

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo



Escuela Superior de Apan

INGENIERÍA EN BIOCIENCIAS

**Resistencia cruzada y sensibilidad colateral a
antibióticos en clonas de *Escherichia coli* MG1655
evolucionadas bajo presión de selección fuerte a
ampicilina**

Tesis

Para obtener el título de la Licenciatura en Ingeniería en Biociencias

PRESENTA

María José Pérez Montes

Directores:

Dra. Deyanira Pérez Morales, Dr. Martín Peralta Gil

Apan, Hidalgo, junio de 2026

El presente trabajo de investigación se realizó en el Programa de Biología de Sistemas del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Morelos, bajo la supervisión de la Dra. Deyanira Pérez Morales y del Dr. Rafael Peña Miller y estuvo financiado por la beca Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)-UNAM, con clave IN215822 y folio 117723.

María José Pérez Montes P.D.L.I.B.C.

P R E S E N T E

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias, **María José Pérez Montes (421122)**, a quien le presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Resistencia cruzada y sensibilidad colateral a antibióticos en clonas de *Escherichia coli* MG1655 evolucionadas bajo presión de selección fuerte a ampicilina”**, después de la revisión, ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dra. Deyanira Pérez Morales

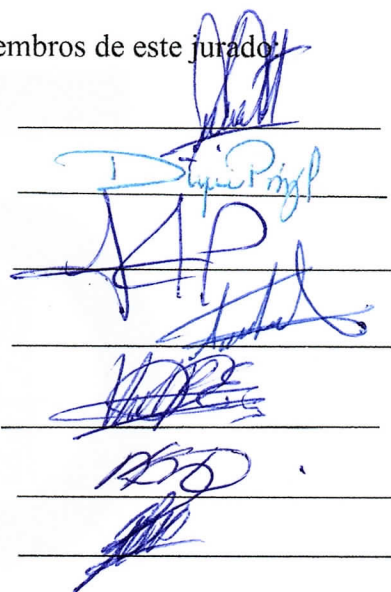
PRIMER VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SEGUNDO VOCAL: Dra. Teresa Romero Cortes

TERCER VOCAL: Dr. Víctor Hugo Pérez España

SUPLENTE 1: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

SUPLENTE 2: Dr. Alejandro Morales Peñaloza



ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Chimalpa, Apan, Hgo., México a 12 de junio de 2026.



Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros
Coordinador de Ingeniería en Biociencias





Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Asunto: Líder del laboratorio donde se desarrolló el proyecto de investigación.

**A quien corresponda
P R E S E N T E**

Por medio de la presente, se hace constar la valiosa contribución del **Dr. Rafael Peña Miller**, investigador titular del Programa de Biología de Sistemas del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, en el desarrollo del proyecto de investigación titulado **“Resistencia cruzada y sensibilidad colateral a antibióticos en clonas de *Escherichia coli* MG1655 evolucionadas bajo presión de selección fuerte a ampicilina”**, realizado por la estudiante **María José Pérez Montes** como requisito para obtener el grado de **Licenciada en Ingeniería en Biociencias** por la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La participación del Dr. Rafael Peña Miller fue fundamental para la ejecución del proyecto, al haber concebido la propuesta científica que dio origen a esta investigación dentro de las líneas de trabajo de su grupo de investigación. En su calidad de responsable del laboratorio donde se desarrolló el proyecto, proporcionó las clonas bacterianas evolucionadas, así como el acceso a la infraestructura especializada, equipamiento y recursos necesarios para la realización de los experimentos. Asimismo, su asesoría científica permitió fortalecer la planeación experimental, el análisis de resultados y la interpretación de los hallazgos.

Gracias a su colaboración, fue posible garantizar el rigor metodológico, la calidad de los datos generados y la solidez científica del trabajo, lo que contribuyó de manera significativa al cumplimiento de los objetivos planteados y a la formación académica de la estudiante.

Se extiende la presente para los fines académicos y administrativos que al interesado convengan.

ATENTAMENTE

AMOR, ORDEN Y PROGRESO
Apan, Hidalgo; 16 de junio de 2026

M.C.E. Enrique Espinosa Aquino
Director de la Escuela Superior de Apan



“Amor, Orden y Progreso”



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43000
Teléfono: 7717172000 Ext. 50900
esap@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis, el Dr. Rafael Peña Miller y la Dra. Deyanira Pérez Morales por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, instruirme y apoyarme al desarrollo de este trabajo de investigación, por su paciencia y pasión por su trabajo.

A mi asesor, el Dr. Martín Peralta Gil, por su dedicación y constante búsqueda del bien para sus alumnos, por ser mi inspiración y motivación para la conclusión de la ingeniería, por todo el conocimiento compartido y por la maravillosa persona que es.

DEDICATORIA

A Natalia, mi hermana, por ser el soporte de mi vida.

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos representa un importante problema de salud pública debido a la capacidad de las bacterias de adaptarse a la presión selectiva ejercida por estos fármacos y de desarrollar mecanismos que reducen su eficacia. En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la historia evolutiva bajo presión fuerte de ampicilina sobre la competencia bacteriana y los perfiles de resistencia cruzada y sensibilidad colateral en clones de *Escherichia coli* MG1655, con el fin de determinar su influencia en la adaptación a otros antibióticos.

Para ello, se analizaron cuatro clones de *E. coli* MG1655 evolucionadas bajo presión fuerte de ampicilina (IC90), pertenecientes a fases evolutivas tempranas (D3 y D8) y tardías (MP51 y P59). Se determinaron los valores de MIC e IC50 de amoxicilina, cefotaxima, piperacilina y gentamicina en las cepas de referencia WT y WT-GFP, validando el uso de esta última al no mostrar costos de fitness significativos. Posteriormente, se realizaron ensayos de competencia entre las clones evolucionadas y la cepa WT-GFP en presencia de cada antibiótico, y su desempeño competitivo se evaluó mediante citometría de flujo a las 0, 3 y 6 horas de incubación.

Los resultados mostraron que las clones de fase temprana presentaron una ventaja competitiva frente a piperacilina y gentamicina, mientras que las de fase tardía presentaron una mayor capacidad adaptativa al desplazar a la cepa de referencia, incluso en presencia de cefotaxima. Ninguna de las clones mostró ventaja competitiva frente a la amoxicilina.

Se concluye que la evolución bajo presión fuerte de ampicilina favorece la acumulación de adaptaciones que modifican la respuesta bacteriana frente a otros antibióticos. Las clones de fases avanzadas desarrollaron una mayor capacidad competitiva y perfiles compatibles con una resistencia cruzada más amplia, lo que evidencia la influencia de la historia evolutiva en la adaptación bacteriana.

Palabras clave: *Escherichia coli*, evolución experimental, fitness competitivo, resistencia cruzada, citometría de flujo.

ABSTRACT

Antibiotic resistance represents a major public health challenge due to bacteria's ability to adapt to the selective pressure exerted by these drugs and to develop mechanisms that reduce their effectiveness. In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of evolutionary history under strong ampicillin pressure on bacterial competition and on patterns of cross-resistance and collateral sensitivity in *Escherichia coli* MG1655 clones, to determine their influence on adaptation to other antibiotics.

To achieve this, four *E. coli* MG1655 clones evolved under strong ampicillin pressure (IC₉₀) were analyzed, including two early-stage clones (D3 and D8) and two late-stage clones (MP51 and P59). MIC and IC₅₀ values for amoxicillin, cefotaxime, piperacillin, and gentamicin were determined in the WT and WT-GFP reference strains, thereby validating the use of the latter, which showed no significant fitness costs. Competition assays were subsequently performed between the evolved clones and the WT-GFP strain in the presence of each antibiotic, and their competitive performance was assessed by flow cytometry at 0, 3, and 6 hours of incubation.

The results showed that early-stage clones displayed a competitive advantage in the presence of piperacillin and gentamicin, whereas late-stage clones exhibited greater adaptive capacity, outcompeting the reference strain even in the presence of cefotaxime. None of the clones showed a competitive advantage in the presence of amoxicillin.

These findings indicate that evolution under strong ampicillin pressure promotes the accumulation of adaptations that alter bacterial responses to other antibiotics. Late-stage clones developed greater competitive capacity and profiles consistent with broader cross-resistance, highlighting the important role of evolutionary history in bacterial adaptation.

Keywords: *Escherichia coli*, experimental evolution, competitive fitness, cross-resistance, flow cytometry.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Antibióticos	1
1.1.1.	Mecanismos de acción.....	2
1.2.	Resistencia a antibióticos.....	4
1.2.1.	Tipos de resistencia bacteriana.....	5
1.2.2.	Crisis global.....	6
1.2.3.	Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos	6
1.3.	Respuesta evolutiva de las bacterias frente a antibióticos	9
1.3.1.	Evolución bacteriana y adaptación.....	9
1.3.2.	Fitness bacteriano y costos adaptativos.....	11
1.3.3.	Resistencia cruzada y sensibilidad colateral.....	12
2.	ANTECEDENTES.....	14
3.	JUSTIFICACIÓN	16
4.	HIPÓTESIS.....	16
5.	OBJETIVOS	17
5.1.	Objetivo general.....	17
5.2.	Objetivos específicos	17
6.	METODOLOGÍA	18
6.1.	Cepas bacterianas.....	19
6.2.	Medios de cultivo	21
6.3.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	22
6.4.	Determinación de la concentración inhibitoria media (IC50).....	23
6.5.	Experimentos de competencia	24
6.6.	Determinación del índice de competencia	25
7.	RESULTADOS.....	26
7.1.	Determinación de MIC e IC50	26
7.2.	Validación de competencia bacteriana mediante citometría de flujo	28
7.3.	Cuantificación de poblaciones GFP positivas	29
7.4.	Comparación entre fases evolutivas	35
7.5.	Resistencia cruzada y sensibilidad colateral	36
8.	DISCUSIÓN	39
9.	CONCLUSIONES	42
10.	REFERENCIAS.....	43

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias han habitado la Tierra durante miles de millones de años y constituyen uno de los grupos de organismos más abundantes y diversos del planeta. Debido a su amplia capacidad adaptativa y diversidad metabólica, se encuentran distribuidas en prácticamente todos los ambientes, desde ecosistemas extremos, hasta residir en otros organismos, incluido el ser humano. La mayoría de las bacterias son completamente inofensivas e incluso desempeñan funciones esenciales en múltiples procesos biológicos, ecológicos y biogeoquímicos (Benítez-Colio y Osuna-Martínez, 2024).

Sin embargo, existen algunas bacterias capaces de causar enfermedades en distintos huéspedes y se clasifican como patógenas. Dichas bacterias cuentan con diversos mecanismos que les permiten colonizar al huésped, evadir las defensas del sistema inmunológico y establecer infecciones. Uno de los métodos más utilizados para combatir bacterias patógenas es la administración de antibióticos.

1.1. Antibióticos

Los antibióticos son compuestos que inhiben el crecimiento o provocan la muerte de las bacterias mediante su interacción con objetivos específicos de la célula bacteriana; pueden ser de origen natural, semisintéticos o sintéticos y se utilizan para tratar diversas infecciones causadas por bacterias (Andersson y Hughes, 2017).

Debido al impacto que las enfermedades causadas por bacterias han tenido en la salud humana, el descubrimiento y desarrollo de antibióticos representaron uno de los avances más importantes de la medicina moderna, ya que permitieron el tratamiento y el control efectivos de numerosas infecciones bacterianas, contribuyendo significativamente a la disminución de las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a dichas enfermedades durante el siglo XX (Aminov, 2009).

1.1.1. Mecanismos de acción

Los antibióticos pueden clasificarse con base en distintos criterios, como su estructura química, su espectro de actividad o su mecanismo de acción. Entre estas clasificaciones, una de las más utilizadas es la que se basa en el mecanismo mediante el cual inhiben o eliminan a las bacterias. Los principales mecanismos de acción de los antibióticos se describen a continuación.

1.1.1.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular

Las bacterias cuentan con una pared celular que las recubre y está formada por peptidoglicano, una capa compuesta por largas cadenas de azúcares. Algunos antibióticos, como los beta-lactámicos y los glucopéptidos, interfieren con la síntesis de la pared celular al inhibir su formación (Kapoor *et al.*, 2017).

Dentro del grupo de los beta-lactámicos se encuentran las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos, entre otros. Son antibióticos que se caracterizan por tener en su estructura un anillo beta-lactámico y actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana en su última etapa, que corresponde a la síntesis del peptidoglicano, y también activando la autolisina bacteriana endógena, que destruye el peptidoglicano; son de amplio espectro y ejercen su acción en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y espiroquetas (Seija y Vignoli, 2006).

Los beta-lactámicos conforman a la clase de antibióticos más numerosa y también la más utilizada en la clínica (Suárez y Gudiol, 2009). Tienen un efecto bactericida parcial, puesto que solo actúan en fase exponencial de crecimiento y son dependientes del tiempo, su efecto bactericida máximo ocurre a concentraciones del antibiótico libre 4-5 veces por encima de la concentración mínima inhibitoria o MIC, por sus siglas en inglés (*Minimum Inhibitory Concentration*), por lo que es vital respetar los intervalos entre las dosis. Provocan mayor respuesta inflamatoria debido a que inducen mayor liberación de endotoxina derivada de su capacidad bactericida rápida (Gómez *et al.*, 2015).

1.1.1.2. Inhibición de la síntesis de proteínas

Los antibióticos que poseen este mecanismo de acción actúan selectivamente sobre el ribosoma bacteriano de 70S. Una clase de antibiótico

que ejerce este mecanismo de acción son los aminoglucósidos, los cuales se unen de manera irreversible a la subunidad ribosomal 30S, inhibiendo la síntesis de proteínas y provocando la lisis celular. Los fármacos de este grupo están estructurados por 3 aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol; se obtienen de *Actinomycetes* del suelo (Etebu y Ariekpar, 2016). Son bactericidas de amplio espectro, con actividad contra bacilos aerobios Gram-negativos y ciertas bacterias Gram-positivas (Peterson, 2008). Presentan un efecto bactericida dependiente de la concentración, intenso y de rápida aparición, con efecto postantibiótico. En la clínica, generalmente se administran en combinación con un beta-lactámico, con el objetivo de lograr sinergia (Sermet y Alfandari, 2021).

El aminoglucósido más antiguo que se conoce es la estreptomicina, el cual ha sido utilizada ampliamente para el tratamiento de la peste bubónica, tularemia y tuberculosis (Talaro y Chess, 2008). Con la investigación posterior se descubrieron otros aminoglucósidos, como la neomicina, la gentamicina, la amikacina y la tobramicina. Otros inhibidores de la subunidad 30S son las tetraciclinas.

Por otra parte, dentro de los inhibidores de la subunidad ribosomal 50S se encuentran el cloranfenicol y los macrólidos, que tienen en su estructura un anillo de lactona cacrocíclica (Upmanyu y Malviya, 2020, Cobos-Trigueros *et al.* 2009), así como las oxazolidinonas, que tienen un mecanismo de acción único al unirse cerca del sitio P de la subunidad 50S, evitando que se una el ARN de transferencia iniciador (Kadam, 1994).

1.1.1.3. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Un ejemplo de antibióticos que presentan esta clase de mecanismo de acción son las quinolonas, compuestos sintéticos y bactericidas que inhiben la síntesis de ADN provocando roturas de doble cadena mediante la interferencia con la topoisomerasa de tipo II, la ADN girasa y la topoisomerasa de tipo IV durante la replicación (Kapoor *et al.*, 2017, Singh *et al.*, 2017). Realizan su efecto citotóxico al penetrar la membrana bacteriana y alcanzar la diana celular, la ADN girasa o la topoisomerasa IV, lo que induce la muerte celular. Se agrupan por generaciones según su época de aparición y su espectro bacteriano. Las quinolonas de 1ª generación son efectivas frente a bacterias Gram-negativas,

con excepción de algunos bacilos no fermentadores; las de 2ª generación son activas también frente a algunos patógenos atípicos. Las de 3ª y 4ª generación conservan su efectividad frente a Gram-negativos y micobacterias, pero son más eficaces frente a Gram-positivos, anaerobios y patógenos atípicos (Cué-Brugueras *et al.*, 2005).

1.1.1.4. Inhibición de la síntesis de ácido fólico

Existen fármacos que inhiben el metabolismo del ácido fólico, bloqueando así pasos clave en la producción de un cofactor necesario para la síntesis de nucleótidos. Los ejemplos de fármacos pertenecientes a esta clase son las sulfonamidas y trimetoprima (Kapoor *et al.*, 2017, Shaikh *et al.* 2015).

1.1.1.5. Desorganización de la membrana celular

Se trata de compuestos con la capacidad de alterar la membrana citoplasmática, aumentando la permeabilidad que permite la fuga del contenido bacteriano, entre ellos los iones de potasio, elementos vitales para la viabilidad bacteriana, o permitiendo la entrada de otros elementos que en altas concentraciones alteran el metabolismo normal. Estos fármacos actúan como bactericidas y pueden ser tóxicos también para las células humanas, ejemplos de ellos son la polimixina y gramicidina (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

1.2. Resistencia a antibióticos

A pesar del gran avance que supuso el descubrimiento de los antibióticos, su uso extensivo y, en muchos casos, inadecuado, ha favorecido la aparición y la propagación de bacterias resistentes.

Otros factores que han contribuido al incremento de la resistencia a los antibióticos incluyen la disminución del desarrollo de nuevos antimicrobianos, el uso inadecuado de estos compuestos y diversas limitaciones en los sistemas de atención médica, como la prescripción empírica de antibióticos sin realizar pruebas diagnósticas previas. Asimismo, distintos autores han señalado que el modelo económico predominante en la industria farmacéutica ha reducido el interés por el desarrollo de nuevos antibióticos debido a su baja rentabilidad frente a otros medicamentos de uso crónico (Akram *et al.*, 2022).

La resistencia a antibióticos se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir a concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras bacterias de la misma especie (Alós, 2015). En este contexto, una bacteria susceptible es aquella cuyo crecimiento puede inhibirse con concentraciones habituales del antibiótico, lo que permite controlar la infección mediante un tratamiento convencional. Por otro lado, una bacteria presenta una susceptibilidad intermedia cuando su respuesta frente al antibiótico es variable, de modo que el tratamiento puede ser efectivo únicamente bajo ciertas condiciones, como una mayor concentración del antibiótico en el sitio de infección o el uso de dosis más elevadas. Se considera que una bacteria es resistente cuando no puede inhibirse ni eliminarse por concentraciones de un antibiótico que normalmente serían efectivas para detener el crecimiento de bacterias susceptibles (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015).

Una bacteria se denomina multirresistente si presenta resistencia a al menos un fármaco de tres o más clases distintas de antibióticos (Camacho-Silvas *et al.*, 2021).

1.2.1. Tipos de resistencia bacteriana

La resistencia a los antibióticos puede clasificarse en intrínseca, adquirida o adaptativa. La resistencia intrínseca es aquella que resulta de propiedades específicas del microorganismo, es decir que es una característica natural de las especies bacterianas, resultado de características estructurales o funcionales inherentes, y su aparición no depende de una exposición previa a fármacos (Blair *et al.*, 2014). Por su parte, la resistencia adquirida es aquella que se adquiere por mutaciones genéticas y, más comúnmente, mediante la transferencia horizontal de genes entre especies bacterianas, lo que permite adquirirla mediante conjugación, transformación o transducción. Por otro lado, la resistencia adaptativa se define como la pérdida de la sensibilidad a los antibióticos utilizados, la cual surge debido a la presión ambiental ejercida por estos, lo que produce respuestas celulares dinámicas al estrés antibiótico (Tavares-Carreón *et al.*, 2023).

1.2.2. Crisis global

Actualmente, la resistencia antimicrobiana representa uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel mundial debido al incremento sostenido de cepas resistentes y a la disminución del desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos eficaces (Davies y Davies, 2010; Ardal *et al.*, 2019). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia antimicrobiana compromete la capacidad de tratar infecciones comunes y amenaza diversos procedimientos médicos que dependen del uso eficaz de antibióticos, incluidos cirugías, trasplantes y tratamientos oncológicos (WHO, 2023).

La OMS ha situado la resistencia a los antimicrobianos entre las 10 principales amenazas para la salud pública. Esto señala una necesidad urgente de una mejor gestión del consumo de antibióticos; dicho problema ha cobrado gran importancia debido al uso indiscriminado de los antibióticos no solo en la atención médica, sino también en el uso veterinario, la acuicultura y la agricultura (Elshobary *et al.*, 2025).

En 2019, la resistencia a antibióticos se relacionó directamente con 1.2 millones de muertes en todo el mundo, y se estima que provocará al menos 10 millones de muertes para el año 2050 y supondrá un costo de alrededor de 100 mil millones de dólares en todo el mundo (Tarín-Pelló *et al.*, 2022, Cook y Wright, 2022).

En la reciente crisis mundial por COVID-19, las prácticas generalizadas de adopción de antibióticos de amplio espectro como tratamiento para la enfermedad aumentaron los niveles de resistencia, ya que, según informes, solo entre el 7% y 8% de los pacientes diagnosticados con COVID-19 padecían alguna infección bacteriana, sin embargo, la ingesta de antibióticos en todo el mundo se elevó en un 71.9% debido a su uso excesivo e innecesario (Akram *et al.*, 2022).

1.2.3. Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos

Existen diversos mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos; además, una misma bacteria puede tener más de un mecanismo simultáneamente (Fig. 1 y Tabla 1).

1.2.3.1. Modificación del sitio blanco del antibiótico

Cambios estructurales en la diana que impiden que el antibiótico se una de forma eficaz, pero permiten que la diana mantenga su función normal en la célula. La mayoría de las modificaciones se producen en las subunidades ribosómicas (Baweja *et al.*, 2025).

1.2.3.2. Expulsión activa del antibiótico

Las bombas de eflujo son proteínas vitales relacionadas con la resistencia a antibióticos que transportan muchos antibióticos del interior de la célula hacia el exterior, cuando estas se sobreexpresan, pueden proporcionarle a la bacteria altos niveles de resistencia a antibióticos (Blair *et al.*, 2014).

Se han descrito seis familias de bombas de eflujo según su capacidad para expulsar antibióticos: familia de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR), superfamilia del facilitador principal (MFS), familia de resistencia-nodulación-división (RND), superfamilia de casete de unión a ATP (ABC), familia de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos (MATE) y familia de eflujo de compuestos antimicrobianos proteobacterianos (PACE) (Gaubá y Miraz-Rahman, 2023).

1.2.3.3. Inactivación del antibiótico

Las bacterias pueden presentar resistencia a un antibiótico mediante la expresión de enzimas modificadoras que degradan o modifican covalentemente el antibiótico, lo que conduce a su inactivación (De Pascale y Wright, 2010). Se han identificado múltiples enzimas que presentan el mismo comportamiento, lo que conduce a la degradación de las moléculas de los antibióticos (Shaikh *et al.*, 2014).

Se trata de uno de los mecanismos más importantes, y se observó por primera vez en la resistencia a ampicilina, la cual es inactivada por beta-lactamasas. Las beta-lactamasas son enzimas producidas por bacterias, como *E. coli*, sometidas a presión de selección antibiótica (Varela *et al.*, 2021).

1.2.3.4. Permeabilidad reducida

Se refiere a la disminución de la entrada a la célula de antibióticos al alterar la permeabilidad de la membrana o la pared celular (Planson *et al.*, 2011).

Las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa que está compuesta por una bicapa lipídica, lo que evita fácilmente la absorción de solutos hidrofílicos, por lo tanto, contiene proteínas que forman canales para permitir el ingreso de nutrientes, dichas proteínas son las porinas (Nikaido, 2003). La producción de porinas depende específicamente del tipo de bacteria, y la eliminación de una o más porinas puede resultar en la generación de resistencia bacteriana. como ejemplo, la pérdida de la porina OprD provoca una deficiencia en el efecto antimicrobiano de muchos fármacos de amplio espectro contra *P. aeruginosa* (McPhee *et al.*, 2009).

Las bacterias que presentan mayor resistencia a beta-lactámicos generalmente presentan mutaciones en el gen *ompF*, la inactivación de su gen estructural impide la entrada de beta-lactámicos, quinolonas y otros antibióticos mediante la disminución de la permeabilidad de la pared celular (Tang *et al.*, 2020).

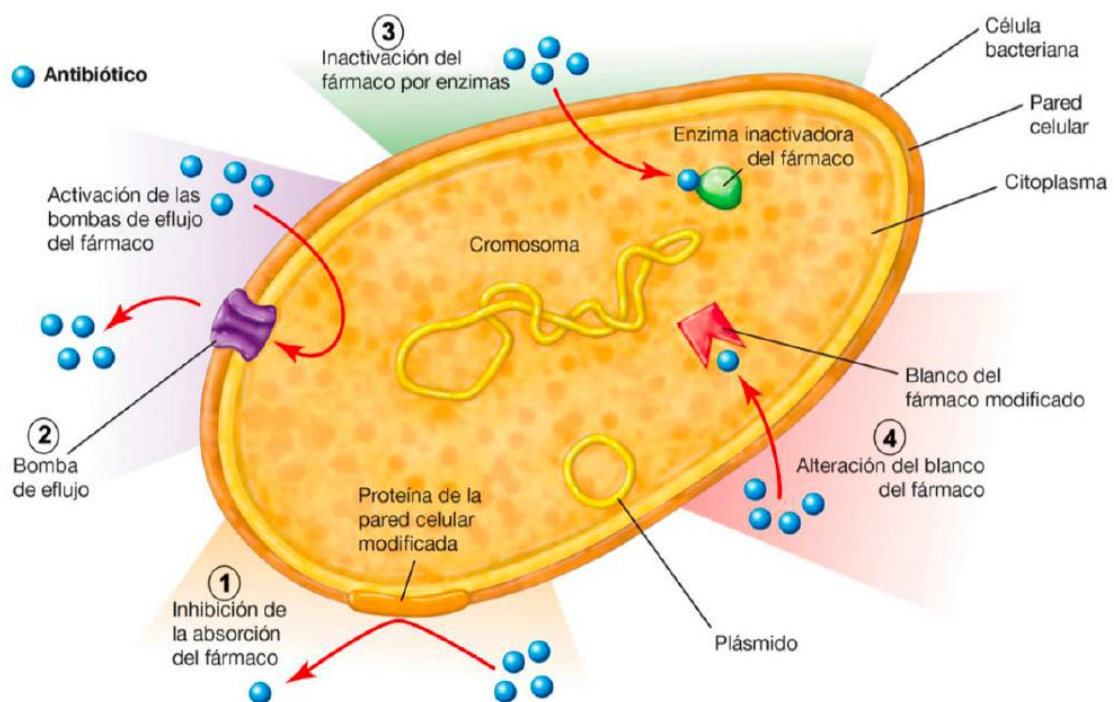


Figura 1. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1) Reducción de la permeabilidad; 2) Expulsión activa del antibiótico; 3) Inactivación del antibiótico; 4) Modificación del sitio blanco del antibiótico (ver texto). Tomado de Uso Racional de Antibióticos (http://www.femeba.org.ar/documentos/download/3049?utm_medium=).

Tabla 1. Principales mecanismos bioquímicos de resistencia a antibióticos.
Tomado de Baweja et al., 2025.

Mecanismo	Bacterias que lo presentan	Genes/enzimas clave
Permeabilidad reducida	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>ompK36</i> , <i>ompF</i> , <i>ompC</i>
Bombas de eflujo	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>	RND (AcrAB-TolC), MFS (NorA), MATE (MepA), SMR, transportadores ABC
Modificación del sitio blanco	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i>	<i>erm</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrA</i> , <i>mecA</i>
Inactivación de antibióticos	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Campylobacter coli</i>	β -lactamasas (AmpC, ESBL, NDM-1), AME (acetil-, fosfo-, nucleotidil- transferasas)

1.3. Respuesta evolutiva de las bacterias frente a antibióticos

1.3.1. Evolución bacteriana y adaptación

Aunque con frecuencia el problema de la resistencia a los antibióticos se aborda desde una perspectiva clínica, la resistencia bacteriana constituye en realidad un proceso evolutivo dinámico. Las poblaciones bacterianas poseen una enorme capacidad de adaptación debido a sus cortos tiempos de generación, elevadas tasas de reproducción y la capacidad de adquirir mutaciones o genes de resistencia mediante la transferencia horizontal (Andersson y Hughes, 2010). Cuando una población bacteriana es expuesta a un antibiótico, este actúa como una presión selectiva que elimina a las células susceptibles y favorece la supervivencia de variantes con mecanismos de resistencia preexistentes o adquiridos *de novo*. Como consecuencia, las poblaciones resistentes pueden

expandirse rápidamente y dominar el ambiente bajo condiciones de estrés antimicrobiano (Levin *et al.*, 1997).

La evolución de la resistencia no depende únicamente de la presencia del antibiótico, sino también de la intensidad y la duración de la presión selectiva. Estudios experimentales han demostrado que diferentes concentraciones de antibióticos pueden modificar significativamente las trayectorias adaptativas bacterianas (Toprak *et al.*, 2012). En particular, ambientes con selección fuerte favorecen la rápida fijación de mutaciones altamente resistentes, mientras que presiones selectivas más suaves pueden permitir la coexistencia de múltiples variantes adaptativas y una mayor diversidad genética dentro de las poblaciones (Mahrt *et al.*, 2021). Estas diferencias pueden afectar no solo la velocidad de adquisición de resistencia, sino también la estabilidad de las mutaciones seleccionadas y el comportamiento evolutivo posterior de las bacterias.

Además, actualmente se reconoce que los antibióticos no solo ejercen presión selectiva en ambientes clínicos, sino también en ecosistemas naturales contaminados con residuos antimicrobianos provenientes de actividades humanas, agrícolas e industriales (Martínez, 2009; Berendonk *et al.*, 2015). Incluso concentraciones subletales de antibióticos pueden favorecer la selección de variantes resistentes y modificar la dinámica evolutiva de las poblaciones bacterianas (Gullberg *et al.*, 2011). Esto ha llevado a considerar la resistencia antimicrobiana como un problema ecológico y evolutivo de gran complejidad, en el que las interacciones entre el ambiente, la historia evolutiva y la presión selectiva determinan la emergencia y la persistencia de cepas resistentes.

En los últimos años, diversos estudios de evolución experimental han demostrado que la adaptación bacteriana no depende exclusivamente del antibiótico al que una población está expuesta, sino también de su historia genética evolutiva previa. Este fenómeno, conocido como contingencia histórica, propone que las adaptaciones adquiridas en el pasado pueden influir en las trayectorias evolutivas futuras y modificar tanto la velocidad como las posibilidades de adaptación ante nuevos ambientes selectivos (Weinreich *et al.*, 2006; Blount *et al.*, 2018).

La importancia de la contingencia histórica radica en que mutaciones previamente adquiridas pueden condicionar el efecto de mutaciones posteriores mediante interacciones epistáticas, favoreciendo o limitando determinadas rutas

evolutivas (Lukačšínová *et al.*, 2020). De esta manera, dos poblaciones bacterianas que inicialmente eran idénticas pueden evolucionar de forma distinta según las presiones selectivas a las que hayan estado expuestas previamente.

Card *et al.* (2019) demostraron que cepas bacterianas con diferentes antecedentes evolutivos presentan capacidades distintas para desarrollar resistencia frente a nuevos antibióticos. Estos autores observaron que el contexto genético previo modifica las trayectorias adaptativas y altera la rapidez con la que las poblaciones adquieren resistencia.

La evolución experimental se ha convertido en una herramienta particularmente útil para estudiar estos procesos, ya que permite observar en tiempo real cómo las poblaciones bacterianas responden a distintas presiones selectivas y cómo la interacción entre selección, mutación y contingencia histórica moldea las trayectorias evolutivas (Barrick y Lenski, 2013). En este contexto, comprender cómo la historia evolutiva modifica la adaptación bacteriana posterior resulta relevante para comprender la persistencia de la resistencia antimicrobiana y su posible impacto en las estrategias terapéuticas futuras.

1.3.2. Fitness bacteriano y costos adaptativos

La adquisición de resistencia a los antibióticos a menudo conlleva costos fisiológicos para las bacterias. Estos costos adaptativos pueden surgir debido a alteraciones metabólicas, regulatorias o estructurales asociadas a los mecanismos de resistencia y pueden afectar negativamente procesos esenciales como el crecimiento, la reproducción o la competitividad bacteriana en ausencia del antibiótico (Andersson y Levin, 1999; Melnyk *et al.*, 2015).

Desde una perspectiva evolutiva, el fitness bacteriano se refiere a la capacidad relativa de una cepa para sobrevivir, reproducirse y competir con éxito en una población determinada. En muchos casos, las mutaciones que confieren resistencia generan desventajas competitivas cuando el antibiótico ya no está presente, ya que las adaptaciones resistentes pueden requerir un gasto energético adicional o alterar procesos celulares importantes (Andersson y Hughes, 2010).

Sin embargo, las poblaciones bacterianas poseen una elevada capacidad de compensación evolutiva. Durante procesos evolutivos prolongados pueden

seleccionarse mutaciones compensatorias que disminuyen o incluso eliminan los costos asociados a la resistencia, permitiendo que las cepas resistentes mantengan altos niveles de fitness aun en ambientes libres de antibióticos (Levin *et al.*, 2000). Esto representa uno de los principales problemas en el control de la resistencia antimicrobiana, ya que algunas mutaciones resistentes pueden persistir incluso después de suspender el uso del antibiótico. Estos hallazgos resaltan la importancia de analizar no solo los niveles de resistencia alcanzados por una población bacteriana, sino también su desempeño competitivo y su estabilidad evolutiva. En este sentido, los ensayos de competencia bacteriana constituyen una herramienta útil para evaluar diferencias de fitness entre cepas susceptibles y resistentes, lo que permite estudiar de manera más integral las consecuencias evolutivas asociadas a la resistencia antimicrobiana.

1.3.3. Resistencia cruzada y sensibilidad colateral

La evolución de la resistencia a un antibiótico puede modificar simultáneamente la susceptibilidad bacteriana a otros compuestos antimicrobianos. Este fenómeno puede manifestarse como resistencia cruzada, cuando una adaptación incrementa la resistencia frente a múltiples antibióticos, o como sensibilidad colateral, cuando la resistencia adquirida frente a un antibiótico incrementa la susceptibilidad frente a otro compuesto (Szybalski y Bryson, 1952; Imamovic y Sommer, 2013).

La resistencia cruzada ocurre cuando los mecanismos que le confieren resistencia a una bacteria inducen resistencia a más de un antibiótico simultáneamente, esto les ofrece una ventaja selectiva para que puedan evadir la mortalidad que les provocarían los fármacos (Obolski *et al.*, 2016).

La resistencia cruzada puede surgir debido a mecanismos compartidos entre diferentes antibióticos, como alteraciones de la permeabilidad de la membrana, modificación de blancos celulares o activación de bombas de eflujo multidroga (Blair *et al.*, 2014). Por ejemplo, cambios en los sistemas de transporte o en la envoltura celular pueden afectar simultáneamente la entrada o la acumulación intracelular de distintos antibióticos, incluso pertenecientes a familias diferentes.

Por otro lado, la sensibilidad colateral representa un fenómeno particularmente interesante desde el punto de vista evolutivo y terapéutico, ya

que implica la existencia de compromisos adaptativos o fisiológicos asociados a la resistencia. Así, la sensibilidad colateral describe una situación en la que se produce una compensación evolutiva entre los mecanismos que confieren a las bacterias resistencia a los antibióticos. En estos casos, la adaptación que mejora la supervivencia frente a un antibiótico puede generar susceptibilidad frente a otro (Hernando-Amado *et al.*, 2023; Pál *et al.*, 2015), lo que significa que una cepa que presente sensibilidad colateral mostrará inhibición del crecimiento con concentraciones más bajas de antibiótico o su eliminación será más rápida en comparación con las cepas que no poseen el mecanismo de resistencia (Roemhild y Andersson, 2021). Según estudios realizados *in vitro*, el 74% de las cepas resistentes a ciertos antibióticos mostraron sensibilidad cruzada a uno o más agentes antimicrobianos (Imamovic y Sommer, 2013).

Debido a ello, en años recientes se ha propuesto que las redes de sensibilidad colateral podrían utilizarse para diseñar tratamientos secuenciales capaces de limitar la evolución de la resistencia bacteriana (Imamovic y Sommer, 2013; Barbosa *et al.*, 2017).

Diversos estudios de evolución experimental han demostrado que los perfiles de resistencia cruzada y sensibilidad colateral pueden variar según la historia evolutiva de las poblaciones bacterianas y la intensidad de la selección aplicada durante el proceso adaptativo (Oz *et al.*, 2014). Esto sugiere que poblaciones evolucionadas bajo condiciones distintas pueden responder de manera diferencial frente a nuevos antibióticos aun cuando presenten niveles similares de resistencia al compuesto original.

2. ANTECEDENTES

El antecedente directo de este trabajo corresponde al estudio realizado por Cisneros-Mayoral *et al.* (2022), en el que se evaluó experimentalmente cómo distintas intensidades de selección afectan la adaptación de poblaciones de *E. coli* MG1655 expuestas a ampicilina.

En dicho estudio, las poblaciones bacterianas fueron sometidas a dos regímenes de selección distintos: selección suave (IC50: concentración del antibiótico que inhibió el crecimiento del 50% de la población) y selección fuerte (IC90: concentración del antibiótico que inhibió el crecimiento del 90% de la población), mediante experimentos de evolución adaptativa en presencia de concentraciones crecientes de ampicilina. Los autores observaron que las poblaciones evolucionadas bajo selección fuerte adquirieron resistencia más rápidamente que las evolucionadas bajo selección suave. Sin embargo, a pesar de alcanzar niveles similares de resistencia fenotípica, las poblaciones evolucionadas bajo ambos regímenes presentaron diferencias importantes en sus perfiles genéticos y dinámicas evolutivas. El análisis genómico reveló que las poblaciones sometidas a selección fuerte acumularon mutaciones distintas de las observadas bajo selección suave, lo que indica que la intensidad de la selección modifica las trayectorias adaptativas bacterianas. Además, Cisneros-Mayoral *et al.* (2022) analizaron la estabilidad de las mutaciones resistentes tras cultivar las poblaciones en ausencia de antibiótico. Encontraron que las mutaciones seleccionadas bajo presión fuerte tendían a perderse más rápidamente al retirar el antibiótico, mientras que varias mutaciones adquiridas bajo selección suave permanecían estables incluso en ambientes libres de antibióticos. Estos resultados sugieren que la intensidad de selección no solo afecta la velocidad de adquisición de la resistencia, sino también la estabilidad evolutiva y los costos adaptativos asociados a las mutaciones resistentes.

Adicionalmente, el estudio mostró que poblaciones evolucionadas bajo selección fuerte fueron capaces de compensar parcialmente los costos fisiológicos asociados a resistencia después de crecer en ausencia de antibiótico, recuperando parte de su fitness competitivo.

Asimismo, cuando el antibiótico fue reintroducido, las poblaciones previamente evolucionadas bajo selección suave mostraron una readaptación

más rápida, lo que evidencia que la historia evolutiva modifica la respuesta bacteriana frente a exposiciones posteriores al antibiótico.

Con base en estos antecedentes, resulta relevante analizar si clones bacterianas derivadas de distintas fases evolutivas, sometidas a una fuerte presión de ampicilina, presentan diferencias en el fitness competitivo y en los perfiles de resistencia cruzada frente a otros antibióticos. El estudio de estas interacciones puede contribuir a comprender cómo la historia evolutiva y la intensidad de la selección influyen en la adaptación bacteriana posterior y en la expansión de perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana.

En este trabajo se retoman clones de *E. coli* resistentes a ampicilina provenientes del régimen de selección fuerte del experimento evolutivo para evaluar su susceptibilidad a distintos antibióticos de las familias beta-lactámicas y aminoglucósidos.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los problemas más importantes para la salud pública a nivel mundial, ya que cada vez es más frecuente encontrar bacterias capaces de sobrevivir a tratamientos que antes eran eficaces. Esta situación no solo dificulta el tratamiento de infecciones bacterianas, sino que también incrementa el riesgo de propagación de cepas resistentes. Por ello, comprender cómo las bacterias desarrollan resistencia y cómo su historia evolutiva influye en su capacidad de adaptación frente a distintos antibióticos resulta fundamental para entender la persistencia de este problema.

Diversos estudios han demostrado que las bacterias pueden evolucionar de manera distinta dependiendo de la intensidad de la presión selectiva a la que son expuestas, generando cambios que afectan tanto la estabilidad de las mutaciones resistentes, como su desempeño competitivo. Sin embargo, todavía hay poca información sobre cómo estas diferencias evolutivas modifican la capacidad de las bacterias para competir y responder frente a otros antibióticos.

En este contexto, el presente trabajo busca analizar clones de *E. coli* evolucionadas bajo una fuerte presión de ampicilina para evaluar sus perfiles de competencia bacteriana y de resistencia cruzada. A través de este análisis, se pretende comprender mejor cómo la historia evolutiva puede influir en la adaptación bacteriana y en la respuesta frente a distintos antibióticos.

4. HIPÓTESIS

Las clones de *Escherichia coli* evolucionadas bajo una fuerte presión de ampicilina presentarán perfiles diferenciales de resistencia cruzada y sensibilidad colateral, dependientes de su historia evolutiva, en los que las clones provenientes de fases tardías mostrarán mayor fitness competitivo y mayor adaptación frente a otros antibióticos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la historia evolutiva bajo presión fuerte de ampicilina sobre la competencia bacteriana y los perfiles de resistencia cruzada y sensibilidad colateral de clonas de *Escherichia coli* mediante citometría de flujo, para determinar su influencia en la adaptación a otros antibióticos.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1. Determinar la concentración mínima inhibitoria de *E. coli* MG1655 WT y *E. coli* MG1655 WT-GFP frente a distintos antibióticos para establecer sus perfiles basales de susceptibilidad antimicrobiana.
- 5.2.2. Calcular la concentración inhibitoria media de las cepas *E. coli* MG1655 WT y *E. coli* MG1655 WT-GFP para cada antibiótico evaluado con el fin de caracterizar cuantitativamente su susceptibilidad antimicrobiana.
- 5.2.3. Evaluar mediante citometría de flujo la competencia bacteriana entre clonas mutantes y la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP en presencia de distintos antibióticos, para determinar las diferencias en el fitness competitivo asociadas a su historia evolutiva.
- 5.2.4. Comparar los perfiles de resistencia cruzada y de sensibilidad colateral entre clonas derivadas de distintas fases evolutivas bajo presión de selección fuerte con ampicilina.

6. METODOLOGÍA

Con el fin de alcanzar los objetivos planteados, se diseñó una estrategia experimental que integró ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, experimentos de competencia bacteriana y análisis mediante citometría de flujo. La Figura 2 resume de manera esquemática las principales etapas metodológicas desarrolladas en este estudio, desde la determinación de parámetros de susceptibilidad a antibióticos hasta la evaluación de la respuesta competitiva y los perfiles de resistencia de las clonas evolucionadas.

El procedimiento experimental inicia con dos conjuntos de cepas bacterianas. Por un lado, se utilizan las cepas de referencia *E. coli* MG1655 WT y *E. coli* MG1655 WT-GFP, y por otro, cuatro clonas derivadas de un experimento previo de evolución bajo presión de selección fuerte con ampicilina (Cisneros-Mayoral *et al.*, 2022). A partir de las cepas de referencia, se determina inicialmente la MIC mediante ensayos de microdilución en placa con los antibióticos seleccionados. Posteriormente, los datos obtenidos se procesan para calcular la concentración inhibitoria media (IC50) de cada antibiótico.

Los valores de IC50 obtenidos sirven como referencia para diseñar los experimentos de competencia bacteriana, en los cuales cada clona evolucionada se enfrenta a la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP en presencia de los antibióticos evaluados. En esta etapa convergen las dos ramas del diagrama: las clonas evolucionadas y las cepas de referencia. Una vez realizados los experimentos de competencia, las muestras se analizan mediante citometría de flujo, aprovechando la fluorescencia de la cepa WT-GFP para diferenciarla de las clonas mutantes no fluorescentes y cuantificar la proporción relativa de cada población bacteriana.

Posteriormente, los datos obtenidos por citometría se procesan para evaluar la respuesta de crecimiento y el desempeño competitivo de las cepas en cada condición experimental. Finalmente, el análisis de estos resultados permite identificar patrones de resistencia cruzada o sensibilidad colateral de las clonas evolucionadas frente a los antibióticos estudiados, y determinar si las

adaptaciones adquiridas durante la evolución bajo presión fuerte de ampicilina modificaron su respuesta a otros agentes antimicrobianos.

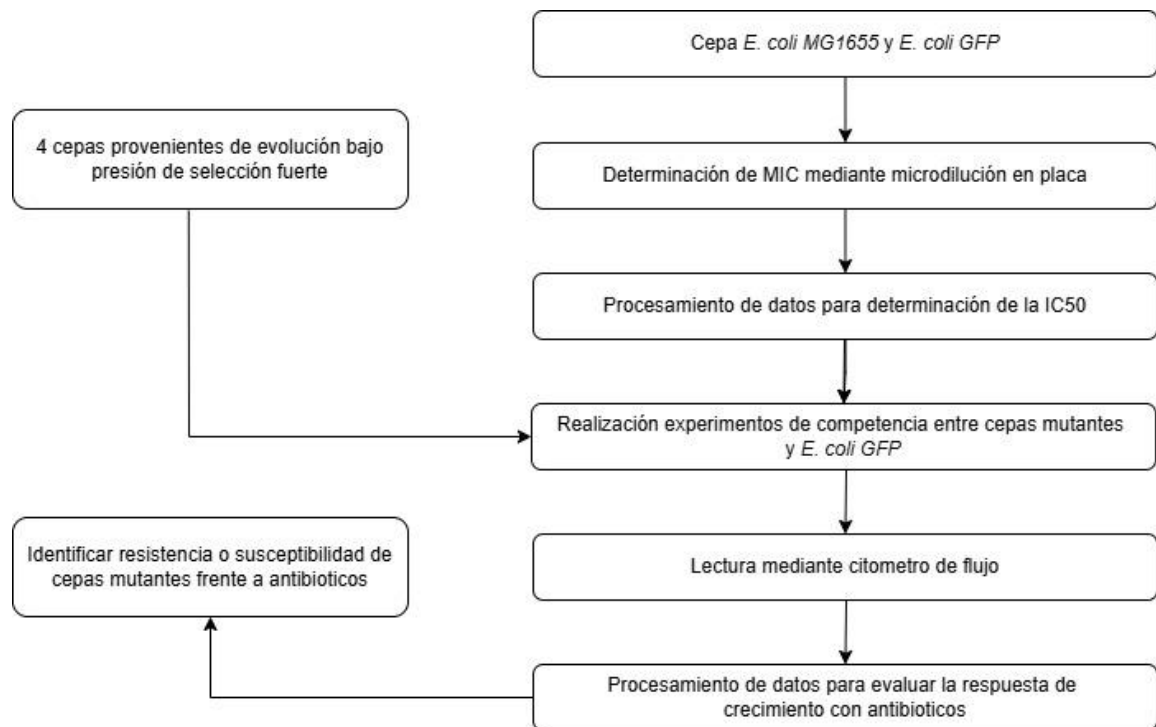


Figura 2. Estrategia experimental empleada en el estudio. Las cepas *E. coli* MG1655 WT y WT-GFP se utilizaron para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y calcular la concentración inhibitoria media (IC50) frente a distintos antibióticos. Los valores de IC50 se emplearon para establecer las condiciones de los experimentos de competencia bacteriana entre cuatro clonas evolucionadas bajo presión fuerte de ampicilina y la cepa WT-GFP. La proporción relativa de las poblaciones se cuantificó mediante citometría de flujo y los datos obtenidos se analizaron para evaluar el desempeño competitivo e identificar perfiles de resistencia cruzada o sensibilidad colateral frente a los antibióticos evaluados.

6.1. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Programa de Biología de Sistemas del Centro de Ciencias Genómicas (CCG), UNAM. Previamente, en el mismo laboratorio se realizó un experimento de evolución experimental utilizando *E. coli* MG1655 sometida a diferentes presiones selectivas de ampicilina: débil (IC50) y fuerte (IC90) (Cisneros-Mayoral, 2022). Durante dicho experimento se aislaron y criopreservaron clonas isogénicas en distintos puntos temporales asociados a cambios en los niveles de resistencia al antibiótico. Como resultado de este proceso, se obtuvieron clonas derivadas de las dos presiones selectivas aplicadas: débil y fuerte. Para el presente trabajo, se seleccionaron cuatro clonas provenientes de poblaciones de

E. coli MG1655 evolucionadas bajo presión de selección fuerte a ampicilina (IC90), aisladas en distintos puntos temporales correspondientes a la primera y tercera fase evolutiva del experimento. En la Tabla 2 se muestran el identificador de las clonas seleccionadas, el día de aislamiento, la microplaca de origen y el pocillo correspondiente.

Los cultivos de las clonas provenientes del experimento de evolución bajo presión de selección fuerte con ampicilina se recuperaron a partir de las correspondientes placas maestras de 96 pozos, almacenadas a -80°C y que contenían glicerol al 25 % como crioprotector. Para ello, se preparó medio LB agar suplementado con ampicilina ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$) y se realizaron siembras por estriado utilizando aproximadamente $10\text{ }\mu\text{L}$ de cada cultivo criopreservado, con el fin de obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a 37°C durante 16-20 h.

Tabla 2. Clonas de *E. coli* MG1655 provenientes de la condición de presión de selección fuerte (IC90) utilizadas en este estudio.

Fase evolutiva	Clona	Día de selección	Nombre de la placa	Pocillo en la placa
Fase 1	D3	3	EVOL_MG1655_AMP_D AY 3_STRONG SELECTION 26/04/17	C12
	D8	8	EVOLUTIVO_MG1655_A MP_STRONG SELECTION_DAY 8 02/06/17	F1
Fase 3	MP51	13	Microplaca 51	B12
	P59	18	DR_Amp_PLACA 59_Re_evol_01 julio 2019_SSyMS	B1

Adicionalmente, se utilizaron las cepas de *E. coli* MG1655 tipo silvestre o WT (*wild type*), consideradas una cepa de referencia con mínima manipulación genética, y *E. coli* WT-GFP, derivada de MG1655 WT y portadora del plásmido pFPV25.1, que expresa el gen *gfpmut3a* constitutivamente para producir la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *green fluorescent protein*); dicho plásmido también porta un gen que confiere resistencia a la ampicilina.

6.2. Medios de cultivo

Para la preparación de medio LB líquido se utilizó LB Broth (Lennox) de Laboratorios Conda S.A. Pronadisa (20 g/L), mientras que para el medio LB sólido se utilizó LB Agar (Lennox) de Laboratorios Conda S.A. Condalab (35 g/L).

En la Figura 3 se muestra el procedimiento general para la preparación de medios de cultivo. El medio deshidratado se pesó en una balanza de precisión (Nimbus Adam), se suspendió en agua destilada y se homogenizó en un agitador magnético (Thermolyne nuova II). Posteriormente, se esterilizó en autoclave (Market Forge Sterilmatic STM-EX/ELX) a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos. En el caso de los medios sólidos, una vez esterilizados, se vertieron aproximadamente 25 mL del medio en cada caja Petri estéril y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Finalmente, las cajas se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

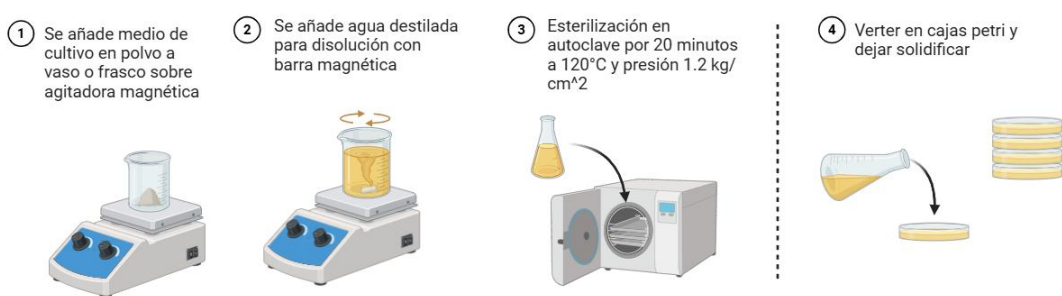


Figura 3. Diagrama del procedimiento general para la preparación de medios de cultivo. (1-3) El medio deshidratado se pesó, se suspendió en agua destilada, se homogenizó y se esterilizó en autoclave. (1-4) En el caso de los medios con agar, el medio esterilizado se vertió en cajas Petri estériles y se dejó solidificar antes de su uso. Imagen creada en BioRender.

6.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La MIC es la menor concentración de un antibiótico, expresada en µg/mL, capaz de inhibir el crecimiento visible de una bacteria en condiciones experimentales específicas y durante un periodo de incubación determinado (Belanger y Hancock, 2021). La determinación de la MIC se realizó mediante ensayos de microdilución en caldo siguiendo los lineamientos establecidos en el documento M07-A10 (10ª edición, 2015) del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, por sus siglas en inglés).

Se determinó la MIC de los antibióticos piperacilina, gentamicina, cefotaxima y amoxicilina para las cepas *E. coli* MG1655 WT y *E. coli* MG1655 WT-GFP. Las concentraciones evaluadas para realizar las curvas de dosis-respuesta se seleccionaron con base en datos del CLSI (2017): para cada antibiótico se identificaron los puntos de corte (*breakpoints*) reportados para enterobacterias y, tomando como referencia el valor correspondiente a la categoría de resistencia intermedia, se seleccionaron cuatro o más concentraciones inferiores y superiores para delimitar el rango de evaluación (Tabla 3). Debido a que el CLSI (2017) no establece puntos de corte específicos para amoxicilina sola en enterobacterias, se utilizaron como referencia los valores reportados para ampicilina, dado el estrecho vínculo estructural y funcional entre ambas aminopenicilinas. Estos valores se emplearon únicamente para definir el rango de concentraciones utilizado en los ensayos y para construir las curvas dosis-respuesta necesarias para la determinación experimental de la MIC, mas no para clasificar a las cepas como susceptibles, intermedias o resistentes.

Tabla 3. Rangos de concentración utilizados para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos seleccionados en las cepas de *E. coli* evaluadas.

Antibiótico	Rango de concentración (µg/mL)
Piperacilina	4 - 512
Gentamicina	1 - 64
Cefotaxima	0.06 - 16
Amoxicilina	2 - 128

Una alícuota de 100 µl de cultivos de las cepas *E. coli* MG1655 WT o *E. coli* MG1655 WT-GFP, previamente incubados en medio LB a 37°C con agitación constante (230 rpm) durante toda la noche, se utilizó para inocular 5 mL de medio LB fresco. Cada cultivo se incubó a 37°C con agitación constante (230 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (OD600), correspondiente a aproximadamente una concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL en *E. coli*. Entonces, los cultivos se diluyeron en medio LB en una proporción 1:20 para conseguir una concentración aproximada de 5×10^6 UFC/mL. Posteriormente, en cada pozo de placas estériles de 96 pozos se depositaron 100 µl de las distintas concentraciones de antibióticos previamente preparadas. Además, se incluyeron un control negativo, que consistió en medio LB sin bacterias ni antibiótico, y un control de crecimiento estándar de las bacterias (medio LB inoculado con bacterias en ausencia de antibiótico). Finalmente, a cada pozo con antibiótico se le adicionó 10 µl de la suspensión de bacterias previamente diluida, para tener una concentración inicial de 5×10^4 UFC/mL. Las placas se incubaron a 37°C durante 16-20 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, el crecimiento bacteriano se evaluó en un lector de microplacas (BioTek EL808x) a una longitud de onda de 630 nm. Los ensayos de cada cepa y antibiótico evaluados incluyeron al menos cuatro réplicas biológicas independientes.

6.4. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC50)

La IC50 se define como la concentración de antibiótico necesaria para reducir el crecimiento bacteriano en un 50 % respecto al control sin antibiótico.

Para su determinación, se utilizaron los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos de microdilución para la MIC. En primer lugar, las lecturas de absorbancia de cada concentración se normalizaron con respecto al control de crecimiento (100 % de crecimiento) y al control negativo (0 % de crecimiento). Posteriormente, se calculó el porcentaje de crecimiento relativo para cada concentración de antibiótico. Los datos se procesaron en Python, donde se construyeron curvas dosis-respuesta relacionando el porcentaje de crecimiento bacteriano con el logaritmo de la concentración del antibiótico. Los datos experimentales se ajustaron mediante un modelo sigmoideal de cuatro parámetros, ampliamente utilizado para describir respuestas biológicas dependientes de la dosis. A partir de la curva ajustada, se estimó la

concentración que corresponde al 50 % de inhibición del crecimiento, definida como la IC₅₀. Para cada cepa y antibiótico, el valor de IC₅₀ se calculó a partir del promedio de las réplicas biológicas y se reportó junto con los parámetros del ajuste obtenidos mediante regresión no lineal.

6.5. Experimentos de competencia

En cada experimento independiente, se seleccionó una colonia aislada de la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP o de las clonas evolucionadas D3, D8, MP51 y P59, y se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (10 µg/mL). Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante durante toda la noche para obtener los preinóculos. Al día siguiente, se transfirieron 100 µL de cada preinóculo a tubos con 5 mL de medio LB fresco suplementado con ampicilina (10 µg/mL). Los cultivos se incubaron a 37 °C y 230 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5.

Posteriormente, se establecieron los cultivos mixtos para los experimentos de competencia mediante la combinación de la cepa de referencia *E. coli* MG1655 WT-GFP y cada una de las clonas evolucionadas en una proporción aproximada de 1:1, utilizando 250 µL de cada cultivo previamente ajustado a OD₆₀₀ = 0.5. Las mezclas se inocularon en 10 mL de medio LB fresco suplementado con cada uno de los antibióticos evaluados a la concentración correspondiente a la IC₅₀ determinada para la cepa *E. coli* WT-GFP. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante durante 6 h.

Se tomaron muestras a las 0, 3 y 6 h de incubación. La muestra correspondiente a 0 h se recolectó inmediatamente después de mezclar ambas poblaciones bacterianas, con el fin de verificar que la proporción inicial entre la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP y la clona evolucionada fuera de aproximadamente 1:1. Posteriormente, se determinó la proporción relativa de cada cepa mediante citometría de flujo. Para ello, se recolectaron muestras de los cultivos mixtos que contenían aproximadamente 1×10^8 células, las cuales se lavaron y resuspendieron en 1 mL de PBS 1X estéril, y se filtraron a través de una membrana de 0.22 µm.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences), utilizando la fluorescencia verde como marcador diferencial entre las cepas. Para la detección de la proteína GFP se

utilizó un láser de excitación a 488 nm y un filtro de emisión de 525/40 nm. Se adquirieron 10,000 eventos por muestra y los datos fueron analizados mediante el software CytExpert (Beckman Coulter Life Sciences), el cual permitió determinar la distribución de fluorescencia y cuantificar la proporción relativa de células GFP positivas (*E. coli* MG1655 WT-GFP) y GFP negativas (D3, D8, MP51 o P59) presentes en cada condición experimental. La discriminación entre ambas poblaciones se realizó mediante el parámetro FITC-A; se consideró población GFP positiva aquella que presentó valores de fluorescencia superiores a 10^3 unidades arbitrarias. Dicho umbral se estableció a partir de controles de la cepa WT-GFP y de las clonas no fluorescentes. La proporción relativa de células GFP positivas y GFP negativas se utilizó para estimar el desempeño competitivo de las cepas en cada condición experimental.

6.6. Determinación del índice de competencia

A partir de los porcentajes poblacionales obtenidos mediante citometría de flujo, se calculó el índice de competencia (IC) con el propósito de cuantificar la ventaja competitiva relativa entre cada clona mutante y la cepa wild type-GFP. Este índice se obtuvo dividiendo el porcentaje de la población mutante entre el porcentaje de la población WT-GFP positiva en cada condición experimental. Posteriormente, los valores se transformaron a escala logarítmica de base 10 [$\log_{10}(\text{IC})$]. En este contexto, valores de $\log_{10}(\text{IC})$ mayores que 0 indicaron predominio de la clona mutante, valores menores que 0 reflejaron predominio de la cepa WT-GFP y valores cercanos a 0 indicaron proporciones similares entre ambas poblaciones.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de MIC e IC50

Como parte de la estandarización experimental, en primer lugar se determinaron los valores de MIC y IC50 para las cepas *E. coli* MG1655 WT y MG1655 WT-GFP frente a los antibióticos utilizados en este estudio, como se describió en la Metodología. Las Figuras 4 y 5 muestran curvas representativas de inhibición del crecimiento bacteriano utilizadas para la determinación de MIC e IC50, respectivamente, mientras que la Tabla 4 resume los valores obtenidos para cada antibiótico evaluado. Estos valores permitieron definir las concentraciones empleadas posteriormente en los experimentos de competencia bacteriana analizados mediante citometría de flujo.

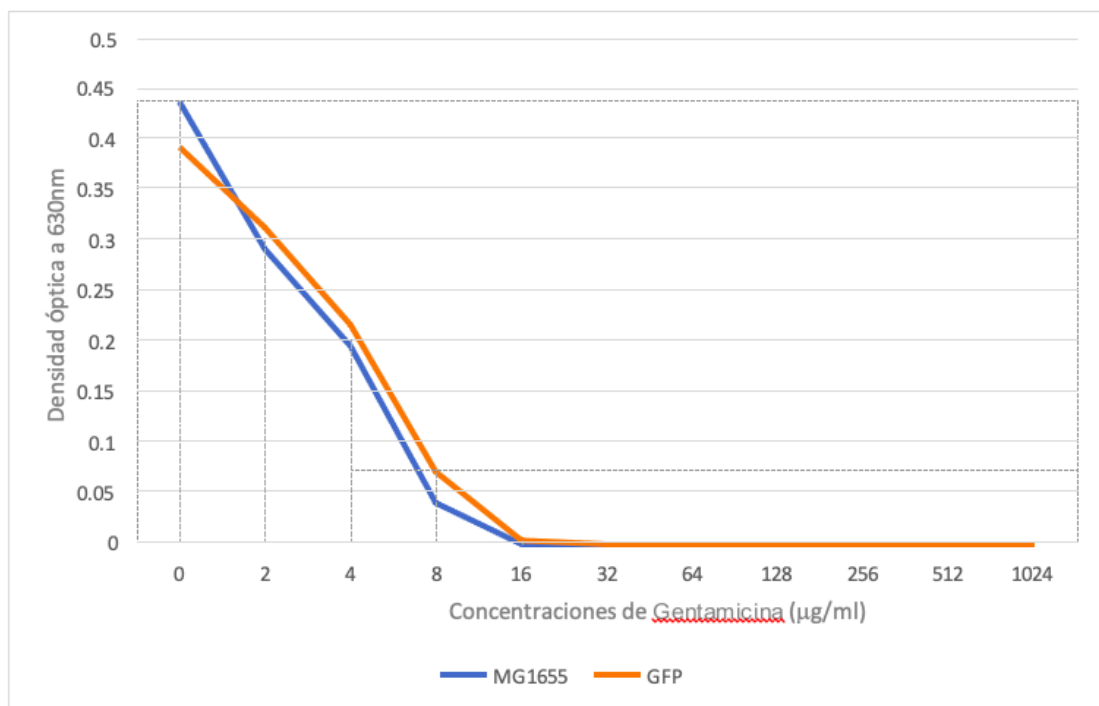


Figura 4. Curva representativa para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Curva de inhibición del crecimiento de las cepas *E. coli* MG1655 WT y MG1655 WT-GFP en presencia de concentraciones crecientes de gentamicina. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante la medición de la densidad óptica a 630 nm al final del periodo de incubación. La reducción progresiva del crecimiento bacteriano permitió estimar la MIC en cada condición experimental.

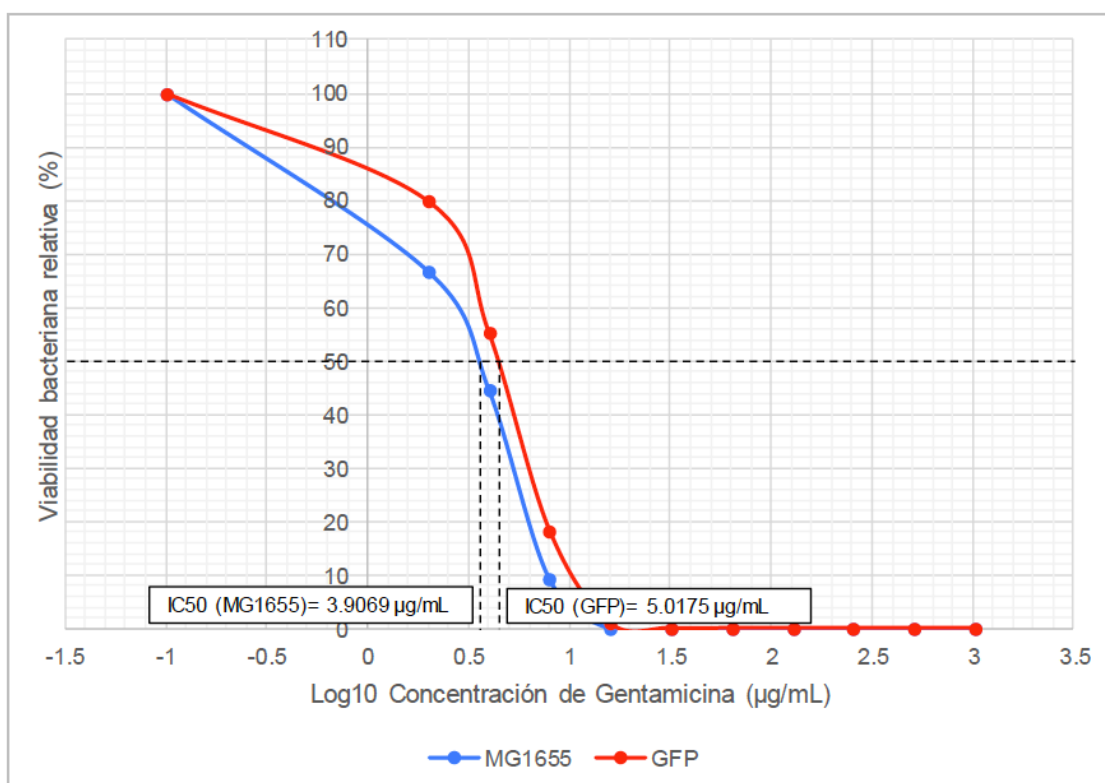


Figura 5. Curva representativa para determinar la concentración inhibitoria media (IC50). Curva dosis-respuesta representativa obtenida a partir del crecimiento relativo de las cepas *E. coli* MG1655 WT y MG1655 WT-GFP expuestas a concentraciones crecientes de gentamicina. La viabilidad bacteriana relativa se calculó en función del crecimiento observado en ausencia de antibiótico. Las líneas punteadas indican la intersección correspondiente al 50 % de crecimiento relativo utilizada para estimar la IC50 de cada cepa. Esta figura ilustra el procedimiento utilizado para calcular los valores de IC50 de los antibióticos evaluados en este estudio.

Debido a que la cepa utilizada como referencia en los ensayos de competencia fue MG1655 WT-GFP, la inclusión de la cepa MG1655 WT tuvo como propósito evaluar si la expresión de GFP modificaba el fenotipo basal de susceptibilidad a los antibióticos. En general, ambas cepas mostraron perfiles de susceptibilidad similares (Tabla 4), lo que sugiere que la incorporación del marcador fluorescente no alteró de manera significativa su respuesta a los tratamientos antimicrobianos. Aunque se observaron algunas diferencias en los valores de MIC, particularmente para piperacilina y gentamicina (Tabla 4), estas no comprometieron el uso de la cepa WT-GFP como referencia experimental ni como marcador fluorescente para el seguimiento de poblaciones bacterianas mediante citometría de flujo. Por lo tanto, la comparación entre ambas cepas permitió atribuir las diferencias observadas posteriormente en los ensayos de competencia principalmente a las adaptaciones adquiridas por las clonas

evolucionadas bajo presión de ampicilina y no a posibles efectos derivados de la expresión de GFP.

Tabla 4. Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración inhibitoria media (IC50) determinados para las cepas de *E. coli* MG1655 WT y *E. coli* MG1655 WT-GFP frente a distintos antibióticos.

Antibiótico	MIC (µg/mL)		IC50 (µg/mL)	
	MG1655 WT	MG1655 WT-GFP	MG1655 WT	MG1655 WT-GFP
Amoxicilina	8	8	2.3	2.1
Piperacilina	8	16	2.4	3.9
Cefotaxima	0.06	0.25	0.03	0.02
Gentamicina	16	32	3.9	5.02

7.2. Validación de competencia bacteriana mediante citometría de flujo

Con el fin de evaluar la competencia bacteriana entre las clonas mutantes no fluorescentes (D3, D8, MP51 y P59) y la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP, se realizaron análisis mediante citometría de flujo utilizando la fluorescencia GFP como marcador diferencial entre poblaciones bacterianas. Previo al análisis de los experimentos de competencia, fue necesario validar la estrategia de adquisición y el análisis citométrico mediante controles y representaciones gráficas que permitieran identificar adecuadamente las poblaciones bacterianas y descartar interferencias asociadas a agregados celulares o al ruido de fondo. Para ello, se obtuvieron histogramas de fluorescencia y diagramas de dispersión (*dot plots*) a partir de los controles experimentales y de las muestras de competencia bacteriana (Fig. 6).

Los histogramas permitieron visualizar la distribución de la fluorescencia de GFP en las poblaciones analizadas, lo que facilitó la identificación de poblaciones con fluorescencia alta y baja. Por otro lado, los *dot plots* permitieron evaluar la homogeneidad de las poblaciones bacterianas e identificar eventos asociados a agregados celulares, residuos o ruido electrónico.

Los análisis citométricos mostraron poblaciones bacterianas mayormente homogéneas y con baja presencia de agregados celulares (Fig. 6A y 6B),

permitiendo una adecuada discriminación entre las poblaciones fluorescentes y no fluorescentes. Asimismo, se utilizaron controles correspondientes a la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP y a cepas no fluorescentes para establecer los límites de fluorescencia y definir el umbral de separación entre poblaciones GFP positivas y GFP negativas. A partir de estos controles se estableció como población GFP positiva aquella que presentó valores de fluorescencia FITC-A superiores a 10^3 unidades arbitrarias (Fig. 6C).

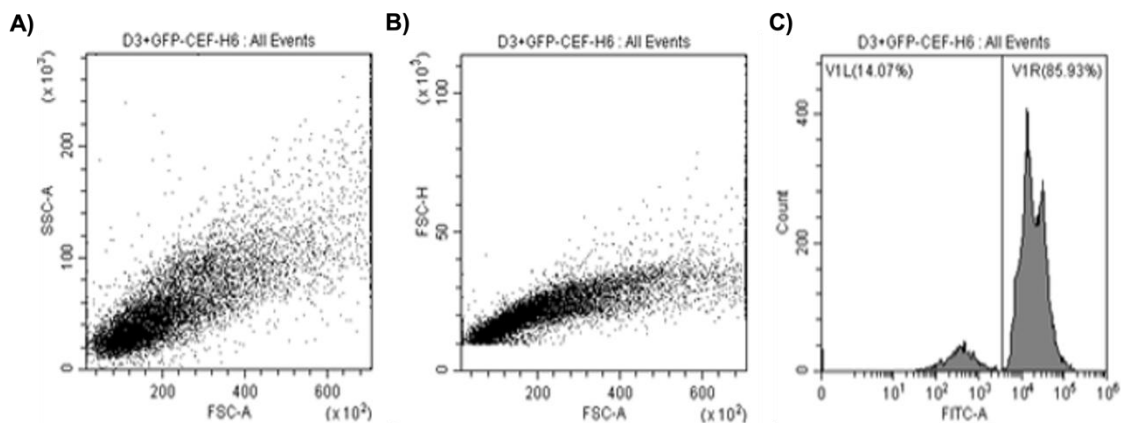


Figura 6. Validación de la estrategia de análisis citométrico empleada en los experimentos de competencia bacteriana. Diagramas de dispersión e histogramas representativos obtenidos mediante citometría de flujo durante los experimentos de competencia bacteriana entre la clona mutante D3 y la cepa *E. coli* WT-GFP en presencia de cefotaxima a las 6 horas de incubación. A) Diagrama FSC-A vs. SSC-A utilizado para evaluar la distribución y la homogeneidad de la población bacteriana, mostrando una baja presencia de agregados y un ruido de fondo bajo. B) Diagrama FSC-H vs. FSC-A empleado para verificar la adecuada discriminación de eventos celulares individuales y descartar la presencia significativa de dobles eventos o agregados bacterianos. C) Histograma de fluorescencia FITC-A utilizado para diferenciar las poblaciones GFP positivas y GFP negativas mediante el establecimiento de un umbral de fluorescencia. La población con alta fluorescencia corresponde a la cepa WT-GFP, mientras que la población con baja fluorescencia corresponde a la clona mutante no fluorescente.

7.3. Cuantificación de poblaciones GFP positivas

Los análisis de citometría permitieron utilizar la proporción de células GFP positivas como indicador indirecto de *fitness* competitivo entre las clonas mutantes y la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP durante los experimentos realizados en presencia de distintos antibióticos. Valores elevados de la población de GFP positiva indicaron predominio de la cepa WT, mientras que una disminución de la fluorescencia indicó una ventaja competitiva de las cepas mutantes.

Los experimentos de competencia revelaron diferencias dependientes tanto del antibiótico como de la fase evolutiva de las clonas analizadas (Fig. 7–10). Las clonas provenientes de las fases 1, D3 y D8 presentaron predominio de la cepa WT-GFP en presencia de amoxicilina y cefotaxima, lo que se reflejó en porcentajes elevados de población GFP positiva (Fig. 7 y 8). En contraste, frente a piperacilina y gentamicina se observó una disminución de la población WT-GFP, lo que indica una mayor ventaja competitiva de las cepas mutantes, particularmente a las 6 horas de incubación.

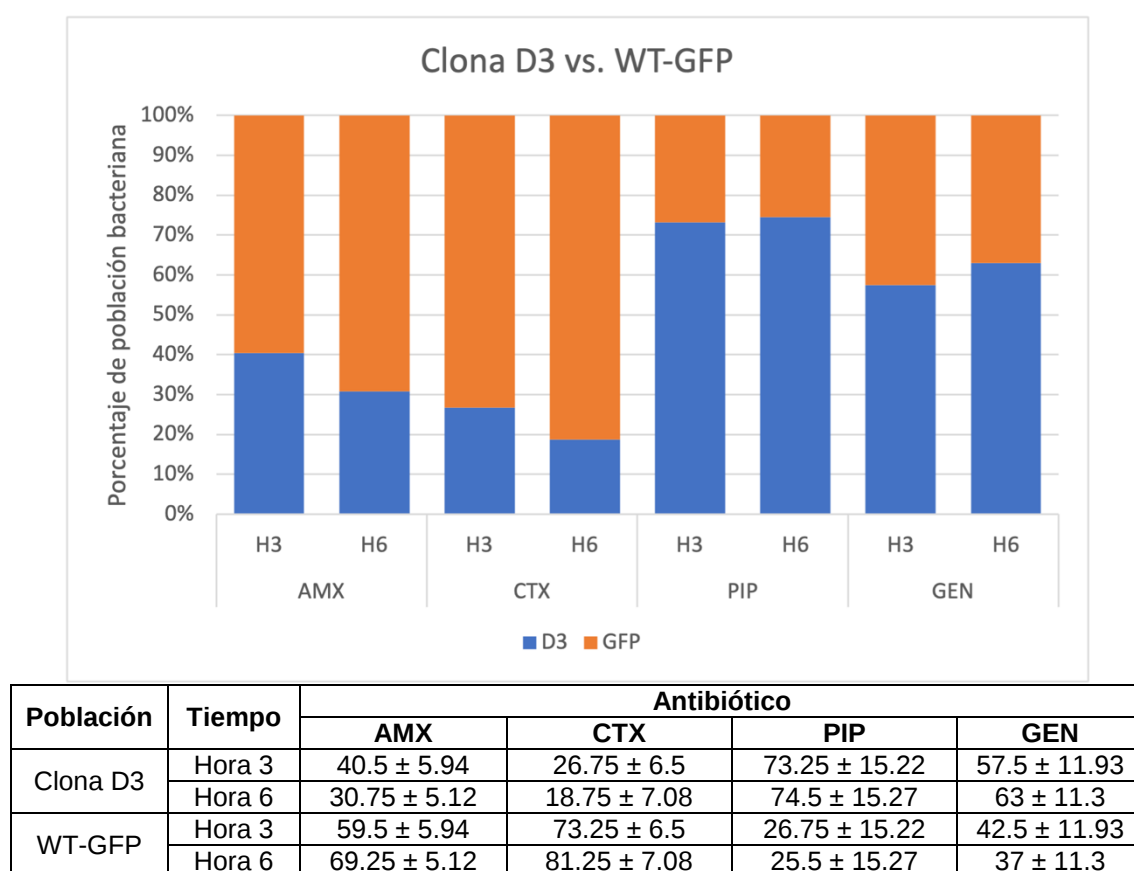
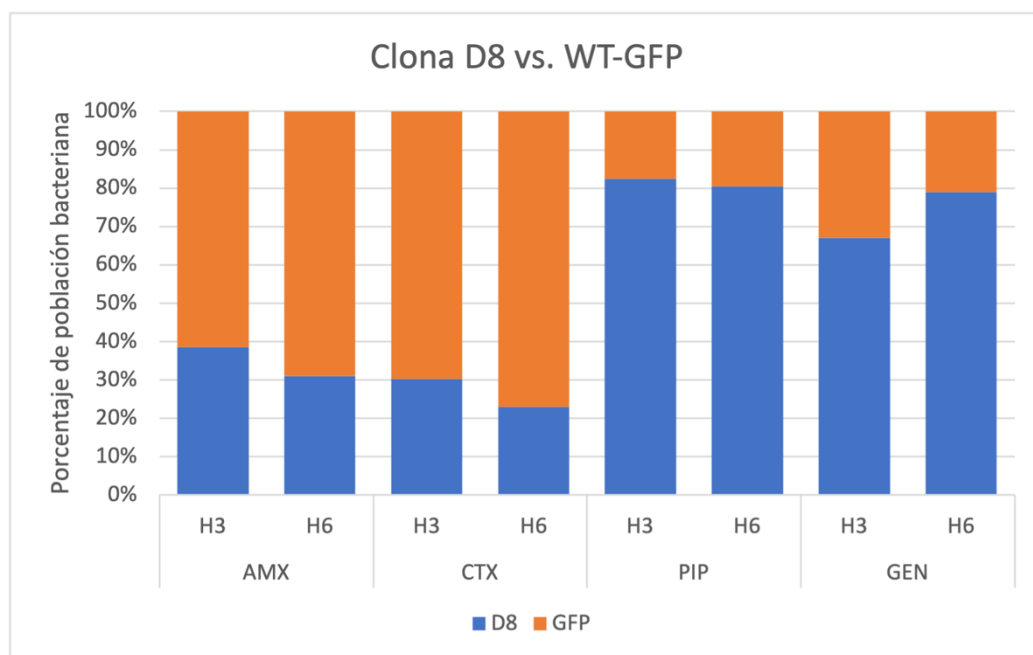


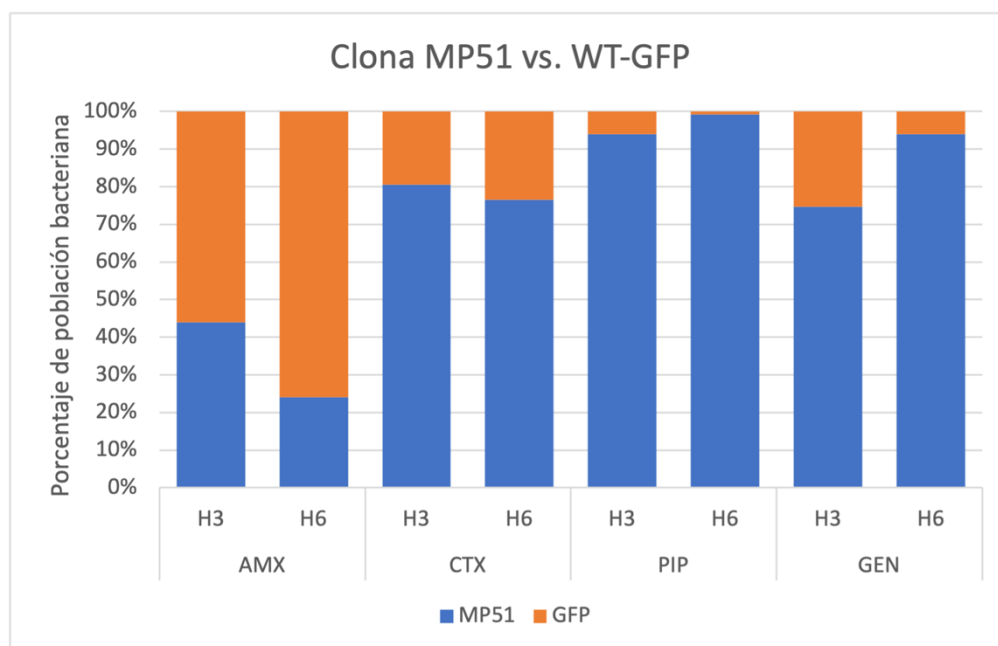
Figura 7. Competencia bacteriana entre la clona D3 y la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP frente a distintos antibióticos. Porcentaje de población bacteriana correspondiente a la clona mutante D3 y a la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP durante los experimentos de competencia bacteriana realizados en presencia de amoxicilina (AMX), cefotaxima (CTX), piperacilina (PIP) y gentamicina (GEN) a las 3 h (H3) y 6 h (H6) de incubación. Los porcentajes se determinaron mediante citometría de flujo, a partir de la proporción de células GFP positivas y GFP negativas en cada condición experimental. Los valores mostrados debajo de la gráfica corresponden al promedio ± desviación estándar obtenidos a partir de al menos tres réplicas independientes.



Población	Tiempo	Antibiótico			
		AMX	CTX	PIP	GEN
Clona D8	Hora 3	38.5 ± 8.08	30.3 ± 11.09	82.5 ± 9.55	67 ± 8.04
	Hora 6	31 ± 3.4	23 ± 9.9	80.5 ± 13.61	79 ± 8.06
WT-GFP	Hora 3	61.5 ± 8.08	69.7 ± 11.09	17.5 ± 9.55	33 ± 8.04
	Hora 6	69 ± 3.4	77 ± 9.9	19.5 ± 13.61	21 ± 8.06

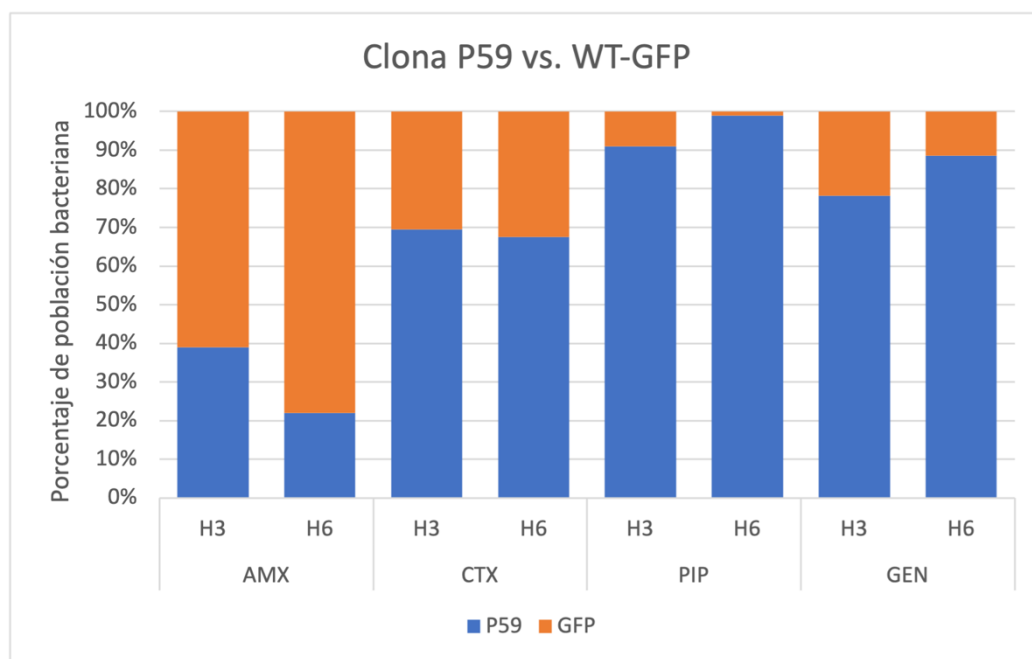
Figura 8. Competencia bacteriana entre la clona D8 y la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP frente a distintos antibióticos. Porcentaje de población bacteriana correspondiente a la clona mutante D8 y a la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP durante los experimentos de competencia bacteriana realizados en presencia de amoxicilina (AMX), cefotaxima (CTX), piperacilina (PIP) y gentamicina (GEN) a las 3 h (H3) y 6 h (H6) de incubación. Los porcentajes se determinaron mediante citometría de flujo, a partir de la proporción de células GFP positivas y GFP negativas en cada condición experimental. Los valores mostrados debajo de la gráfica corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar obtenidos a partir de al menos tres réplicas independientes.

Por otro lado, las clonas provenientes de la fase 3, MP51 y P59, mostraron un patrón adaptativo distinto, caracterizado por una reducción mucho más pronunciada de la población GFP positiva en presencia de cefotaxima, piperacilina y gentamicina (Fig. 9 y 10). Este comportamiento fue más evidente a las 6 horas, donde las poblaciones mutantes alcanzaron porcentajes cercanos al predominio total frente a la cepa WT-GFP, especialmente en presencia de piperacilina. Estos resultados sugieren un incremento en la capacidad competitiva de las clonas derivadas de fases evolutivas más tardías.



Población	Tiempo	Antibiótico			
		AMX	CTX	PIP	GEN
Clona MP51	Hora 3	44 ± 2.83	80.5 ± 11.67	94 ± 3.27	74.75 ± 11.45
	Hora 6	24 ± 11.78	76.5 ± 18.69	99.2 ± 0.33	94 ± 4.06
WT-GFP	Hora 3	56 ± 2.83	19.5 ± 11.67	6 ± 3.27	25.25 ± 11.45
	Hora 6	76 ± 11.78	23.5 ± 18.69	0.8 ± 0.33	6 ± 4.06

Figura 9. Competencia bacteriana entre la clona MP51 y la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP frente a distintos antibióticos. Porcentaje de población bacteriana correspondiente a la clona mutante MP51 y a la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP durante los experimentos de competencia bacteriana realizados en presencia de amoxicilina (AMX), cefotaxima (CTX), piperacilina (PIP) y gentamicina (GEN) a las 3 h (H3) y 6 h (H6) de incubación. Los porcentajes se determinaron mediante citometría de flujo, a partir de la proporción de células GFP positivas y GFP negativas en cada condición experimental. Los valores mostrados debajo de la gráfica corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar obtenidos a partir de al menos tres réplicas independientes.



Población	Tiempo	Antibiótico			
		AMX	CTX	PIP	GEN
Clona P59	Hora 3	39 ± 8.58	69.5 ± 16.44	91 ± 3.27	78.25 ± 13.81
	Hora 6	22 ± 13.96	67.5 ± 21.66	99 ± 0.48	88.5 ± 5.6
WT-GFP	Hora 3	61 ± 8.58	30.5 ± 16.44	9 ± 3.27	21.75 ± 13.81
	Hora 6	78 ± 13.96	32.5 ± 21.66	1 ± 0.48	11.5 ± 5.6

Figura 10. Competencia bacteriana entre la clona P59 y la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP frente a distintos antibióticos. Porcentaje de población bacteriana correspondiente a la clona mutante P59 y a la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP durante los experimentos de competencia bacteriana realizados en presencia de amoxicilina (AMX), cefotaxima (CTX), piperacilina (PIP) y gentamicina (GEN) a las 3 h (H3) y 6 h (H6) de incubación. Los porcentajes se determinaron mediante citometría de flujo, a partir de la proporción de células GFP positivas y GFP negativas en cada condición experimental. Los valores mostrados debajo de la gráfica corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar obtenidos a partir de al menos tres réplicas independientes.

Para complementar el análisis de las poblaciones GFP positivas, se calculó el índice de competencia (IC) como la proporción relativa entre la población mutante y la población GFP, expresada en escala log₁₀. Valores de log₁₀(IC) mayores a 0 indicaron predominio competitivo de las clonas mutantes, mientras que valores menores a 0 reflejaron predominio de la cepa WT- GFP.

Los índices de competencia obtenidos fueron consistentes con los porcentajes de población GFP observados en los experimentos de citometría. Las clonas de la fase 1 presentaron bajos índices de competencia en presencia de amoxicilina y cefotaxima, lo que indica una menor capacidad competitiva frente a la cepa WT (Tabla 5). En contraste, frente a piperacilina y gentamicina

se observaron incrementos en el índice de competencia, lo que refleja una ventaja competitiva parcial de las clonas mutantes (Tabla 5). Por otro lado, las clonas derivadas de la fase 3 mostraron los valores más altos de IC en presencia de cefotaxima, piperacilina y gentamicina (Tabla 5), lo que sugiere una expansión de los perfiles de resistencia cruzada y una mejora del fitness competitivo bacteriano asociada a la evolución bajo una fuerte presión de ampicilina.

En conjunto, estos resultados indican que la historia evolutiva influye directamente en la capacidad competitiva bacteriana y en la respuesta frente a distintos antibióticos, lo que favorece patrones diferenciales de adaptación entre las clonas provenientes de distintas fases evolutivas.

Tabla 5. Índices de competencia (IC) en escala log10 de las clonas de *E. coli* D3, D8, MP51 y P59 frente a distintos antibióticos.

Competencia	Antibiótico	log10 (IC)		Ventaja competitiva
		Hora 3	Hora 6	
FASE 1				
D3 vs. WT-GFP	Amoxicilina	-0.17	-0.35	WT-GFP
	Cefotaxima	-0.44	-0.63	WT-GFP
	Piperacilina	0.44	0.47	D3
	Gentamicina	0.13	0.23	D3 (moderada)
D8 vs. WT-GFP	Amoxicilina	-0.2	-0.35	WT-GFP
	Cefotaxima	-0.36	-0.52	WT-GFP
	Piperacilina	0.67	0.62	D8
	Gentamicina	0.3	0.58	D8
FASE 3				
MP51 vs. WT-GFP	Amoxicilina	-0.1	-0.5	WT-GFP
	Cefotaxima	0.62	0.51	MP51
	Piperacilina	1.19	2.01	MP51 (muy marcada)
	Gentamicina	0.47	1.2	MP51 (marcada)
P59 vs. WT-GFP	Amoxicilina	-0.2	-0.55	WT-GFP
	Cefotaxima	0.36	0.32	P59
	Piperacilina	1	1.9	P59 (muy marcada)
	Gentamicina	0.56	0.89	P59 (marcada)

Los índices de competencia [$\log_{10}(\text{IC})$] se calcularon a partir de la proporción relativa entre la población mutante y la población WT-GFP durante los experimentos de competencia bacteriana realizados a las 3 y 6 horas de incubación en presencia de amoxicilina, cefotaxima, piperacilina y gentamicina. Valores de $\log_{10}(\text{IC})$ mayores que 0 indican predominio competitivo de las clonas mutantes, mientras que valores menores que 0 reflejan predominio de la cepa WT-GFP.

7.4. Comparación entre fases evolutivas

Con el objetivo de evaluar el efecto de la historia evolutiva sobre la capacidad competitiva de las clonas resistentes, se comparó el porcentaje promedio de población GFP positiva entre las clonas derivadas de la fase 1 (D3 y D8) y de la fase 3 (MP51 y P59) en presencia de los distintos antibióticos evaluados (Fig. 11).

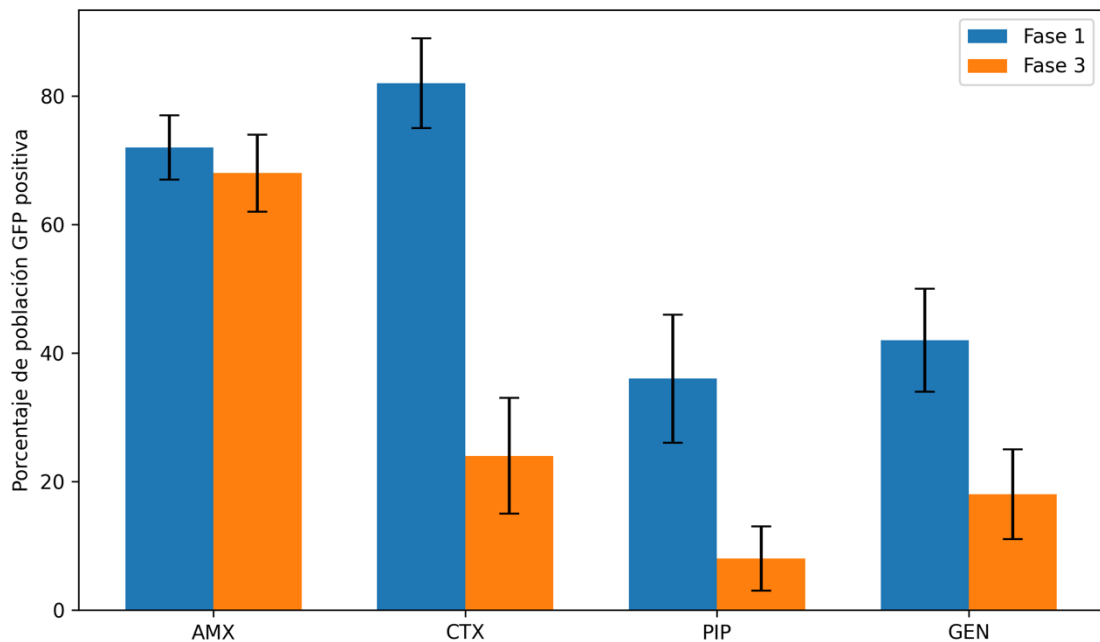


Figura 11. Comparación de poblaciones GFP positivas entre fases evolutivas bajo una fuerte presión de ampicilina. Comparación del porcentaje promedio de población GFP positiva entre clonas derivadas de la fase 1 (D3 y D8) y de la fase 3 (MP51 y P59) durante los experimentos de competencia bacteriana realizados en presencia de amoxicilina (AMX), cefotaxima (CTX), piperacilina (PIP) y gentamicina (GEN). Las barras representan el promedio de las poblaciones GFP positivas y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los porcentajes más bajos de población GFP positiva indican una mayor ventaja competitiva de las clonas mutantes frente a la cepa WT-GFP.

En presencia de amoxicilina (AMX), ambas fases (1 y 3) mostraron porcentajes elevados de población GFP positiva, con valores promedio cercanos al 70 %, lo que indica que la cepa *E. coli* MG1655 WT-GFP mantuvo el predominio competitivo independientemente del tiempo evolutivo de las clonas (Fig. 11). Este resultado sugiere que la evolución bajo presión fuerte de amoxicilina no confirió una ventaja competitiva adicional frente a este antibiótico.

En contraste, las diferencias entre fases fueron más evidentes en presencia de cefotaxima (CTX). Mientras que las clonas de fase 1 presentaron un porcentaje promedio de población GFP positiva superior al 80 %, las clonas de fase 3 mostraron una reducción marcada hasta aproximadamente el 24 % (Fig. 11). Esta disminución indica una pérdida importante de competitividad de la cepa WT-GFP y una ventaja competitiva significativa de las clonas evolucionadas en fases más tardías de la selección.

Un patrón similar se observó con piperacilina (PIP) y gentamicina (GEN). En ambos casos, las clonas de fase 3 presentaron porcentajes de población WT-GFP positiva considerablemente menores que las clonas de fase 1 (Fig. 11). Para piperacilina, el porcentaje promedio de población GFP positiva disminuyó de aproximadamente 36 % en fase 1 a 8 % en fase 3, mientras que para gentamicina se redujo de aproximadamente 42 % a 18 % (Fig. 11). Estos resultados indican que las clonas derivadas de la fase 3 desplazaron con mayor eficacia a la cepa WT-GFP durante los experimentos de competencia.

En conjunto, estos resultados muestran que el avance de la evolución experimental bajo una fuerte presión de ampicilina estuvo asociado con una reducción progresiva de las poblaciones WT-GFP positivas frente a cefotaxima, piperacilina y gentamicina. Debido a que menores porcentajes de población GFP positiva reflejan una mayor proporción de células mutantes en la mezcla competitiva, estos datos sugieren un incremento gradual de la capacidad competitiva y una expansión de los perfiles de resistencia cruzada a medida que avanzó el proceso evolutivo. Particularmente, la transición de la fase 1 a la fase 3 estuvo acompañada por la aparición de una ventaja competitiva frente a cefotaxima, además de la ya observada frente a piperacilina y gentamicina, lo que respalda la hipótesis de que la historia evolutiva influye en la respuesta posterior de las poblaciones bacterianas frente a distintos antibióticos.

7.5. Resistencia cruzada y sensibilidad colateral

Con el fin de integrar y facilitar la interpretación de los resultados de los experimentos de competencia bacteriana, se elaboró una tabla resumen del comportamiento observado de cada clona frente a los distintos antibióticos evaluados (Tabla 6). Esta clasificación se construyó a partir de los porcentajes

de población GFP positiva y de los índices de competencia obtenidos mediante citometría de flujo. Para cada condición experimental, se consideró que existía predominio de la clona mutante cuando los porcentajes de población GFP positiva disminuían y los índices de competencia indicaban una ventaja de la población mutante sobre la cepa de referencia. Por el contrario, cuando predominó la población GFP positiva y los índices de competencia favorecieron a la cepa de referencia, la condición se clasificó como WT. De esta manera, la Tabla 6 resume cualitativamente los patrones observados en los análisis previos y permite comparar globalmente la respuesta de las distintas clonas frente a los antibióticos evaluados.

Las clonas D3 y D8, aisladas durante las primeras etapas de la evolución bajo presión de ampicilina, mostraron una ventaja frente a piperacilina y gentamicina, sin embargo, cuando se evaluaron en presencia de amoxicilina y cefotaxima, la cepa de referencia WT-GFP continuó siendo la población predominante (Tabla 6). Esto indica que, en esta etapa temprana de la evolución, los cambios acumulados por las bacterias aún no eran suficientes para conferirles una ventaja frente a todos los antibióticos estudiados.

En contraste, las clonas MP51 y P59, obtenidas en etapas más tardías del experimento, presentaron una ventaja no solo frente a piperacilina y gentamicina, sino también frente a cefotaxima (Tabla 6), lo cual recuerda a lo observado en las gráficas de competencia, donde las poblaciones GFP positivas disminuyeron considerablemente en presencia de estos antibióticos.

Al comparar ambos grupos de clonas, se observa que la capacidad de competir frente a otros antibióticos aumentó conforme avanzó el proceso evolutivo. Mientras que las clonas de la fase 1 mostraron ventaja frente a dos antibióticos, las clonas de la fase 3 fueron capaces de hacerlo frente a tres (Tabla 6). Esto sugiere que los cambios seleccionados durante la evolución bajo una fuerte presión de ampicilina tuvieron efectos que fueron más allá de este antibiótico y también influyeron en la respuesta frente a otros compuestos relacionados.

Por otro lado, ninguna de las clonas mostró una ventaja clara frente a amoxicilina. En todas las condiciones evaluadas con este antibiótico, la cepa WT-GFP se mantuvo como la población predominante (Tabla 6). Aunque este resultado podría sugerir una limitación de la capacidad adaptativa de las clonas

frente a este compuesto, los datos obtenidos no permiten concluir la existencia de una sensibilidad colateral.

En conjunto, estos resultados muestran que la evolución bajo presión fuerte de ampicilina modificó gradualmente la respuesta de las bacterias frente a otros antibióticos. Además, sugieren que las clonas obtenidas en etapas más avanzadas del experimento desarrollaron una mayor capacidad de competir y sobrevivir en presencia de distintos antibióticos, lo que evidencia patrones compatibles con una expansión progresiva de la resistencia cruzada.

Tabla 6. Resumen de los perfiles de competencia bacteriana de clonas evolucionadas bajo presión fuerte de ampicilina frente a distintos antibióticos.

Fase	Cepa	Antibiótico			
		Amoxicilina	Cefotaxima	Piperacilina	Gentamicina
Fase 1	D3	WT	WT	Mut	Mut
	D8	WT	WT	Mut	Mut
Fase 3	MP51	WT	Mut	Mut	Mut
	P59	WT	Mut	Mut	Mut

Clasificación fenotípica elaborada a partir de los porcentajes de población GFP positiva y de los índices de competencia obtenidos mediante citometría de flujo en los experimentos de competencia bacteriana. La categoría **Mut** indica predominio de la clona evolucionada sobre la cepa de referencia *E. coli* MG1655 WT-GFP, mientras que **WT** indica predominio de la cepa de referencia. La tabla resume los patrones observados en las clonas pertenecientes a la fase 1 (D3 y D8) y a la fase 3 (MP51 y P59) de la evolución experimental bajo presión fuerte de ampicilina, lo que permite identificar tendencias compatibles con resistencia cruzada frente a los antibióticos evaluados.

8. DISCUSIÓN

La determinación de los valores de MIC e IC50 permitió establecer las concentraciones de antibióticos empleadas en los experimentos de competencia bacteriana. Además, la comparación entre las cepas *E. coli* MG1655 WT y MG1655 WT-GFP evidenció que, en general, ambas cepas presentaron perfiles de susceptibilidad similares frente a los antibióticos evaluados. Aunque se observaron diferencias en algunos valores de MIC, particularmente en piperacilina y gentamicina, los valores de IC50 fueron relativamente similares entre ambas cepas. Esto sugiere que la expresión de GFP no modificó de manera significativa el comportamiento fisiológico general de la cepa utilizada como referencia en los ensayos de competencia. Este aspecto es particularmente relevante porque diversos estudios han señalado que la introducción de plásmidos o marcadores fluorescentes puede generar costos fisiológicos asociados a la replicación del ADN plasmídico, a la síntesis de proteínas heterólogas o a alteraciones metabólicas que afectan el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en este estudio dichas diferencias no parecen haber sido suficientemente grandes como para comprometer la utilidad de la cepa WT-GFP como población de referencia.

Los experimentos de competencia aportaron información que no puede obtenerse únicamente mediante pruebas de susceptibilidad. Mientras que parámetros como la MIC o la IC50 permiten conocer la respuesta de una población frente a un antibiótico, los ensayos de competencia muestran qué tan eficiente es una cepa para crecer y desplazar a otra cuando ambas comparten el mismo ambiente. Gracias al uso de la cepa WT-GFP fue posible seguir ambas poblaciones mediante citometría de flujo y cuantificar los cambios en su abundancia relativa a lo largo del tiempo.

Los resultados mostraron que la respuesta de las clonas evolucionadas dependió tanto del antibiótico como del momento evolutivo en el que fueron aisladas. Las clonas D3 y D8, obtenidas en etapas tempranas del experimento, mostraron ventaja competitiva frente a piperacilina y gentamicina, mientras que las clonas MP51 y P59, aisladas en fases más tardías, además presentaron ventaja frente a cefotaxima. Esto sugiere que la evolución bajo presión fuerte de ampicilina produjo cambios que se fueron acumulando gradualmente y que

permitieron a las bacterias responder favorablemente ante un mayor número de antibióticos.

La aparición de una ventaja competitiva frente a cefotaxima y piperacilina resulta particularmente interesante, ya que ambos antibióticos, al igual que la ampicilina, pertenecen a la familia de los β -lactámicos. Diversos estudios han mostrado que la exposición prolongada a un β -lactámico puede favorecer la aparición de resistencia cruzada a otros compuestos con mecanismos de acción similares (Gross *et al.*, 2024; Uhland *et al.*, 2023). Los resultados obtenidos en este trabajo son congruentes con estas observaciones y sugieren que las adaptaciones seleccionadas durante la evolución con ampicilina pudieron conferir ventajas frente a otros β -lactámicos.

También fue notable la ventaja observada frente a la gentamicina, un antibiótico de una familia diferente y cuyo blanco celular no está relacionado con la síntesis de la pared celular. Este resultado ha sido reportado previamente en estudios de evolución experimental y suele asociarse con mecanismos más generales, como cambios en la permeabilidad de la membrana o en los sistemas de transporte y expulsión de compuestos (Lázár *et al.*, 2014). Por lo tanto, es posible que algunas de las adaptaciones adquiridas durante la evolución bajo presión de ampicilina hayan tenido efectos en varios procesos celulares y no únicamente en la respuesta a los β -lactámicos.

La comparación entre las clonas de las fases 1 y 3 mostró que las poblaciones aisladas en etapas más avanzadas fueron capaces de competir con éxito frente a un mayor número de antibióticos. Esto coincide con estudios previos que han demostrado que la historia evolutiva puede influir de manera importante en las respuestas futuras de las bacterias, ya que las mutaciones acumuladas durante las primeras etapas de adaptación condicionan las posibilidades evolutivas posteriores (Kryazhimskiy *et al.*, 2014). En este sentido, los resultados sugieren que la evolución bajo presión fuerte de ampicilina favoreció una expansión progresiva de perfiles compatibles con la resistencia cruzada.

Por otro lado, aunque las clonas evolucionadas no mostraron ventaja competitiva frente a amoxicilina, los resultados no permiten concluir la existencia de sensibilidad colateral. Para demostrar este fenómeno habría sido necesario comparar directamente parámetros de susceptibilidad, como MIC o IC50, entre

las clonas evolucionadas y la cepa ancestral. Por lo tanto, la evidencia obtenida indica que las adaptaciones seleccionadas bajo presión de ampicilina no proporcionaron una ventaja frente a amoxicilina, pero no permite afirmar que hayan incrementado la susceptibilidad a este antibiótico.

En conjunto, los resultados muestran que la evolución bajo presión fuerte de ampicilina produjo cambios que trascendieron la resistencia al antibiótico seleccionada. Las clonas aisladas en etapas más avanzadas del experimento desarrollaron una mayor capacidad de competir en presencia de cefotaxima, piperacilina y gentamicina, lo que sugiere una expansión gradual de perfiles compatibles con la resistencia cruzada. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la historia evolutiva de las poblaciones bacterianas para comprender cómo surgen y se diversifican las resistencias a los antibióticos.

9. CONCLUSIONES

- Las clonas evolucionadas bajo presión fuerte de ampicilina mostraron ventajas competitivas frente a distintos antibióticos, las cuales dependieron del momento evolutivo en que fueron aisladas.
- Las clonas de fase 3 presentaron una ventaja competitiva frente a un mayor número de antibióticos que las clonas de fase 1, lo que indica una acumulación progresiva de adaptaciones durante la evolución experimental.
- Los resultados obtenidos son compatibles con la presencia de resistencia cruzada, específicamente frente a cefotaxima, piperacilina y gentamicina.
- Los resultados demuestran que la evolución bajo presión fuerte de ampicilina modificó la respuesta de *E. coli* frente a otros antibióticos y que la historia evolutiva influye en la capacidad adaptativa de las poblaciones bacterianas.

10. REFERENCIAS

- Akram, F., Imtiaz, M. y Haq, I.U. (2022). Emergent crisis of antibiotic resistance: A silent pandemic threat to 21st century. *Microbial Pathogenesis*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105923>
- Alós J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Aminov, R.I. (2009). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers In Microbiology*, 1(134). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Andersson, D.I. y Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 260–271.
- Andersson, D.I. y Hughes, D. (2017). Selection and transmission of Antibiotic-Resistant bacteria. *Microbiology spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0013-2016>
- Andersson, D.I. y Levin, B.R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion In Microbiology*, 2(5), 489-493. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(99\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(99)00005-3)
- Årdal, C., Balasegaram, M., Laxminarayan, R., McAdams, D., Outtersson, K., Rex, J.H. y Sumpradit, N. (2019). Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 267-274. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0293-3>
- Barbosa, C., Trebosc, V., Kemmer, C., Rosenstiel, F., Beardmore, R., Schulenburg, H. y Jansen, G. (2017). Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects. *Molecular Biology and Evolution*, 38(6):2229–2244.
- Barrick, J.E. y Lenski, R.E. (2013). Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*, 14, 827–839.
- Baweja, R., Singh, M., Shukla, S., Ravi, R., Ahmad, R. y Mishra, A. (2025). Antimicrobial resistance: Mechanism, causes, prevention and societal impact. *The Microbe*, 9(100617). <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100617>

- Belanger, C.R. y Hancock, R.E.W. (2021). Testing physiologically relevant conditions in minimal inhibitory concentration assays. *Nature Protocols*, 16(8), 3761-3774. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00572-8>
- Benítez-Colio, L.R. y Osuna-Martínez, C.C. (2024). Bacterias: aliadas en la ecología y la biorremediación. *Elementos*, 139, 43-46.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlín, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F. y Martínez, J.L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 310–317.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. y Piddock, L.J.V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blount, Z.D., Lenski, R.E. y Losos, J.B. (2018). Contingency and determinism in evolution: replaying life's tape. *Science*, 362(6415).
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Camacho-Silvas, L.A., Portillo-Gallo, J.H., Rivera-Cisneros, A.E., Sánchez-González, J.M., Franco-Cendejas, R., Duque-Rodríguez, J., Veloz-Méndez, G. y Ishida-Gutiérrez, C. (2021). Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. *Cirugía y Cirujanos*, 89(4), 426-434. <https://doi.org/10.24875/ciru.20000304>
- Card, K.J., LaBar, T., Gomez, J.B. y Lenski, R.E. (2019). Historical contingency in the evolution of antibiotic resistance after decades of relaxed selection. *PLoS Biology*, 17(10).
- Cisneros-Mayoral, S., Graña-Miraglia, L., Pérez-Morales, D., Peña-Miller, R. y Fuentes-Hernández, A. (2022). Evolutionary history and strength of selection determine the rate of antibiotic resistance adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, 39(9). <https://doi.org/10.1093/molbev/msac185>
- Cobos-Trigueros, N., Ateka, O., Pitart, C. y Vila, J. (2009). Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(7), 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.002>

- Cook, M.A. y Wright, G.D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, 14.
- Cué-Brugueras, M., Morejón-García, M. y Morejón-García, R. (2005). Actualidad de las quinolonas. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152005000100011&script=sci_arttext&tlng=pt
- Davies, J. y Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433
- De la Fuente-Salcido, N.M., Villarreal-Prieto, J.M. y Díaz-León, M.A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(2). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007
- De Pascale, G. y Wright, G.D. (2010). Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. *ChemBioChem*, 11(10), 1325-1334. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000067>
- Elshobary, M., Badawy, N., Ashraf, Y. y Zatioun, A. (2025). Lucha contra la resistencia a los antibióticos: mecanismos, patógenos multirresistentes y nuevos enfoques terapéuticos: una revisión actualizada. *Pharmaceuticals*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/ph18030402>
- Etebu, E. y Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal Of Applied Microbiology And Biotechnology Research*, 4, 90-101.
- Gaub, A. y Miraz-Rahman, K. (2023). Evaluación de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gramnegativas. *Antibióticos*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>
- Gómez, J., Garcia-Vazquez, E. y Hernandez-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la clínica práctica. *Revista Española de Quimioterapia. Suplemento*, 28(1), 1-9. <https://medes.com/publication/96108>
- Gross, R., Yelin, I., Lázár, V., Datta, M.S. y Kishony, R. (2024). Rutas evolutivas dependientes e independientes de la betalactamasa hacia la resistencia de alto nivel a la ampicilina. *Nat Commun* 15, 5383. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49621-2>

- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7).
- Hernando-Amado, S., Laborda, P. y Martínez, J.L. (2023). Tackling antibiotic resistance by inducing transient and robust collateral sensitivity. *Nature Communications*, 14(1), 1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37357-4>
- Imamovic, L. y Sommer, M.O.A. (2013). Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. *Science Translational Medicine*, 5(204).
- Kadam, S. (1994). *Mechanism-Based Screens in the Discovery of Chemotherapeutic Antibacterials*. Elsevier eBooks, 26, 247-266. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-9003-4.50014-9>
- Kapoor, G., Saigal, S. y Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal Of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3). https://doi.org/10.4103/joacp.joacp_349_15
- Kryazhimskiy, S., Rice, D.P., Jerison, E.R. y Desai, M.M. (2014). Global epistasis makes adaptation predictable despite sequence-level stochasticity. *Science*, 344(6191), 1519-1522. <https://doi.org/10.1126/science.1250939>
- Lázár, V., Nagy, I., Spohn, R., Csörgő, B., Györkei, Á., Nyerges, Á., Horváth, B., Vörös, A., Busa-Fekete, R., Hrtyan, M., Bogos, B., Méhi, O., Fekete, G., Szappanos, B., Kégl, B., Papp, B. y Pál, C. (2014). Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. *Nature Communications*, 5(1), 4352. <https://doi.org/10.1038/ncomms5352>
- Levin, B.R., Lipsitch, M., Perrot, V., Schrag, S., Antia, R., Simonsen, L., Walker, N.M. y Stewart, F.M. (1997). The Population Genetics of Antibiotic Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement_1), S9-S16. https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement_1.s9
- Levin, B.R., Perrot, V. y Walker, N. (2000). Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, 154(3), 985–997.

- Lukačšínová, M., Fernando, B. y Bollenbach, T. (2020). Highly parallel lab evolution reveals that epistasis can curb the evolution of antibiotic resistance. *Nature Communications*, 11(1), 3105.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16932-z>
- Mahrt, N., Tietze, A., Künzel, S., Franzenburg, S., Barbosa, C., Jansen, G., Schulenburg, H. (2021). Bottleneck size and selection level reproducibly impact evolution of antibiotic resistance. *Natural Ecological Evolution*, 5(9), 1233-1242. DOI: 10.1038/s41559-021-01511-2.
- Martínez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893–2902.
- Mayoral-Álvarez, S. G. (2022). *Evolución de resistencia a antibióticos en ambientes con estructura espacio-temporal*. [Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM].
- McPhee, J.B., Tamber, S., Brazas, M.D., Lewenza, S. y Hancock, R.E.W. (2009). *Antibiotic Resistance Due to Reduced Uptake*. En Humana Press eBooks (pp. 97-110). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2_9
- Melnyk, A.H., Wong, A. y Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 8(3), 273–283.
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656.
<https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003>
- Obolski, U., Dellus-Gur, E., Stein, G.Y. y Hadany, L. (2016). Antibiotic cross-resistance in the lab and resistance co-occurrence in the clinic: Discrepancies and implications in *E. coli*. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.017>
- Oz, T., Guvenek, A., Yildiz, S., Karaboga, E., Talha-Tamer, Y., Mumcuyan, N., Ozan, V.B., Senturk, G.H., Cokol, M., Yeh, P. y Toprak, E. (2014). Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 31(9), 2387–2401.
- Pál, C., Papp, B. y Lázár, V. (2015). Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends in Microbiology*, 23(7), 401–407.
- Peterson, L.R. (2008). Currently available antimicrobial agents and their potential for use as monotherapy. *Clin Microbial. Infect.* 14(6), 30-45.

- Planson, A., Carbonell, P., Grigoras, I. y Faulon, J. (2011). Engineering antibiotic production and overcoming bacterial resistance. *Biotechnology Journal*, 6(7), 812-825. <https://doi.org/10.1002/biot.201100085>
- Roemhild, R. y Andersson, D.I. (2021). Mechanisms and therapeutic potential of collateral sensitivity to antibiotics. *PLoS Pathogens*, 17(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009172>
- Seija, V. y Vignoli. (2006). Principales grupos de antibióticos. En *Temas de bacteriología y virología médica* (2.^a ed., pp. 631-647). Oficina del libro FEFMUR.
- Sermet, K. y Alfandari, S. (2021). Aminoglucósidos. *EMC - Tratado de Medicina*, 25(4), 1-4. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(21\)45710-7](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(21)45710-7)
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S.M.D. y Kamal, M.A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 22(1), 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
- Singh, S.B., Young, K. y Silver, L.L. (2017). What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.003>
- Suárez, C. y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Szybalski, W. y Bryson, V. (1952). Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents, I. *Journal Of Bacteriology*, 64(4), 489-499. <https://doi.org/10.1128/jb.64.4.489-499.1952>
- Talaro, K.P. y Chess, B. (2008). *Foundations in microbiology*. 8th Ed. McGraw Hill, New York.
- Tang, X., Chang, S., Qiao, W., Luo, Q., Chen, Y., Jia, Z., Coleman, J., Zhang, K., Wang, T., Zhang, Z., Zhang, C., Zhu, X., Wei, X., Dong, C., Zhang, X. y Dong, H. (2020). Structural insights into outer membrane asymmetry maintenance in Gram-negative bacteria by MlaFEDB. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(1), 81-91. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00532-y>
- Tarín-Pelló, A., Suay-García, B. y Pérez-Gracia, M.T. (2022). Antibiotic Resistant bacteria: Current situation and treatment options to accelerate the

- development of a new antimicrobial arsenal. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 20(8), 1095-1108.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2022.2078308>
- Tavares-Carreón, F., De Anda-Mora, K., Rojas-Barrera, I.C. y Andrade, A. (2023). *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ*, 11.
<https://doi.org/10.7717/peerj.14399>
- Toprak, E., Verez, A., Michel, J.B., Chait, R., Hartl, D.L. y Kishony, R. (2012). *Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection*. *Nature Genetics*, 44, 101–105.
- Uhland, F.C., Li, X., Mulvey, M.R., Reid-Smith, R., Sherk, L.M., Ziraldo, H., Jin, G., Young, K.M., Reist, M. y Carson, C.A. (2023). Extended spectrum B-Lactamase-Producing enterobacterales of shrimp and salmon available for purchase by consumers in Canada—A risk profile using the CODEX framework. *Antibiotics*, 12(9), 1412.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12091412>
- Upmanyu, N. y Malviya, V.N. (2020). Antibiotics: mechanisms of action and modern challenges. *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*, 367-382. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819001-2.00018-8>
- Varela, M.F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L.M., Hernandez, A.J., Parvathi, A. y Kumar, S.H. (2021). Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, 10(5), 593.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
- Weinreich, D.M., Delaney, N.F., Depristo, M.A. y Hartl, D.L. (2006). Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science*, 312(5770), 111–114.
- World Health Organization: WHO. (2023, 21 noviembre). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>