

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



UANL

DETERMINACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE GENES
RESISTENTES EN *ESCHERICHIA COLI*: SEGUIMIENTO DE
SU TRAYECTORIA EVOLUTIVA HACÍA SU RESISTENCIA AL
CIPROFLOXACINO.

POR:

SILVIA PAOLA RAMÍREZ JIMÉNEZ

Como requisito para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
Orientación en Microbiología Aplicada.

febrero 2026

Determinación y Descripción de Genes Resistentes en *Escherichia coli*: Seguimiento de su Trayectoria Evolutiva Hacia su Resistencia al Ciprofloxacino.

Los miembros del comité de tesis aprueban la tesis realizada por el alumno **Silvia Paola Ramírez Jiménez** con matrícula **1830110**, como opción al grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada.

Aprobado: _____



Dr. José Rubén Morones Ramírez

Asesor de tesis

Aprobado: _____

Dr. Javier Alberto Garza Cervantes

Co-asesor de tesis

Aprobado: _____

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Evaluador

Aprobado: _____

Dr. María Elena Cantú Cardenas

Evaluador

Aprobado: _____

Dr. Xristo Zarate Kalfopulos

Evaluador

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la vida, a mis padres, a mi hermano, a mi David y amistades.

Al iniciar este trabajo, me detengo en una idea fundamental que, aunque a veces pasa desapercibida entre metodologías, datos y teorías, constituye el alma de toda empresa educativa y científica genuina: la vocación.

La vocación no es solo un llamado, sino una chispa interior que transforma el aprendizaje en un viaje de descubrimiento y la enseñanza en un acto de acompañamiento. En un mundo que a menudo prioriza los resultados sobre los procesos, las calificaciones sobre la comprensión y la especialización sobre una visión amplia, recordar la importancia de esta chispa es más crucial que nunca.

Se trata de fomentar ese deseo innato de aprender, de cultivar la curiosidad hasta convertirla en una herramienta sólida y constante para explorar la realidad. Nuestro papel, como el que busco mediante esta maestría, es ser guía, es abrir caminos: mostrar las múltiples puertas del conocimiento, proporcionar las herramientas para abrirlas y, posteriormente, ofrecer el espacio necesario para que cada estudiante decore su propia habitación en la casa del saber.

En este camino, no debemos perder de vista el punto fundamental que da sentido a toda ciencia, por compleja que sea: su capacidad para ayudarnos a comprender, con mayor sencillez y claridad, la vida. La ciencia, en su esencia más pura, no es un conjunto de fórmulas inaccesibles. Es, quizás, la expresión más organizada de nuestro asombro ante el mundo. Es el intento paciente de desenredar, con humildad y rigor, los hilos de la existencia. Cada concepto, cada teoría, cada pequeño hallazgo es una lente que nos permite ver un poco mejor el paisaje de lo que nos rodea y de nosotros mismos.

Índice general

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 La Crisis de la Resistencia Antimicrobiana: Importancia Global, Contexto Clínico y Económico	1
1.2 La Vigilancia de la RAM y la Necesidad de Métodos de Alerta Temprana	4
1.3 Marco del Estudio y Modelos Biológicos	5
1.3.1 Ciprofloxacino: La Molécula y Mecanismo de Acción	5
1.3.2 El Dispositivo MEGA-Plate (Microbial Evolution and Growth Arena)	6
1.3.3 Escherichia coli ATCC 11229: El Modelo Biológico	6
1.4 Antecedentes Relevantes	7
1.5 Aportación Científica	7
Capítulo 2. Antecedentes y Marco Teórico	8
2.1 Mecanismos Genéticos Clásicos de Resistencia a Fluoroquinolonas en <i>E. coli</i>	8
2.2 El Marco Evolutivo: Paisajes Adaptativos, Costo de Aptitud y la Respuesta Fenotípica Temprana	9
2.3 Plataformas Experimentales y el Futuro de la Vigilancia Integrada Fenotipo-Genotipo	11
2.4 Síntesis y Brecha de Conocimiento	12
Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos	13
3.1 Hipótesis	13
3.2 Objetivos	14
3.2.1 Objetivo General	14
3.2.2 Objetivos Específicos	14
Capítulo 4. Metodología Experimental	16
4.1 Materiales y Reactivos	16
4.1.1 Cepas Bacterianas y MIC inicial	20
4.2 Diseño, Preparación y Esterilización del Sistema MEGA-plate	21
4.2.1 Preparación de Medios y Estratificación con Gradiente de Antibiótico	21
4.3 Inoculación y Evolución Experimental	22
4.4 Aislamiento de cepas evolucionadas	23
4.5 Procesamiento y Preservación de Cepas Evolucionadas (C1-C5)	23
4.5.1 Preparación de Tinción Gram	23
4.6 Examen Morfológico de las Cepas Mediante SEM y TEM	24
4.6.1 Preparación para Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	24

4.6.2	Preparación para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	25
4.6.3	Procesamiento de Imágenes y Análisis Cuantitativo de Datos	26
4.7	Evaluación del crecimiento mediante Densidad Óptica y Capacidad de formación de Biofilm	29
4.8	Análisis Genotípico	30
4.8.1	Identificación y Agrupación de Secuencias	30
Capítulo 5. Resultados		32
5.1	Determinación de la MIC del Control	32
5.2	Crecimiento en Sistema MEGA-plate tras 12 días	33
5.3	Fenotipo de Crecimiento y Costo de Aptitud de las Cepas Evolucionadas	34
5.4	Fenotipos Morfológicos y de Susceptibilidad Visual Preliminar	36
5.4.1	Morfología Macroscópica de Colonias	36
5.4.2	Morfología Celular (Microscopía Óptica)	38
5.5	Micrografías	39
5.5.1	SEM	39
5.5.2	TEM	41
5.6	Confirmación de la Cepa de Control y Análisis Genómico de Tipo Silvestre	43
5.7	Análisis Cuantitativo de la Morfología y Ultraestructura Bacteriana	44
5.7.1	Dinámica Morfométrica (SEM)	44
5.7.2	Caracterización Ultraestructural Intracelular (TEM)	45
Capítulo 6. Discusión y Perspectivas		48
6.1	Discusión de Resultados	48
6.1.1	La Cinética de Crecimiento y el Costo de Aptitud: Evidencia de un Paisaje Adaptativo Rugoso	49
6.1.2	Biofilm y Morfología: Estrategias Fenotípicas de Supervivencia y Persistencia	50
6.1.3	Correlación Fenotipo-Genotipo: De la Morfología a la Mutación	51
6.1.4	Validación Ultraestructural: El Costo Adaptativo se Hace Visible	52
6.1.5	La Morfología como Biomarcador Predictivo: Convergencia con Enfoques de Inteligencia Artificial	52
6.1.6	Implicaciones y Perspectivas: Hacia una Vigilancia Predictiva de la RAM	54
Capítulo 7. Conclusiones		55
7.1	Ciclo Evolutivo de Resistencia: Desestabilización y Recuperación Fenotípica	57
7.2	Perspectivas e Innovación Científica	59

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema del mecanismo de acción de CIP en <i>E. coli</i> y de resistencia . . .	4
Figura 2 – Estructura química del ciprofloxacino	5
Figura 3 – Ejemplo gráfico de vertido de MIC en el sistema MEGA-plate.	22
Figura 4 – Expansión de <i>E. coli</i> en gradiente de ciprofloxacino	33
Figura 5 – Cinética de crecimiento y costo de aptitud de cepas evolucionadas . . .	34
Figura 6 – Cuantificación de biomasa de biofilm en cepas evolucionadas	35
Figura 7 – Morfología colonial de las cepas evolucionadas en placa	36
Figura 8 – Morfología celular de las cepas evolucionadas (Tinción de Gram)	39
Figura 9 – Micrografías SEM de <i>E. coli</i> para los carriles C1-C5.	40
Figura 10 – Micrografías TEM de <i>E. coli</i> para los carriles C1-C5.	42
Figura 11 – Análisis por Electroforesis en Gel de Agarosa de ADN de <i>E. coli</i>	43
Figura 12 – Dinámica de la elongación celular (<i>Aspect Ratio</i>) en <i>E. coli</i>	45
Figura 13 – Integridad superficial (<i>Solidity</i>) de la envoltura celular en <i>E. coli</i>	45
Figura 14 – Densidad Electrónica Relativa del citoplasma bacteriano (TEM)	46
Figura 15 – Heterogeneidad del nucleoide bacteriano – <i>Standard Deviation</i> (TEM) .	46
Figura 16 – Diagrama de dispersión bivalente de la ultraestructura celular (TEM) .	47

Índice de tablas

Tabla 1 – Materiales y equipos utilizados en el experimento MEGA-plate para evolución de resistencia en <i>E. coli</i>	16
Tabla 2 – Parámetros morfométricos configurados en <i>Set Measurements</i> de <i>Fiji</i> para el análisis de imágenes de SEM.	27
Tabla 3 – Parámetros analíticos configurados en <i>Set Measurements</i> de <i>Fiji</i> para el análisis de imágenes de TEM.	28
Tabla 4 – Ensayo de microdilución para determinar la MIC de ciprofloxacino en <i>E. coli</i> ATCC 11229	32
Tabla 5 – Mutaciones observadas en la posición 83 de la región QRDR del gen <i>gyrA</i> en las cepas evolucionadas de <i>E. coli</i>	44

Lista de abreviaciones

AA	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AR	<i>Aspect Ratio</i> (Índice de Elongación)
CIP	Ciprofloxacino
DO	Densidad Óptica
DO590	Densidad Óptica a 590 nm (para cuantificación de biofilm)
DO600	Densidad Óptica a 600 nm (para cinética de crecimiento)
FQ	Fluoroquinolonas
IA	Inteligencia Artificial
IQR	Rango Intercuartil (del inglés <i>Interquartile Range</i>)
MDR	Multidrogorresistente
MEGA-plate	<i>Microbial Evolution and Growth Arena</i>
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria (del inglés <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MSA	Alineación de Secuencia Múltiple (del inglés <i>Multiple Sequence Alignment</i>)
O/N	Cultivo <i>Overnight</i> (cultivo de un día para otro)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Paisaje Adaptativo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QRDR	Región Determinante de Resistencia a Quinolonas
RAM	Resistencia a los Antimicrobianos
ROI	Región de Interés (del inglés <i>Region of Interest</i>)
rRNA	ARN Ribosomal

SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (del inglés <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SNPs	Polimorfismos de Nucleótido Único (del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión (del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
WT	Tipo Silvestre (del inglés <i>Wild Type</i>)
XDR	Panresistente
pb	pares de bases
μg/mL	microgramo por mililitro
g/mL	gramo por mililitro
cm	centímetro
μL	microlitro
mL	mililitro
min	minuto
h	hora
nm	nanómetro
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
°C	grados Celsius
v/v	volumen/volumen
×	aumento o multiplicación

Resumen

La Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) representa una de las crisis de salud pública más apremiantes a nivel global. El uso generalizado de antibióticos ha impulsado la selección y evolución de cepas bacterianas Multidrogorresistentes (MDR) y Panresistentes (XDR), lo que reduce drásticamente la eficacia de los tratamientos clínicos. En este contexto, las Fluoroquinolonas (FQ), y en particular el Ciprofloxacino (CIP), son fármacos de amplio espectro de importancia crítica en la medicina humana y veterinaria; sin embargo, su efectividad está comprometida por el surgimiento de resistencia en patógenos clave como es el caso de *Escherichia coli*. La evolución de esta resistencia suele ser un proceso escalonado y complejo, que involucra mutaciones genéticas específicas que confieren ventajas de supervivencia bajo presión selectiva.

El objetivo principal de este estudio fue analizar la morfología y tiempo de crecimiento de las bacterias para notar cambios en respuesta a la resistencia antimicrobiana, así como determinar y describir los genes resistentes en *E. coli*, siguiendo y caracterizando su trayectoria evolutiva hacia la resistencia al CIP. Se buscó la evolución de la resistencia bajo un gradiente de concentración de antibiótico en un recinto evolutivo llamado Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA-plate), para conseguir los gradientes fue necesario determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y posterior a la obtención de cepas, analizar sus fenotipos de crecimiento y formación de biofilm; así como identificar y caracterizar las mutaciones genéticas que confieren resistencia, con énfasis en la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas

(QRDR) del gen *gyrA*.

Para simular la evolución bacteriana en un ambiente espacialmente heterogéneo y bajo presión de selección, se empleó la técnica del MEGA-plate (Microbial Evolution and Growth Arena) [1]. Este modelo permite observar la adaptación y evolución de las bacterias a medida que migran desde zonas sin antibiótico, siendo esta cepa nuestra cepa *Wild Type* (WT), hacia zonas con concentraciones progresivamente crecientes de CIP. El crecimiento y la adaptación continua resultaron en la selección de cepas con distintos niveles de resistencia.

Las cepas aisladas de las zonas de alta concentración de antibióticos fueron sometidas a una caracterización fenotípica, donde se evaluó su cinética de crecimiento mediante Densidad Óptica (DO600) para identificar posibles costos biológicos asociados a la resistencia. Además, se analizó la formación de biofilm, cuantificada por (DO590) y se realizó un examen morfológico mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM) para detectar cambios estructurales en la superficie o membrana celular, para realizar una correlación con el análisis molecular de las cepas resistentes. Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación, se aisló y analizó el material genético de interés. El análisis bioinformático posterior, mediante la Alineación de Secuencia Múltiple (MSA), reveló la aparición de Sustituciones de Nucleótidos (SNPs) específicas en las cepas resistentes.

Se confirmó que la principal ruta evolutiva para la resistencia a CIP se asocia a mutaciones puntuales en el gen *gyrA*, específicamente en la región QRDR. Estas mutaciones resultan en cambios de Aminoácidos (AA) que alteran la estructura de la enzima ADN girasa, su blanco de acción, reduciendo la afinidad por el antibiótico y confiriendo altos niveles de resistencia. Adicionalmente, se utilizó el gen 16S rRNA como marcador de control para confirmar la identidad taxonómica de las cepas como *E. coli*.

Los resultados fenotípicos mostraron que, si bien las cepas resistentes adquirieron la capacidad de crecer en altas concentraciones de CIP, algunas presentaron ligeras modificaciones en su velocidad de crecimiento o en su capacidad de formar biofilm en comparación con la cepa WT. Estos datos sugieren un posible costo biológico asociado a la resistencia.

El examen morfológico (SEM/TEM), en fase avanzada de análisis, busca establecer si las mutaciones genéticas resultan en alteraciones visibles de la pared celular, de la membrana o en la morfología general, lo que podría explicar las diferencias observadas en la formación de biofilm o la susceptibilidad.

Este estudio contribuye a un campo emergente que busca delinear los mecanismos evolutivos de la RAM desde una perspectiva integrada fenotipo-genotipo [2], [3]. Al caracterizar sistemáticamente la secuencia de eventos morfológicos y genéticos durante la adaptación a un gradiente de CIP, este trabajo no solo proporciona bases moleculares para comprender la organización sinérgica de poblaciones bacterianas bajo estrés, sino que también valida la morfología como una herramienta de detección temprana y potencial predicción de la resistencia. En el futuro, este conocimiento podría fundamentar el desarrollo de sistemas de vigilancia basados en inteligencia artificial e imagen automatizada [4], capaces de alertar sobre la emergencia de resistencia antes de que esta se consolide a nivel genómico, ofreciendo así una ventana de intervención terapéutica más temprana y efectiva.

Capítulo 1

Introducción

1.1. La Crisis de la Resistencia Antimicrobiana: Importancia Global, Contexto Clínico y Económico

La RAM se encuentra entre las amenazas más relevantes para la salud a nivel mundial, con repercusiones que trascienden el ámbito clínico. Las estimaciones actuales indican que, de no tomar acciones contundentes, las infecciones por patógenos resistentes podrían ocasionar alrededor de 10 millones de muertes anuales a partir del año 2050, generando al mismo tiempo un perjuicio económico capaz de crear un problema socioeconómico importante a largo plazo. Esta problemática mundial puede llevar a 28.3 millones de personas hacia la pobreza extrema, comprometiendo metas globales de desarrollo, con un aumento estimado de los costos de salud global anual. Asimismo, se prevé una caída de la producción ganadera global de hasta un 7.5% anual, afectando la seguridad alimentaria. Dadas estas problemáticas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha posicionado a la RAM entre los diez riesgos globales para la salud más urgentes [2].

El impacto de la RAM no se limita a la mortalidad o a las pérdidas económicas, sino que también limita la medicina contemporánea, incrementando los riesgos asociados a intervenciones médicas; procedimientos como cirugías de alta complejidad, tratamientos de quimioterapia y trasplantes de órganos dependen de manera crucial de la disponibilidad de antibióticos eficaces para prevenir y combatir infecciones oportunistas. La diseminación de cepas bacterianas multi-resistentes (MDR) y panresistentes (XDR) en entornos hospitalarios reduce drásticamente las alternativas terapéuticas. Debido al avance y la adaptabilidad de la RAM, el sector hospitalario se ve forzado en muchos casos al uso de fármacos de último recurso, lo que incrementa la duración de los tratamientos, los costos y compromete la estabilidad de los pacientes [2], [5].

A nivel global, el costo económico de la RAM se calcula en billones de dólares, englobando tanto los gastos sanitarios directos como las pérdidas indirectas en productividad. Esta carga financiera se materializa también en el incremento de los costos operativos hospitalarios. Además de afectar al sector salud, la RAM representa un problema en otros ámbitos de interés público, como la veterinaria y la agricultura, donde el empleo de antibióticos en la producción pecuaria y agrícola acelera la dispersión de genes de resistencia. Esto impacta directamente en la seguridad alimentaria y la economía del sector primario, ya que las enfermedades resistentes en animales comprometen la producción y las exportaciones [6].

También la seguridad alimentaria se ve afectada con bacterias resistentes, como es el caso de *E. coli*, la cual es un agente causal frecuente de infecciones gastrointestinales y actúa también como un reservorio crucial de genes de resistencia, siendo capaz de transferir elementos genéticos móviles a otras especies bacterianas. El seguimiento de la resistencia en *E. coli* es de importancia, ya que actúa como un indicador clave para vigilar la diseminación de la RAM en el ecosistema bacteriano. Entre las cepas de alto riesgo destacan los linajes ST131 y ST410, que exhiben resistencia concurrente a fluoroquinolonas, betalactámicos y carbapenémicos, lo cual

resalta la necesidad de establecer sistemas de vigilancia [7].

Las topoisomerasas II son enzimas fundamentales que modulan las propiedades del ADN cromosómico bacteriano; forman parte del proceso para la replicación, transcripción y segregación cromosómica. En bacterias Gram-negativas, como es el caso de *E. coli*, las FQ ejercen su efecto principal sobre dos enzimas particulares: la ADN girasa (Topoisomerasa II), que es una enzima heterotrimérica compuesta por dos subunidades GyrA (codificadas por *gyrA*) y dos GyrB (codificadas por *gyrB*), y que cataliza la introducción de superenrollamientos negativos en el ADN. Esta actividad es exclusiva de las bacterias y es vital para mantener el estado de superhelicidad del cromosoma. La otra enzima donde se ve un efecto de las FQ es la Topoisomerasa IV, integrada por las subunidades ParC (codificada por *parC*) y ParE (codificada por *parE*); esta enzima cumple un papel esencial en el proceso de decatenación cromosómica, lo que permite una correcta segregación del material genético durante la división celular [8].

El proceso mediante el cual las FQ (estructura química representada en la Figura 1) desencadenan su efecto letal implica una serie de eventos moleculares. Primero, se forma un complejo ternario donde la molécula de CIP se intercala en el complejo transitorio que se forma entre la topoisomerasa (ya sea la ADN girasa o Topoisomerasa IV) y su sustrato de ADN, generando un complejo ternario fármaco-enzima-ADN. Posteriormente, el CIP estabiliza el complejo de escisión, que es un estado intermedio en el cual el ADN permanece cortado y unido covalentemente a la enzima a través de enlaces fosfodiéster entre residuos de tirosina de las subunidades GyrA/ParC y los extremos 5'-fosfato del ADN. En condiciones normales, este intermediario es transitorio y se resuelve mediante la religación de las hebras de ADN; sin embargo, al estabilizar el complejo de escisión, el CIP impide el paso crítico de religación de la doble hebra de ADN. Como consecuencia, se acumulan roturas de doble cadena sin reparar en el cromosoma bacteriano [9]. La unión del CIP al complejo enzima-ADN se establece mediante múltiples

interacciones no covalentes, como el puente de agua-ion metálico; este puente molecular está coordinado por residuos aminoacídicos altamente conservados en el sitio activo de las topoisomerasas, específicamente una serina (Ser83 en GyrA) y un residuo ácido (Asp87 en GyrA) de *E. coli*, que quelan un catión divalente. Esta estructura permite la coordinación precisa de la FQ con el ADN cortado y la enzima [10].

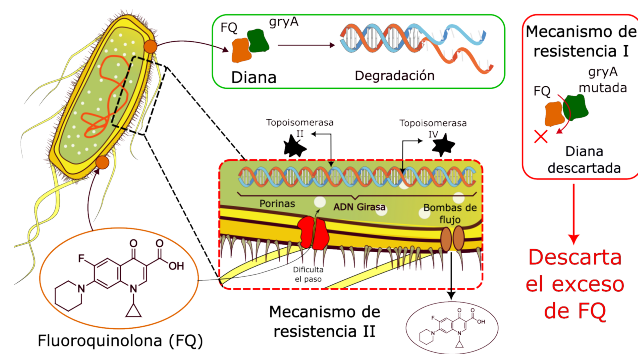


Figura 1: Esquema del mecanismo de acción de CIP en *E. coli* y de resistencia

1.2. La Vigilancia de la RAM y la Necesidad de Métodos de Alerta Temprana

La vigilancia efectiva de la RAM es fundamental para contener su propagación. Tradicionalmente, esta vigilancia se ha basado en métodos fenotípicos, como la determinación de la MIC, y, cada vez más, en técnicas genómicas para identificar mutaciones y genes específicos de resistencia. Sin embargo, estos enfoques suelen detectar la resistencia cuando ya está establecida a nivel poblacional y genético.

Aquí surge un paradigma prometedor y complementario: la morfología bacteriana como biomarcador de alerta temprana. Diversos estudios científicos destacan que, bajo presión antibiótica, las bacterias experimentan cambios morfológicos y ultraestructurales significativos —como filamentación, pleomorfismo o alteraciones en la división celular— que preceden y anuncian

la aparición de mutaciones genéticas estables de resistencia [11]. Estos cambios representan una respuesta adaptativa inmediata al estrés y pueden ser la primera señal fenotípica de que una población bacteriana está iniciando un proceso evolutivo hacia la resistencia. Por tanto, la cuantificación y el seguimiento de estas dinámicas fenotípicas ofrecen una ventana única para detectar y, posiblemente, predecir la emergencia de la RAM antes de que se fije en el genoma [2].

1.3. Marco del Estudio y Modelos Biológicos

1.3.1. Ciprofloxacino: La Molécula y Mecanismo de Acción

El ciprofloxacino (Figura 2) se define como un antibiótico sintético de amplio espectro, perteneciente a las fluoroquinolonas, que cuenta con un mecanismo de acción bactericida basado en la inhibición selectiva de dos enzimas nucleares necesarias para la replicación del ADN bacteriano: la ADN girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV. La molécula actúa ingresando a la bacteria y afectando específicamente a la subunidad A de la ADN girasa (GyrA/GyrB en Gram negativas). Al bloquear estas subunidades, el fármaco impide el resellado de la doble cadena de ADN tras el corte necesario para liberar el superenrollamiento, lo que genera fragmentación cromosómica y detención de la replicación celular.

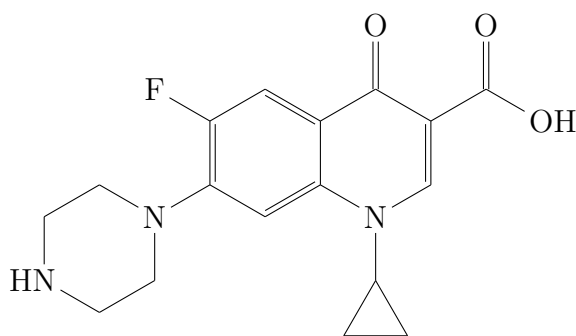


Figura 2: Estructura química de la molécula de ciprofloxacino (CIP), una fluoroquinolona utilizada como agente selectivo en el estudio.

1.3.2. El Dispositivo MEGA-Plate (Microbial Evolution and Growth Arena)

El dispositivo MEGA-Plate es un entorno simulador evolutivo controlado diseñado para analizar la trayectoria espacio-temporal de la resistencia a antibióticos. Consiste en una placa rectangular de gran tamaño (54 x 40 cm), que cuenta con un sistema de capas superpuestas para garantizar la esterilidad y permitir la movilidad bacteriana. El dispositivo establece un gradiente escalonado de concentraciones crecientes de ciprofloxacino (desde 0X hasta 1000X la CMI), forzando a la población bacteriana a adaptarse genéticamente para colonizar los siguientes sectores.

1.3.3. *Escherichia coli* ATCC 11229: El Modelo Biológico

Para este estudio experimental se utiliza la cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 como organismo modelo. Es un bacilo Gram negativo con una morfología uniforme de aproximadamente 1-3 μm de longitud. Se seleccionó esta cepa por presentar Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) bajas, lo cual facilita su manejo seguro en el laboratorio durante la inducción de resistencia. Posee la capacidad de formar biofilms, estructuras complejas compuestas por una matriz polimérica extracelular (polisacáridos, ADN extracelular y proteínas), lo cual es relevante para estudiar mecanismos de supervivencia colectiva y tolerancia a fármacos. Bajo estrés antibiótico, esta bacteria exhibe una notable plasticidad fenotípica, incluyendo filamentación y pleomorfismo, como respuesta al daño en la pared celular y estrés replicativo.

1.4. Antecedentes Relevantes

Diversos estudios han sentado las bases para esta investigación. Baym et al. [1] establecieron la metodología del MEGA-plate y presentaron los primeros hallazgos de la evolución bacteriana en concentraciones crecientes de antibióticos, demostrando que el camino de la resistencia está facilitado por presión selectiva moderada y mutaciones compensatorias. Cushnie [11] destacó la importancia de los cambios morfológicos y ultraestructurales, donde los avances en microscopía ayudan a un mejor entendimiento de los eventos moleculares. Butler [2] introdujo el concepto de mutaciones inducidas por estrés, proponiendo cuantificar la dinámica fenotípica bajo estrés antibiótico y la automatización de imágenes para el análisis. Imkamp [3] clasificó trayectorias evolutivas mediante genotipo/fenotipo para algoritmos de detección. Finalmente, Nayak et al. [4] demostraron con aiGeneR 1.0 cómo la inteligencia artificial puede acelerar la detección de genes de resistencia, guiando el diseño de terapias.

1.5. Aportación Científica

Este estudio presenta un análisis de la dinámica adaptativa de *Escherichia coli* frente a gradientes de concentración de ciprofloxacino, mediante el seguimiento y descripción de los cambios que conducen a la RAM. Dicha caracterización es necesaria para elucidar los mecanismos de organización sinérgica y supervivencia que permiten a la bacteria persistir en nichos ecológicos extremos. El trabajo proporciona las bases necesarias para identificar redes de interacción que facilitan la detección de las bacterias resistentes.

Capítulo 2

Antecedentes y Marco Teórico

2.1. Mecanismos Genéticos Clásicos de Resistencia a Fluoroquinolonas en *E. coli*

Aldred et al. [12], en su artículo **Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: Mechanistic basis of quinolone resistance**, mencionan que la resistencia a las FQ en *Escherichia coli* se basa principalmente en mutaciones puntuales en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR) de sus enzimas diana: la ADN girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*). Las sustituciones aminoacídicas más frecuentes y significativas, como **S83L** y **D87N** en *GyrA*, alteran críticamente el sitio de unión del antibiótico (específicamente el puente de agua-ion metálico), lo que reduce su afinidad y genera un primer nivel de resistencia. Para alcanzar un fenotipo de alta resistencia clínicamente relevante, como frente a la ciprofloxacina (CIP), suele ser necesaria la acumulación de una mutación secundaria en *parC* (por ejemplo, S80I), la cual actúa de forma epistática, potenciando la resistencia conferida por *gyrA*. Esta trayectoria secuencial (*gyrA*

seguido de *parC*) está sólidamente respaldada por la evidencia, como es el caso de Huseby et al. [13], en su estudio **Mutation Supply and Relative Fitness Shape the Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli***.

Existen mecanismos complementarios, como la sobreexpresión de sistemas de eflujo (por ejemplo, *AcrAB-TolC*), mediada a menudo por mutaciones en reguladores globales como *marR*. Los hallazgos de Jang [14], en **AcrAB—TolC, a major efflux pump in Gram-negative bacteria: toward understanding its operation mechanism**, indican que estas mutaciones frecuentemente imponen un costo de aptitud, como una tasa de crecimiento reducida, lo que puede conducir a la aparición posterior de mutaciones compensatorias que restauran la competitividad sin revertir la resistencia.

2.2. El Marco Evolutivo: Paisajes Adaptativos, Costo de Aptitud y la Respuesta Fenotípica Temprana

La evolución de la resistencia puede modelarse conceptualmente mediante la metáfora del paisaje adaptativo, donde la aptitud biológica se representa como la altura de una superficie topográfica, tal como se describe en el título **Global epistasis on fitness landscapes** de Diaz-Colunga et al. [15]. La topografía de este paisaje, determinada por interacciones epistáticas, define las trayectorias evolutivas accesibles. En la resistencia a FQ, se observa una epistasis positiva característica: la mutación inicial en *gyrA* crea el contexto genético en el que una mutación posterior en *parC* confiere un beneficio adaptativo mayor, lo que guía la evolución hacia picos específicos de resistencia.

En el estudio **Interaction between DNA gyrase and quinolones: Effects of alanine**

mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87, Barnard y Maxwell [16] señalan que estas mutaciones a menudo imponen un costo de aptitud, como una tasa de crecimiento reducida, lo que puede conducir a la aparición posterior de mutaciones compensatorias que restauran la competitividad sin revertir la resistencia.

Recientemente, se ha destacado que el estrés antibiótico intenso puede inducir directamente un aumento en la tasa de mutación y desencadenar respuestas fenotípicas transitorias. Butler et al. [2] sostienen que es fundamental “**delinear los mecanismos evolutivos de la resistencia**” mediante la cuantificación de esta dinámica fenotípica bajo estrés, proponiendo el uso de imágenes automatizadas para rastrear trayectorias adaptativas en tiempo real.

En este contexto, los cambios morfológicos y ultraestructurales emergen como un componente fenotípico crítico y subestimado. Cushnie et al. [11] destaca la importancia de estas alteraciones —como la filamentación, el pleomorfismo y las modificaciones en la división celular— inducidas por antibióticos. Estas respuestas, observables mediante microscopía avanzada, no son meros artefactos, sino indicadores fisiológicos que pueden preceder y facilitar la posterior identificación de mutaciones genéticas, ofreciendo así una ventana para la detección temprana del proceso adaptativo. Este enfoque se describe en el estudio **Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action**.

2.3. Plataformas Experimentales y el Futuro de la Vigilancia Integrada Fenotipo-Genotipo

El estudio de estas trayectorias requiere plataformas que simulen la complejidad espacial de la adaptación. La *MEGA-plate (Microbial Evolution and Growth Arena)*, desarrollada por Baym et al. [1], representa una innovación fundamental. Este dispositivo genera un gradiente escalonado y espacial de antibiótico en una placa de agar de gran tamaño, lo que permite observar en tiempo real cómo las poblaciones bacterianas exploran y evolucionan para colonizar zonas con concentraciones crecientes. Su diseño ha revelado la importancia de las mutaciones compensatorias, la formación de biopelículas como estrategia de protección colectiva y el papel de una presión selectiva moderada y estructurada espacialmente en la conectividad de los pasos evolutivos Carr et al. [17].

Para descifrar la compleja relación entre los cambios observados en dichas plataformas y su base genómica, se están desarrollando enfoques de alto rendimiento. Imkamp et al. [3] trabajan en algoritmos de clasificación integrada genotipo-fenotipo, mientras que Nayak et al. [4] desarrollaron “aiGeneR 1.0”, una herramienta de inteligencia artificial que acelera la identificación de genes mutados asociados a la resistencia a partir de datos de expresión génica. Estos avances apuntan hacia un paradigma futuro en el que la **predicción de mecanismos de resistencia y el diseño de terapias dirigidas** se basarán en el análisis integrado y automatizado de datos fenotípicos, como imágenes morfológicas y análisis genómicos, tal como se menciona en el estudio **Escherichia coli survival in response to ciprofloxacin antibiotic stress correlates with increased nucleoid length and effective misfolded protein management**, realizado por Butler et al. [2].

2.4. Síntesis y Brecha de Conocimiento

En conjunto, los antecedentes establecen un marco sólido: **i** la resistencia a CIP en *E. coli* sigue trayectorias genéticas secuenciales dentro de un paisaje adaptativo con epistasis; **ii** las plataformas evolutivas espaciales (MEGA-plate) permiten analizar estas trayectorias *in situ*; y **iii** las nuevas tecnologías (IA, análisis automatizado de imágenes) prometen revolucionar la capacidad de descifrar estas trayectorias a gran escala.

Sin embargo, persiste una brecha crítica: la caracterización sistemática, temporalmente precisa y correlacionada de los cambios morfológicos dinámicos que ocurren durante el proceso de adaptación en plataformas como la MEGA-plate, así como su vínculo causal o predictivo con la aparición de mutaciones genéticas específicas. Esta tesis busca llenar ese vacío, posicionando la morfología como un biomarcador fenotípico integral y un indicador temprano de la evolución genotípica de la resistencia, un enfoque necesario para el desarrollo de sistemas de alerta temprana.

Capítulo 3

Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

La evolución de *Escherichia coli* bajo un gradiente de ciprofloxacino en un entorno espacialmente estructurado como el MEGA-plate, es capaz de elucidar múltiples trayectorias genotípicas distintas, definidas por la acumulación secuencial de mutaciones en el QRDR y genes de eflujo. Mediante el empleo de técnicas avanzadas de microscopía, análisis fenotípicos y secuenciación, será posible caracterizar y describir los cambios genotípicos y fenotípicos que aportan resistencia a fluoroquinolonas y correlacionar los patrones evolutivos con parámetros de aptitud bacteriana.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

Comprender y describir en detalle los mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* bajo presión de ciprofloxacino en un entorno espacialmente estructurado MEGA-plate, con el fin de elucidar cómo las trayectorias genotípicas y los cambios fenotípicos determinan el nivel de resistencia antimicrobiana y el costo de aptitud asociado.

3.2.2. Objetivos Específicos

- Establecer la línea base de susceptibilidad mediante la validación genética de la cepa control *E. coli* ATCC 11229 y la determinación de su MIC para ciprofloxacino.
- Evaluar la trayectoria evolutiva y el costo de aptitud de las cepas evolucionadas (C1 a C5) en condiciones de competencia selectiva, mediante cinéticas de crecimiento y cuantificación de biopelícula.
- Identificar los determinantes genéticos de la resistencia mediante la secuenciación de las cepas resistentes, con énfasis en el análisis del QRDR (*gyrA*) para detectar mutaciones puntuales y del gen 16S para la confirmación de la identidad bacteriana.
- Caracterizar los cambios fenotípicos asociados a la resistencia mediante un análisis morfológico detallado de las colonias y la visualización mediante SEM y TEM de las cepas evolucionadas.
- Integrar cuantitativamente los datos genotípicos y fenotípicos para correlacionar las mutaciones específicas con el nivel de resistencia y el costo de aptitud, permitiendo el mapeo

del paisaje adaptativo.

Capítulo 4

Metodología Experimental

4.1. Materiales y Reactivos

Los reactivos y productos químicos empleados en este proyecto son de grado analítico y se describen en la Tabla [1](#).

Tabla 1: Materiales y equipos utilizados en el experimento MEGA-plate para evolución de resistencia en *E. coli*

Categoría	Material	Especificaciones	Uso Específico
Cepas	<i>E. coli</i> ATCC 11229	ID catálogo 11229	Cepa parental susceptible (tipo silvestre)
Antibióticos	Ciprofloxacino (CIP)	Grado clínico (250 mg)	Agente de presión selectiva principal en MEGA-plate

Continúa en la siguiente página

Categoría	Material	Especificaciones	Uso Específico
Medios Base	Kanamicina	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la capa base	Co-selección y marcaje adicional
	Caldo LB (Luria–Bertani)	Miller	Medio base nutritivo para crecimiento
	Agar bacteriológico	BD Bacto Agar	Agente solidificante (capas al 2 % y 0.28–0.35 %)
Aditivos/Auxiliares	Tinta china	4 mL/capa	Marcador visual de capas (contraste)
	Glicerol estéril	–	Criopreservación de cepas (25 % v/v)
Soluciones	Hipoclorito de sodio	Solución al 10 % (v/v)	Inmersión desinfectante de la MEGA-plate
	Agua estéril	–	Enjuague exhaustivo post-químico
	Jabón desinfectante	–	Limpieza inicial de la estructura de acrílico
Placa de Evolución	MEGA-plate	Acrílico personalizado	Medidas (80 × 62 × 0.6 cm)
Placas de Ensayo	Placas de 96 pocillos	Fondo plano (Corning, Costar)	MIC y mediciones de DO

Continúa en la siguiente página

Categoría	Material	Especificaciones	Uso Específico
Viales/Tubos	Crioviales, tubos de ensayo	Estériles	Almacenaje
Material de Sellado	Adhesivo de silicona, plástico y cinta adhesiva	Aprobado por FDA	Sellado de placa
Equipos y Analizadores de Laboratorio	Cabina de seguridad	Flujo laminar Clase II, Labconco	Mantenimiento de condiciones estériles y control de flujo
	Lector de placas	Multiskan Go (Thermo Scientific)	Cuantificación de MIC, cinética de crecimiento (DO ₆₀₀) y biofilm (DO ₅₉₀)
	Secuenciadores	Modelos 3500 y 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)	Secuenciación Sanger de QRDR de <i>gyrA</i> y <i>parC</i>
	Termociclador	Verity (Applied Biosystems)	Amplificación de ADN por PCR punto final
	Equipo de electroforesis	miniPCR	Verificación de tamaño y pureza de amplicones de PCR

Continúa en la siguiente página

Categoría	Material	Especificaciones	Uso Específico
	Microscopio óptico	Inmersión 100× (Fisher Scientific)	Examen morfológico y confirmación de tinción de Gram
	Kits de extracción	GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific)	Aislamiento y purificación de ADN genómico
	Incubadora	Estática, 37°C (Lab Companion)	Incubación del experimento MEGA-plate
	Campana UV	Luz germicida	Esterilización superficial de la MEGA-plate
Material de Vidrio	Vasos de precipitado	250, 500 y 1000 mL (Pyrex)	Usos varios
	Botes con tapa	500 mL y 1000 mL	Preparación y almacenamiento de agar para MEGA-plate
Material Consumible de Plástico	Tubos para centrífuga	1 y 2 mL (Corning)	Centrifugación de ADN
	Puntillas para micropipetas	0.1–20 μ L, 1–200 μ L, 100–1000 μ L (Corning)	Usos varios

Continúa en la siguiente página

Categoría	Material	Especificaciones	Uso Específico
	Tubos de centrífuga	15 y 50 mL (Corning)	Usos varios
	Placas de 96 pocillos	Corning	Lecturas de muestras en Multiskan Go
	Placas Petri	60 mm × 15 mm (Corning)	Almacenamiento de cepas

4.1.1. Cepas Bacterianas y MIC inicial

La cepa de estudio y referencia utilizada fue *E. coli* ATCC 11229, seleccionada por su genotipo WT confirmado y su alta susceptibilidad a CIP. Las cinco cepas evolucionadas, C1 a C5, se aislaron a partir de la evolución experimental en el MEGA-plate.

La cepa parental de *E. coli* se cultivó inicialmente en Caldo LB; posteriormente, se determinó la MIC inicial para CIP. La susceptibilidad de la cepa inicial se cuantificó mediante microdilución en caldo en placas de 96 pocillos. A partir de un cultivo *overnight* en LB sin antibiótico, se preparó una suspensión bacteriana de *E. coli* ATCC 11229 ajustada a $\sim 1.5 \times 10^8$ UFC/mL. Se prepararon diluciones seriadas de CIP en Caldo LB en proporción 1:2, probando un rango desde 1 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0.015625 $\mu\text{g/mL}$, incluyendo controles sin bacteria y control inoculado sin antibiótico. Posteriormente, cada pocillo se inoculó para obtener una concentración final de $\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La MIC se determinó como la concentración más baja de CIP que inhibió visiblemente el crecimiento bacteriano.

4.2. Diseño, Preparación y Esterilización del Sistema MEGA-plate

El sistema experimental se fundamentó en el diseño original de la Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA-plate) descrita por Baym et al. [1], adaptado para el estudio de la evolución de la resistencia a ciprofloxacino (CIP). La estructura se fabricó a medida con láminas de acrílico, constando de una base y tapa de 40 cm x 54 cm, un grosor de 0.6 cm de altura y cinco separadores internos de 5 cm de alto: dos de 40 cm de longitud y dos de 54 cm, que definen seis carriles de 12.9 cm de ancho cada uno. Tras el ensamblaje y sellado con diclorometano, la placa se sometió a un riguroso protocolo de esterilización por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante una hora. Finalmente, para eliminar los residuos químicos y asegurar la asepsia superficial, la placa se enjuagó abundantemente con agua estéril y se expuso a luz ultravioleta germicida dentro de una campana de flujo laminar durante 45 minutos.

4.2.1. Preparación de Medios y Estratificación con Gradiente de Antibiótico

Bajo condiciones estériles en cabina de flujo laminar Clase II, se vertieron 6 L de medio en tres capas estratificadas. Las capas se vertieron de forma individual, 400 mL por carril en cada capa, permitiendo la solidificación completa de cada una antes de proceder con la siguiente.

La Capa 1 (C1) consta de 400 mL de LB con agar LB al 2 %, 4 mL de tinta china y Kanamicina (KAN) 300 ppm, como agente selectivo contra contaminantes debido a la duración del proyecto.

La Capa 2 (C2) consta de 400 mL de LB con agar LB al 2% sin antibióticos, para aislar la capa base de la superficial, y 4 mL de tinta china. Esta capa funge como separación entre la capa 1 y 3 y evita la mezcla de antibióticos.

La Capa 3 (C3) consta de agar LB semisólido (0.3%) con un gradiente escalonado de CIP. Las concentraciones en cada carril se establecieron en base a la MIC inicial de la cepa parental *E. coli* ATCC 11229, siguiendo una progresión geométrica 0X, 1X, 10X, 100X y 1000X la MIC.

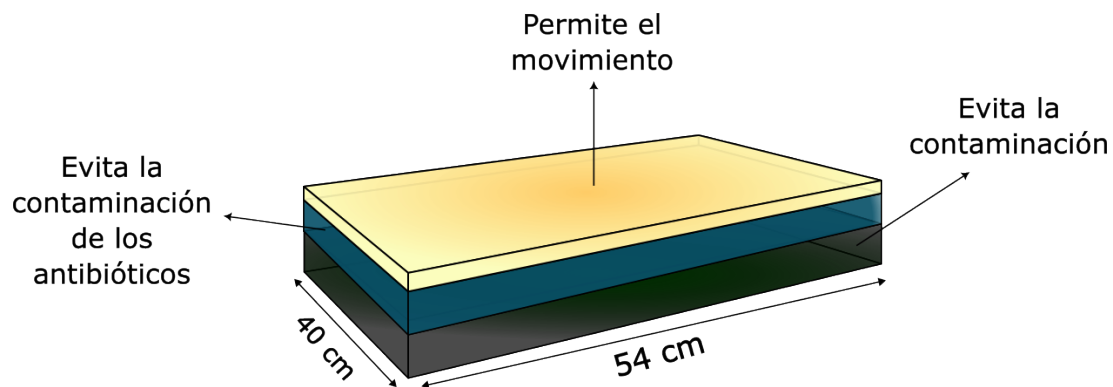


Figura 3: Ejemplo gráfico de vertido de MIC en el sistema MEGA-plate.

4.3. Inoculación y Evolución Experimental

Se inoculó un cultivo *overnight* (O/N) de la cepa inicial *E. coli* ATCC 11229 en el primer carril con una concentración de 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CIP. La bacteria se dejó reposar hasta secarse completamente para asegurar una siembra uniforme antes de sellar la placa. La MEGA-plate se tapó con una cubierta de acrílico y se selló con plástico aprobado por FDA y cinta adhesiva para mantener la humedad y la esterilidad. Se incubó en condiciones óptimas de crecimiento a 37 °C en una incubadora estática, bajo flujo de aire continuo y ambiente controlado, durante un período de 10 días. Se realizó un monitoreo diario de los patrones de migración de las colonias. Las cepas aisladas se designaron como C1 a C5.

4.4. Aislamiento de cepas evolucionadas

Al concluir la incubación, se aislaron colonias individuales de los frentes de migración en cada carril, designándose como cepas evolucionadas C1 a C5. Se preservaron en medio LB con las concentraciones de CIP equivalentes a las presentes en el MEGA-plate. Para recrear las condiciones de presión selectiva del MEGA-plate y asegurar el mantenimiento del fenotipo resistente durante los estudios posteriores, se preparó Caldo LB con Gradiente de CIP, el cual fue esterilizado y se dejó enfriar a 45–50 °C para posteriormente adicionarle ciprofloxacino en las concentraciones equivalentes a cada carril de donde fueron aisladas las cepas. Las placas de Petri con LB-Agar al 2% se prepararon vertiendo aproximadamente 20 mL de medio LB-agar por placa, con concentraciones de CIP correspondientes.

4.5. Procesamiento y Preservación de Cepas Evolucionadas (C1-C5)

4.5.1. Preparación de Tinción Gram

Una pequeña porción de cada colonia aislada (C1-C5) se emulsionó en una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos y se fijó por calor suave. Posteriormente, se realizaron tinciones Gram en las cuales se aplicó Cristal Violeta (1 min), seguido de enjuague; Lugol, y nuevo enjuague; decoloración crítica con acetona-alcohol (5-10 s), con enjuague inmediato; y finalmente Safranina (1 min), con enjuague final. Las muestras se observaron bajo objetivo de inmersión (100X) para verificar la tinción Gram-negativa característica de *E. coli* y documentar la morfología celular, así como la pureza.

Utilizando el software de análisis de imagen ImageJ/FIJI con el plugin MicrobeJ, se realizó la detección de morfologías aberrantes basándose en la frecuencia de células filamentadas (longitud $>10 \mu\text{m}$), células miniaturizadas o con constricciones anómalas.

4.6. Examen Morfológico de las Cepas Mediante SEM y TEM

4.6.1. Preparación para Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El proceso para SEM se centra en obtener una muestra deshidratada y con una buena preservación de la estructura superficial. Las muestras para SEM se procesaron para visualizar alteraciones en la topografía y organización superficial de poblaciones enteras y biopelículas incipientes.

1. Filtración y Fijación

Se filtraron 10 mL de cultivo logarítmico a través de membranas Nucleopore $0.22 \mu\text{m}$.

El fijador de elección es Glutaraldehído al 3 % en tampón fosfato 0.1 M. Este se prepara a partir de una solución comercial al 25 %. Se necesitan 3-4 ml de fijador por muestra.

Los filtros se colocan en placas de ELISA de pocillos grandes con los 3-4 ml de fijador; el tiempo de fijación debe ser de un mínimo de 2 horas.

Las muestras en Glutaraldehído se limpiaron en tampón fosfato 0.1 M durante 10 minutos, repitiendo este paso 2-3 veces. Pasando a la deshidratación, que consistió en una serie de soluciones de etanol de concentración creciente, cambiando la muestra de una solución a otra y siguiendo este protocolo:

-
- Etanol al 50 % (5-10 minutos).
 - Etanol al 70 % (2 veces).
 - Etanol al 90 % (3 veces).
 - Etanol al 96 % (3 veces).
 - Etanol Absoluto (3 veces a tiempos crecientes: 5, 10, 15 minutos).

2. Preparación Final y Secado de Punto Crítico

Las muestras se secaron por punto crítico con CO₂ para evitar colapsos estructurales. Posteriormente, se metalizaron con una capa fina (10-15 nm) de oro-paladio en un metalizador por sputtering. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido. Se documentaron características como rugosidad de superficie, presencia de fimbrias o vesículas, y organización celular en microcolonias.

4.6.2. Preparación para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El proceso para TEM requiere pasos adicionales como la post-fijación, que consta de la inclusión en resina y el corte en secciones ultrafinas.

El protocolo para TEM se optimizó para revelar detalles ultraestructurales asociados al estrés antibiótico y a mecanismos de resistencia. Las muestras se recolectaron en tubos de microcentrífuga de 2 mL para obtener un pellet visible e inmediatamente se agregó el fijador. Los pellets celulares se fijaron primariamente con glutaraldehído al 2.5 % en tampón cacodilato 0.1 M (2 h, 4 °C) y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1 % (1 h, 4 °C) para contrastar lípidos y membranas. Tras lavados, la deshidratación se realizó con EtOH en series crecientes.

Las muestras se infiltraron e incluyeron en resina epóxica Spurr's. La resina se polimerizó mediante calor (60 °C) para endurecer la muestra. Los bloques se cortaron en un ultramicrotomo para obtener cortes ultrafinos (60-80 nm), que se recolectaron en rejillas de cobre. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para aumentar el contraste. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión. Se buscaron y documentaron alteraciones específicas como: (i) engrosamiento o irregularidades en la pared celular y membrana externa; (ii) condensación o segregación del material nucleoide (ADN); (iii) presencia de inclusiones citoplasmáticas o vesículas de membrana externa.

4.6.3. Procesamiento de Imágenes y Análisis Cuantitativo de Datos

Para el análisis cuantitativo de la morfología y la ultraestructura bacteriana, las micrografías obtenidas fueron procesadas digitalmente utilizando el software especializado *Fiji* (ImageJ). El tratamiento de las imágenes se dividió en dos enfoques dependiendo de la técnica microscópica empleada.

Procesamiento de Imágenes de SEM (Morfometría)

En el caso de las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), se calibró inicialmente la escala de cada micrografía para asegurar la precisión dimensional. Se determinaron las Regiones de Interés (ROI) contorneando las células bacterianas individuales y se utilizó la función *Set Measurements* para extraer los parámetros morfométricos descritos en la Tabla [2](#).

Tabla 2: Parámetros morfométricos configurados en *Set Measurements* de *Fiji* para el análisis de imágenes de SEM.

Parámetro (<i>Fiji</i>)	Equivalente en español	Interpretación y uso en el estudio
<i>Shape descriptors</i>	Descriptores de forma	Grupo de métricas para evaluar la proporción y regularidad del contorno bacteriano. Comprende los subparámetros siguientes:
<i>Aspect Ratio</i> (AR)	Índice de Elongación	Cociente entre el eje mayor y el eje menor de la elipse ajustada. Emplea-do para cuantificar la magnitud de la filamentación bacteriana asociada a la respuesta celular SOS.
<i>Solidity</i>	Índice de Integridad Superficial	Cociente entre el área real y el área convexa de la bacteria. Permite eva-luar topográficamente la rugosidad, el daño en la envoltura celular o la for-mación de vesículas.
<i>Circularity</i>	Circularidad	Parámetro geométrico complementa-rio ($4\pi \cdot \text{Área} / \text{Perímetro}^2$); valor de 1.0 indica circunferencia perfecta.
<i>Roundness</i>	Redondez	Inverso del <i>Aspect Ratio</i> ; mide la com-pacidad del eje menor respecto al ma-yor.
<i>Feret's diameter</i>	Diámetro de Feret	Diámetro máximo (<i>Feret</i>) y mínimo (<i>MinFeret</i>) de la celda medidos como distancias caliper. Representa la lon-gitud total real de la bacteria en μm ; contrasta con el AR para validar el ta-maño celular absoluto.
<i>Area</i>	Área	Superficie bidimensional total abarca-da por la bacteria dentro del contorno trazado.
<i>Perimeter</i>	Perímetro	Longitud total de la línea de contorno celular. En relación matemática con el área, facilita la parametrización de la rugosidad superficial.

Procesamiento de Imágenes de TEM (Ultraestructura)

Para las micrografías de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), el enfoque consistió en evaluar la densidad y organización intracelular. Se procedió a delimitar manualmente el citoplasma de las bacterias mediante la herramienta *Polygon Selection*, excluyendo la pared

celular para evitar sesgos en la medición de la densidad interna. Los parámetros analíticos configurados en *Set Measurements* se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros analíticos configurados en *Set Measurements* de *Fiji* para el análisis de imágenes de TEM.

Parámetro (<i>Fiji</i>)	Equivalente en español	Interpretación y uso en el estudio
<i>Area</i>	Área citoplasmática	Tamaño exacto de la zona citoplasmática delimitada; normaliza las mediciones de densidad al área real analizada.
<i>Mean gray value</i>	Valor medio de gris	Indicador de la Densidad Electrónica Relativa. Cuantifica qué tan “vacía” o densa se encontraba la bacteria, reflejando cambios en contenido macromolecular frente al tratamiento.
<i>Standard deviation</i>	Desviación estándar del gris	Mide el grado de heterogeneidad interna de la distribución de grises. Funciona como indicador de presencia de aglomeraciones, condensación o segregación del ADN (nucleoide).
<i>Min & max gray value</i>	Valores mínimo y máximo de gris	Métrica de control de calidad para verificar que los rangos de intensidad de la imagen (0–255) estén correctamente normalizados.

Tratamiento Estadístico y Visualización de Datos

Durante el procesamiento, el código agrupó las variables para aplicar estadística descriptiva, calculando medidas de tendencia central (medias) y de dispersión (desviación estándar) para cada fase evolutiva. Finalmente, con el uso de librerías estadísticas (tales como *Pandas* y *Seaborn*), el *script* generó de manera automatizada la visualización de los datos estadísticos: diagramas de violín para observar la densidad de probabilidad y heterogeneidad fenotípica de la población (ej. distribución de la elongación), diagramas de cajas (*boxplots*) para evaluar la integridad intercuartílica y la mediana poblacional (ej. solidez), y gráficos de dispersión (*scat-*

ter plots) para correlacionar variables intracelulares complejas, como la densidad frente a la condensación del ADN.

4.7. Evaluación del crecimiento mediante Densidad Óptica y Capacidad de formación de Biofilm

La aptitud biológica de las cepas evolucionadas (C1 a C5) se evaluó midiendo la cinética de crecimiento en medio de cultivo sin CIP a lo largo de 16 h. El crecimiento se monitorizó mediante densidad óptica (DO), automatizando un ciclo de lecturas durante 16 h; posteriormente, se cuantificó la capacidad de formación de biopelículas mediante tinción con Cristal Violeta al 0.1 % y medición de la DO a 590 nm.

Se prepararon cultivos de cada cepa (C1-C5) en Caldo LB con sus respectivas concentraciones de CIP. Las cepas se dispensaron en una placa de 96 pocillos con Caldo LB. La placa se colocó en un Lector de Placas Multiskan Go (Thermo Scientific) y el crecimiento se monitorizó automáticamente a 37 °C durante 16 h, tomando lecturas de DO_{600} cada hora. Los datos de la cinética de crecimiento se utilizaron para calcular la tasa de crecimiento específica para cada cepa. Paralelamente, las cepas C1-C5 se cultivaron en Caldo LB en placas de 96 pocillos durante 48 horas en condiciones estáticas a 37 °C para evaluar la formación de biopelícula. Tras la incubación, se retiró el medio, se lavaron suavemente los pocillos, se tiñeron los biofilms con Cristal Violeta al 0.1 % (15 min), se lavó el exceso de colorante, se disolvió el colorante unido con etanol, y se cuantificó la intensidad de la tinción midiendo la DO_{590} .

4.8. Análisis Genotípico

La caracterización genotípica se centró en identificar mutaciones puntuales y confirmar la identidad bacteriana. Este proceso fue realizado por LANBAMA-IPICYT, San Luis Potosí: Laboratorio de Referencia, quienes amplificaron y secuenciaron productos de PCR.

Se identificó el gen 16S rRNA (como control taxonómico) y se secuenció las regiones QRDR de *gyrA*. Se amplificaron mediante PCR de punto final en un Termociclador Verity (Applied Biosystems). La calidad y el tamaño de los productos de PCR amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, utilizando un estándar de peso molecular. Una vez obtenidas las bandas confirmatorias se procedió a realizar la secuenciación de las muestras purificadas mediante el método de Sanger en los Secuenciadores Modelo 3500 y 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias crudas se analizaron bioinformáticamente, realizando una Alineación de Secuencia Múltiple (MSA) para el QRDR de *gyrA* con la secuencia de referencia de *E. coli* K-12 MG1655 tomada de GeneBank, para confirmar el genotipo de Tipo Silvestre del control e identificar las sustituciones de nucleótidos (SNPs) en las posiciones críticas (Ser-83 y Asp-87).

4.8.1. Identificación y Agrupación de Secuencias

Se obtuvo la secuencia del gen *gyrA* de la cepa de referencia *E. coli* K-12 MG1655 de NCBI, tomando en cuenta que la secuencia de referencia debe ser el Tipo Silvestre (WT) para el *gyrA*, que ya se confirmó en el control *E. coli* ATCC 11229. Posteriormente, se realizó la Alineación de Secuencia Múltiple (MSA); para este paso se usó el software bioinformático diseñado para realizar alineamientos de secuencia múltiple, Clustal Omega. Allí se ingresaron

todas las secuencias de *gyrA* (las 9 muestras de las cepas C1-C5 y la secuencia de referencia WT). La MSA alinea nucleótido por nucleótido cada secuencia con la secuencia de referencia WT, asegurando que las regiones homólogas y las posiciones de los codones coincidan. El objetivo de la MSA para el *gyrA* fue confirmar el genotipo de Tipo Silvestre del control y detectar Sustituciones de Nucleótidos (SNPs) en las posiciones críticas. Para la detección de las SNPs, se localizaron las Regiones Determinantes de Resistencia (QRDR), específicamente en los codones 67-106 de *gyrA* y 56-108 de *parC*, concentrándose en la búsqueda de SNPs en las posiciones críticas: Ser-83 y Asp-87.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Determinación de la MIC del Control

El ensayo de microdilución confirmó la alta sensibilidad de *E. coli* ATCC 11229 a ciprofloxacino (CIP). El valor de la MIC se determinó en 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dado que la MIC se define como la concentración más baja que inhibe visiblemente el crecimiento (crecimiento menor al 1% del control sin antibiótico). El ensayo arrojó los siguientes resultados que sustentan esta determinación (Tabla 4).

Tabla 4: Ensayo de microdilución para determinar la MIC de ciprofloxacino en *E. coli* ATCC 11229

MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de crecimiento
1	0.78
0.5	1.76
0.25	3.36

En la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el crecimiento fue de solo 0.78%, cruzando el umbral de inhibición. Este valor confirma que la cepa de control es altamente susceptible, estableciendo

una línea base para evaluar la evolución experimental.

5.2. Crecimiento en Sistema MEGA-plate tras 12 días

El crecimiento de *E. coli* en el sistema MEGA-plate (Figura 4) revela una dinámica adaptativa compleja y espacialmente estructurada. Se observa una expansión progresiva desde el carril inicial (0X) hacia regiones con mayor concentración de ciprofloxacino, evidenciando la capacidad de la población para superar la presión selectiva de manera escalonada. Las formaciones de crecimiento son notablemente irregulares, presentando patrones dendríticos y frentes de colonización no uniformes. Esta morfología sugiere fuertemente la formación de biopelículas superficiales y una expansión activa mediante motilidad colectiva, estrategias que permiten a la bacteria explorar y colonizar nichos adversos.

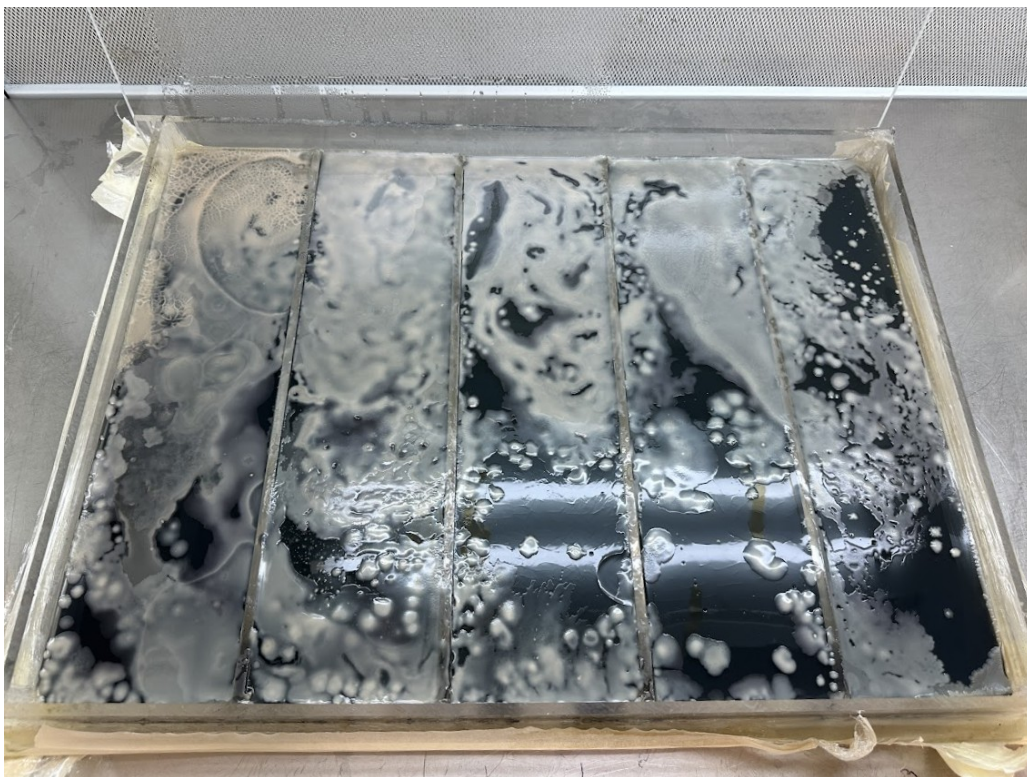


Figura 4: Crecimiento de *E. coli* en el sistema MEGA-plate tras 12 días de incubación. Se observa la expansión de la población a través de un gradiente de ciprofloxacino con concentración creciente de izquierda a derecha.

5.3. Fenotipo de Crecimiento y Costo de Aptitud de las Cepas Evolucionadas

Los resultados del crecimiento de las cinco cepas evolucionadas (C1 a C5, Figura 5) revelaron diferencias significativas en su aptitud biológica. La evolución de la DO corregida a lo largo de 16 horas sugirió la existencia de diferentes estrategias adaptativas y costos asociados a las mutaciones adquiridas.

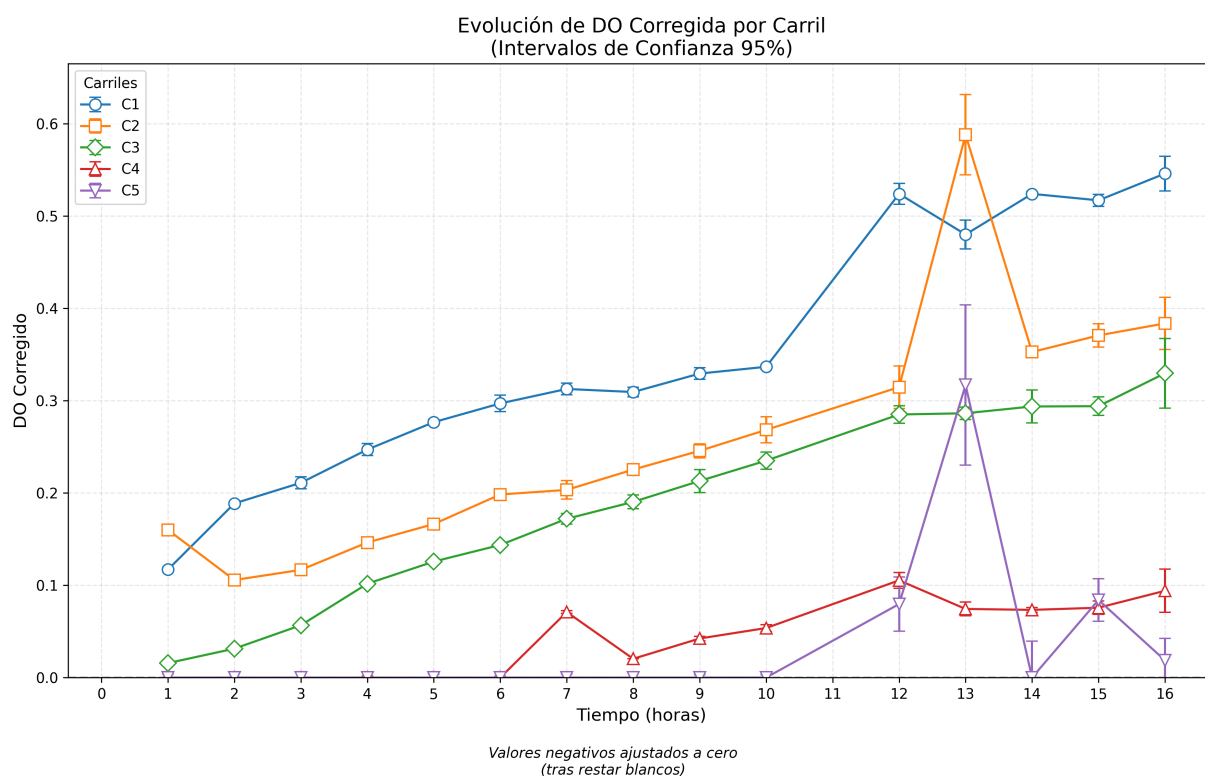


Figura 5: Cinética de crecimiento de las cepas evolucionadas (C1-C5) de *E. coli* durante 16 horas. Las curvas representan la Densidad Óptica (DO) corregida y sus intervalos de confianza al 95%. Se observan diferencias en la tasa de crecimiento, donde C1 y C2 muestran la mayor aptitud, mientras que C4 y C5 presentan el crecimiento más reducido.

Las cepas C1 y C2 exhibieron la mayor velocidad de crecimiento y alcanzaron las mayores densidades celulares. Este patrón sugiere una adaptación exitosa, donde los linajes probablemente acumularon mutaciones secundarias compensatorias que mitigan el costo de aptitud impuesto por las mutaciones primarias de resistencia. Las cepas C3 y C4 mostraron la mayor reducción en la tasa de crecimiento; C4 presentó un crecimiento casi nulo hasta la hora 6. Este

fenotipo es la confirmación clásica del costo de aptitud, típicamente asociado a las primeras mutaciones de resistencia antes de que surjan mecanismos compensatorios. La baja aptitud de C3 y C4 sugiere un estadio evolutivo más temprano. La cepa C5 mostró un patrón de crecimiento intermedio, con un retraso en la fase *lag*.

La capacidad de producir biopelículas (Figura 6) también fue variada, lo que sugiere que las trayectorias evolutivas afectan no solo a las enzimas diana, sino también a la regulación de la matriz extracelular. Las cepas C2 y C5 mostraron los niveles más altos de biomasa de biofilm, un fenotipo que puede acelerar la evolución de la RAM y conferir protección frente al antibiótico. En comparación, las cepas C1 y C3 presentaron los niveles más bajos de biomasa.

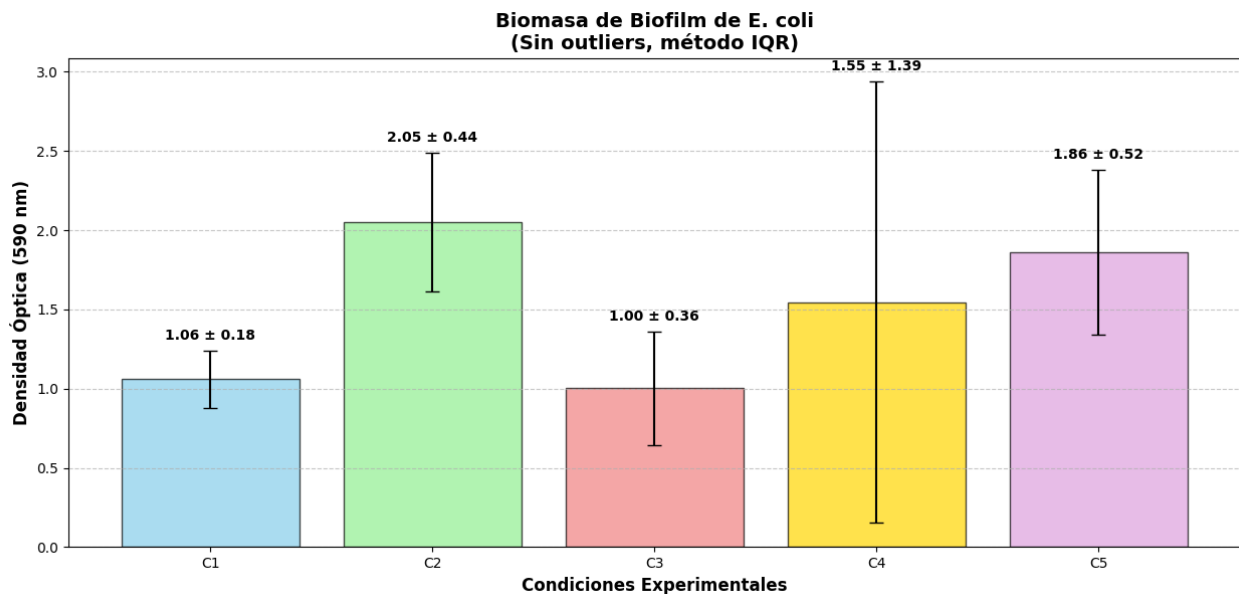


Figura 6: Cuantificación de la biomasa de biofilm producida por las cepas evolucionadas (C1-C5) de *E. coli*. Las barras representan la absorbancia media a 590 nm, indicando que la cepa C2 exhibe la mayor capacidad de formación de biofilm.

5.4. Fenotipos Morfológicos y de Susceptibilidad Visual

Preliminar

5.4.1. Morfología Macroscópica de Colonias

Las imágenes de la Figura 7 revelan una serie de placas de agar LB que presentan el impacto de CIP. Cada placa, señalada como C1 a C5, representa la concentración particular de CIP equivalente a 1X, 10X, 100X y 1000X.

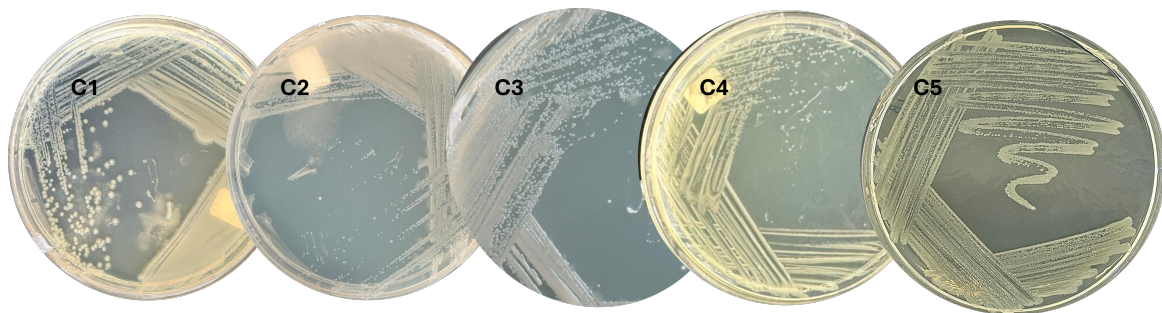


Figura 7: Morfología de las colonias de las cepas evolucionadas (C1-C5) de *E. coli*. Se observan variaciones fenotípicas en tamaño, brillo y textura, desde colonias circulares y brillantes (C1) hasta colonias más pequeñas y opacas con posible formación de biofilm (C4-C5).

La placa C1 manifiesta la más alta densidad de crecimiento bacteriano; esto se debe a que en el primer carril no existe concentración de CIP y, por tanto, no presenta estrés para su crecimiento. El efecto sobre el desarrollo bacteriano es muy poco o inexistente. Las colonias parecen estar bien formadas y distribuidas, mostrando un crecimiento sano y característico de *E. coli*.

Pasando a las placas C2 y C3, se aprecia una baja notable en la densidad de las colonias. Si bien aún se aprecia un crecimiento considerable, el número de colonias es menor, y estas se observan de un tamaño más pequeño o esparcidas en comparación con C1. Esto sugiere que estas concentraciones y las mutaciones adquiridas ejercen un efecto notable sobre el crecimiento de bacterias, disminuyendo la viabilidad o la velocidad de proliferación.

En la placa C4, los efectos de las mutaciones conferidas por el intento de supervivencia de *E. coli* se hacen aún más evidentes. La densidad de colonias es mucho más baja en comparación con C2 y C3, y además se aprecian zonas de agar sin colonias más amplias. Esto señala que la concentración y las mutaciones que conllevaron a la resistencia del CIP en C4 se hacen notar en una significativa disminución de células capaces de formar colonias y en una disminución notable del tamaño e irregularidad en las colonias.

La placa C5 exhibe la menor cantidad de crecimiento bacteriano, con solo unas pocas colonias aisladas. Esto sugiere que la concentración más alta de CIP a la que fue expuesta *E. coli* afecta considerablemente su crecimiento. La presencia de algunas colonias podría indicar la aparición de mutantes resistentes o la supervivencia de un pequeño porcentaje de la población que tolera esta concentración. El grupo de imágenes muestra sin duda una relación dosis-respuesta clara en relación con la concentración del CIP y su efecto en el crecimiento de las cepas de *E. coli*. Se observa cómo desciende gradualmente la densidad de colonias desde C1 hasta C5, lo cual sugiere un efecto bacteriostático o bactericida dependiente de la concentración que no llegó a dañar por completo las cepas y les permitió adquirir las mutaciones pertinentes para sobrevivir.

Las formaciones irregulares y la extensión del crecimiento sugieren que se están formando biofilms o que las colonias están expandiéndose activamente sobre la superficie del agar a lo largo del gradiente, evidenciando el potencial evolutivo de *E. coli* para superar la presión selectiva de los antibióticos.

5.4.2. Morfología Celular (Microscopía Óptica)

La muestra C1 en la Figura 8 denota un campo denso de bacilos Gram-negativos uniformes, con la morfología típica de *E. coli* sin estrés. La cepa C2 muestra bacilos que, aunque conservan la morfología Gram-negativa, son más alargados o filamentosos que el control. La filamentación es una respuesta común al daño en el ADN inducido por las FQ. Que C2 presente este rasgo a pesar de su alta aptitud sugiere que, si bien es resistente, la enzima diana GyrA sigue siendo afectada, pero la bacteria ha desarrollado mecanismos como la posible sobreexpresión de AcrAB-TolC para sobrevivir. La cepa C3 exhibe una morfología celular más corta e irregular. La presencia de formas menos uniformes y la baja aptitud sugieren un mayor estrés celular y una posible disrupción en la división celular, compatible con una mutación primaria de resistencia GyrA S83L que impone un alto costo biológico. La cepa C4 muestra bacilos Gram-negativos notablemente alargados y filamentosos, incluso más acentuados que C2. Esta filamentación severa se correlaciona con la descripción fenotípica de crecimiento casi nulo reportada para C4 y es una manifestación clara de la respuesta SOS activada por la fuerte inhibición del complejo ADN-topoisomerasa. El genotipo de esta cepa puede representar el estadio evolutivo más temprano, con una mutación primaria de resistencia que ofrece poca protección y un costo de aptitud máximo. La cepa C5 parece comenzar a exhibir una morfología celular más corta. La presencia de formas menos uniformes y la baja aptitud sugieren un mayor estrés celular que puede conllevar una mutación de importancia para la supervivencia bacteriana.

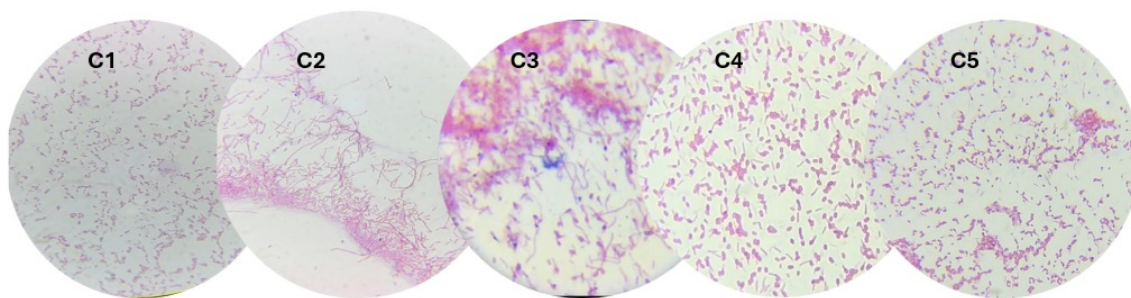
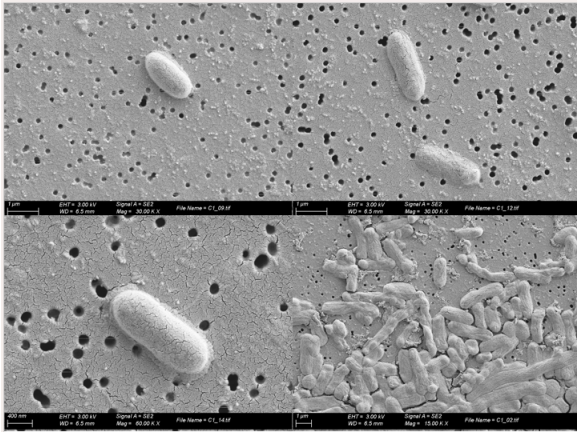


Figura 8: Micrografías de las cepas evolucionadas (C1-C5) de *E. coli* mediante tinción de Gram (100X). Se aprecian variaciones morfológicas como la filamentación en respuesta al estrés (C2) y la presencia de células más pequeñas e irregulares (C4, C5).

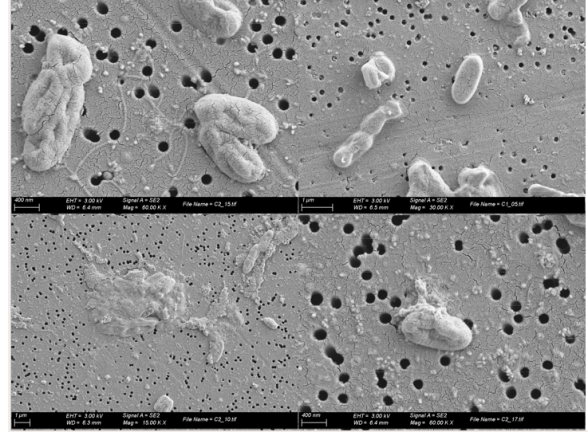
5.5. Micrografías

5.5.1. SEM

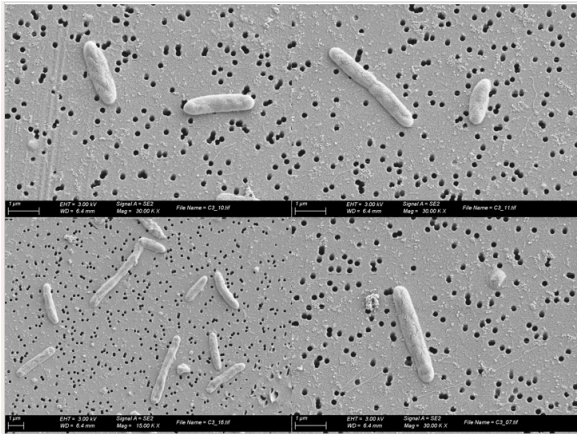
El análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (Figura 9) permitió caracterizar la topografía superficial de las cepas. La cepa parental C1 mostró bacilos de tamaño uniforme con superficie lisa e íntegra. Las cepas evolucionadas, en cambio, exhibieron una notable heterogeneidad morfológica. Se confirmó la filamentación extrema en las cepas C2 y C4, con células que alcanzan longitudes varias veces superiores a la cepa control, indicativo de un bloqueo en la citocinesis inducido por el daño al ADN. Asimismo, se observaron irregularidades en la superficie celular, como rugosidades y posibles vesículas de membrana, particularmente en las cepas sometidas a mayores concentraciones de antibiótico, lo que sugiere una desestabilización de la envoltura bacteriana como respuesta al estrés.



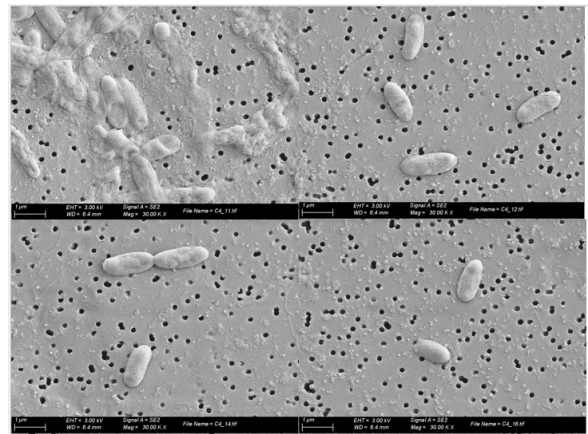
(a) Micrografía SEM de la cepa C1.



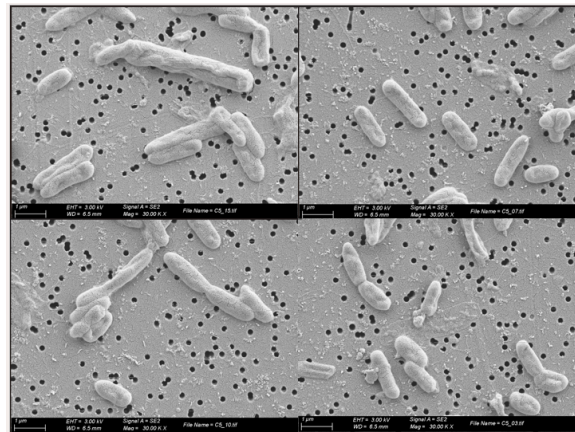
(b) Micrografía SEM de la cepa C2.



(c) Micrografía SEM de la cepa C3.



(d) Micrografía SEM de la cepa C4.

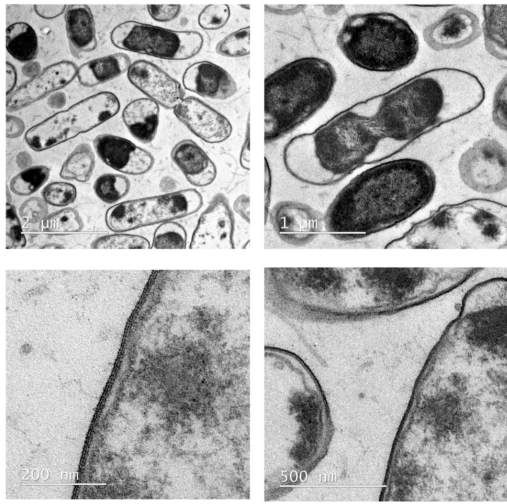


(e) Micrografía SEM de la cepa C5.

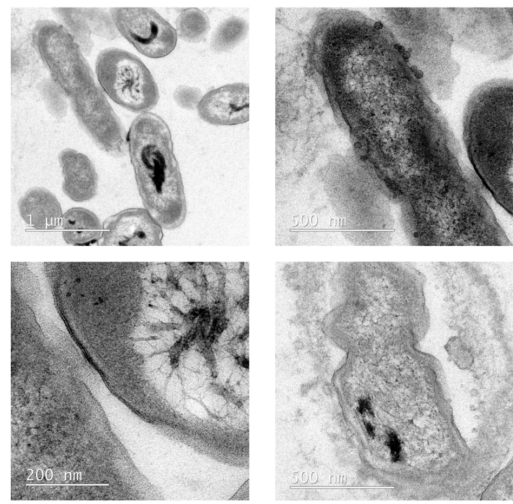
Figura 9: Micrografías SEM de *E. coli* para los carriles C1-C5.

5.5.2. TEM

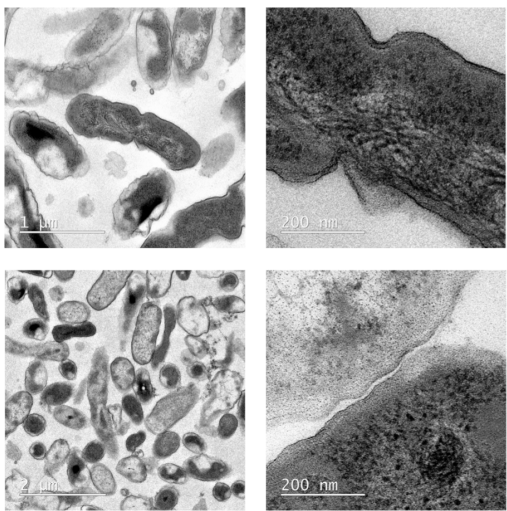
Complementariamente, la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (Figura 10) reveló alteraciones a nivel ultraestructural. Mientras que C1 presentó una morfología interna conservada con membranas bien definidas, las cepas resistentes mostraron evidencias claras de daño celular y reorganización estructural. Se identificaron engrosamientos irregulares en la pared celular y la membrana externa en ciertos linajes, una posible adaptación para limitar la entrada del fármaco. Además, se observaron zonas de baja densidad electrónica en el citoplasma y formación de vacuolas en las cepas con mayor costo de aptitud (C3, C4), signos característicos de muerte celular programada o lisis parcial en respuesta a la toxicidad del ciprofloxacino.



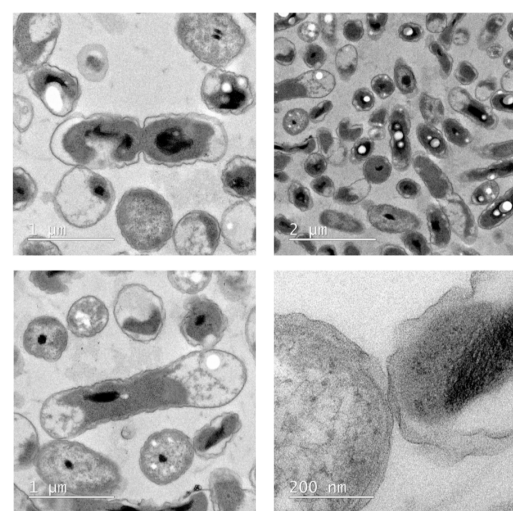
(a) Micrografía TEM de la cepa C1.



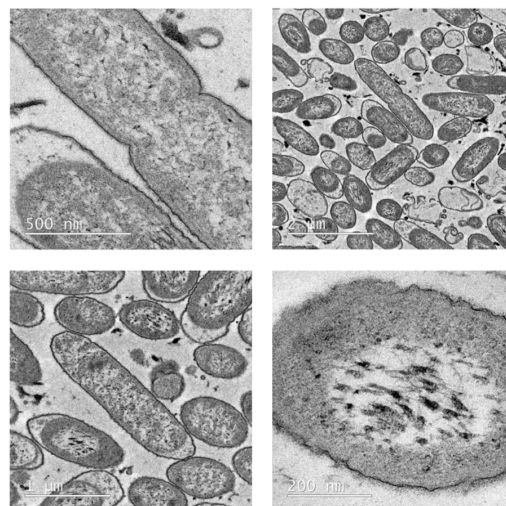
(b) Micrografía TEM de la cepa C2.



(c) Micrografía TEM de la cepa C3.



(d) Micrografía TEM de la cepa C4.



(e) Micrografía TEM de la cepa C5.

Figura 10: Micrografías TEM de *E. coli* para los carriles C1-C5.

5.6. Confirmación de la Cepa de Control y Análisis Genómico de Tipo Silvestre

El análisis bioinformático confirmó que las secuencias del Grupo “-1” se asignaron a la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (*gyrA* QRDR) y las secuencias del Grupo “-5” corresponden al gen *rRNA*, un marcador de control 16s (Figura 11).

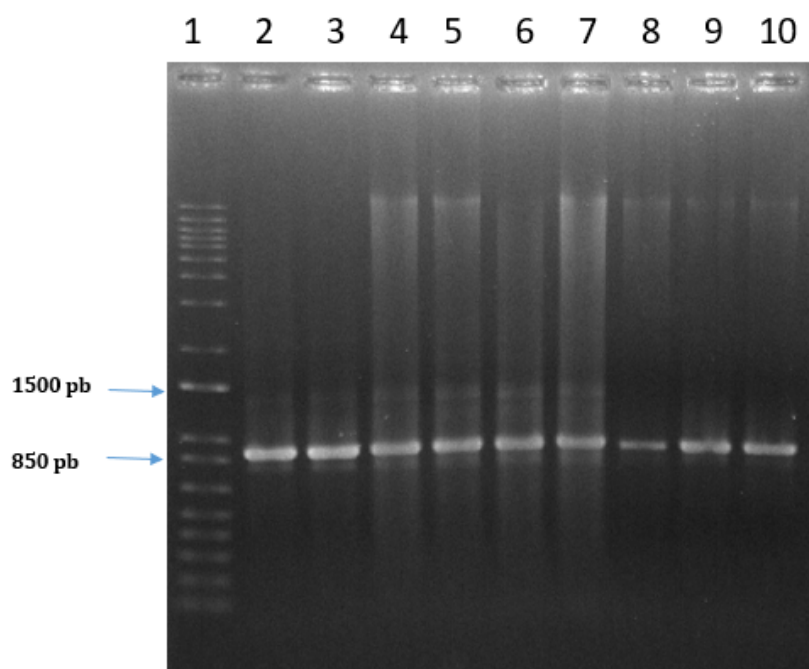


Figura 11: Análisis por Electroforesis en Gel de Agarosa de ADN de *E. coli.*, de las 5 cepas (duplicados). El carril 1 corresponde a un marcador de peso molecular. Se observan bandas de aproximadamente 1500 pb correspondientes a la amplificación del gen *gyrA* y bandas de 850 pb correspondientes al fragmento del gen 16S rRNA, confirmando la presencia y tamaño consistente de los amplicones esperados en las muestras analizadas.

El alineamiento de las secuencias de la cepa control confirmó un genotipo de Tipo Silvestre (WT) en los sitios de mutación más críticos del QRDR (Ser-83 y Asp-87), los resultados se muestran en la Tabla 5. Este genotipo WT predice un fenotipo susceptible.

Tabla 5: Mutaciones observadas en la posición 83 de la región QRDR del gen *gyrA* en las cepas evolucionadas de *E. coli*

Cepa	Codón	Aminoácido (AA)	Mutación
C1	TCC	S	WT
C2	TCC	S	WT
C3	TTT	F	S83F
C4	TTC	F	S83F
C5	TTC	F	S83F

5.7. Análisis Cuantitativo de la Morfología y Ultraestructura Bacteriana

5.7.1. Dinámica Morfométrica (SEM)

El análisis estadístico de los gráficos obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló que *E. coli* experimenta una transformación física drástica bajo la presión selectiva de ciprofloxacino. El Índice de Elongación (*Aspect Ratio*) mostró una estabilidad basal en los carriles c1 y c2 (2.23 y 2.29 respectivamente), seguida de un incremento crítico en el carril c3, alcanzando un promedio de 4.01. Este fenómeno de filamentación se vio acompañado por una pérdida de la Integridad Superficial (*Solidity*), la cual descendió de 0.985 (c1) a 0.946 (c3), indicando un aumento en la rugosidad de la envoltura celular. Hacia el carril c5, la población recuperó un fenotipo similar al silvestre (AR: 2.39), sugiriendo una estabilización de la forma en la cepa resistente.

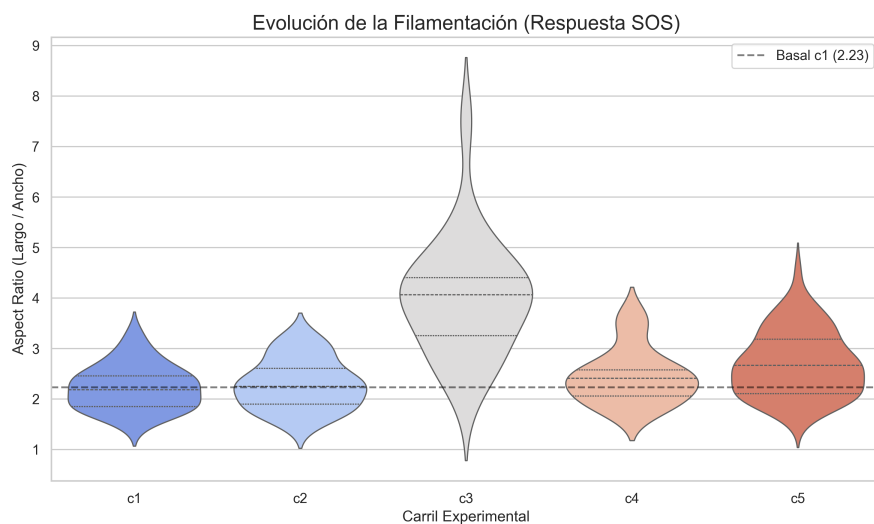


Figura 12: Distribución del *Aspect Ratio* (Índice de Elongación) a lo largo de los carriles evolutivos (c1–c5), representada mediante diagrama de violín. Se observa el pico de filamentación heterogénea en c3 y la estabilización fenotípica de la cepa resistente en c5.

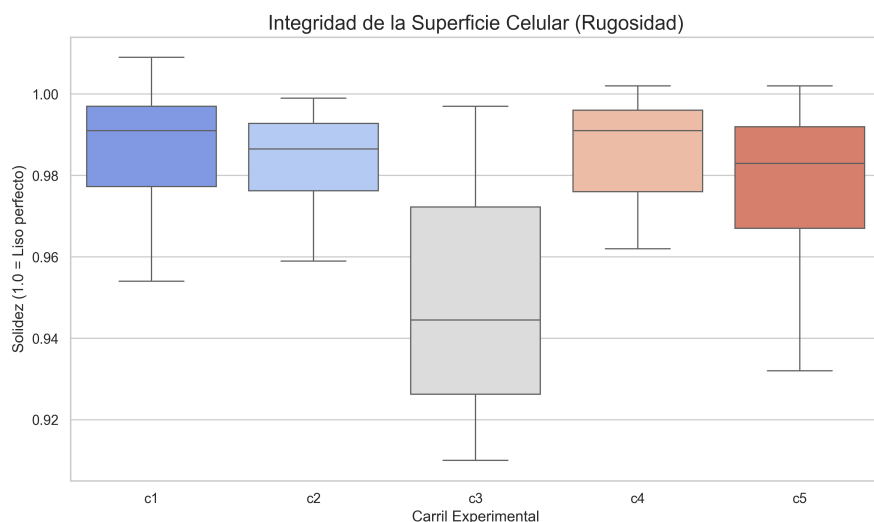


Figura 13: Diagrama de cajas del índice *Solidity* (Índice de Integridad Superficial) en los carriles c1–c5. Se ilustra el descenso progresivo de la solidez del contorno bacteriano como indicador del daño en la membrana y el aumento de rugosidad superficial.

5.7.2. Caracterización Ultraestructural Intracelular (TEM)

Complementariamente, la interpretación de los diagramas de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) permitió observar la reorganización del contenido citoplasmático. La Densidad Electrónica Relativa (*Mean gray value*) disminuyó significativamente desde el control (163.8 u.a.) hasta el carril c4 (108.0 u.a.), evidenciando un proceso de vaciamiento citoplasmático y formación de células “fantasma”. Simultáneamente, el Grado de Heterogeneidad del Nucleoide

(*StdDev*) se redujo de 48.2 (c1) a 37.7 (c3). Esta transición hacia un citoplasma más homogéneo sugiere una desorganización de la arquitectura compacta del ADN, consecuencia directa de la interferencia del antibiótico con las enzimas de superenrollamiento. En la fase final (c5), los valores de densidad (125.9 u.a.) y heterogeneidad (40.4) alcanzaron un nuevo estado estacionario, distinto al de la cepa original.

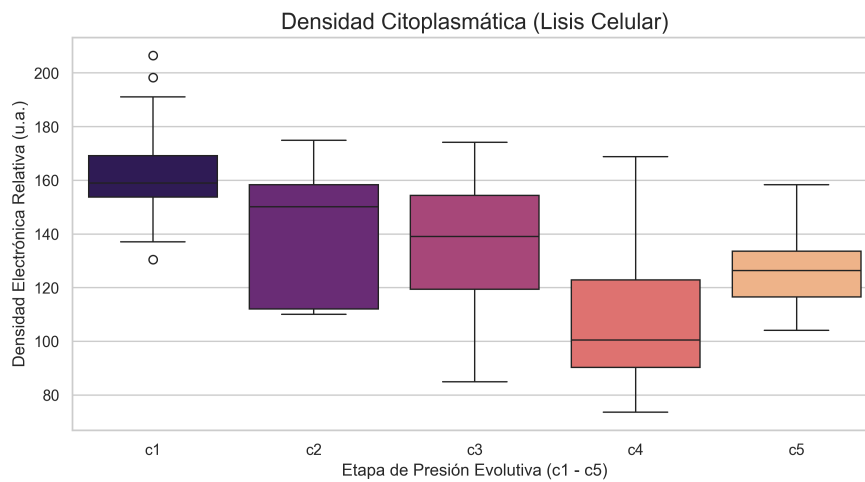


Figura 14: Distribución de la Densidad Electrónica Relativa (*Mean gray value*) del citoplasma en los carriles c1–c5. Se observa la caída progresiva de la intensidad media de gris como indicador de lisis parcial y aumento de permeabilidad intracelular.

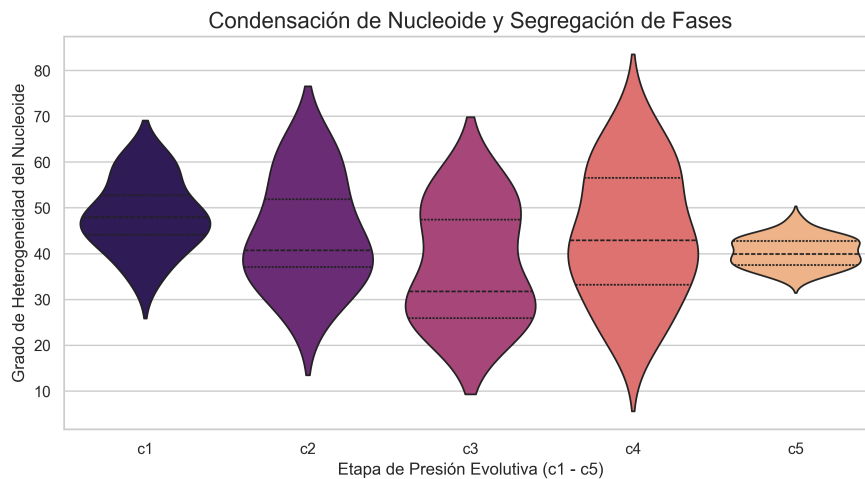


Figura 15: Distribución de la desviación estándar de la intensidad de gris (*StdDev*) como indicador del Grado de Heterogeneidad del Nucleoide en los carriles c1–c5. La reducción de la dispersión refleja la desorganización de la arquitectura del ADN inducida por el ciprofloxacino.

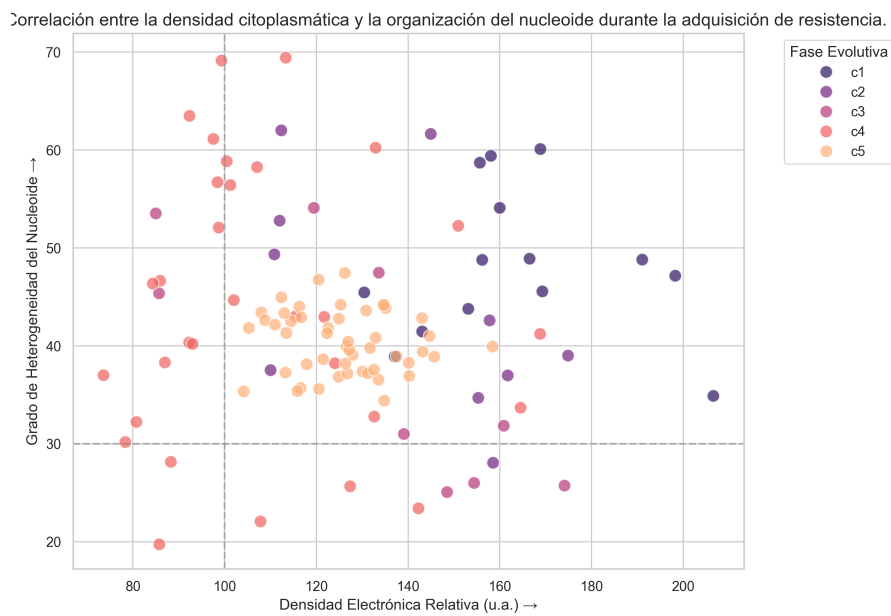


Figura 16: Diagrama de dispersión bivalente de la Densidad Electrónica frente a la Heterogeneidad del Nucleoide. Se ilustra la trayectoria evolutiva de las subpoblaciones desde el control (c1), a través de la máxima desestabilización celular (c3–c4), hasta el nuevo estado estacionario de la cepa resistente (c5).

Capítulo 6

Discusión y Perspectivas

6.1. Discusión de Resultados

Esta investigación integró un modelo evolutivo espacial (MEGA-plate), caracterización fenotípica multinivel y análisis genómico para rastrear la trayectoria adaptativa de *E. coli* hacia la resistencia al CIP. Los resultados confirman que los cambios morfológicos y fisiológicos son biomarcadores tempranos y dinámicos que preceden y acompañan la fijación de mutaciones genéticas, validando el enfoque integrado fenotipo-genotipo para descifrar los mecanismos de la RAM. El uso de sistemas como el MEGA-plate ha demostrado ser una herramienta poderosa para visualizar y cuantificar la dinámica evolutiva en tiempo real [1], [17].

6.1.1. La Cinética de Crecimiento y el Costo de Aptitud: Evidencia de un Paisaje Adaptativo Rugoso

La cinética de crecimiento diferencial (Figura 5) revela el costo de aptitud (*fitness cost*) asociado a la adquisición de resistencia, un fenómeno ampliamente documentado en la evolución de bacterias bajo presión antibiótica [13], [18]. Las cepas de los primeros carriles C1 y C2 mantuvieron un crecimiento constante, mientras que C3, C4 y C5 mostraron latencias prolongadas, tasas de crecimiento reducidas y una mayor variabilidad (reflejada en las amplias barras de error del intervalo de confianza del 95 %). Esta variabilidad no es artefactual; es un indicador de heterogeneidad poblacional e inestabilidad fenotípica durante etapas críticas de adaptación, tal como se ha observado en estudios de evolución en gradientes de antibióticos [19].

Como postula el modelo de paisajes adaptativos [15], [20], la evolución hacia la resistencia implica transitar por “valles” de baja aptitud. Nuestros datos son consistentes con esto: las cepas que colonizaron concentraciones más altas (C3-C5) pagaron un costo metabólico por su resistencia inicial. La recuperación tardía en el crecimiento de C5 sugiere que, tras un cuello de botella poblacional, surgieron mutaciones compensatorias que restauraron parcialmente la aptitud, un fenómeno documentado en sistemas evolutivos espaciales [1] y que ha sido caracterizado como “evolución compensatoria por intercambio” (*exchange compensation*) en paisajes con compensaciones adaptativas [18]. El éxito de una cepa en este proceso no solo depende de su resistencia intrínseca, sino también de su capacidad para gestionar el estrés proteico y mantener la integridad del nucleóide [2].

6.1.2. Biofilm y Morfología: Estrategias Fenotípicas de Supervivencia y Persistencia

La capacidad de formar biopelícula mostró un patrón bimodal, con picos significativos en C2 y C5 (Figura 6). Este resultado es crucial: la formación de biofilm no es correlato de la concentración de antibiótico, sino una estrategia fenotípica discreta y potente. En C2 (aún genotipo salvaje, WT), el biofilm pudo actuar como un mecanismo de tolerancia colectiva que permitió la supervivencia inicial sin mutaciones en las QRDR, coincidiendo con lo reportado sobre el papel de los biopolímeros extracelulares en la protección bacteriana [21]. La exposición a concentraciones subinhibitorias (sub-MIC) de CIP puede, paradójicamente, modular la formación de biofilm y la expresión de genes de virulencia [22]. En C5, un mutante con costo de aptitud intermedio, la fuerte producción de biofilm pudo ser una compensación fenotípica que le permitió persistir y avanzar en el gradiente, evidenciando que el éxito adaptativo puede depender de inversiones en fenotipos de persistencia, no solo en la velocidad de crecimiento. La evolución de la resistencia en biopelículas expuestas a altas dosis de antibióticos puede seguir trayectorias aceleradas [23], lo que subraya la relevancia de nuestro modelo.

La morfología celular fue el biomarcador más dinámico. La filamentación severa observada en C4 (Figura 8) es una manifestación clásica de la respuesta SOS activada por el daño al ADN, tal como describen [24] y [11]. Esta alteración, junto con el pleomorfismo observado, no es aleatoria: es una respuesta programada de supervivencia que precede a la división celular y permite la reparación del material genético. La correlación entre la filamentación extrema y un crecimiento casi nulo en C4 ilustra vívidamente el alto costo biológico de las primeras mutaciones de resistencia. Estudios recientes correlacionan la supervivencia de *E. coli* al estrés por CIP con un aumento en la longitud del nucleóide y una gestión efectiva de las proteínas mal plegadas [2]. La plasticidad morfológica puede ser, en sí misma, un mecanismo de resistencia al

alterar la relación superficie-volumen y la acumulación intracelular del antibiótico [25].

6.1.3. Correlación Fenotipo-Genotipo: De la Morfología a la Mutación

El análisis genómico proporcionó el vínculo causal final (Sección 5.6). Las cepas C1 y C2, a pesar de crecer bajo presión antibiótica, mantuvieron el genotipo *wild type* en el QRDR de *gyrA*. Esto sugiere fuertemente que su supervivencia inicial se sustentó en mecanismos no mutacionales o preexistentes, como la sobreexpresión de bombas de eflujo (AcrAB-TolC) [14] o la presencia de genes de resistencia mediada por plásmidos (*qnr*) [26], un hallazgo consistente con modelos cuantitativos que desglosan la contribución de distintos mecanismos a la CMI de la CIP [27]. La resistencia de bajo nivel y multirresistencia pueden desarrollarse y seleccionarse incluso en un rango extendido de concentraciones subinhibitorias [28].

Por el contrario, las cepas C3, C4 y C5 presentaron la mutación S83F en *GyrA*. Esta sustitución, que altera el sitio de unión del CIP en la ADN girasa [6], [29], es la puerta de entrada genética a la resistencia de alto nivel. La correlación es clara: la aparición de esta mutación coincide con los fenotipos de mayor costo (crecimiento lento) y estrés morfológico extremo (filamentación). Nuestros datos trazan así una trayectoria evolutiva: i) tolerancia fenotípica (biofilm, filamentación) en bajas concentraciones, ii) adquisición de una mutación primaria costosa (S83F) bajo presión alta, y iii) exploración de compensaciones (posiblemente segunda mutación o regulación de eflujo) para restablecer la aptitud, como sugiere el éxito de C2 (que podría albergar mutaciones compensatorias no detectadas en *parC* o reguladores). El orden y la combinación específica de mutaciones en *gyrA* y *parC* son determinantes para el nivel final de resistencia y su costo asociado [30].

6.1.4. Validación Ultraestructural: El Costo Adaptativo se Hace Visible

Las imágenes de SEM y TEM proporcionaron la validación ultraestructural. En SEM, la superficie celular rugosa y las fallas en el septo observadas en C3 y C5 son la firma visible del estrés en la síntesis de la pared celular y la división (Figura 9), directamente relacionado con la inhibición de las topoisomerasas [31]. En TEM, la condensación anormal del nucleoide y la reducción de ribosomas en cepas como C4 reflejan el colapso de la maquinaria de replicación y traducción, un daño interno coherente con el mecanismo de acción bactericida de las fluoroquinolonas [11]. Estas técnicas no solo corroboran los datos fisiológicos, sino que convierten el “costo de aptitud” en una imagen tangible, mostrando las consecuencias citológicas de la acción antibiótica y la respuesta adaptativa de la bacteria.

6.1.5. La Morfología como Biomarcador Predictivo: Convergencia con Enfoques de Inteligencia Artificial

La reversión de la filamentación observada en el carril C5 sugiere que la morfología bacteriana actúa como un “código de barras” fenotípico del estado de resistencia. Este hallazgo es consistente con estudios recientes de bioinformática estructural; por ejemplo, Ikebe et al. demostraron mediante microscopía óptica y aprendizaje profundo (*Deep Learning*) que las características morfológicas, tales como la longitud y el ancho celular, poseen una asociación estadística directa con los perfiles de resistencia a antibióticos. En concordancia con nuestros resultados de *Aspect Ratio*, Ikebe y colaboradores validaron que las bacterias resistentes presentan firmas morfométricas distinguibles de sus parentales sensibles, lo que respalda el uso de la elongación como un biomarcador predictivo y no solo como un rasgo descriptivo del estrés

celular [32].

Por otro lado, la homogeneización del citoplasma y la alteración en la textura del nucleoide identificadas en nuestros análisis de TEM coinciden con reportes que vinculan la ultraestructura con la identidad de la cepa resistente. Hayashi-Nishino et al. establecieron un precedente crucial al utilizar Redes Neuronales Convolucionales (CNN) para clasificar bacterias farmacoresistentes basándose exclusivamente en imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Sus hallazgos confirman que las bacterias resistentes exhiben patrones de textura intracelular imperceptibles para el ojo humano pero cuantificables computacionalmente. Esto valida nuestra observación de que la disminución en la Desviación Estándar (heterogeneidad) en el carril C3 no es un artefacto, sino una característica estructural conservada que refleja la reorganización del material genético ante la inhibición de la girasa [33].

Finalmente, la robustez de los datos morfométricos (SEM) y densitométricos (TEM) obtenidos en este estudio sugiere su potencial aplicación en el entrenamiento de algoritmos de Inteligencia Artificial para el diagnóstico rápido. La viabilidad de este enfoque ha sido demostrada recientemente por Guan et al., quienes desarrollaron un sistema de “huella dactilar morfológica” impulsado por aprendizaje profundo (*Deep Learning*) capaz de identificar patógenos con alta precisión mediante el análisis de patrones visuales simples [34]. De manera análoga, proponemos que las métricas de Solidez y Densidad Electrónica descritas en esta tesis podrían alimentar modelos de redes neuronales para predecir, de manera automatizada y libre de cultivo, la fase evolutiva de resistencia en la que se encuentra una muestra clínica de *E. coli*.

6.1.6. Implicaciones y Perspectivas: Hacia una Vigilancia Predictiva de la RAM

Este estudio demuestra que el análisis morfológico cuantitativo y dinámico puede servir como un sistema de alerta temprana. Los cambios en la forma celular, la formación de biofilm y las alteraciones en el crecimiento son señales fenotípicas que se manifiestan antes de que una mutación de resistencia se fije y disemine en la población. Fenotipos como la filamentación podrían utilizarse como biomarcadores rápidos y accesibles para inferir mecanismos de resistencia subyacentes [31].

Esta visión abre la puerta a tecnologías de vigilancia predictiva y diagnósticos más rápidos. La integración de nuestros datos multinivel (imágenes, cinéticas, genómica) con algoritmos de aprendizaje automático (*Machine Learning*) e inteligencia artificial podría entrenar modelos predictivos robustos. Por ejemplo, se han desarrollado algoritmos como QUIRMIA para inferir mecanismos de resistencia a quinolonas a partir de datos fenotípicos de difusión en disco [3], y herramientas como aiGeneR 1.0 que utilizan aprendizaje profundo para identificar genes de resistencia informativos [4]. Asimismo, se han creado modelos de ML para predecir la CMI de CIP basándose en perfiles genómicos [35]. El campo de la nanobiotecnología también promete biosensores avanzados para la detección rápida de bacterias y resistencia [36], [37], [38]. En un futuro cercano, un sistema automatizado que analice en tiempo real la morfología y dinámica de crecimiento de un aislado clínico, posiblemente acoplado a biosensores electroquímicos o nanomateriales [39], podría predecir su potencial evolutivo hacia resistencias más complejas y guiar terapias más precisas y tempranas, mitigando la crisis global de la RAM [5], [40]. El enfoque de Una Sola Salud (*One Health*) es crucial para comprender y contener la diseminación de resistencias en interfaces ambientales, animales y humanas [41], [42].

Capítulo 7

Conclusiones

Los hallazgos de esta investigación, basados en la caracterización genotípica parcial y la evaluación fenotípica multinivel de linajes de *E. coli* evolucionados en un gradiente espacial de ciprofloxacino (MEGA-plate), permiten validar la hipótesis central del trabajo y ofrecer respuestas a los objetivos planteados.

1. **Validación del modelo experimental y del punto de partida sensible.** La cepa control *E. coli* ATCC 11229 confirmó un genotipo salvaje (WT) en los residuos críticos Ser83 y Asp87 de la región QRDR de *gyrA*, correlacionándose fenotípicamente con una alta susceptibilidad al CIP (MIC = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Este valor estableció la línea base de sensibilidad, permitiendo cuantificar de manera confiable el incremento en la resistencia adquirida por los mutantes evolucionados y validando el sistema MEGA-plate como un modelo robusto para estudiar trayectorias adaptativas en tiempo real [1](#).
2. **Caracterización de la trayectoria adaptativa inicial y el costo de aptitud.** Los linajes C3, C4 y C5 fueron confirmados como mutantes primarios portadores de la sustitución S83L/F en GyrA. Esta mutación, aunque necesaria para conferir resistencia, se

asoció con una marcada **penalización en la aptitud biológica**, evidenciada por latencias prolongadas, tasas de crecimiento reducidas y, en el caso de C4, una filamentación celular extrema que refleja la activación máxima de la respuesta SOS. Estos resultados confirman que la evolución hacia la resistencia en un paisaje adaptativo rugoso [15] implica transitar por “valles” de baja aptitud, donde la mutación primaria es insuficiente para compensar el daño celular inducido por el antibiótico.

- 3. Identificación de mecanismos de compensación y emergencia de picos adaptativos.** Los linajes de mayor éxito replicativo (C1 y C2) exhibieron cinéticas de crecimiento robustas. Este hallazgo sugiere fuertemente la operación de **epistasis positiva** y la adquisición de mutaciones compensatorias secundarias [18], [30]. Dichas mutaciones, aún por identificar completamente, probablemente residen en genes como *parC* o en reguladores de sistemas de eflujo (AcrAB-TolC [14]), y son esenciales para restaurar la eficiencia celular sin comprometer el nivel de resistencia, permitiendo a estas cepas ascender a nuevos “picos” en el paisaje adaptativo.
- 4. El papel de las estrategias fenotípicas no mutacionales en la persistencia.** La cuantificación de biofilm reveló que la adaptación no se limita a alteraciones genéticas. Las cepas C2 y C5 fueron clasificadas como altas productoras de biopelícula. En particular, para C5 (un mutante primario con aptitud intermedia), la inversión en biofilm parece actuar como una **estrategia de compensación fenotípica** [21], que le permitió persistir en zonas de alta concentración antibiótica aun con un crecimiento replicativo limitado. Esto subraya la multifactorialidad de la adaptación, donde mecanismos de tolerancia y persistencia pueden operar de forma concertada o alternativa a las mutaciones en dianas primarias.
- 5. Implicaciones para la vigilancia y el diagnóstico de la resistencia.** Los cambios

morfológicos drásticos (como la filamentación severa) y las alteraciones en la cinética de crecimiento se manifestaron como **biomarcadores fenotípicos tempranos** del estrés antibiótico y de la adquisición de mutaciones costosas. Esto valida el enfoque integrado fenotipo-genotipo y sienta las bases para el desarrollo de herramientas de vigilancia predictiva. La correlación sistemática de estos fenotipos con genotipos específicos, potenciada por algoritmos de aprendizaje automático [3], [4], podría conducir a métodos diagnósticos más rápidos que anticipen la evolución hacia resistencias de alto nivel.

Esta investigación demuestra que la evolución de *E. coli* bajo presión de ciprofloxacino en un entorno espacialmente estructurado sigue un modelo de **paisaje adaptativo rugoso y multifactorial**. La ruta hacia un éxito replicativo sostenible no es lineal, sino que requiere superar umbrales de costo biológico mediante la combinación de: i) mutaciones primarias en dianas farmacológicas (p. ej., *gyrA*), ii) mutaciones compensatorias secundarias que restablezcan la aptitud, y iii) la activación de estrategias fenotípicas de persistencia como la formación de biofilm. Estos hallazgos no solo aportan una comprensión más dinámica e integrada de la emergencia de la resistencia, sino que también destacan la utilidad de los biomarcadores fenotípicos como señales tempranas en la vigilancia de esta amenaza global para la salud pública [5].

7.1. Ciclo Evolutivo de Resistencia: Desestabilización y Recuperación Fenotípica

Se concluye que la morfología celular y la ultraestructura interna de *E. coli* trascienden la simple descripción física, constituyendo indicadores sensibles y predictivos de su estado de resistencia antimicrobiana. A través del análisis de imágenes (SEM y TEM), se demostró que

la trayectoria evolutiva frente a la presión selectiva del ciprofloxacino no es lineal, sino que está definida por un ciclo medible de desestabilización y recuperación fenotípica:

- **Fase de Crisis (estrés agudo):** Caracterizada cuantitativamente por una elongación celular masiva (pico en el *Aspect Ratio*) y una desorganización profunda de la arquitectura del nucleoide (reducción en la Desviación Estándar de la densidad electrónica). Esta fase denota la activación del sistema de emergencia SOS y el impacto directo del antibiótico sobre su diana molecular (las topoisomerasas), impidiendo la correcta segregación del ADN.
- **Fase de Adaptación (costo biológico):** Marcada por la pérdida de la integridad topográfica de la membrana (caída en la Solidez) y un vaciamiento citoplasmático significativo. Mas allá de ser un proceso aleatorio, la lisis de la subpoblación más susceptible libera ADN extracelular (eDNA), el cual funciona como un andamio estructural para la formación de biofilms. Esta matriz protege a la subpoblación sobreviviente y promueve la resistencia comunitaria, demostrando que la muerte celular de unos facilita la adaptación del resto.
- **Fase de Resistencia (consolidación):** Identificada por el retorno a la estabilidad morfométrica de bacilo corto y la adopción de una nueva configuración de densidad interna. Esta fase confirma la fijación de mutaciones genéticas que permiten a la célula restaurar su homeostasis, aunque manteniendo una firma estructural o *fitness cost* sutilmente distinta a la de la cepa silvestre.

7.2. Perspectivas e Innovación Científica

Los descubrimientos de este estudio confirman que parámetros como la elongación, la rugosidad superficial, la densidad citoplasmática y la textura del nucleoide funcionan como verdaderos biomarcadores o “códigos de barras” fenotípicos.

Al demostrar que estas variaciones morfológicas son consistentes y estadísticamente cuantificables, esta investigación sienta las bases para la integración de la microbiología clásica con herramientas de bioinformática avanzada. Se concluye que los códigos morfométricos y densitométricos aquí descritos poseen una verificación matemática necesaria para alimentar y entrenar algoritmos de Inteligencia Artificial (IA) y modelos de aprendizaje profundo (*Deep Learning*) [32], [33], [34]. En el futuro, se espera la implementación de estas tecnologías utilizando los parámetros estandarizados en esta tesis permitirá identificar, clasificar y predecir la fase de resistencia de cepas clínicas de manera automatizada, rápida y libre de cultivo, revolucionando el diagnóstico oportuno frente a la crisis global de la resistencia a los antimicrobianos [5].

Bibliografía

- [1] M. Baym et al., “Spatiotemporal Microbial Evolution on Antibiotic Landscapes,” *Science*, vol. 353, n.º 6304, págs. 1147-1151, **9 de sep. de 2016**, ISSN: 10959203. DOI: [10.1126/science.aag0822](https://doi.org/10.1126/science.aag0822). PMID: [27609891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27609891/).
- [2] G. Butler, J. Bos, R. H. Austin, S. R. Amend y K. J. Pienta, “Escherichia Coli Survival in Response to Ciprofloxacin Antibiotic Stress Correlates with Increased Nucleoid Length and Effective Misfolded Protein Management,” *Royal Society Open Science*, vol. 10, n.º 8, **9 de ago. de 2023**, ISSN: 20545703. DOI: [10.1098/rsos.230338](https://doi.org/10.1098/rsos.230338).
- [3] F. Imkamp, E. Bodendoerfer y S. Mancini, “QUIRMIA—a Phenotype-Based Algorithm for the Inference of Quinolone Resistance Mechanisms in Escherichia Coli,” *Antibiotics*, vol. 12, n.º 7, **1 de jul. de 2023**, ISSN: 20796382. DOI: [10.3390/antibiotics12071119](https://doi.org/10.3390/antibiotics12071119).
- [4] D. S. K. Nayak et al., “aiGeneR 1.0: An artificial intelligence technique for the revelation of informative and antibiotic resistant genes in escherichia coli,” *Frontiers in Bioscience-Landmark*, vol. 29, n.º 2, pág. 82, **22 de feb. de 2024**, ISSN: 2768-6701, 2768-6698. DOI: [10.31083/j.fb12902082](https://doi.org/10.31083/j.fb12902082), visitado 11 de nov. de 2025. dirección: <https://www.imrpess.com/journal/FBL/29/2/10.31083/j.fb12902082>.
- [5] G. J. Buckley y G. H. Palmer, *COMBATING ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND PROTECTING THE MIRACLE OF MODERN MEDICINE*. National Academies Press, **1 de ene. de 2022**, 1-366, ISBN: 978-0-309-26945-2. DOI: [10.17226/26350](https://doi.org/10.17226/26350).

-
- [6] K. J. Aldred, R. J. Kerns y N. Osheroff, “Mechanism of quinolone action and resistance,” *Biochemistry*, vol. 53, n.º 10, págs. 1565-1574, **18 de mar. de 2014**, ISSN: 0006-2960, 1520-4995. DOI: [10.1021/bi5000564](https://doi.org/10.1021/bi5000564), visitado 11 de nov. de 2025. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi5000564>.
- [7] D. W. Datok, D. Ishaleku, P. A. Tsaku, E. O. Agya y M. P. Adoga, “Multidrug Resistance to Commonly Prescribed Antibiotics in Escherichia Coli Isolated from Barbecued Beef (Suya) Sold in a Nigerian City,” *Pan African Medical Journal*, vol. 39, **2021**, ISSN: 19378688. DOI: [10.11604/pamj.2021.39.50.25502](https://doi.org/10.11604/pamj.2021.39.50.25502). PMID: [34422173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34422173/).
- [8] Q. Zhang et al., “Acceleration of Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance in Connected Microenvironments,” *Science*, vol. 333, n.º 6050, págs. 1764-1767, **23 de oct. de 2011**, ISSN: 10959203. DOI: [10.1126/science.1208747](https://doi.org/10.1126/science.1208747).
- [9] D. C. Hooper y G. A. Jacoby, “Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 6, n.º 9, **1 de sep. de 2016**, ISSN: 21571422. DOI: [10.1101/cshperspect.a025320](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320). PMID: [27449972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27449972/).
- [10] K. Tang y H. Zhao, “Quinolone Antibiotics: Resistance and Therapy,” *Infection and Drug Resistance*, vol. Volume 16, págs. 811-820, **feb. de 2023**, ISSN: 1178-6973. DOI: [10.2147/idr.s401663](https://doi.org/10.2147/idr.s401663).
- [11] T. P. Cushnie, N. H. O’Driscoll y A. J. Lamb, “Morphological and Ultrastructural Changes in Bacterial Cells as an Indicator of Antibacterial Mechanism of Action,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, n.º 23, págs. 4471-4492, **8 de jul. de 2016**, ISSN: 14209071. DOI: [10.1007/s00018-016-2302-2](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2302-2). PMID: [27392605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27392605/).
- [12] K. J. Aldred, S. A. McPherson, C. L. Turnbough, R. J. Kerns y N. Osheroff, “Topoisomerase IV-quinolone Interactions Are Mediated through a Water-Metal Ion Bridge: Mechanistic Basis of Quinolone Resistance,” *Nucleic Acids Research*, vol. 41, n.º 8,

-
- págs. 4628-4639, **abr. de 2013**, ISSN: 03051048. DOI: [10.1093/nar/gkt124](https://doi.org/10.1093/nar/gkt124). PMID: [23460203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23460203/).
- [13] D. L. Huseby, F. Pietsch, G. Brandis, L. Garoff, A. Tegehall y D. Hughes, “Mutation Supply and Relative Fitness Shape the Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia Coli*,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 34, n.º 5, págs. 1029-1039, **1 de mayo de 2017**, ISSN: 15371719. DOI: [10.1093/molbev/msx052](https://doi.org/10.1093/molbev/msx052). PMID: [28087782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28087782/).
- [14] S. Jang, “AcrAB–TolC, a Major Efflux Pump in Gram Negative Bacteria: Toward Understanding Its Operation Mechanism,” *BMB Reports*, vol. 56, n.º 6, págs. 326-334, **2023**, ISSN: 1976670X. DOI: [10.5483/BMBRep.2023-0070](https://doi.org/10.5483/BMBRep.2023-0070). PMID: [37254571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37254571/).
- [15] J. Diaz-Colunga et al., “Global Epistasis on Fitness Landscapes,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 378, n.º 1877, **22 de mayo de 2023**, ISSN: 14712970. DOI: [10.1098/rstb.2022.0053](https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0053). PMID: [37004717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37004717/).
- [16] F. M. Barnard y A. Maxwell, “Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser83 and Asp87,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, n.º 7, págs. 1994-2000, **2001**, ISSN: 00664804. DOI: [10.1128/AAC.45.7.1994-2000.2001](https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.1994-2000.2001). PMID: [11408214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11408214/).
- [17] S. A. Carr, S. L. Mathews, J. A. Pruneski y N. M. Stasulli, “A Case Study to Engage Students in Evolutionary Thinking around Antibiotic Resistance Using the MEGA-plate Experiment,” *Journal of Microbiology & Biology Education*, vol. 25, n.º 3, **12 de dic. de 2024**, ISSN: 1935-7877. DOI: [10.1128/jmbe.00039-24](https://doi.org/10.1128/jmbe.00039-24).
- [18] S. G. Das, M. Mungan y J. Krug, *Epistasis-Mediated Compensatory Evolution in a Fitness Landscape with Adaptational Tradeoffs*, bioRxiv, **3 de nov. de 2024**. DOI: [10.1101/2024.11.03.621663](https://doi.org/10.1101/2024.11.03.621663). dirección: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.11.03.621663>.

-
- [19] J. Deng et al., “Adaptive evolution of *Escherichia coli* to ciprofloxacin in controlled stress environments: Contrasting patterns of resistance in spatially varying versus uniformly mixed concentration conditions,” *Environmental Science and Technology*, vol. 53, n.º 14, págs. 7996-8005, **16 de jul. de 2019**, Publisher: American Chemical Society, ISSN: 15205851. DOI: [10.1021/acs.est.9b00881](https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00881).
- [20] H. Eble, M. Joswig, L. Lamberti y W. B. Ludington, *High Dimensional Geometry of Fitness Landscapes Identifies Master Regulators of Evolution and the Microbiome*, bioRxiv, **12 de sep. de 2021**. DOI: [10.1101/2021.09.11.459926](https://doi.org/10.1101/2021.09.11.459926). dirección: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.09.11.459926>.
- [21] J. A. Garza-Cervantes et al., “Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Biopolymer-Ni, Zn Nanoparticle Biocomposites Synthesized Using *R. Mucilaginosa* UANL-001L Exopolysaccharide as a Capping Agent,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14, págs. 2557-2571, **2019**, ISSN: 11782013. DOI: [10.2147/IJN.S196470](https://doi.org/10.2147/IJN.S196470). PMID: [31118605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31118605/).
- [22] G. Dong et al., “Effects of Sub-Minimum Inhibitory Concentrations of Ciprofloxacin on Biofilm Formation and Virulence Factors of *Escherichia coli*,” *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 23, n.º 1, págs. 15-21, **1 de ene. de 2019**, ISSN: 16784391. DOI: [10.1016/j.bjid.2019.01.004](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.01.004). PMID: [30796889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30796889/).
- [23] L. L. Nesse, A. M. Osland, B. Asal y S. S. Mo, “Evolution of Antimicrobial Resistance in *E. coli* Biofilm Treated with High Doses of Ciprofloxacin,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, **2023**, ISSN: 1664302X. DOI: [10.3389/fmicb.2023.1246895](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1246895).
- [24] S. S. Justice, D. A. Hunstad, L. Cegelski y S. J. Hultgren, “Morphological plasticity as a bacterial survival strategy,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, n.º 2, págs. 162-168, **feb. de 2008**, ISSN: 1740-1526, 1740-1534. DOI: [10.1038/nrmicro1820](https://doi.org/10.1038/nrmicro1820). visitado 11 de nov. de 2025. dirección: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1820>.

-
- [25] N. Ojkic, D. Serbanescu y S. Banerjee, “Antibiotic Resistance via Bacterial Cell Shape-Shifting,” *mBio*, vol. 13, n.º 3, **1 de jun. de 2022**, ISSN: 21507511. DOI: [10.1128/mbio.00659-22](https://doi.org/10.1128/mbio.00659-22). PMID: [35616332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35616332/).
- [26] J. M. Rodríguez-Martínez, “Mecanismos de Resistencia a Quinolonas Mediada Por Plásmidos,” *1*, **2005**, págs. 25-31.
- [27] B. C. L. Van Der Putten, D. Remondini, G. Pasquini, V. A. Janes, S. Matamoros y C. Schultsz, “Quantifying the contribution of four resistance mechanisms to ciprofloxacin MIC in *Escherichia coli*,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 74, n.º 2, págs. 298-310, **1 de feb. de 2019**, ISSN: 0305-7453, 1460-2091. DOI: [10.1093/jac/dky417](https://doi.org/10.1093/jac/dky417). visitado 11 de nov. de 2025. dirección: <https://academic.oup.com/jac/article/74/2/298/5144001>.
- [28] C. Ching y M. H. Zaman, “Development and Selection of Low-Level Multi-Drug Resistance over an Extended Range of Sub-Inhibitory Ciprofloxacin Concentrations in *Escherichia Coli*,” *Scientific Reports*, vol. 10, n.º 1, **1 de dic. de 2020**, ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/s41598-020-65602-z](https://doi.org/10.1038/s41598-020-65602-z). PMID: [32471975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32471975/).
- [29] A. Wohlkonig et al., “Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 17, n.º 9, págs. 1152-1153, **sep. de 2010**, ISSN: 1545-9993, 1545-9985. DOI: [10.1038/nsmb.1892](https://doi.org/10.1038/nsmb.1892). visitado 11 de nov. de 2025. dirección: <https://www.nature.com/articles/nsmb.1892>.
- [30] S. Trindade, A. Sousa, K. B. Xavier, F. Dionisio, M. G. Ferreira e I. Gordo, “Positive epistasis drives the acquisition of multidrug resistance,” *PLoS Genetics*, vol. 5, n.º 7, **jul. de 2009**, ISSN: 15537390. DOI: [10.1371/journal.pgen.1000578](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000578).
- [31] F. Otero et al., “Rapid Detection of Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria through Assessment of Changes in Cellular Morphology,” *Microbial Drug Resistance*,

-
- vol. 23, n.º 2, págs. 157-162, **1 de mar. de 2017**, ISSN: 19318448. DOI: [10.1089/mdr.2016.0023](https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0023). PMID: [27259183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27259183/).
- [32] M. Ikebe, K. Aoki, M. Hayashi-Nishino, C. Furusawa y K. Nishino, “Bioinformatic Analysis Reveals the Association between Bacterial Morphology and Antibiotic Resistance Using Light Microscopy with Deep Learning,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 15, pág. 1450804, **2024**. DOI: [10.3389/fmicb.2024.1450804](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1450804).
- [33] M. Hayashi-Nishino, K. Aoki, A. Kishimoto et al., “Identification of Bacterial Drug-Resistant Cells by the Convolutional Neural Network in Transmission Electron Microscope Images,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, pág. 839718, **2022**. DOI: [10.3389/fmicb.2022.839718](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.839718).
- [34] S. Guan et al., “Deep Learning-Driven Morphological Fingerprinting: Rapid, Accurate and Low-Cost Pathogen Identification via the Analysis of Dried Patterns of Droplets,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 23, **2025**. DOI: [10.1186/s12951-025-03923-9](https://doi.org/10.1186/s12951-025-03923-9).
- [35] B. Á. Pataki et al., “Understanding and Predicting Ciprofloxacin Minimum Inhibitory Concentration in Escherichia Coli with Machine Learning,” *Scientific Reports*, vol. 10, n.º 1, **1 de dic. de 2020**, ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/s41598-020-71693-5](https://doi.org/10.1038/s41598-020-71693-5). PMID: [32929164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32929164/).
- [36] Q. Xia, H. Jiang, X. Liu, L. Yin y X. Wang, “Advances in Engineered Nano-Biosensors for Bacteria Diagnosis and Multidrug Resistance Inhibition,” *Biosensors*, vol. 14, n.º 2, **1 de feb. de 2024**, ISSN: 20796374. DOI: [10.3390/bios14020059](https://doi.org/10.3390/bios14020059). PMID: [38391978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38391978/).
- [37] S. Takallu et al., “Nanotechnology Improves the Detection of Bacteria: Recent Advances and Future Perspectives,” *Heliyon*, vol. 10, n.º 11, **15 de jun. de 2024**, ISSN: 24058440. DOI: [10.1016/j.heliyon.2024.e32020](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32020).

-
- [38] C. S. Sreelakshmi, V. Kini, M. Singh, C. Mukhopadhyay, P. Nag y K. Sadani, “Disposable Electrochemical Biosensors for the Detection of Bacteria in the Light of Antimicrobial Resistance,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 121, n.º 9, págs. 2549-2584, **1 de sep. de 2024**, ISSN: 10970290. DOI: [10.1002/bit.28735](https://doi.org/10.1002/bit.28735). PMID: [38822742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38822742/).
- [39] A. Ahmed, J. V. Rushworth, N. A. Hirst y P. A. Millner, “Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 27, n.º 3, págs. 631-646, **2014**, ISSN: 10986618. DOI: [10.1128/CMR.00120-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13). PMID: [24982325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24982325/).
- [40] D. G. Larsson y C. F. Flach, “Antibiotic Resistance in the Environment,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 20, n.º 5, págs. 257-269, **1 de mayo de 2022**, ISSN: 17401534. DOI: [10.1038/s41579-021-00649-x](https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x). PMID: [34737424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34737424/).
- [41] K. B. Jiménez, L. C. Jiménez y M. A. Andrés, “The Impact of the Antibiotic Resistance on the Sustainable Development,” *Poblacion y Salud en Mesoamerica*, vol. 19, n.º 2, **1 de ene. de 2022**, ISSN: 16590201. DOI: [10.15517/psm.v0i19.47590](https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590).
- [42] T. Das et al., “High Prevalence of Ciprofloxacin Resistance in Escherichia Coli Isolated from Chickens, Humans and the Environment: An Emerging One Health Issue,” *PLoS ONE*, vol. 18, n.º 11, **1 de nov. de 2023**, ISSN: 19326203. DOI: [10.1371/journal.pone.0294043](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294043). PMID: [37983240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37983240/).