tiempo de estancia hospitalaria, aumenta los costos a la atención de la salud y el riesgo de mortalidad (7). El aumento de bacterias resistentes a antibióticos es promovido por diversos factores como la falta de educación sanitaria por parte de los pacientes (8), venta y prescripción inapropiada de antibióticos (9), uso de antibióticos como promotores del crecimiento en animales de consumo (10), tratamiento de eliminación inadecuado en aguas

residuales (11), la terapia antibiótica para pacientes con inmunodeficiencia y el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los microorganismos aislados (12).

AÑO DE DESCUBRIMIENTO, APLICACIÓN CLÍNICA Y APARICIÓN DE RESISTENCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS



Gráfica 1 Año de descubrimiento, aplicación clínica y aparición de resistencia de agentes antimicrobianos. a) Penicilina, b) Estreptomicina, c) Tetraciclina, d) Eritromicina, e) Vancomicina, f) Gentamicina y g) Fluoroquinolonas. Gráfica de elaboración propia.

s

Panorama nacional e internacional

La resistencia a los antibióticos se amplifica en todo el mundo a niveles delicados. La progresiva expansión de la resistencia bacteriana va de la mano del desarrollo en paralelo de nuevos antibióticos, por ello uno de los esfuerzos para hacer frente al problema fue la “Iniciativa 10x20” de la IDSA (Infectious Diseases Society of América) y el ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), la cual en 2010 se propuso desarrollar 10 nuevos antibióticos para el año 2020. Dentro de las estrategias de esta iniciativa está la cooperación entre líderes políticos, industriales, científicos, económicos y médicos para crear incentivos que estimulen la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (13). Como resultado de la iniciativa, se desarrollaron los antibióticos de la **Tabla 1**:

Tabla 1 Antibióticos desarrollados por medio de la “Iniciativa 10x20”*.

Antibiótico	Año	Familia	Espectro
Ceftarolina	2010	Cefalosporina de quinta generación	<i>Staphylococcus aureus</i> en cepas resistentes a meticilina y vancomicina (14) (15).
Dalbavancina	2014	Lipoglucopeptido de segunda generación	<i>Staphylococcus aureus</i> en cepas sensibles y resistentes a meticilina, <i>Estafilococos coagulasa negativa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Streptococcus spp.</i> (16).
Tedizolid	2014	Oxazolidona de primera generación	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina y <i>Enterobacterias</i> resistentes a vancomicina (17).
Oritavancina	2014	Lipoglucopeptido de segunda generación	<i>Staphylococcus aureus</i> en cepas sensibles y resistentes a meticilina, glicopeptidos, y vancomicina, <i>Staphylococcus epidermidis</i> en cepas resistentes y sensibles a meticilina, cepas de <i>Enterobacterias</i> sensibles y resistentes a vancomicina (18) (19).
Ceftolozane/ta zobactam	2014	cefalosporina/ inhibidor de β - lactamasa	Bacterias Gram-negativas productoras de β - lactamasas de espectro extendido y <i>Enterobacterias</i> resistentes a ceftazidime (20).
Ceftadizina/avi bactam	2015	cefalosporina/ inhibidor de β - lactamasa	Bacterias Gram-negativas productoras de β - lactamasas de espectro extendido (21).
Delafloxacina	2017	Fluoroquinolona de quinta generación	<i>Staphylococcus aureus</i> en cepas sensibles y resistentes a meticilina y Bacterias Gram- negativas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (22).
Meropenem/va robactam	2017	Carbapenem/inhi bidor de betalactamasa	Mantiene el amplio espectro de actividad del meropenem y <i>Enterobacterias</i> resistentes a los carbapenemasas producidas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> (23) (24).
Plazomicina	2018	Aminoglucósidos	Bacterias Gram-negativas productoras de β - lactamasas de espectro extendido producidas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> (25) (26).
Eravacyclina	2018	Tetraciclina	Bacterias Gram-negativas productoras de β - lactamasas de espectro extendido por <i>Klebsiella pneumoniae</i> y resistentes a vancomicina,

			<i>Staphylococcus aureus</i> en cepas sensibles y resistentes a meticilina (27).
Omadacyclina	2018	Tetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, <i>Streptococcus pneumoniae</i> multirresistente, <i>Enterobacterias</i> resistentes a vancomicina, <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Chlamydia</i> y <i>Mycoplasma</i> (28).
Cefiderocol	2019	Cefalosporina	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Serratia marcescens</i> (29).
Imipenem/relebactam	2020	Carbapenem/inhibidor de β -lactamasa	<i>Enterobacterias</i> resistentes a los carbapenemasas producidas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (30).

*Tabla de elaboración propia.

La proliferación de bacterias resistentes es un fenómeno que tiene grandes costos monetarios y de vidas para las naciones, debido a que pone en peligro la eficacia de los programas de atención sanitaria, este hecho queda demostrado por Mendoza Brito en hospitales de Santa Marta (31). En 2014, la Organización Mundial de la Salud, OMS, declaró la disminución de la eficacia de los antibióticos como una de las 3 mayores amenazas para la salud a nivel mundial, ya que el panorama de una era post-antibiótica, en donde las infecciones comunes pueden resultar mortales, se convirtió en una posibilidad para los siguientes 20 años (32).

En 2015 la OMS publicó el “Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos” mediante el cual se busca el aseguramiento del tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas a través de fármacos seguros y eficaces. Entre los objetivos establecidos esta la cooperación entre industria farmacéutica, gobierno y academia. Así como el aumento en la inversión en investigación para el desarrollo de antibióticos tomando en cuenta las necesidades de cada país (33).

En 2020, alrededor de 20 laboratorios, pertenecientes a la Federación Internacional de Asociaciones de Fabricantes de Productos Farmacéuticos, se unieron con el Banco Europeo de inversiones para crear el Fondo de Acción contra la resistencia a los antimicrobianos. Este fondo consta de una inversión de 1 billón de dólares destinado a la producción de nuevos antibióticos y la reforma de políticas para lograr una línea de producción de fármacos sostenible. La meta final es poner a disposición de los pacientes entre 2 y 4 nuevos antibióticos antes de 2030 (34).

Según el reporte del 2019 de la CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades), en Estados Unidos murieron 35,000 personas por infección de bacterias resistentes a antibióticos. Además, catalogó 5 cepas bacterianas como amenaza urgente para el sistema de salud: *Acinetobacter* resistente a los carbapenemes, *Candida auris* (*C. auris*), *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), *Enterobacteriaceae* resistente a los carbapenemes (CRE) y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a los medicamentos (*N. gonorrhoeae*) (35).

Durante el 2015, en México se registró 61,969 casos de infecciones por bacterias resistentes a antibióticos, de los cuales 16.1% tuvo una tasa de letalidad elevada según el informe anual de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) (36). En 2018, el boletín de la

CONAMED (Comisión Nacional de Arbitraje Médico) reportó que las cepas resistentes de mayor amenaza en el ámbito hospitalario son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter species*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* (37). En este mismo año se publicó la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a Antimicrobianos en el Diario Oficial de la Federación (38).

Tipos de resistencia

La resistencia bacteriana a uno o más clases de antibióticos puede ser consecuencia de dos posibles bases, una es genética por lo que se le llama resistencia intrínseca y la otra depende de los antibióticos a los que la bacteria sea expuesta, la resistencia adquirida (39). Las cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie tienen un mecanismo de resistencia en común. El mecanismo es determinado por las características genéticas presentes, a su vez, la estructura de una bacteria queda determinada precisamente por la información genética que posee, esta es la base de la resistencia natural o intrínseca (40). Un ejemplo es la resistencia de *proteus miabilis* a la colistina debido a la producción de un polisacárido que disminuye la afinidad del antibiótico al sitio blanco (41). Por otra parte, cuando la resistencia se da como resultado de mutaciones mediante cambios en la secuencia del cromosoma de una generación a otra, o por medio de la transmisión de material genético en forma de plásmidos de una especie bacteriana a otra, se le llama resistencia adquirida. Esta es la base de resistencia bacteriana de relevancia clínica ya que es responsable del fracaso terapéutico en pacientes infectados. Además, una bacteria puede adquirir resistencia a varios antibióticos sin estar en contacto con estos (42). Un ejemplo es la resistencia por modificación de la DNA girasa de enterobacterias a las quinolonas (43).

Mecanismos de resistencia

Para que un antibiótico tenga efecto, debe interactuar con la bacteria, llegar al blanco molecular y enlazarse para desencadenar su mecanismo de acción (40). Los mecanismos de resistencia bacteriana son una respuesta de adaptación al ambiente hostil que supone la terapia antibiótica. A través de la evolución, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos de resistencia y pueden englobarse en 3 grupos: Inactivación del antibiótico, modificación del sitio blanco y cambios en la permeabilidad de la membrana (41). La inactivación del antibiótico se lleva a cabo mediante la producción de enzimas que destruyan o modifiquen al antibiótico. Una enzima que destruye al antibiótico es la β -lactamasa, una proteína enzimática de tipo hidrolasa que rompe el enlace amida

en el núcleo β -lactámico. Una enzima modificadora de la estructura del antibiótico es la cloranfenicol-acetiltransferasa (44). La alteración del sitio blanco se logra mediante la modificación de los sitios activos de la célula bacteriana a los que el antibiótico tiene afinidad como la pared celular, el ribosoma, o la membrana celular. Un ejemplo es la modificación de la topoisomerasa II a través de la mutación del gen GyrA en *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tal mutación da como resultado la resistencia a quinolonas (45). Finalmente, la alteración de la permeabilidad se genera mediante cambios en las proteínas receptoras de membrana específicos para antibióticos, mediante alteraciones de los componentes en la estructura de la barrera celular, mediante la pérdida de mecanismos de transporte activo o por medio de bombas de flujo exterior. La porinas son canales llenos de agua encargados de permitir la entrada a compuestos hidrófilos, es posible controlar la entrada de antibiótico y su concentración en la célula al cambiar el diámetro y número de porinas abiertas en la membrana interna (41). Por último, las bombas de flujo externo son proteínas transmembrana que constituyen un mecanismo de transporte activo para expulsar al antibiótico, evitando que su concentración aumente. *P. aeruginosa* tiene resistencia contra levofloxacina mediante este mecanismo (46).

Bacterias multi-resistentes

Aunque la resistencia antibióticos es parte del mecanismo de selección natural, se trata de un fenómeno alarmante para los sistemas de salud. En 2011, se reportó la presencia de microorganismos con resistencia a más de 2 clases de antibióticos en pacientes críticos, denominadas multirresistentes. Estos microorganismos tienen relevancia clínica ya que son capaces de transmitir el mecanismo de resistencia a otras generaciones y causar brotes epidémicos. Ejemplo de estos microorganismos son: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina (ERV), enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y bacilos gramnegativos (BGN) no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a distintos grupos de antimicrobianos (47). En 2017, la OMS publicó una lista de bacterias para las que se necesitan nuevos antibióticos. En la clasificación de urgente se encuentra: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus* (48). Las opciones de tratamiento contra las cepas multirresistentes se ven cada vez más limitadas por lo que es

indispensable procurar la investigación continua en el desarrollo de nuevos antibióticos, reposicionamiento de antibióticos viejos y el uso racional por parte de la población.

Antibióticos carbapenémicos

Los carbapenémicos son los integrantes de la familia de antibióticos betalactámicos con mayor actividad, espectro y resistencia a las enzimas betalactamásas incluyendo las de espectro extendido (49). Debido a estas características, son parte del tratamiento cuando se sospecha de una bacteria multiresistente. Existen 4 carbapenémicos disponibles para uso clínico: Impimenem, Meropenem, Ertapenem y Doripenem.

La estructura de los carbapenémicos se caracteriza por la condensación de un anillo betalactámico y un anillo de 5 miembros insaturado, es decir, tiene estructura bicíclica. Aunque forman parte de la familia de los betalactámicos, difieren de las penicilinas y cefalosporinas al tener un grupo metileno en vez de un azufre en el anillo betalactámico. Esta conformación estructural les confiere elevada afinidad por proteínas fijadoras de las penicilinas, amplio espectro y comportamiento bactericida. Cada carbapenémico se distingue de los otros según sustituciones en la posición 1 y 2 del anillo betalactámico (50). En cuanto al mecanismo de acción, los carbapenémicos tienen afinidad por las proteínas encargadas de la síntesis de componentes de la pared celular, estas proteínas son las enzimas fijadoras de penicilina (PBPs) y pueden ser transglicosilasas, transpeptidasas y carboxipeptidasas. Como consecuencia se compromete la estabilidad de la pared celular y se inhibe la síntesis de los componentes para su ensamblaje lo que lleva a la lisis celular (51). El mecanismo de acción de los carbapenémicos les confiere un amplio espectro de actividad contra bacterias gram negativas y gram positivas (52).

Mecanismos de resistencia contra carbapenémicos

Las Bacterias expuestas ante antibióticos betalactámicos, como los carbapenémicos, han desarrollado mecanismos de resistencia que incluyen cambios en las proteínas de membrana externa, modificación del sitio blanco, y producción de enzimas betalactamásas. Para alterar la permeabilidad de la membrana externa se modifica el tamaño o disminuye el número de porinas, esto da como resultado resistencia en *E. coli*, *Pseudomona Haemophilus* y *gonococo* (53). El sitio blanco de los carbapenémicos son las PBPs por lo que la bacteria las modifica para disminuir la afinidad por el antibiótico o cambia la expresión genética para aumentar su producción. A través

de este mecanismo los neumococos y enterococos adquieren resistencia (54). La producción de enzimas β -lactamásas es el mecanismo de resistencia contra carbapenémicos más importante. Estas enzimas son de tipo hidrolasas ya que catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico, lo cual inactiva al antibiótico y evita que se una a las PBPs ejemplos de bacterias con este mecanismo son, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes* (55).

Resistencia clínica reportada

A continuación, la **Tabla 2** muestra las infecciones reportadas como resistentes a carbapenémicos alrededor del mundo en un periodo de 2002-2012.

Tabla 2 Aislamientos de infecciones nosocomiales resistentes a carbapenémicos reportadas en la literatura*.

Bacteria	Resistencia	Ubicación
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35% a imipenem de una muestra de 1120 aislamientos, 2012.	Unidades de cuidados intensivos pertenecientes a la Red de resistencia bacteriana nosocomial del CIDEIM, Medellín, Colombia (56).
	30% a meropenem de una muestra de 1120 aislamientos, 2012.	
	48.9% a imipenem de una muestra de 234 aislamientos 2010.	Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY 2008-2010, Latino América. Argentina (57).
	53.8% meropenem de una muestra de 234 aislamientos, 2010.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	45.3% a imipenem de una muestra de 490 aislamientos 2010.	Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY 2008-2010, Latino América. Brasil (57).
	42.4% meropenem de una muestra de 490 aislamientos, 2010.	
	41% a Imipenem de una muestra de 98 aislamientos en 2005.	Hospitales de atención terciaria en Atenas, Grecia (58).
	37.1% a imipenem de una muestra de 947 aislamientos 2009.	Unidades de cuidados intensivos pertenecientes a la Red de resistencia bacteriana nosocomial del CIDEIM, Medellín, Colombia (56).
<i>Acinetobacter baumannii</i>	98.8% meropenem de una muestra de 1868 aislamientos, 2012.	Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY 2008-2010, Latino América. México (57).
	58.6% a imipenem de una muestra de 239 aislamientos 2010.	
	59.7% meropenem de una muestra de 239 aislamientos, 2010.	
	73% a imipenem de una muestra de 355 aislamientos 2010.	Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY 2008-2010, Latino América. Brasil (57).
	72.7% meropenem de una muestra de 355 aislamientos, 2010.	

94% a imipenem de una muestra de 100 aislamientos en 2004.	Hospitales de atención terciaria en Atenas, Grecia (58).
50% a meropenem de una muestra de 281 aislamientos en 2002.	Unidades de cuidados intensivos de la red de vigilancia nosocomial, Estados Unidos (59).
47.8% a imipenem de una muestra de 287 aislamientos 2006.	Hospitales de España participantes en el estudio de vigilancia de resistencia a antimicrobianos: VIRA 2006 (60).
51.5% meropenem de una muestra de 287 aislamientos, 2006.	

*Tabla de elaboración propia.

Clasificación de las betalactamásas

Las betalactamásas son proteínas globulares con una masa 100 veces superior a los antibióticos betalactámicos. Existen distintos criterios para clasificar estas enzimas. La clasificación de Amber se basa en la secuencia de aminoácidos, localización y peso molecular. Las enzimas tipo A, B Y D están codificadas en plásmidos y pesan alrededor de 25 y 30 kD. Mientras que las tipas C se codifican en el cromosoma de la bacteria y pesan 40kD. Las enzimas de tipo B reciben el nombre de metalo-betalactamásas ya que necesitan un metal para su mecanismo de acción (61). Otra clasificación diseñada por Bush y Medeiros se basa en la funcionalidad de cada enzima: peso molecular, punto isoeléctrico, perfil del sustrato y propiedad de inhibición por monobactámicos. Las enzimas del grupo 1 tienen acción cefalosporinasa y no las inhiben los monobactámicos, las del grupo 2 son penicilinasas y cefalosporinasas inhibidas por ácido clavulánico. Las del grupo 3 se corresponden con las metalo enzimas del grupo B. por último, el grupo 4 incluye actividad contra penicilinas (62). Las betalactamásas de tipo A, tienen afinidad por los carbapenémicos, por ello reciben el nombre de carbapenemasas (63). Esta clase de enzimas se encuentra presente en la familia de las bacterias Enterobacteriaceae, pero también se han reportado en *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella spp* (64). Otra clasificación funcional está basada enzimas que hidrolizan carbapenémicos y otras características como: mecanismo de hidrólisis, modo de transferencia de genes e interacción con inhibidores. Se trata de las serin-carbapenemasas, incluyen la clase A y D de Amber y las metalo-betalactamásas, la **Tabla 3** muestra una breve descripción de cada clase (65).

Tabla 3 Clasificación funcional Amber de carbapenemasas*

Clasificación / característica	Betalactámicos que inhiben	Mecanismo de hidrolisis	Transferencia de genes	Interacción con inhibidores	Ejemplos
Serin Carbapenemasas	Penicilinas, Cefalosporinas y Carbapenémicos	Poseen un residuo de serina en su sitio activo.	Principalmente cromosómica	Ácido clavulánico y tazobactam.	KPC, SME, IMI/SHV.
Metalo betalactamásas	Todos los betalactámicos excepto monobactámicos	Requieren la presencia de Zinc u otro metal como cofactor	Principalmente por plasmidos, integrones y transposones	Inhibidas por quelantes de iones metálicos	VIM/IMP, NDM-1

* Tabla tomada de Moreno-Monge 2013(65). †KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapemasa, SME: enzima de *Serratia marcescens*, IMI: β -lactamasa que hidroliza el imipenem, SHV: reactivo sulfhídrico variable, VIM: metallo- β -lactamasa codificada por el integrón de Verona, IMP: activa sobre el imipenem y NDM-1: metallo-beta-lactamasa de Nueva Delhi.

Química computacional y sus herramientas

La química computacional integra las ecuaciones de la física clásica y moderna, los conocimientos de la química orgánica e inorgánica, y métodos numéricos a través de computadoras para estudiar, caracterizar, interpretar la estructura electrónica y estabilidad de los sistemas químicos. Como resultado, es posible investigar la geometría molecular, las energías de moléculas y estados de transición, la reactividad química de la materia, las propiedades físicas de una molécula y la interacción entre una enzima y su sustrato para explicar mecanismos de reacción a nivel molecular y proporcionar información adicional que no es posible obtener por el método experimental en el área de ciencia de materiales (66). Por otra parte, ayuda a validar modelos y teorías que tienen pocas posibilidades de contrastarse con la realidad. Esto la convierte en una herramienta complementaria para explicar el fenómeno experimental.

Mecánica molecular

Esta área de la física-química se apega a las leyes de la mecánica clásica para describir el movimiento de las moléculas, es decir, no toma en cuenta la contribución de los electrones en las interacciones con otras moléculas. Cada molécula se trata como una esfera y la distancia entre ellas se representa como un resorte. Si se conoce la longitud de cada resorte, los ángulos que se forman entre los resortes y las esferas y la fuerza necesaria para estirar y doblar estos resortes, es posible calcular la energía de todo el sistema. Cuando a estos términos se les expresa de forma matemática se crean distintos modelos o “force fields” (67). Para hacer este cálculo, toma como referencia a la energía potencial para describir la unión entre varias esferas. Las interacciones entre 2 o más esferas se describen por medio de un oscilador armónico, el cual se comporta como un resorte, y las fuerzas de van der Waals, las cuales describen la fuerza de unión o repulsión entre 2 moléculas (68). La ecuación completa que describe la energía potencial de cada molécula se compone de la contribución de los enlaces, ángulos, diedros, las fuerzas de van der Waals y la energía de las interacciones electrostáticas calculadas por la ley de Coulomb como se muestra en la **Ecuación 1**. A partir de una simulación con mecánica molecular se llevan a cabo optimizaciones geométricas para encontrar la conformación de menor energía y obtener propiedades físicas de la molécula (69).

Ecuación 1 Ecuación de la energía potencial

$$U(R) = \sum_{\text{Enlaces}} k_i^{\text{enlace}} (r_i - r_0)^2 + \sum_{\text{Angulos}} k_i^{\text{angulo}} (\theta_i - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Dihedros}} k_i^{\text{dihedro}} [1 + \cos(n_i \phi_i + \delta_i)] + \sum_{i < j}^{\text{atomos}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i < j}^{\text{atomos}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

Cálculos Ab Initio y métodos semi empíricos

Los cálculos por Ab Initio están basados en la ecuación de Schrödinger, la cual describe cómo se comportan los electrones en un sistema. Para resolver esta ecuación, el método calcula la energía y la función de onda del sistema de interés. Esta función de onda es una función matemática con la que se calcula la distribución de los electrones en la molécula, a partir de esta información es posible calcular características como la polaridad de la molécula (70). Según la mecánica cuántica, no es posible resolver la ecuación de Schrödinger exacta para sistemas con más de un electrón. Es por ello que se utilizan aproximaciones para llevar a cabo cálculo por Ab Initio, este término hace referencia a los métodos basados en química cuántica para resolver la ecuación previamente mencionada. A mayor número de electrones en el sistema, más tiempo y recursos le tomará a la computadora (71). Los métodos semi empíricos son más rápidos a comparación con los cálculos Ab Initio ya que toman en cuenta medibles provenientes de experimentos contenidos en librerías para después parametrizarlos en la ecuación inicial. sin embargo, esta ventaja se ve limitada al número de medibles experimentales disponibles (72). Los cálculos Ab Initio se utilizan para conocer medibles como geometrías moleculares, frecuencias de vibración, potencial de ionización y afinidad electrónica.

DFT, Teoría del Funcional de la Densidad

La teoría del funcional de la densidad está basada en la función de onda y en los teoremas de Hohenberg-Kohn, los cuales establecen que las propiedades en estado base de un átomo, una molécula o un sistema pueden determinarse a partir de la función de la densidad electrónica, es decir, la probabilidad de encontrar un electrón en una región específica del espacio. A su vez, la densidad electrónica depende de las coordenadas espaciales de cada átomo (73). Esta simplificación de la función de onda reduce el tiempo y costo computacional en comparación con otros métodos para calcular propiedades físicas y químicas de sistemas moleculares con un mayor número de electrones. Los términos de la ecuación de onda en función de la densidad se observan en la **Ecuación 2**.

Ecuación 2 Ecuación de Schrödinger para la función de onda en términos de densidad

$$E_v[\rho] = T_v[\rho] + E_H[\rho] + E_{XC}[\rho] + \langle \rho(r) v_{ne}(r) \rangle$$

Técnicas sobre el diseño de fármacos asistido por computadora

El proceso para descubrir y desarrollar un nuevo fármaco toma entre 10 y 14 años y una inversión mayor al billón de dólares. Sin embargo, gracias al diseño de fármacos asistido por computadora se reportado una disminución de hasta el 50% de los costos. Esta metodología consiste en softwares basados en procesos para establecer normas que relacionen la actividad de una molécula con su estructura (74). Existen distintas técnicas de la química computacional para el diseño de fármacos. El modelado molecular de compuestos con actividad biológica propone cambios específicos a las estructuras químicas para ayudar a incrementar su afinidad con la diana terapéutica. Por otra parte, el acoplamiento molecular busca la conformación y posición optima del ligando dentro de su blanco molecular entre 2 macromoléculas. En la **Tabla 4** se muestran ejemplos de fármacos desarrollados por química computacional (75).

Tabla 4 Fármacos desarrollados por métodos de química computacional*

Fármaco	Aplicación	Técnica computacional	Laboratorio
Crizotinib	Agente antineoplásico para cáncer de pulmón	Acoplamiento molecular	Pfizer
Rilpivirina	Antiviral para infección por VIH	Acoplamiento molecular	Janssen Pharmaceuticals
Zelboraf	Agente neoplásico para melanoma	Acoplamiento molecular y análisis de subestructuras	Roche
Boceprevir	Antiviral para infección por virus de la hepatitis C	Acoplamiento molecular	Merck & Co

*Tabla tomada de Medina-Franco 2015 (75).

Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular, o Docking, se trata de un método basado en la estructura 3D en el que se hace una predicción de como interactúa la molécula según la complementariedad estructural y complementariedad electrónica (76). Este enfoque permite calcular las interacciones entre 1 o más moléculas in silico. Para lograr hacer la predicción, es necesario implementar las estructuras moleculares de interés, la orientación en la que se espera que interactúen y la función de puntuación que permitirá evaluar la afinidad de unión. El primer estudio de docking molecular enfocado al desarrollo de fármacos se llevó a cabo en 1982, en el cual, se analizó la unión de los análogos de la hormona tiroidea a la pre albúmina tomando en cuenta los enlaces de hidrógeno y la repulsión de esferas en la función de scoring (puntuación) para describir las interacciones entre la proteína y su ligando (77). 40 años después, se han desarrollado nuevos algoritmos que permiten llevar a cabo predicciones con mayor exactitud e incluir sistemas con un gran número de átomos. Recientemente, nuevos enfoques combinan la dinámica molecular con los algoritmos de docking (acoplamiento) para validar y perfeccionar los modelos 3D computacionales (78). Los medibles obtenidos mediante esta estrategia tienen un nivel de precisión comparable con las estructuras cristalográficas y medibles experimentales. En la **Tabla 5** se muestran antecedentes en el estudio de las interacciones entre carbapenémicos- β -lactamasa por química computacional.

Tabla 5 Antecedentes del estudio de interacciones entre carbapenémicos y β -lactamasa por química computacional*

Autor, Año y Lugar	Enfoque	Aportación
Fátima Fonseca 2012 Reino Unido (79)	Simulación del mecanismo de reacción de la hidrólisis de doripenem por β -lactamasas de clase A	<ul style="list-style-type: none"> ● Comparación de los resultados obtenidos a través de la simulación vs experimentales ● Modelos del antibiótico y la enzima digitales
Albert Ardévol 2013 Suiza (80)	Métodos de simulación QM/MM para enzimología computacional	<ul style="list-style-type: none"> ● Técnicas de simulación de enzimas y softwares recomendados ● Parámetros iniciales para calculo
Ioannis Galdadas 2018 Londres (81)	Identificación de sitios activos en modelos de carbapenemasas	<ul style="list-style-type: none"> ● Modelo descriptivo de los sitios blancos moleculares de la enzima y su función
Clyde A. Smith 2013 Estados Unidos (82)	Simulación de la actividad de la β -lactamasa OXA-23 de <i>Acinetobacter Baumannii</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Parámetros y medibles cinéticos de la hidrólisis de la enzima en cada carbapenémico
Thomas Gerken 2005 Canadá (83)	Estudio de la relación entre actividad y estructura de betalactámicos.	<ul style="list-style-type: none"> ● Descripción fisicoquímica de los enlaces covalentes formados entre los betalactámicos y la bacteria

*Tabla de elaboración propia.

Fonseca (79), combina los enfoques in silico y experimental para aportar información sobre los mecanismos de hidrólisis a carbapenémicos mediada por β -lactamasas de clase A. El autor menciona que se puede obtener una noción de que tan buena es la aproximación del modelo computacional al comparar los resultados obtenidos por simulación con cristalografías. A su vez, es posible ajustar el modelo para obtener mejores aproximaciones a lo reportado experimentalmente. Esta aportación es útil para el trabajo de tesis ya que se pueden contrastar los modelos propios computacionales con los reportados in silico y experimentalmente.

Un paso importante en la planeación de experimentos in silico es anticipar los recursos computacionales, referente a capacidad, tiempo y costo, necesarios para obtener resultados con un nivel de precisión adecuado. La investigación de Ardévol (80) aporta protocolos de simulación con diferentes softwares, esto permite conocer los alcances y limitaciones de la metodología que se llevó a cabo antes de iniciar con el diseño de protocolos, parámetros iniciales y las simulaciones propias.

Para lograr un modelo aproximado de la interacción entre una enzima y el antibiótico es necesario conocer los sitios activos donde sucede la formación de enlaces. Galdadas (81), reporta modelos computacionales y señala la localización de los sitios activos junto con su función en el mecanismo de acción de las β -lactamasas. Esta información puede servir como referencia al momento de establecer la ubicación de los sitios blanco en los modelos a generar y para contrastar resultados.

Para simular los mecanismos de acción enzimáticos se requiere conocer cuáles son los parámetros necesarios para reproducir la reacción. Smith (82) reporta parámetros sobre la reacción de hidrólisis de la enzima para cada carbapenémico. Dado que son de naturaleza cinética, pueden servir como guía de comparación al momento de hacer la simulación de reacción y para calcular la energía de la estructura enzimática en cada paso.

La investigación de Gerken (83) hace una distinción en las interacciones covalentes entre el antibiótico y la enzima, este es uno de los objetivos de la investigación, por lo que puede comprarse la metodología que usaron para obtener las interacciones covalentes con el protocolo de simulación que se implementará. De esta manera se conoce cuál fue el camino más costo efectivo en relación al tiempo de cálculo y la aproximación a los valores experimentalmente reportados.

III. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO

III.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA PREGUNTA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La demanda global por disponer de nuevos antibióticos aumenta a un ritmo alarmante debido a varios aspectos de una población en constante crecimiento. Uno de estos aspectos son las bacterias que dejaron de responder ante el antibiótico de prescripción. El problema de la fármaco-resistencia afecta a toda la población mundial, pone en riesgo la efectividad de los sistemas de salud y tiene grandes costos monetarios y de vidas para las naciones. En pleno siglo XXI, la investigación y desarrollo de nuevos fármacos antibióticos no avanza con suficiente rapidez para hacerle frente a la aparición de cepas bacterianas resistentes. Esta situación representa una amenaza para el tratamiento y prevención de enfermedades. Parte de la información que aportan las técnicas de desarrollo de fármacos asistido por computadora, es la caracterización de las propiedades en los sitios activos de la enzima, las cuales, definen la afinidad que tendrá el antibiótico al sitio de unión enzimático. Si bien, existen distintos estudios enfocados en las β -lactamasas, no se encuentra una descripción fisicoquímica de las interacciones que ocurren entre el sitio blanco y el antibiótico carbapenémico. Al conocer dichas características, se puede aportar al diseño de nuevos antibióticos capaces de inhibir a la enzima o evitar la afinidad. Por ello, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué información calculable por medio de química computacional caracteriza de manera fisicoquímica las interacciones entre carbapenémicos y β -lactamasa tipo A?

III.2 HIPÓTESIS

A continuación, se presenta la hipótesis formulada a partir de la revisión del marco teórico y antecedentes, la cual, busca responder la pregunta de investigación.

Las propiedades de estructura electrónica calculadas en los sitios activos de auto ensamblados carbapenémico- β -lactamasa KPC2 permiten conocer las interacciones moleculares que dan origen a la resistencia bacteriana.

III.3 OBJETIVOS

La siguiente sección está destinada a delimitar el objetivo general mediante el cual se desarrolla la investigación y los objetivos específicos que permitirán fijar el camino para cumplir con el objetivo general

3.3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar de manera fisicoquímica las interacciones que originan la resistencia entre los antibióticos de la familia de carbapenémicos y los sitios blanco de las β -lactamasas tipo A por medio de experimentos computacionales.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar un procedimiento metodológico para llevar a cabo los experimentos computacionales por docking y DFT. Constará de experimentos computacionales iniciales que permitan conocer alcances y limitaciones de los softwares y niveles de teoría adecuados para la simulación de moléculas, ensamblados e interacciones existentes en estos sistemas.
- Obtener la estructura de mínima energía y para cada una de las moléculas de antibióticos carbapenémicos y β -lactamasas tipo A y validar contra resultados de espectroscopias experimentales publicadas. Los modelos partirán de las estructuras publicadas en las bases de datos: Protein Data Bank y Drugbank.
- Analizar los resultados de los ensamblados antibiótico- β -lactamasa computados por la metodología de docking.
- Identificación de los medibles que influyen en los mecanismos de resistencia de las β -lactamasas tipo A contra carbapenémicos.

IV. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana a antibióticos es un mecanismo progresivo consecuencia de la selección natural. Aquellas cepas bacterianas capaces de adaptarse al entorno, a través de mutaciones aleatorias, logran sobrevivir y reproducirse para continuar el linaje (5). Aunque este mecanismo progresivo es parte de la evolución, la resistencia bacteriana se ha acelerado debido al uso indiscriminado de fármacos antibióticos por parte de la población a escala global (66).

En pleno siglo XXI las enfermedades infecciosas son una de las causas de muerte más importantes a nivel mundial; entre 1990 a 2010 se reportaron 20,013.1 millones de muertes debido a enfermedades infecciosas (incluyendo infecciones por virus, bacterias y hongos) en todo el mundo (68). En el año 2010, México creó una ley que prohíbe la compra de antibióticos sin receta médica (69). A pesar de esta medida preventiva, en 2018 catorce instituciones hospitalarias mexicanas reportaron un nivel elevado de resistencia en bacterias Gram negativas a través de censos en 100,000 egresos hospitalarios y 11,900 cultivos de aislamientos bacterianos (70).

El método tradicional para el desarrollo de fármacos es un proceso largo y complejo, puede tomar hasta 15 años y una inversión de millones de dólares sin garantía de éxito (71). Organizaciones internacionales como la OMS y la ONU han elaborado planes de intervención y cooperación para la investigación de nuevos antibióticos entre países para hacerle frente a esta problemática declarada como emergencia mundial (2). Se habla de una era post-antibiótica durante el año 2050 en el cual, 10 millones de personas mueren debido a la carencia de tratamiento terapéutico disponible (74).

La química computacional ha permitido el diseño y desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos y materiales (57). Esta disciplina tiene como objetivo modificar y adecuar moléculas según lo demanden las necesidades de aplicación por medio de la predicción de propiedades de sistemas moleculares. Además, al apoyarse de conceptos de la física clásica, cuántica, química teórica y mecánica estadística aplicados en softwares científicos, permite llevar a cabo la simulación de experimentos de manera eficiente y económica (75). De ahí la importancia en invertir en los equipos y capacitación para llevar a cabo estudios basados en el diseño de fármacos basado en la química computacional.

Los mecanismos de acción de las diferentes clases de antibióticos han sido ampliamente explicados (76). Pero, no existe la descripción fisicoquímica de las interacciones entre antibióticos y el sitio blanco en la célula. Tampoco existe una relación entre estas interacciones a nivel fisicoquímico y el papel que desempeñan en los mecanismos de resistencia bacteriana.

Hace 8 años, los antibióticos de la familia de los carbapenémicos se consideraban la última línea de defensa contra infecciones graves, sin embargo, cada vez más cepas resistentes a este grupo de antibióticos son aisladas provenientes de bacterias Gram negativas, a través de la producción de β -lactamasas (77). A falta de nuevos antibióticos capaces de hacerle frente a las bacterias, los departamentos de salud han desarrollado alternativas para lidiar con su aparición: Apoyo administrativo, vigilancia, administración de antibióticos controlada y protocolos sobre el control de infecciones, desafortunadamente estos esfuerzos no son suficientes (78).

Mediante la caracterización fisicoquímica del fenómeno de unión antibiótico-bacteria entre carbapenémicos y β -lactamasas, se permite estudiar el mecanismo de acción a nivel molecular. Aquí resalta la pertinencia de este trabajo, ya que al comprender la naturaleza de estas interacciones y los cambios estructurales que dan pie a la resistencia, es posible llevar a cabo el diseño inteligente de antibióticos eficaces contra cepas multirresistentes.

Razones principales para llevar a cabo el estudio:

- Contribuir a la solución del problema de la fármaco-resistencia al aportar información para el diseño inteligente de antibióticos. Al identificar las interacciones que favorecen el mecanismo de resistencia de las bacterias contra antibióticos, se apoya a las farmacéuticas para enfocarse a los mejores candidatos moleculares para el desarrollo de nuevos y eficaces tratamientos antibacterianos.
- Aumentar el conocimiento científico al desarrollar una metodología que permita obtener medibles fisicoquímicos de las interacciones entre el antibiótico-enzima. Al estandarizar la simulación de este sistema molecular, se obtienen medibles que permiten la generación de ciencia básica, ya que permite escalarla a otros complejos antibiótico-enzima distintos. De manera indirecta, se beneficia a la población, tanto humana como animal, que es infectada por bacterias resistentes a carbapenémicos y otras familias de antibióticos al apoyar en el diseño de tratamientos efectivos.

- El uso de técnicas de la química computacional permite obtener medibles fisicoquímicos de manera confiable, costo-efectiva y más rápido que la metodología experimental. Si bien, existe la inversión inicial para la adquisición del equipo computacional adecuado, durante el desarrollo de este proyecto no fue necesario contar con un laboratorio, grandes cantidades de reactivos ni cultivos bacterianos para llevar a cabo el número de simulaciones que fueron necesarias para obtener resultados.
- Las bacterias resistentes a antibióticos cobran miles de vidas al año en todo el mundo y esta tendencia va en aumento. Por ello, es necesario explorar alternativas para hacerle frente a la amenaza. El experimento computacional permite abordar esta problemática a partir de la aplicación de ciencia básica en el área de la salud.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio de química computacional (Medina 2015) para determinar cuáles son las interacciones entre fármacos carbapenémicos y la enzima β -lactamasa que favorecen la resistencia bacteriana a esta familia de antibióticos. El estudio está basado en el cálculo y análisis de propiedades fisicoquímicas a través teorías en forma de algoritmos implementados de manera computacional. Se manipulan variables como las geometrías moleculares, energías de enlace y medio de simulación. Al establecer un ambiente de experimentación in silico, es posible obtener medibles que no son accesibles de manera in vitro. La investigación en química computacional tiene un enfoque inductivo, ya que, a partir del análisis del sistema molecular de interés, permite obtener conclusiones o formular teorías a partir de resultados particulares que pueden aplicarse a grupos moleculares similares (79).

V.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El sistema molecular de interés es el ensamble carbapenémico y β -lactamasa clase A. Este compuesto se forma cuando el antibiótico ingresa en el organismo infectado e interactúa con la enzima bacteriana. Se obtuvieron las estructuras moleculares de 4 carbapenémicos: Imipenem, Meropenem, Ertapenem y Doripenem de la base de datos Pubchem en formato xml. Para la estructura molecular de la β -lactamasa clase A se descargará la enzima proveniente de *Klebsiella pneumoniae* de la base de datos del Protein Data Bank en formato pdb. La **Figura 1** muestra las estructuras que forman el sistema molecular de interés.

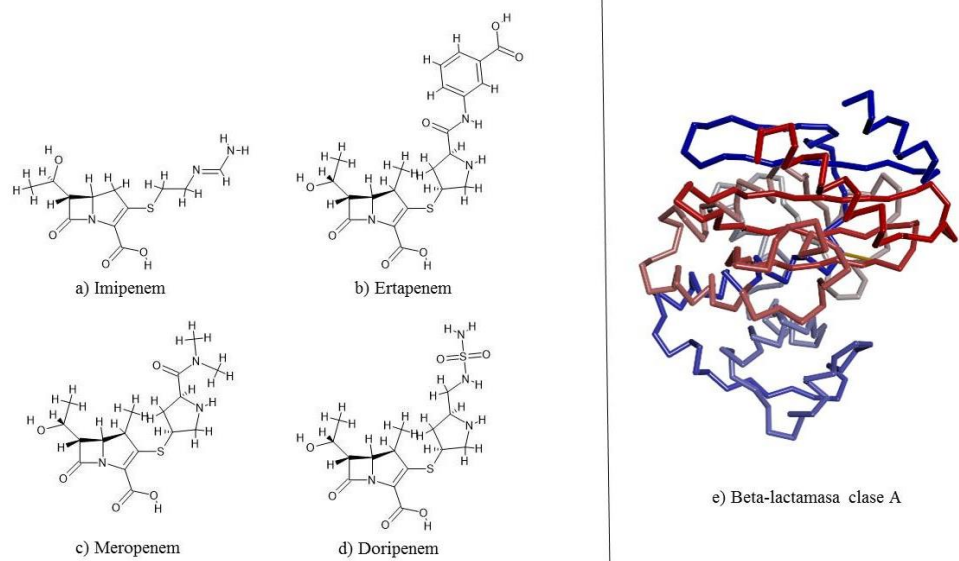


Figura 1 Moléculas del sistema de interés: antibióticos carbapenémicos y enzima β -lactamasa. Figura de elaboración propia.

5.2 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variables independientes

Las variables independientes, descritas en la

Tabla 6 se concentran en las moléculas de carbapenémicos y β -lactamásas, debido a que la estructura de una molécula dicta las propiedades físicas, químicas e interacciones posibles entre sí.

Tabla 6 Definición de variables independientes

Variable	Definición conceptual	Tipo de escala de medición	Escala de medición
Distancia de enlace	Distancia media entre los núcleos de dos átomos unidos mediante un enlace químico (81).	Razón	Angstroms
Angulo de enlace	Ángulo formado por tres átomos enlazados consecutivamente (82).	Razón	Grados
Tipo de enlace	La naturaleza del enlace depende de la clase de átomos que se enlazan (83).	Nominal	Iónico, covalente y metálico
Número de enlaces donadores de hidrogeno	Los enlaces de hidrogeno se forman cuando un átomo donador cede el átomo de H unido	Razón	Cantidad: Número de enlaces
Número de enlaces receptores de hidrogeno	por enlace covalente al átomo electronegativo aceptor (85).	Razón	

VARIABLES DEPENDIENTES

Las variables dependientes para el protocolo de investigación, descritas en la **Tabla 7**, son factores que contribuyen o describen a la afinidad electrónica entre ligando antibiótico-enzima.

Tabla 7 Definición de variables dependientes

Variable	Definición conceptual	Tipo de escala	Escala de medición
Estabilidad química	Tendencia de un material para resistir el cambio o la composición debido a la reacción interna o debido a perturbadores externos (87).	Razón	Kcal/mol o KJ/mol
Potencial de ionización	Energía mínima necesaria para sacar un electrón de la capa de valencia de un átomo cuando se encuentra en estado gaseoso y eléctricamente neutro.	Razón	KJ/mol

Índice electrofílico	Energía de estabilización de un sistema electrónico cuando saturado con electrones (91).	Intervalo	-1.0 a +1.0
TPSA (Superficie polar topológica)	La suma de la superficie sobre todos los átomos o moléculas polares, (92).	Razón	Angstroms al cuadrado

5.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

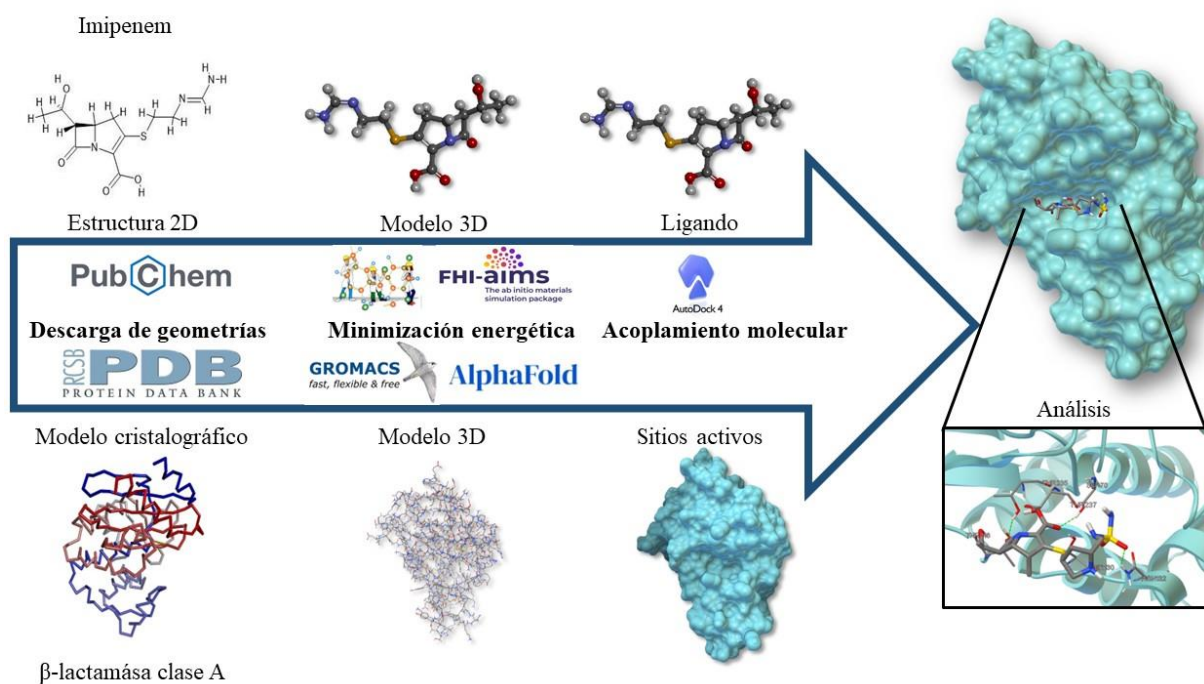


Figura 2 Diagrama de flujo para el procedimiento metodológico. Diagrama de elaboración propia.

El protocolo experimental, en la **Figura 2**, inicia con el modelado molecular de los antibióticos y de la enzima. El objetivo de este paso es obtener la estructura de mínima energía para las moléculas de interés, esto se traduce a encontrar la conformación estructural química y eléctricamente más estable. Para ello, se utilizaron 4 softwares: Tinker, FHI-aims, AlphaFold2 y GROMACS. Luego

se llevó a cabo el acoplamiento molecular o “docking” para 4 ensamblajes entre la enzima y los antibióticos: KPC2-imipenem, KPC2-doripenem, KPC2-ertapenem Y KPC2-meropenem. En este paso se utilizó el software Autodock, para simular las interacciones presentes en cada ensamblaje. Posteriormente se visualizaron los ensamblajes finales a partir del mismo software. Finalmente, el cálculo de propiedades fisicoquímicas se realizó mediante el software FHI-aims. Tanto el modelado molecular como el acoplamiento molecular se seleccionó el nivel de teoría de DFT y mecánica molecular (97). **La** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. muestra una descripción de cada paso.

Tabla 8 Descripción del procedimiento metodológico

Paso	Descripción
1.- Obtención de las moléculas de interés	Las estructuras moleculares de cuatro carbapenémicos, Imipenem (ID: 104838), Meropenem (ID: 441130), Ertapenem (ID: 150610) y Doripenem (ID: 73303) se descargaron de la base de datos Pubchem (84). Adicionalmente, se descargó la estructura de la enzima KPC2 Carbapenemasa (PDB ID: 2OV5) de la base de datos del Protein Data Bank (85). Ambas bases de datos son de libre acceso.
2.- Optimización geométrica de antibióticos	La primera fase inicia con el modelado molecular de los antibióticos para obtener la geometría de mínima energía, es decir, la conformación estructural más estable. Se manejaron dos niveles de teoría. Al inicio se empleó un acercamiento semi clásico para obtener las geometrías iniciales por la metodología force field (86) cómo se encuentra implementada en el código del software Tinker V. 8 (87) con un máximo de 5000 iteraciones. Los criterios de convergencia se configuraron según: Convergencia estructural con energía de 1×10^{-6} Hartree, desplazamiento máximo entre átomos 0.18 Å y fuerza máxima de 0.003 Hartree/Bohr (88). A continuación, se tomaron las cinco moléculas más estables para ser tratadas empleando DFT, con el nivel de teoría m06/lanl2dz (89,90), en el código all-electron full-potential de bases numéricas centradas en cada átomo en el software FHI-aims V. 210716 (91).
3.- Optimización geométrica de la enzima	Para el modelado de la enzima, se utilizó el software GROMACS V. 5 (92). Se empleó el force field OPLS-AA all atom (93), se seleccionó agua como solvente para llenar el espacio alrededor de la molécula y iones de cloro y sodio para neutralizar la carga de la proteína. Adicionalmente se generó un segundo modelo enzimático por inteligencia artificial a través del software Alphafold2 (Jumper et al. 2022)
4.- Acoplamiento molecular	Se seleccionaron los sitios activos en la enzima: SER70, TRP105, SER130, ASN132, LYS234, THR235, THR237, GLU166, LEU167 y ASN170, según lo reportado en la literatura de manera experimental (12). Después se delimitó el espacio de interacción con las dimensiones o “grid” $x=52$ Å, $y=50$ Å, y $z=56$ Å. La enzima se mantuvo rígida y se fijaron las posiciones de todos sus residuos para reducir el esfuerzo computacional. Se permitió que la conformación de cada carbapenémico variara durante la

simulación, dejando libres los ángulos diedros para la minimización de la energía total de enlace. El resultado final fueron cuatro ensambles enzima-antibiótico.

5.- Análisis de las geometrías optimizadas y poses de acoplamiento	Los resultados de cada cálculo son nuevas conformaciones moleculares a partir de los cuales se obtuvieron parámetros que describen al sistema molecular. Las distancias, ángulos y energías de enlace fueron comparadas con los resultados reportados experimentalmente para evaluar la exactitud y precisión de los cálculos a través de espectroscopías (antibióticos) y el valor de la desviación cuadrática media (enzimas). Los ensambles que obtuvieron buenas aproximaciones fueron seleccionados para el cálculo de propiedades e interacciones que describan el acoplamiento entre el antibiótico y la enzima.
6.- Análisis de resultados	Una vez obtenidas los 4 ensambles más estables, se llevó a cabo el cálculo de propiedades fisicoquímicas mediante el software FHI-aims.

**Tabla de elaboración propia.*

Equipo y servidor

Los cálculos se llevaron a cabo en 4 computadoras de escritorio con procesador i7, de octava generación, 16 GB en RAM, tarjeta de video Nvidia GTX-1080 con 3584 núcleos CUDA. Además, para los cálculos de mayor capacidad se utilizará el servidor del Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México.

5.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

En la presente investigación se emplearon modelos computacionales de fármacos y modelos computacionales de enzimas, no involucró el uso de muestras humanas, muestras animales, productos químicos ni productos biológicos, por lo que no se lleva a cabo la consulta de normas o documentos referentes.

VI. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados según el orden metodológico en el que fueron generados. Antes de analizar los enlaces formados en los ensambles antibiótico-enzima, se midió la precisión de los modelos.

6.1 Primer paso: Optimización geométrica de carbapenémicos

Las conformaciones moleculares resultantes de la optimización geométrica por DFT en carbapenémicos se muestran en la **Figura 3a-3d**. Los 4 antibióticos (a, b, c y d) comparten la misma estructura central, el anillo betalactámico, y difieren en los grupos funcionales que rodean el anillo. Como se mencionó antes, el anillo betalactámico tiene un papel importante tanto en el mecanismo de acción de los antibióticos como en el mecanismo de resistencia mediado por enzimas β -lactamasas, la **Figura 3e** muestra un esquema de la estructura común y de la numeración de los átomos en el anillo betalactámico, lo que hace diferente a cada carbapenémico son los grupos funcionales acoplados a esta estructura general.

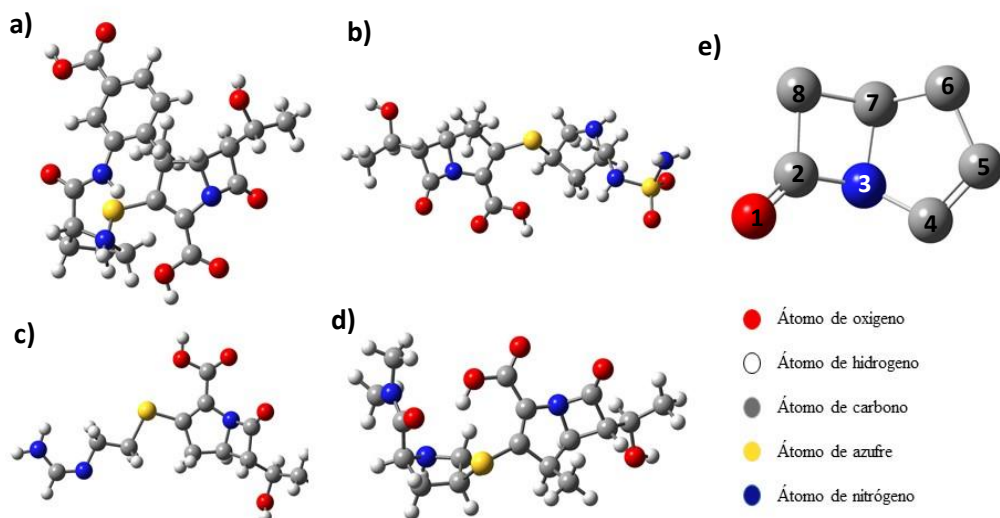


Figura 3 Geometrías optimizadas de los carbapenémicos a) ertapenem b) doripenem c) imipenem y d) meropenem, y e) Esquema resultante de la numeración de átomos en el anillo betalactámico. Figura de elaboración propia.

A partir del esquema propuesto en la **Figura 3e**, se registraron los ángulos y distancias de enlace de cada anillo betalactámico para su posterior comparación estructural con espectroscopías de UV-VIS provenientes de moléculas experimentales, estas comparaciones se observan en la **Figura 4**.

La espectroscopia UV-VIS es capaz de identificar los enlaces y los átomos dentro de una molécula a partir del espectro de absorbancia. Cuando la fuente de luz emite fotones a la longitud de onda deseada los electrones de la muestra en este caso de los carbapenémicos van a pasar a un estado excitado, este fenómeno de absorbancia se registra por un detector el cual manda las distintas corrientes de electrones a una computadora como señal de salida. La química computacional permite hacer una simulación de espectroscopias Ultravioleta visible por medio de las ecuaciones matemáticas que describen el fenómeno. Por ello se buscaron las espectroscopias experimentales de antibióticos carbapenémicos en el solvente agua para su comparación. Al compararlo contra los picos característicos de las espectroscopias reportadas de manera experimental (líneas rojas) observamos un error que va desde 0.14 hasta 0.96 eV.

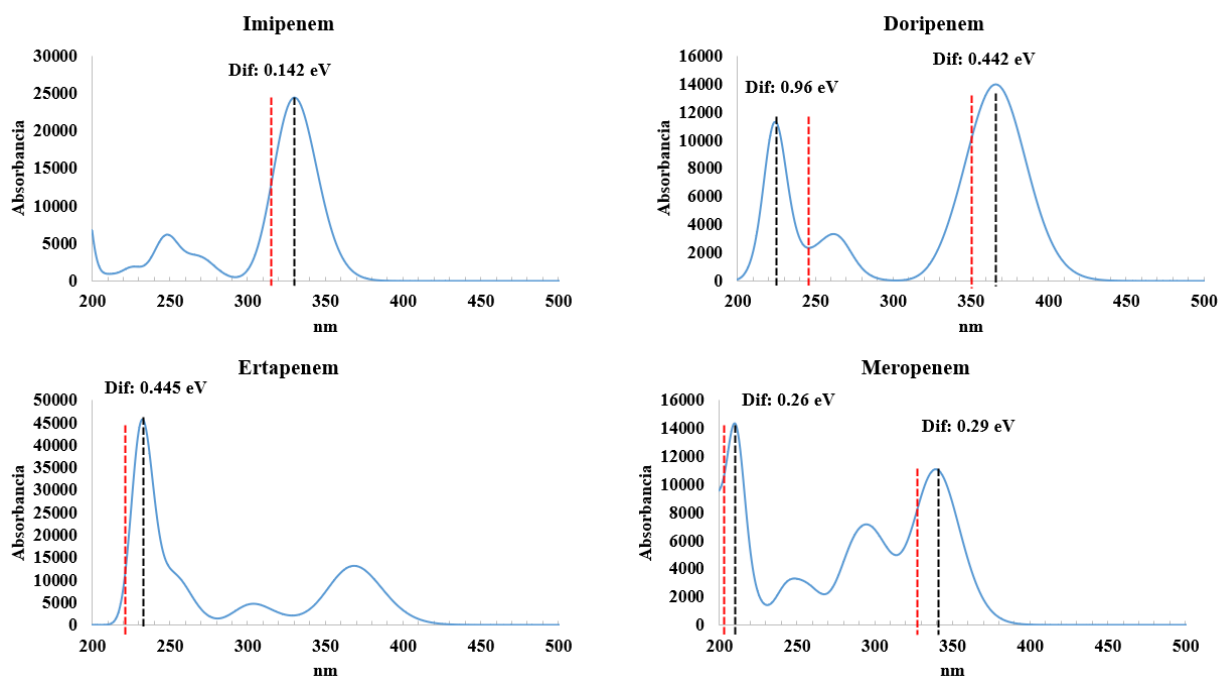


Figura 4 Valores experimentales y teóricos de las espectroscopías UV-VIS pertenecientes a las moléculas de antibióticos carbapenémicos. Nota: Imipenem de Tremblay et al., Doripenem de Colombo et al., Ertapenem Smith et al. y Doripenem Nukaga et al.

6.2 Segundo paso: Optimización geométrica de la enzima β -lactamása

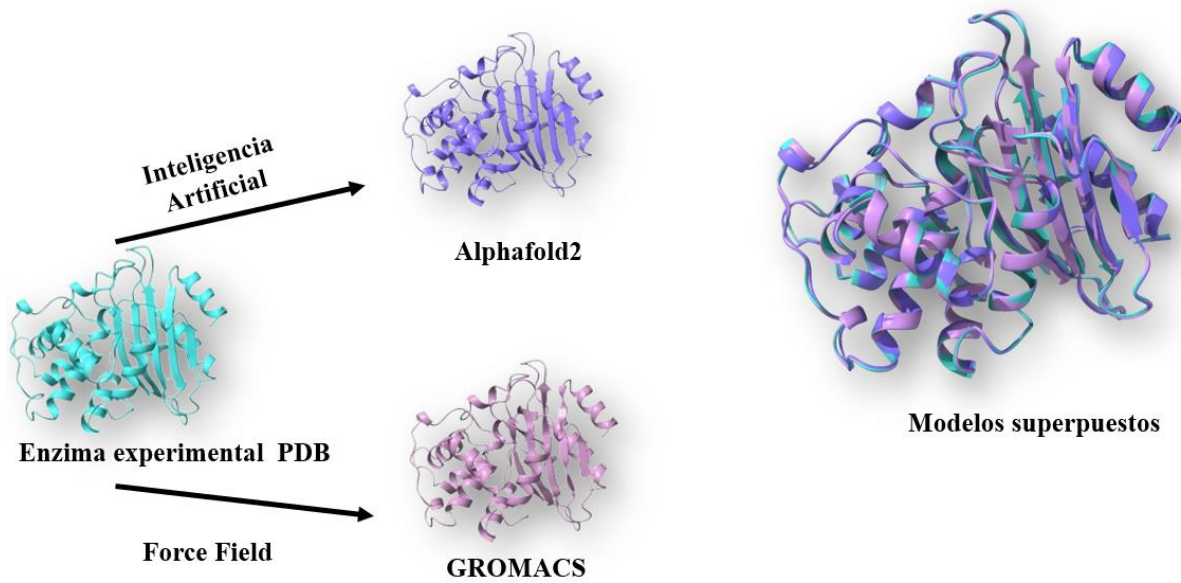


Figura 5 Modelos enzimáticos generados por GROMACS (rosa) y AlphaFold2 (morado) a partir del modelo experimental del Protein Data Bank (azul)

Para validar los 2 modelos generados para la enzima, se utiliza un medible que compara la similitud entre las geometrías de las proteínas. Tomando como referencia la enzima experimental de Protein Data Bank. Este medible es la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas o RMSD. Una vez que se tienen los modelos superpuestos se calcula la distancia media entre los átomos correspondientes a cada uno de los modelos. Al ser una desviación, el modelo con mejor precisión ser el de menor RMSD, como se muestra en la **Ecuación 3**:

Ecuación 3 Desviación cuadrática media

$$RMSD = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2$$

6.3 Tercer paso: Ensamblajes del acoplamiento molecular

Los sitios resultantes de mayor interacción de carbapenémicos con la enzima β -lactamasa de *K. pneumoniae* y su ubicación espacial, se muestran en la **Figura 6**. Los aminoácidos que participan en estas interacciones fueron: Ser70, Ser130, Asn132, Thr235, Thr237 y Cys238.

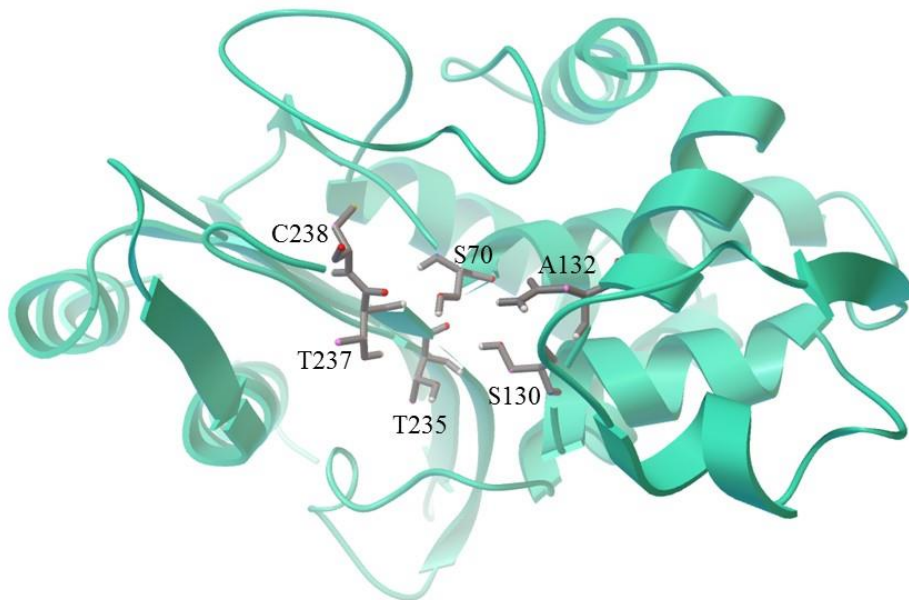


Figura 6 Aminoácidos presentes en los sitios activos de la enzima β -lactamasa de *Klebsiella pneumoniae*

La **Tabla 9** muestra en la primera columna el ensamblaje entre la enzima KPC2 y cada uno de los antibióticos carbapenémicos para la enzima experimental y para la generada por inteligencia artificial. Las energías del enlace intermolecular KPC2-carbapenémico se muestran en la segunda y sexta columna. Esta es la cantidad de energía requerida para separar el ensamblaje KPC2-carbapenémico. La tercera y séptima columna enlista de tres a cinco lugares más activos entre cada ensamblaje KPC2-antibiótico. Las columnas cuarta, quinta, octava y novena se refieren a la distancia y energía de cada uno de los enlaces intramoleculares; esto es debido a que la molécula antibiótica interactúa con la beta-lactamasa en más de un área al mismo tiempo.

Los cuatro carbapenémicos se colocaron en la misma orientación centrados en los sitios activos reportados dentro de la enzima. Los resultados del acoplamiento molecular demostraron que todos

los carbapenémicos obtienen una energía de afinidad entre -6.84 y -8.76 kcal/mol. Como se muestra en la Tabla 9, doripenem formó el ensamble más estable en ambas enzimas, mientras que ertapenem obtuvo el ensamble con la energía de afinidad menor para la enzima experimental e Imipenem para la proveniente de inteligencia artificial. Los ensambles demostraron que los enlaces formados pertenecen a la categoría de puentes de hidrogeno, es decir, interacciones dipolo-dipolo entre un átomo de hidrogeno y otro átomo de carácter electronegativo, oxígeno. Los enlaces entre O-H pueden formarse a una distancia de hasta 2.8 angstrom (\AA), lo cual concuerda con los enlaces presentes en cada ensamble.

Tabla 9 Energías obtenidas y enlaces formados en cada complejo antibiótico-enzima proveniente de Alphafold2 y PDB.

Ensamble	Energía del ensamble (kcal/mol)	Enlaces	Distancia de enlace (Å)	Energía de cada enlace (kcal/mol)	Energía del ensamble (kcal/mol)	Enlaces	Distancia de enlace (Å)	Energía de cada enlace (kcal/mol)
Imipenem-KPC2	-7.07	ASN132	1.841	-0.457	-7.3	ASN132	2.1574	-1.283
		THR237	1.861	-0.528		THR235	1.809	-4.566
		THR237	2.199	-4.28		THR237	1.574	-0.07
		SER130	1.81	-4.651		THR216	1.886	-1.864
		SER70	1.969	-3.434		GLU275	1.774	-5.234
		GLU166	2.166	-0.871		ASN132	2.082	-0.2
		SER70	1.996	-0.169		SER70	2.126	-0.05
Doripenem-KPC2	-8.42	SER130	2.012	-0.198	-8.76	SER130	1.872	-2.674
		ASN132	2.109	-1.679		ASP132	1.919	-3.736
		THR235	2.187	-1.694		ARG210	2.081	-0.172
		THR237	2.007	-0.16		THR237	2.001	-4.183
		THR216	2.076	-4.397				
Ertapenem-KPC2	-6.84	SER70	2.194	-0.38	-7.72	THR237	1.941	-4.312
		ASN132	2.179	-1.008		THR237	2.21	-4.09
		THR237	2.191	-0.023		ARG210	2.145	-2.261
		GLU166	1.804	-0.422		SER130	1.2693	-2.613
		SER130	2.19	-0.29		TRP105	2.038	-1.396
						ASN132	2.204	-1.378
						THR235	1.844	-4.161
Meropenem-KPC2	-8.13	THR237	1.979	-1.431	-8.05	THR237	1.602	-2.151
		SER130	2.055	-0.08		ASN132	2.086	-0.215
		SER70	2.054	-0.085				
		THR235	1.868	-3.953				
		THR216	1.992	-6.044				

Enzima experimental en PDB

Enzima de inteligencia artificial

Los resultados obtenidos en cada ensamble presentan enlaces con al menos tres de los seis sitios activos reportados, cada ensamble se muestra en la **Figura 7a-5d**. Los aminoácidos participantes en enlaces en los cuatro ensambles son SER70 y ASN132 para ambas enzimas.

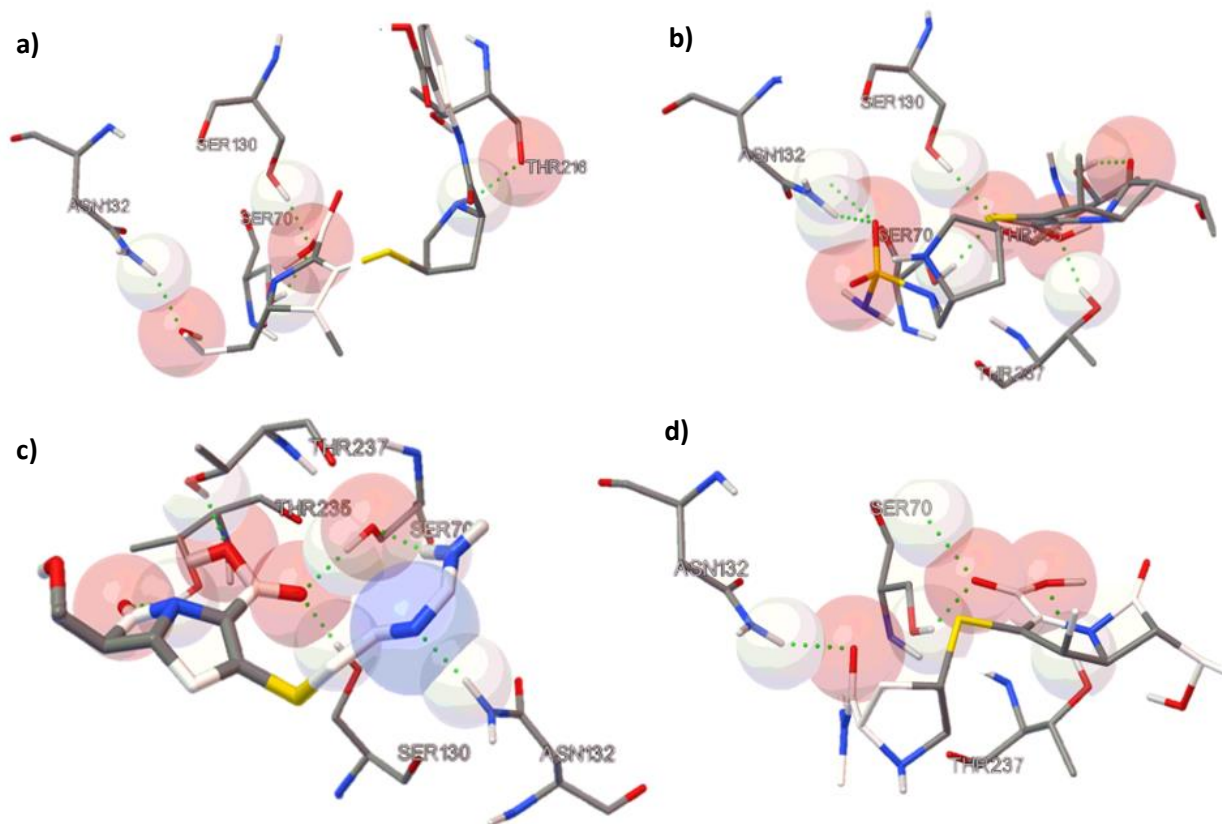


Figura 7 Interacciones de enlace de a) ertapenem, b) doripenem, c) imipenem y d) meropenem con los residuos de aminoácidos de la betalactamasa.

VI.1 TESIS

A partir de la caracterización computacional fisicoquímica de las interacciones β -lactamasa-carbapenémico se han encontrado los sitios de acción reportados por trabajos previos. Con ello, podemos estudiar los mecanismos de acción a nivel molecular. Al comprender dichas interacciones en cada una de las moléculas antibióticas de carbapenémicos con el sitio blanco de la enzima, es posible apoyar el diseño inteligente de antibióticos eficaces contra cepas bacterianas farmacoresistentes. Se espera probar computacionalmente una gran cantidad de nuevas moléculas tomando como punto de partida tanto la metodología creada como las 4 moléculas existentes de carbapenémicos.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Primer paso: Optimización geométrica de carbapenémicos

Al comparar los picos resultantes de los modelos de simulación (líneas negras) contra los picos característicos de las espectroscopias reportadas de manera experimental (líneas rojas) observamos una diferencia o un error que va desde 0.14 hasta 0.96 eV en la **Figura 4**. El mayor nivel de precisión química se encuentra a 0.1 eV. Uno de los factores por los que los resultados de simulación no se acercan a este nivel de precisión, podría estar relacionado con la energía vibracional debido al aumento de temperatura, ósea la liberación de fonones durante la minimización energética. Ajustar la temperatura en la que se lleva a cabo las optimizaciones geométricas y las UV-VIS podría resultar en un nivel de error menor. El error menor a 0.1 eV es un valor deseado que no se logró, pero estos resultados siguen siendo precisos y no invalidan los resultados ni las conclusiones que se pueden hacer a partir de ellos.

7.2 Segundo paso: Optimización geométrica de la enzima β -lactamasa

La importancia de contar con un modelo preciso de la enzima es la orientación de los sitios activos. En la enzima experimental se observa que los sitios activos quedan orientados en una misma sección formando un bolsillo catalítico. Los softwares Gromacs y Alphafold2, llevan a cabo el plegamiento de la proteína con distintos parámetros, uno con mecánica molecular y el otro con inteligencia artificial, esta diferencia puede resultar en sitios activos orientados en conformaciones distintas, y por lo tanto acoplamiento molecular de menor precisión. Alphafold logró una similitud de 0.52 Å.

7.3 Tercer paso: Ensamblajes del acoplamiento molecular

Al observar la **Figura 7** es notable que todos los enlaces formados se tratan de puentes de hidrógeno, átomos de hidrógeno unidos a un oxígeno o a un nitrógeno. Tomando en cuenta los ensamblajes formados de la enzima experimental y de la enzima de inteligencia artificial se tienen en total 8 complejos antibiótico-enzima. Llevar a cabo el experimento de acoplamiento de manera

experimental sólo nos permitiría conocer los enlaces formados. A partir de las técnicas de química computacional podemos conocer las distancias y energías de cada enlace así como la energía del ensamble completo y orientación del fármaco en el bolsillo catalítico. Al observar los aminoácidos que formaron enlaces en los ensambles de ambas enzimas, se resalta que los sitios activos reportados de manera experimental coinciden con los modelos de simulación. Estas son la asparagina 132 las treoninas 237 y 235 y las serinas 130 y 70. Según lo reportado por estudios experimentales, cada sitio activo lleva a cabo un papel fundamental en el mecanismo de hidrólisis cómo es la orientación del antibiótico en el bolsillo catalítico y el ataque hacia el enlace nitrógeno carbono. Al comparar cada ensamble de la enzima experimental con respecto a la encima de inteligencia artificial, Se observa que el medible energía del ensamble para ambos grupos permanecen dentro de un rango de 0.23 a 0.88 kcal de aproximación para los acoplamientos con inteligencia artificial.

VIII. CONCLUSIONES

Los procesos metodológicos de química computacional diseñados para llevar a cabo los experimentos por Force Field, DFT y Docking reproducen los medibles reportados por modelos experimentales con una aproximación dentro de un rango de 0.52-0.82 Å en RMSD y de 0.14-0.96 eV en UV-VIS.

Se obtuvieron las estructuras de mínima energía para las moléculas de antibióticos carbapenémicos (DFT) y de β -lactamasas (Force field e IA). La precisión obtenida valida los resultados estructurales y de interacciones, derivados de ellas.

La descripción fisicoquímica por medio de experimentos computacionales de la interacción carbapenémico-KPC2 permitió corroborar la mayoría de los sitios activos reportados experimentalmente. Con la información de sitios activos adicionales se puede indagar en los resultados experimentales nuevamente.

Al comprender las interacciones clave en cada ensamble, se puede apoyar con alternativas en el diseño inteligente de nuevos antibióticos que sean eficaces contra cepas bacterianas fármaco-resistentes.

IX. REFERENCIAS

1. Errecalde O J. Uso De Antimicrobianos En Animales De Consumo (incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública) [Internet]. 2004. 2004. 2–4 p. Available from: <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm#Contents>
2. Ejecutivo C. Seguimiento de las reuniones de alto nivel de la Asamblea General de las Naciones Unidas sobre temas relacionados con la salud: rResistencia a los antimicrobianos: informe del Director General. 2018;1–12.
3. Schenone M, Wagner BK, Clemons PA, Program B. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol*. 2017;9(4):232–40.
4. Alves MJ, Froufe HJC, Costa AFT, Santos AF, Oliveira LG, Osório SRM, et al. Docking studies in target proteins involved in antibacterial action mechanisms: Extending the knowledge on standard antibiotics to antimicrobial mushroom compounds. *Molecules*. 2014;19(2):1672–84.
5. Darwin C. 1861_OriginNY_F382.pdf. 1859.
6. Luria, S. E. Delbruck M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*. 1943;28(6):491–511.
7. Fariña N. Resistencia Bacteriana: un Problema de Salud Pública Mundial de Difícil Solución. In: *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 2016. p. 4–5.
8. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: Consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2011;30(6):519–28.
9. Torres C, Zarazaga M. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit*. 2002;16(2):109–12.
10. Robledo Zacarías VH, Velázquez Machuca MA, Montañez Soto JL, Pimentel Equihua JL, Vallejo Cardona AA, López Calvillo MD, et al. Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de Morelia, Michoacán, México. *Rev Int Contam Ambient*. 2017;33(2):221–35.
11. Fernández O, Grau S. Prescripción inapropiada de antibióticos. *Boletín de Prevención de Errores de Medicación de Cataluña* [Internet]. 2011;14:1–10. Available from: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/2532/butll_prev_errors_medicacio_catalunya_2016_14_03_cas.pdf?sequence=2
12. Wilke MH. Multiresistant bacteria and current therapy - The economical side of the story. *Eur J Med Res*. 2010;15(12):571–6.
13. Gilbert DN, Guidos RJ, Boucher HW, Talbot GH, Spellberg B, Edwards JE, et al. The 10 X 20 initiative: Pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis*. 2010;50(8):1081–3.
14. Khan A, Rivas LM, Spencer M, Martinez R, Lam M, Rojas P, et al. A multicenter study to evaluate ceftaroline breakpoints: Performance in an area with high prevalence of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 5 lineage. *J Clin Microbiol*. 2019;57(9).
15. Organización Panamericana de la Salud. Tratamiento de las enfermedades infecciosas. [Internet]. 8th ed. Vol. 112, *La Semana médica*. Washington, D.C.; 396 p. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51695/9789275321133_spa.pdf?sequence=9
16. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha Técnica: Xydalba [Internet]. 2015. p. 29. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/114986001/FT_114986001.html#5-propiedades-farmacol-gicas

17. Zhanel GG, Love R, Adam H, Golden A, Zelenitsky S, Schweizer F, et al. Tedizolid: A novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Drugs*. 2015;75(3):253–70.
18. Mendes RE, Woosley LN, Farrell DJ, Sader HS, Jonesa RN. Oritavancin activity against vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant enterococci with molecularly characterized glycopeptide resistance genes recovered from bacteremic patients, 2009-2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1639–42.
19. Corey GR, Kabler H, Mehra P, Gupta S, Overcash JS, Porwal A, et al. Single-Dose Oritavancin in the Treatment of Acute Bacterial Skin Infections. *N Engl J Med*. 2014;370(23):2180–90.
20. Zhanel GG, Chung P, Adam H, Zelenitsky S, Denisuik A, Schweizer F, et al. Ceftolozane/tazobactam: A novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*. 2014;74(1):31–51.
21. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs* [Internet]. 2018;78(6):675–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0902-x>
22. Kocsis B, Gulyás D, Szabó D. Delafloxacin, Finafloxacin, and Zabofloxacin: Novel Fluoroquinolones in the Antibiotic Pipeline. *Antibiotics*. 2021;10(1506):12.
23. Bhowmick T, Weinstein MP. Microbiology of Meropenem-Vaborbactam: A Novel Carbapenem Beta-Lactamase Inhibitor Combination for Carbapenem-Resistant Enterobacterales Infections. *Infect Dis Ther* [Internet]. 2020;9(4):757–67. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00350-1>
24. Patel TS, Pogue JM, Mills JP, Kaye KS. Meropenem-vaborbactam: A new weapon in the war against infections due to resistant Gram-negative bacteria. *Future Microbiol*. 2018;13(9):971–83.
25. Clark JA, Burgess DS. Plazomicin: a new aminoglycoside in the fight against antimicrobial resistance. *Ther Adv Infect Dis*. 2020;7(1):15.
26. Saravolatz LD, Stein GE. Plazomicin: A New Aminoglycoside. *Clin Infect Dis*. 2020;70(4):704–9.
27. Heaney M, Mahoney M V., Gallagher JC. Eravacycline: The Tetracyclines Strike Back. *Ann Pharmacother*. 2019;53(11):1124–35.
28. Gallagher JC. Omadacycline: A Modernized Tetracycline. *Clin Infect Dis*. 2019;69:S1–5.
29. El-Lababidi RM, Rizk JG. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin. *Ann Pharmacother*. 2020;54(12):1215–31.
30. Campanella TA, Gallagher JC. A clinical review and critical evaluation of imipenem-relebactam: Evidence to date. *Infect Drug Resist*. 2020;13:4297–308.
31. Mendoza Brito LM. Costos económicos directos de la resistencia bacteriana en la atención de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Fernando Troconis de Santa Marta 2010-2011. [Internet]. Universidad del Norte; 2014. Available from: [https://manglar.uninorte.edu.co/bitstream/handle/10584/10029/Mendoza Brito.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://manglar.uninorte.edu.co/bitstream/handle/10584/10029/Mendoza_Brito.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
32. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. 2014.
33. Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos.
34. World Health Organization. AMR action fund [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-opening-remarks-at-the-amr-action-fund-launch>
35. Centers for Disease Control and Prevention. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES [Internet]. 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>

36. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Informe anual 2015. Red Hosp Vigil Epidemiológica [Internet]. 2016;1:1–61. Available from: <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015>
37. Rizo AJN. Seguridad del paciente en odontología. *Conamed-Ops*. 2018;3–6.
38. Diario Oficial de la Federación. ESTRATEGIA NACIONAL DE ACCIÓN CONTRA LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. 2018.
39. Tello A, Austin B, Telfer TC. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environ Health Perspect*. 2012;120(8):1100–6.
40. Farmacología y Terapéutica en Odontología. 2nd ed. Espinosa Meléndez. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2012. 448 p.
41. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in enterobacteriaceae. *Infect Drug Resist*. 2019;12:965–75.
42. Daza Pérez R. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sist Nac Salud* [Internet]. 1998;22(3):57–67. Available from: <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
43. Jacoby, George A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Suppl 2):120–6.
44. Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (B Aires)*. 2011;47(3):137–46.
45. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(4):648–56.
46. Marchetti M, Errecalde J, Mestorino N. Dirección para correspondencia: Resistencia bacteriana a Los antimicrobianos ocasionada por bombas de Eflujo. Impacto en la Multirresistencia. *AnAlectA Vet*. 2011;40(312):40–53.
47. López-Pueyo MJ, Barcenilla-Gaite F, Amaya-Villar R, Garnacho-Montero J. Multirresistencia antibiotica en unidades de críticos. *Med Intensiva*. 2011;35(1):41–53.
48. World Health Organization. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017. p. 2. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
49. Aguado JM. Papel de los nuevos carbapenémicos en la infección intraabdominal nosocomial. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010;28(SUPPL. 2):65–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70032-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70032-X)
50. Fresnadillo Martínez MJ, García García MI, García Sánchez E, García Sánchez JE. Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010;28(SUPPL. 2):53–64. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70031-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70031-8)
51. Rivero Arias E, Herrera Torres ML, Larredondo Muguercia H, Lozano Valdés D, León Pérez D. Carbapenémicos y monobactámicos. 1998;8(1):66–70.
52. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11(4):529–44.
53. Javier Zepeda C. Resistencia de las Bacterias a los Antibióticos Resistance of Bacteria to Antibiotics. *Rev Med Hondur* [Internet]. 2015;66(2). Available from: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/1998/pdf/Vol66-2-1998-8.pdf>
54. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:455–78.

55. García Cedrón D, Saravia Cueva V, Alcalde Mosqueira J. Bacterias productoras de β -lactamasas clásicas y de espectro ampliado aislados de pacientes con infecciones del tracto urinario del Hospital IV "Víctor Lazarte Echegaray" EsSalud – Trujillo, 2009. *Sciéndo*. 2017;18(1):12–22.
56. Hernández-Gómez C, Blanco VM, Motoa G, Correa A, Maya JJ, de la Cadena E, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomedica*. 2014;34(SUPPL.1):91–100.
57. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012;73(4):354–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
58. Souli M, Kontopidou F V., Koratzanis E, Antoniadou A, Giannitsioti E, Evangelopoulou P, et al. In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram-negative and gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3166–9.
59. Jones RN, Huynh HK, Biedenbach DJ, Fritsche TR, Sader HS. Doripenem (S-4661), a novel carbapenem: Comparative activity against contemporary pathogens including bactericidal action and preliminary in vitro methods evaluations. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(1):144–54.
60. Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Gómez M. Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: Estudio VIRA 2004. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(9):517–25.
61. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases [1]. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):1050–1.
62. Calvo J, Cantón R, Fernandez F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos, SEIMC [Internet]. *Seimc*. 2011. 54 p. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
63. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(10):2269–75.
64. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):657–86.
65. Moreno-Monge KM. Terapéutica Médica Carbapenémicos : Tipos Y Mecanismos De Resistencia. *Rev Médica Costa Rica y Centroamérica LXX* [Internet]. 2013;608(608):599–605. Available from: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>
66. Willems H, De Cesco S, Svensson F. Computational Chemistry on a Budget: Supporting Drug Discovery with Limited Resources. *J Med Chem*. 2020;63(18):10158–69.
67. Lewars EG. Computational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. 2011. 1–664 p.
68. Ashworth SH. *Molecular Quantum Mechanics*, 5th edn, by Peter Atkins and Ronald Friedman. *Contemp Phys*. 2012;53(4):372–3.
69. Deriabina A, Ledesma JO, González E, Herrera JN, Poltev V. Desarrollo de un campo de fuerzas de mecánica molecular para la interacción de Na⁺ con agua. *Rev Mex Fis*. 2006;52(1):74–9.
70. Senent ML. El rol fundamental de los métodos ab initio en la Astroquímica. *An Quim*. 2009;105(4):257–64.
71. Gonzalez RN, Serrato AR. Cálculos ab initio de la estructura electrónica del superconductor MgB₂. *Rev Mex Fis*. 2002;48(5):391–6.

72. Angulo-Cornejo JR, Tovar CF. UTILIZACIÓN DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL: MÉTODO SEMIEMPÍRICO PM3, PARA ELUCIDAR LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO BIS (1,5-DIFENIL-1,2,4-TRIAZOL-3-TIONATO) PLOMO (II) (Pb(DTT)). *Rev la Soc Química del Perú*. 2014;80(2):136–43.
73. Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*. 1964;136(3B):864–70.
74. Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch Pharm Res*. 2015;38(9):1686–701.
75. Medina-Franco JL, Fernán-Dezde Gortari E, Jesús Naveja J. Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educ Quim*. 2015;26(3):180–6.
76. Gohlke H, Klebe G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew Chemie - Int Ed*. 2002;41(15):2644–76.
77. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE. *A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions*. 1982;
78. Adcock SA, McCammon JA. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev*. 2006;106(5):1589–615.
79. Fonseca F, Chudyk EI, Van Der Kamp MW, Correia A, Mulholland AJ, Spencer J. The basis for carbapenem hydrolysis by class a β -lactamases: A combined investigation using crystallography and simulations. *J Am Chem Soc*. 2012;134(44):18275–85.
80. Ardèvol A. Métodos de simulación QM / MM y de mecánica estadística : una aproximación teórica a la biología molecular. *Real Soc Española Química*. 2013;109(4):268–75.
81. Galdadas I, Lovera S, Pérez-Hernández G, Barnes MD, Healy J, Afsharikhho H, et al. Defining the architecture of KPC-2 Carbapenemase: identifying allosteric networks to fight antibiotics resistance. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–13.
82. Smith CA, Tiago Antunes N, Stewart NK, Toth M, Kumarasiri M, Chang M, et al. Structural Basis for Carbapenemase Activity of the OXA-23 β Lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *Chem Biol*. 2013;20(9):1107–15.
83. Hujer AM, Kania M, Gerken T, Anderson VE, Buynak JD, Ge X, et al. Structure-Activity Relationships of Different β -Lactam Antibiotics against a Soluble Form of. *Society*. 2005;49(2):612–8.
84. Bolton EE, Chen J, Kim S, Han L, He S, Shi W, et al. PubChem3D: A new resource for scientists. *J Cheminform*. 2011;3(9):1–15.
85. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235–42.
86. Cramer CJ. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. 2nd Editio. Wiley; 2004. 624 p.
87. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman, J. R. Scalmani G, et al. Gaussian 16, Revision C.09 [Internet]. Wallingford CT; 2016. Available from: <https://gaussian.com/>
88. Rackers JA, Wang Z, Lu C, Laury ML, Lagardère L, Schnieders MJ, et al. Tinker 8: Software Tools for Molecular Design. *J Chem Theory Comput*. 2018;14(10):5273–89.
89. Chiodo S, Russo N, Sicilia E. LANL2DZ basis sets recontracted in the framework of density functional theory. *J Chem Phys*. 2006;125(10).
90. Zhao Y, Truhlar DG. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. *Theor Chem Acc*. 2008;120(1–3):215–41.
91. Blum V, Gehrke R, Hanke F, Havu P, Havu V, Ren X, et al. Ab initio molecular simulations with numeric

atom-centered orbitals. *Comput Phys Commun* [Internet]. 2009;180(11):2175–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpc.2009.06.022>

92. Lindahl, Abraham, Hess, Spoel van der. GROMACS Documentation. GROMACS 20213 Man. 2021;1–623.
93. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc.* 1996;118(45):11225–36.