



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**“Efecto de antibióticos sobre un sistema de medición de actividad de ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* en *Escherichia coli* recombinante”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en  
Biología

Autor

Maria Carolina Ortiz Caceres

Asesor

Dr. Daniel Guerra Giraldez

Lima, Perú

2024

## **Jurado**

**Presidente: Dra. Rosa Patricia Herrera Velit**

**Secretario: Mg. Ruth Liliana Cristobal Delgado**

**Vocal: Mg. Dora Jesus Maurtua Torres**



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

"Efecto de antibióticos sobre un sistema de medición de actividad de ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* en *Escherichia coli* recombinante"

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor  
Maria Carolina Ortiz Caceres

Asesor  
Dr. Daniel Guerra Giraldez

Lima, Perú

2024

Informe estándar [Más información](#)  
Informe en inglés no disponible

### 15% Similitud estándar

2 Exclusiones → [Filtros](#)

Fuentes  
Mostrar las fuentes solapadas

- 1 Internet  [hdl.handle.net](#) <1%  
15 bloques de texto 187 palabra que coinciden
- 2 Internet  [www.biorxiv.org](#) <1%  
6 bloques de texto 153 palabra que coinciden
- 3 Internet  [journals.plos.org](#) <1%  
6 bloques de texto 148 palabra que coinciden
- 4 Internet  [www.pref.saitama.lg.jp](#) <1%  
3 bloques de texto 99 palabra que coinciden
- 5 Publicación  Stefan R. Schmidt. "Chapter 11 Fusion Proteins: C..." <1%  
2 bloques de texto 69 palabra que coinciden

viernes, 13 de diciembre de 2024

# ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
<b>I. Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>II. Marco Teórico .....</b>	<b>7</b>
A. Antibióticos.....	7
B. Sistema de expresión del bacteriófago T7.....	10
C. Proteína fluorescente verde (GFP).....	11
D. Cultivos productivos en dos fases .....	12
E. Modelo matemático.....	13
<b>III. Hipótesis.....</b>	<b>17</b>
<b>IV. Objetivos .....</b>	<b>18</b>
<b>V. Materiales y métodos .....</b>	<b>19</b>
A. Exploración en la literatura actual y selección de antibióticos .....	19
B. Estableciendo condiciones y variables en ensayos de inhibición.....	19
C. Tratamiento de datos: Gráficos de crecimiento y fluorescencia.....	26
D. Comparación de la actividad antibiótica en <i>E. coli</i> , ARNP-Mtb y ribosomas.....	27
<b>VI. Resultados.....</b>	<b>29</b>
A. Selección de antibióticos.....	29
B. Estableciendo condiciones y variables de prueba de inhibición .....	29
1. Ensayos preliminares con los antibióticos seleccionados .....	29
2. Efecto del solvente en ensayos con CFX: dimetilsulfóxido (DMSO).....	36
3. Ensayos de localización de fluorescencia.....	38
C. Ensayos de inhibición .....	40
1. Curva dosis – respuesta con Cefuroxima .....	40
2. Curva dosis – respuesta con Cloranfenicol .....	46
D. Comparación de actividad antibiótica en <i>E. coli</i> , ARNP-MTb y ribosomas .....	52
<b>VII. Discusión .....</b>	<b>56</b>
A. Comprobación de hipótesis: Identificando el efecto de los antibióticos sobre ARNP-Mtb y sobre <i>E. coli</i> .....	56
B. Discusión detallada de los experimentos .....	58
<b>VIII. Conclusiones .....</b>	<b>73</b>
<b>IX. Referencias.....</b>	<b>74</b>
<b>X. Anexos.....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1. Diagrama esquemático del modelo matemático desarrollado por Arias & Guerra (72), inspirado en el trabajo de Towbin et al. (73).** Se muestra la leyenda de cada símbolo en la parte superior

**Figura 2. Funcionamiento de la Bacteria Reportera cuando es inducida con IPTG**

**Figura 3. Esquema de distribución de cultivo para ensayo de localización de fluorescencia.** La gradiente de colores, tanto en la placa como en los tubos, refleja condiciones diferentes. Por lo tanto, de la placa se colectó individualmente el volumen total de cultivo de cada condición y se transfirió al tubo correspondiente de 1.5 mL

**Figura 4. Crecimiento de Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (CFX) a partir las 4 h 15 min.** Se probaron 5 valores mayores a la MIC<sub>90</sub> para analizar el rango de sobrevivencia. Densidad óptica inicial: 0.01

**Figura 5. Comparación de las tasas de crecimiento de la Bacteria Reportera en ausencia de antibiótico y a 25 mg/L de Cefuroxima (Adicionado a 4 h 15 min).** Líneas de la gráfica: Tasa de crecimiento (rojo), tasas de fluorescencia (amarillo), la densidad óptica (azul) y la fluorescencia (verde). Datos de fluorescencia obtenidos a ganancia 50. CFX: Cefuroxima. T: tiempo de adición. La flecha indica el momento en que fue añadido el antibiótico. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 6. Crecimiento de la Bacteria Reportera en diferentes tiempos de inoculación de Cefuroxima (CFX) 20 mg/L.** Arriba (a): Curva de crecimiento bacteriano en los 3 tiempos de inoculación evaluados. Abajo (b): Tasas de crecimiento (línea roja) en los 3 tiempos en que se colocó el antibiótico. Datos de fluorescencia obtenidos a ganancia 50. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 7. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, a diferentes tiempos de inoculación de Cefuroxima (CFX) 20 mg/L.** Se muestra la fluorescencia normalizada en los 3 tiempos con antibiótico y la Bacteria Control (BC). Resultados a ganancia 50.

**Figura 8. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol.** Nótese el rápido efecto del antibiótico en el crecimiento a comparación de la condición sin antibiótico. Tiempo de inoculación de CAM: 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 9. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol.** Se observa una reducción proporcional a mayor cantidad de antibiótico. Tiempo de inoculación de CAM: 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 10. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cloranfenicol.** Nótese el mismo comportamiento visualizado en la gráfica de crecimiento. Resultados a ganancia 50. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min. Tiempo de inoculación de CAM: 2 h 30 min.

**Figura 11. Comparación del crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (CFX) y del solvente DMSO.** Arriba (a): A diferentes concentraciones de antibiótico y del solvente. Abajo (b): Sólo varían las concentraciones del antibiótico. Tiempo de adición de CFX: 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 12. Comparación de la Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cefuroxima (CFX) y el solvente DMSO.** Arriba (a): A diferentes concentraciones del antibiótico y del solvente. Abajo (b): Sólo varían las concentraciones del antibiótico. Resultados a ganancia 100. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min. Tiempo de inoculación de CFX: 2 h 30 min..... 37

**Figura 13. Comparación de tasas de crecimiento de la Bacteria Reporta sin inducir e inducida, en presencia y ausencia del solvente DMSO.** Con el solvente, no se observa diferencia en la tasa de crecimiento (línea roja) ni en la densidad óptica (línea azul); mientras que al cuando se indujo a la BR, sí hubo un gran aumento de fluorescencia (línea verde). Datos de fluorescencia obtenidos a ganancia 100. Densidad óptica inicial: 0.01..... 38

**Figura 14. Resultados del ensayo de localización de fluorescencia.** Las concentraciones de Cefuroxima (CFX) y DMSO fueron añadidas al tiempo establecido de 2 h 30 min. Arriba (a): se muestran los porcentajes de fluorescencia normalizada incluyendo el efecto del DMSO. Abajo (b): se muestran los porcentajes de fluorescencia normalizada sólo bajo el efecto del antibiótico. Resultados obtenidos a ganancia 100. .... 39

**Figura 15. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (adicionado a 2 h 30 min).** Nótese un aumento constante en la OD a medida que aumenta la concentración del antibiótico. BC: Bacteria Control. Densidad óptica inicial: 0.01..... 40

**Figura 16. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cefuroxima (adicionado a 2 h 30 min).** Se observa una reducción el a fluorescencia producida a mayor concentración de antibiótico. Resultados a ganancia 50. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min.

**Figura 17. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (adicionado a 1 h 45 min).** BC: Bacteria Control. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 18. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cefuroxima (adicionado a 1 h 45 min).** Resultados a ganancia 50. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min.

**Figura 19. Tasas de crecimiento (rojo) y producción de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a diferentes concentraciones de Cefuroxima (adicionadas a 2 h 30 min).** Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CFX: Cefuroxima. Densidad óptica inicial: 0.01

**Figura 20. Tasas de crecimiento (rojo) y producción de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a diferentes concentraciones de Cefuroxima (adicionadas a 1 h 45 min).** Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CFX: Cefuroxima. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 21. Prueba de Susceptibilidad Antibiótica con la Bacteria Reportera para Cefuroxima.** Se muestra la Densidad óptica inicial de cada cultivo en los corchetes. No se observó sobrevivencia al antibiótico añadido al inicio del experimento

**Figura 22. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol.** Se adicionó el antibiótico a las 2 h 45 min. Se observa el mismo efecto inhibitorio cuando CAM es añadido a 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01

**Figura 23. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cloranfenicol (adicionado a 2 h 45 min).** Se observa una reducción rápida y gradual a mayor cantidad de CAM.

**Figura 24. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol (adicionado a 1 h 45 min).** A diferencia del tiempo de inoculación a 2 h 45 min, se visualiza un crecimiento muy similar a todas las concentraciones. Densidad óptica inicial: 0.01.

**Figura 25. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cloranfenicol (adicionado a 1 h 45 min).** Resultados a ganancia 50. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min.

**Figura 26. Tasas de crecimiento (rojo), tasas de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a diferentes concentraciones de Cloranfenicol (adicionado a 2 h 45 min).** Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CAM: Cloranfenicol. Densidad óptica inicial: 0.01

**Figura 27. Tasas de crecimiento (rojo), tasas de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a diferentes concentraciones de Cloranfenicol (adicionado a 1 h 45 min).** Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CAM: Cloranfenicol. Densidad óptica inicial: 0.01

**Figura 28. Blancos de acción de los antibióticos seleccionados para los experimentos con la Bacteria Reportera.** Figura hecha en Biorender.com

**Figura 29. Fluorescencia Normalizada a diferentes concentraciones de a) Rifampicina y b) Cefuroxima.** Las flechas indican tiempo de inoculación (naranja) e inducción (verde): 1 h 45 min. Figuras a ganancia 100.

**Figura 30. Fluorescencia Normalizada a diferentes concentraciones de a) Rifaximina y b) Cefuroxima.** Las flechas indican tiempo de inoculación (naranja) e inducción (verde): 1 h 45 min. Figuras a ganancia 100. BC: Bacteria Control.

**Figura 31. Crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de a) Cloranfenicol y b) Cefuroxima.** La flecha naranja indica tiempo de inoculación: 1 h 45 min. BC: Bacteria Control. Densidad óptica inicial: 0.01

**Figura 32. Fluorescencia Normalizada a diferentes concentraciones de a) Cloranfenicol y b) Cefuroxima.** Las flechas indican tiempo de inoculación (naranja) e inducción (verde): 1 h 45 min. Figuras a ganancia 100. BC: Bacteria Control

**Figura 33. Función de regulación del efecto de antibióticos en la fracción heteróloga (GFP)**

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Condiciones para definir el tiempo de inoculación del antibiótico.

Tabla 2. Concentraciones finales para los ensayos de inhibición con Cloranfenicol y Cefuroxima

Tabla 3. Concentraciones de los antibióticos utilizados para el modelo matemático.

Tabla 4. Antibióticos que podrían ser empleados para continuar evaluando al sistema recombinante



## ABREVIATURAS

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

ATB: Antibiótico(s)

ARNP / ARNPs: ARN polimerasa(s)

ARNP – Mtb: ARN polimerasa de *M. tuberculosis*

ARNP – T7: ARN polimerasa del fago T7

GFP: Green Fluorescent Protein (Proteína fluorescente verde)

MDR: Multidrogoresistencia

TB: Tuberculosis

RR: Resistencia a Rifampicina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Pb: Pares de base

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

kDa: Kilo Daltons

M: Molar

μM: micromolar

mM: milimolar

IPTG: Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido

PBP: Penicillin binding proteins (Transpeptidasas)

RIF: Rifampicina

RFX: Rifaximina

HTS: High Throughput Screening

BR: Bacteria Reportera

BC: Bacteria Control

CFX: Cefuroxima

CAM: Cloranfenicol

OD: Densidad óptica

MIC: Concentración mínima de inhibición

MIC50: Concentración mínima para inhibir el 50% de la densidad bacteriana

MIC90: Concentración mínima para inhibir el 90% de la densidad bacteriana

DMSO: Dimetilsulfóxido

nm: Nanómetros

CFU: Unidades formadoras de colonias

## Resumen

La resistencia antibiótica en *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es una preocupación global. La eficacia de los antibióticos dirigidos a la proteína ARN polimerasa (ARNP) la convierte en un blanco apropiado para la creación de nuevos agentes antituberculosos. Sin embargo, el cribado de antibióticos para Mtb conlleva desafíos y riesgos adicionales.

Recientemente, el Laboratorio de Moléculas Individuales de la UPCH diseñó una *E. coli* que expresa una proteína fluorescente verde (GFP), dependiente de la actividad de la ARNP de Mtb producida en su interior. Esta Bacteria Reportera permitiría el cribado de nuevos inhibidores de esta enzima, reduciendo así los riesgos para la salud, gastos y tiempo. Sin embargo, los posibles efectos en *E. coli* podrían dificultar la interpretación de resultados. Por ello, hemos planteado evaluar antibióticos con acción sobre *E. coli* para discernir entre efectos sobre la ARNP de Mtb y sobre la célula hospedera.

Se seleccionó un antibiótico que afecta la viabilidad de *E. coli* (Cefuroxima) y otro que afecta a sus ribosomas (Cloranfenicol). Se evaluaron sus efectos sobre la supervivencia bacteriana, la fluorescencia normalizada, así como las tasas de crecimiento y fluorescencia de GFP. Además, se comparó su acción con otros antibióticos que inhiben la actividad de ARNP-Mtb (Rifaximina y Rifampicina). Para todos los antibióticos se observó una tendencia común: una reducción en la fluorescencia que no necesariamente se correlaciona con una disminución del crecimiento. Esta observación fue respaldada por un modelo matemático que mostró un resultado similar, incluso para la Cefuroxima. Sin embargo, los gráficos de fluorescencia indicaron que los antibióticos que afectan a la ARNP-Mtb generan una caída más lenta y abrupta de producción de GFP que aquellos que solo afectan a la bacteria hospedera. Aunque el sistema actual puede usarse para el cribado de antibióticos dirigidos a la ARNP-Mtb, es necesario evaluar a otros antibióticos con diferentes blancos de acción.

**Palabras clave:** Antibióticos, *Mycobacterium tuberculosis*, Proteínas Recombinantes.

## Abstract

Antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is a global concern. The efficacy of antibiotics targeting the RNA polymerase protein (ARNP) makes it an appropriate target for the development of novel anti-tuberculosis agents. However, antibiotic screening for Mtb carries additional challenges and risks.

Recently, the Laboratorio de Moléculas Individuales at UPCH engineered an *E. coli* that expresses a green fluorescent protein (GFP), dependent on the Mtb ARNP activity produced within it. This reporter bacterium would allow the screening of new inhibitors of this enzyme, thus reducing health risks, expenses and time. However, possible effects on *E. coli* could make interpretation of results difficult. Therefore, we set out to evaluate antibiotics with action on *E. coli* to discern between effects on Mtb ARNP and on the host cell.

An antibiotic that affects the viability of *E. coli* (Cefuroxime) and another that affects its ribosomes (Chloramphenicol) were selected. Their effects on bacterial survival, normalized fluorescence, as well as growth and GFP fluorescence rates were evaluated. In addition, their action was compared with other antibiotics that inhibit ARNP-Mtb activity (Rifaximin and Rifampicin). For all antibiotics, a common trend was observed: a reduction in fluorescence that does not necessarily correlate with a decrease in growth. This observation was supported by a mathematical model that showed a similar result, even for Cefuroxime. However, the fluorescence plots indicated that antibiotics that affect ARNP-Mtb generate a slower and steeper drop in GFP production than those that only affect the host bacterium. Although the current system can be used for screening antibiotics targeting ARNP-Mtb, other antibiotics with different targets of action need to be evaluated.

**Keywords:** Antibiotics, *Mycobacterium tuberculosis*, Recombinant Proteins.

## I. Introducción

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente causante de la tuberculosis (TB), es considerado el segundo patógeno con mayor índice de mortalidad a nivel mundial (1). En los años posteriores a la pandemia de la COVID-19, el número de notificaciones de casos de TB volvió a niveles pre-pandémicos, indicando un retroceso en la meta global de reducción de la tuberculosis para el año 2030. Además, la proliferación de variantes resistentes en países considerados de alta carga, como el Perú, presenta un desafío significativo para erradicar definitivamente la enfermedad.

Hasta hace algunos años, la Rifampicina, un antibiótico de primera línea para combatir la TB, fue ampliamente utilizado para tratar variantes resistentes. Su eficacia radica en inhibir el inicio de la transcripción mediada por la ARN polimerasa (ARNP) de *M. tuberculosis* (2). Sin embargo, entre los años 2020 y 2021, hubo un aumento de 3.1% en el número de personas que adquirieron cepas multidrogoresistentes y resistentes a la Rifampicina a nivel mundial (3). Esto obliga al uso de medicamentos de segunda línea, los cuales son difíciles de encontrar en el mercado y altamente tóxicos; lo que desalienta al paciente a continuar con el tratamiento (4). Dicha problemática promueve la búsqueda de nuevos antibióticos con actividad eficaz.

No obstante, encontrar nuevos antibióticos para combatir a *M. tuberculosis* representa un desafío. En países con alta incidencia de la enfermedad, se han reportado casos de infección tanto en el personal de centros de salud como en el personal de laboratorio que manipula fluidos de pacientes con tuberculosis (5,6). El riesgo de infección aumenta en los laboratorios que realizan ensayos de susceptibilidad antibiótica o se manejan muestras que contienen cepas resistentes (7).

Dado que la transmisión de esta enfermedad infecciosa ocurre por vía aérea, es fundamental evitar la liberación de aerosoles que contengan a la bacteria. Por ese motivo, los laboratorios que investigan a *M. tuberculosis*, clasificados como de nivel de bioseguridad 3, están obligados a cumplir con estrictas normas de bioseguridad, tales como: buenas prácticas de laboratorio, una constante evaluación de riesgos, uso de equipo de protección personal, equipamiento de laboratorio, medidas de vigilancia sanitaria, entre otros (7,8).

Una alternativa para evitar riesgos sanitarios, consiste en trabajar con micobacterias menos peligrosas, como *M. bovis* o *M. smegmatis*. Por ejemplo, la cercanía genética entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* convierte a esta última en una opción adecuada y menos riesgosa para investigar la fisiología de Mtb (9). Sin embargo, ambas especies pertenecen a un grupo de micobacterias caracterizado por su lento tiempo de crecimiento, lo que significa que las colonias pueden tardar días o semanas en formarse después de la siembra (10). Esto retarda la posibilidad de obtener resultados rápidos para un antibiótico candidato.

Asimismo, *M. smegmatis* es otra micobacteria que es utilizada en lugar de *M. tuberculosis*. Aunque esta especie ofrece la ventaja de un crecimiento más rápido (2 horas), es genéticamente menos semejante a Mtb (11). Dichos obstáculos, asociados a las características particulares de estas micobacterias, han disminuido el interés por descubrir nuevos antibióticos contra *M. tuberculosis*.

Por otro lado, la tecnología de ADN recombinante implica la manipulación y construcción de secuencias de ADN, con el propósito de mejorar las características de los organismos receptores de este ADN foráneo, también denominados “chasis”(12). Entre muchas de sus contribuciones a la salud y a la medicina, esta tecnología ha ampliado la exploración de nuevos fármacos y la producción de estos en grande escala. Asimismo, la expresión de proteínas heterólogas por microorganismos de rápido crecimiento y sencillo manejo en laboratorio, como *Escherichia coli*, ha facilitado diferentes abordajes biológicos.

Las investigaciones sobre *M. tuberculosis* también han sido beneficiadas por la tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, la producción de proteínas recombinantes de Mtb ha sido útil para entender mejor su función durante la patología de la enfermedad (13,14). Estos sistemas recombinantes también reducen el riesgo de trabajar directamente con microorganismos patogénicos, optimizan la producción de proteínas y aceleran la obtención de datos (15). Además, la adición de genes reporteros en organismos vivos ha favorecido la generación de bacterias que expresan proteínas fluorescentes bajo determinadas condiciones, las cuales son de gran utilidad para observar el efecto de compuestos antibacterianos en procesos celulares y en la supervivencia de la bacteria (16,17).

Debido a la vital importancia de la enzima ARN polimerasa en la supervivencia de Mtb y la eficacia del antibiótico Rifampicina (18,19), esta proteína es considerada un blanco crucial de acción antibiótica. Este reconocimiento también impulsó el diseño de sistemas de transcripción que permiten explorar la actividad bactericida de nuevas moléculas. Los sistemas de transcripción *in vivo* adoptan un enfoque semejante al ambiente interno de la bacteria, proporcionando datos más reveladores sobre la farmacodinámica (20). Este enfoque ha sido desarrollado por algunos investigadores (21,22), utilizando una bacteria inocua y de rápido crecimiento como hospedero para expresar la enzima heteróloga ARN polimerasa de Mtb.

No obstante, en los trabajos de Banerjee *et al.* y Sharma *et al.* (21,22) se describe que la bacteria alberga 3 plásmidos, dos de los cuales contienen genes que codifican las subunidades de la ARNP-Mtb y uno que produce una proteína reportera fluorescente. Durante la división celular, el costo energético de mantener la misma cantidad de tantos plásmidos puede causar inestabilidad en su repartición (23). Por esta razón, es necesario el desarrollo de sistemas de transcripción más estables para el cribado fenotípico de nuevos antibióticos contra Mtb.

Recientemente, el Laboratorio de Moléculas Individuales de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, desarrolló una bacteria *E. coli* que expresa la proteína fluorescente GFP en forma dependiente de la actividad de la ARNP-Mtb producida en su interior, lo que permitiría el cribado de nuevos antibióticos con actividad sobre esta enzima. Sin embargo, los efectos sobre *E. coli*, célula hospedera de este sistema recombinante, podrían dificultar la interpretación de resultados. Por ello, planteamos evaluar diversos antibióticos con acción sobre *E. coli*, interrogando si es posible discernir entre efectos sobre la ARNP de Mtb y los efectos sobre la célula hospedera.

Para ello, se investigó el efecto de antibióticos que afecten la viabilidad de *E. coli*. Dicha evaluación fue desarrollada mediante ensayos de inhibición, en los cuales se midieron los valores de crecimiento bacteriano y fluorescencia de la proteína GFP (esta última expresada por la proteína heteróloga). A partir de los datos, se generaron gráficos y tasas de crecimiento. Finalmente, los resultados fueron analizados y comparados con aquellos

obtenidos de otros antibióticos que sí afectan a la ARNP-Mtb o que no afectan a ninguno de los dos blancos (ARNP-Mtb y *E. coli*).

## II. Marco Teórico

### A. Antibióticos

#### 1. Definición

Los antibióticos son moléculas pequeñas que inhiben el crecimiento bacteriano. Su clasificación es principalmente basada en el blanco de acción y la estructura química. Existen 5 mecanismos de acción en los que los antibióticos inhiben la supervivencia y/o crecimiento de las bacterias: síntesis de pared celular (betalactámicos, glicolipopéptidos), síntesis de proteínas (macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, fenicoles), síntesis de ácidos nucleicos (rifampicina, fluoroquinolonas), metabolismo celular (trimetoprim-sulfametoxazol) y función de membrana celular (lipopéptidos, péptidos macrocíclicos) (24).

#### 2. Función

La capacidad inhibitoria de los antibióticos puede definirse como bacteriostática o bactericida. La inhibición bacteriostática detiene el crecimiento de la bacteria sin necesariamente causarle la muerte. Sin embargo, existe la posibilidad de antibióticos bacteriostáticos que cuenten con un mecanismo de acción que a largo plazo cause muerte celular (25). Por otro lado, la inhibición bactericida sí genera muerte celular (24).

#### 3. Antibióticos utilizados en este trabajo

##### a) Cefuroxima

Cefuroxima (CFX) es un antibiótico que forma parte del grupo de los betalactámicos. Es clasificada como una cefalosporina de segunda generación; por ello, cuenta con una estructura que tiene menos propensión a sufrir hidrólisis por betalactamasas y mayor polaridad, lo que le confiere más efectividad contra bacterias Gram-negativas (26,27). Aun así, Cefuroxima es poco soluble en agua (28); por ello, suele ser disuelto en DMSO, un solvente orgánico comúnmente usado para la administración de fármacos.

Su mecanismo de acción incluye la inhibición de las transpeptidasas o proteínas de unión a penicilina (PBP). Son las transpeptidasas de mayor tamaño las que catalizan la última etapa de la biosíntesis de pared celular (29): el entrecruzamiento de la subunidad de D-



Alanyl-D-Alanina para la síntesis de peptidoglucano (30). La semejanza estructural entre la molécula de Cefuroxima y el dipéptido favorece que las PBPs catalicen la acilación con el antibiótico, produciendo una unión irreversible entre el anillo betalactámico y el sitio activo de la enzima (24,30). Esta acción reduce la cantidad de PBP disponibles para la formación de pared, produciendo lisis celular.

En *E. coli*, Cefuroxima tiene una alta afinidad por las transpeptidasas PBP3, PBP1a y PBP1b (31). La MIC90 de Cefuroxima Acetil *in vitro* para *E. coli* se encuentra en un rango de 4 mg/L – 8 mg/L (o 5  $\mu$ M – 10  $\mu$ M), en algunos casos siendo 32 mg/L (40  $\mu$ M) (27,32).

Sin embargo, en la actualidad no se tiene un conocimiento preciso acerca de cómo exactamente el antibiótico desencadena el proceso de muerte celular (24,26). De acuerdo con las investigaciones de Tomasz *et al.* (30), se sugiere que este proceso sería provocado por la debilidad de la pared celular frente al continuo crecimiento de la biomasa bacteriana, eventualmente provocando lisis. Además, se ha observado que la toxicidad de los betalactámicos se basa en su capacidad para impactar en múltiples procesos de manera simultánea, como alterar la actividad de proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared (33,34), influir en procesos relacionados con la respiración celular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (35–37), así como afectar la presión de turgencia (38).

#### b) Rifampicina y Rifaximina

La Rifampicina (RIF) y la Rifaximina (RFX) son antibióticos que pertenecen al grupo de las rifamicinas. Ambos inhiben la fase inicial de la transcripción al asociarse a la subunidad beta de la ARN polimerasa, cerca del área en donde ocurre la extensión del ARN mensajero naciente (2,39). La unión de las rifamicinas a dicha subunidad genera un impedimento estérico que obstaculiza la transcripción después de que la polimerasa ha catalizado el enlace fosfodiéster del tercer nucleótido (2).

La Rifampicina es un antibiótico de amplio espectro, en el que se puede destacar su actividad contra la ARN polimerasa de *M. tuberculosis*. Sin embargo, debido al desarrollo de mutaciones en los genes asociados a las subunidades de esa proteína (40), suele

combinarse con otros antibióticos de primera línea contra la tuberculosis. Para *E. coli*, la MIC50 y la MIC90 de Rifampicina abarcan desde 8 mg/L (9.6 µM) – 16 mg/L (19.2 µM) (40), mientras que para *M. tuberculosis*, abarcan desde 0.5 mg/L (0.6 µM) – 8 mg/L (9.6 µM) (40,41).

Por otro lado, la Rifaximina es un derivado de la Rifampicina y se utiliza mayormente para infecciones gastrointestinales (40). No obstante, también inhibe a la ARNP-Mtb en condiciones *in vitro*. La MIC50 y la MIC90 de este antibiótico para *E. coli* abarcan un rango desde a 8 mg/L (10.2 µM) – 32 mg/L (40.8 µM) (42); mientras que la MIC90 para Gram-positivas como *M. tuberculosis*, serían desde 0.01 (0.01 µM) – 0.5 mg/L (0.64 µM) (43).

A pesar de que ambos antibióticos tienen actividad sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se ha reportado que las concentraciones mínimas inhibitorias más altas en bacterias Gram-negativas se debería a su capacidad de traspasar la membrana externa (44). Por tal motivo, son considerados bacteriostáticos en este grupo y bactericidas en Gram-positivas (24).

#### c) Cloranfenicol

Cloranfenicol (CAM) es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro que interfiere en la última fase de expresión proteica, la traducción (24). Naturalmente, la síntesis de aminoácidos sucede por la intervención de los ARN de transferencia (ARNt), quienes transportan a los aminoácidos hacia la subunidad ribosomal menor, donde ya se encuentra el ARN mensajero (ARNm). Una vez que los codones del ARNm y anticodones del ARNt se han posicionado correctamente, la subunidad ribosomal mayor se une al complejo para catalizar el enlace peptídico mediado por la enzima peptidil-transferasa (45). Finalmente, ocurre una traslocación en la posición del ARNt previo y uno nuevo ingresa al sitio inicial (sitio A) para que el proceso se repita (46).

En presencia de CAM, este compete contra el ARNt por el sitio A de la subunidad ribosomal mayor. Al unirse reversiblemente, inhibe la función de la peptidil-transferasa e impide la elongación del péptido naciente (45,47). De acuerdo con la literatura, la

MIC50 y la MIC90 de Cloranfenicol para *E. coli* es 8 mg/L (24.8  $\mu$ M) – 16 mg/L (49.6  $\mu$ M) (48).

#### 4. Cribado de alto rendimiento (HTS)

La validación de la actividad antibiótica es un procedimiento esencial para confirmar si nuevas moléculas son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano o matar a la bacteria (49). El cribado de antibióticos es una metodología por la cual es posible realizar esta evaluación para una diversidad de moléculas candidatas, pudiendo ser basado en un blanco o en un fenotipo. En el primer abordaje se trabaja con un blanco predefinido sobre el cual se generan hipótesis para la actividad del antibiótico, mientras que en el segundo se espera observar un efecto en alguna vía o macromolécula para posteriormente entender su mecanismo de acción (50).

El cribado de alto rendimiento, *HTS* por sus siglas en inglés, es un enfoque en el que se realizan evaluaciones a gran escala para encontrar moléculas con potencial antibiótico. Los ensayos HTS se realizan en placas multipozo y, dependiendo del objetivo de investigación, pueden ser basados en un blanco específico (ej: receptores, enzimas, hormonas, etc.) o basados en el fenotipo de células vivas (51,52). A través de la sistematización, es posible identificar miles de compuestos diariamente de manera efectiva, económica y rápida en comparación con el cribado tradicional (53). En la actualidad, su aplicación se ha extendido al descubrimiento de sustancias de origen natural que sean eficaces para el tratamiento de enfermedades e infecciones (54,55).

#### **B. Sistema de expresión del bacteriófago T7**

Es uno de los sistemas de expresión más utilizados para producir proteínas recombinantes. Consta de una ARN polimerasa T7 (ARNP-T7) que cuando reconoce a su promotor T7, es capaz de transcribir 5 veces más rápido que la polimerasa de *E. coli* y presenta una gran selectividad (56,57). Esta enzima se encuentra dentro del genoma de algunas cepas bacterianas de *E. coli* que fueron modificadas genéticamente, conocido como el sistema DE3.

Para inducir este sistema, la ARNP-T7 suele estar bajo el control del promotor *lac-UV5*. Esta secuencia de ADN es similar a la del promotor *lac*, pero contiene algunas mutaciones que le brindan cualidades ventajosas al sistema de expresión (56,58). En ausencia de inductor, la expresión de la ARNP-T7 es inhibida por el complejo formado entre el represor LacI y la región operadora del operón, cerca al promotor (58). En presencia de un azúcar como el IPTG, el complejo LacI – operador se deshace y la polimerasa es expresada. La transcripción de esta enzima permite la subsecuente transcripción del gen de interés. Este gen de interés usualmente está dentro de un plásmido y se encuentra asociado a un promotor T7 que es reconocido por la ARN polimerasa T7.

### C. Proteína fluorescente verde (GFP)

La proteína fluorescente verde (GFP) es una macromolécula que emite fluorescencia de dicho color. Originalmente producida por la medusa *Aequorea victoria*, fue descubierta por Osamu Shimomura en el año 1961 y posteriormente aislada en el año 1962. Después de que se demostró que la secuencia clonada de GFP podía ser producida sin problemas en diferentes organismos (59), su expresión comenzó a generar mayor interés. Una de las razones para esta característica se debería a que dicha proteína contiene señales peptídicas para la traducción en el citosol (60).

Adicionalmente, la GFP presenta un peso molecular de 27 kDa y su estructura proteica terciaria está compuesta por un barril de 11 hojas beta que contiene en su interior al cromóforo p-hidroxibencilidenimidazolinona (HBDI) (61). Así como el plegamiento, la maduración de la GFP implica la síntesis correcta de este cromóforo, por lo que es el último paso limitante para la funcionalidad de la proteína (62). La biosíntesis del HBDI ocurre mediante la ciclización post-traducciona l de los aminoácidos serina, tirosina y glicina; ubicados en las posiciones 65, 66 y 67 del polipéptido, respectivamente (61,62). Asimismo, para la biosíntesis se requiere únicamente de la presencia de oxígeno, otro factor que facilita su expresión en organismos diferentes.

Con el crecimiento de la biología sintética, la GFP ha sido utilizada ampliamente como reportera a nivel celular y sistémico. Esto también motivó al mejoramiento de algunas características de la proteína. Por ejemplo, la GFP nativa presenta una óptima maduración a temperaturas menores de 37°C (61). Además, la duración de la madurez es muy extensa;

según el estudio de Heim *et al.* (63), se puede observar fluorescencia a partir de las 4 horas post-inducción a temperatura ambiente. Con la generación de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y sus derivados, se ha facilitado y ampliado su uso en diferentes abordajes. Mediante mutagénesis dirigida, la EGFP fue desarrollada a partir de la sustitución del aminoácido serina por treonina y fenilalanina por leucina en las posiciones 65 y 64, respectivamente (63,64). Estas modificaciones brindaron al cromóforo mayor fotoestabilidad, mayor termoestabilidad a 37°C, menor tiempo de maduración y 5 veces más brillo que la GFP nativa (65).

#### **D. Cultivos productivos en dos fases**

El rendimiento de proteínas recombinantes depende de las condiciones de cultivo en las que se encuentra sometido el chasis (66). Las alteraciones en este entorno pueden generar cambios en el metabolismo y así, afectar la asignación de recursos de la célula hospedera hacia la supervivencia y reproducción, poniendo en compromiso la producción de la proteína heteróloga (67). Debido a este inherente conflicto entre las funciones nativas y la función heteróloga deseada por los investigadores o usuarios de biotecnología, es común la estrategia de realizar cultivos bifásicos.

En estos, se prioriza en una etapa la reproducción de los microorganismos, y en una segunda etapa, la producción de proteínas recombinantes. En la primera fase, se prioriza la proliferación celular y la generación de biomasa mediante el establecimiento de condiciones óptimas, con la finalidad de obtener una alta densidad de células (68). Posteriormente, se realiza un cambio en las condiciones para establecer la segunda fase. El cambio en un factor ambiental (pudiendo ser pH, temperatura de crecimiento, adición del inductor, oxigenación, etc.) producirá que el crecimiento sea afectado (en algunos casos podría detenerse) y se priorice la producción de las proteínas recombinantes (67). Actualmente, el concepto de cultivos bifásicos resulta ser muy útil para alcanzar el mayor rendimiento posible de diversas proteínas heterólogas con función terapéutica o industrial.

Este concepto fue adoptado previamente en el trabajo de Tesis Doctoral de K. Espinoza, ya que se requirió definir el momento y dosis adecuados para añadir el inductor IPTG en el sistema recombinante, y así, separar la fase de crecimiento de la fase heteróloga.

### E. Modelo matemático

La expresión de una proteína heteróloga puede llegar a ser una carga metabólica considerable para el hospedero (23). Esto ocurre debido al consumo extra de los recursos naturales necesarios para procesos metabólicos de mayor importancia para la célula (69). Asimismo, algunas bacterias han demostrado ser capaces de adaptarse a cambios en el ambiente, como la adición de elementos genéticos móviles (70). Esta adaptación implica redistribuir los recursos internos para sobrevivir en diferentes condiciones (71). Por otra parte, esto genera inconvenientes en los circuitos sintéticos y la producción de diversas proteínas recombinantes. Dichos obstáculos han motivado a los investigadores a entender el funcionamiento de los circuitos metabólicos en sistemas biológicos para aprender a cómo controlarlos.

Según el estudio de Arias & Guerra (72,73), es posible descomponer el proteoma en fracciones. Cada fracción proteómica  $\Phi_i$  será equivalente a la masa de la proteína  $i$  con respecto al total de proteínas  $m$ :

$$\phi_i = \frac{m_i}{m}$$

Asimismo, de acuerdo con el trabajo de Scott *et al.* (74), la composición del proteoma puede ser descompuesta en 3 grupos:  $\phi_R$ ,  $\phi_P$  y  $\phi_Q$ . El primero representa la fracción ribosomal, el segundo, la fracción constitutiva y el tercero, la fracción invariable. En una célula modificada por ingeniería genética, el proteoma puede ser dividido hasta en 4 fracciones:

$$\phi_R + \phi_Q + \phi_C + \phi_H = 1$$

Donde:

- $\Phi_R$  corresponde a la fracción ribosomal o de producción de proteínas
- $\Phi_Q$  corresponde a la fracción estructural o de mantenimiento celular
- $\Phi_C$  corresponde a la fracción fijadora de nutrientes en la célula

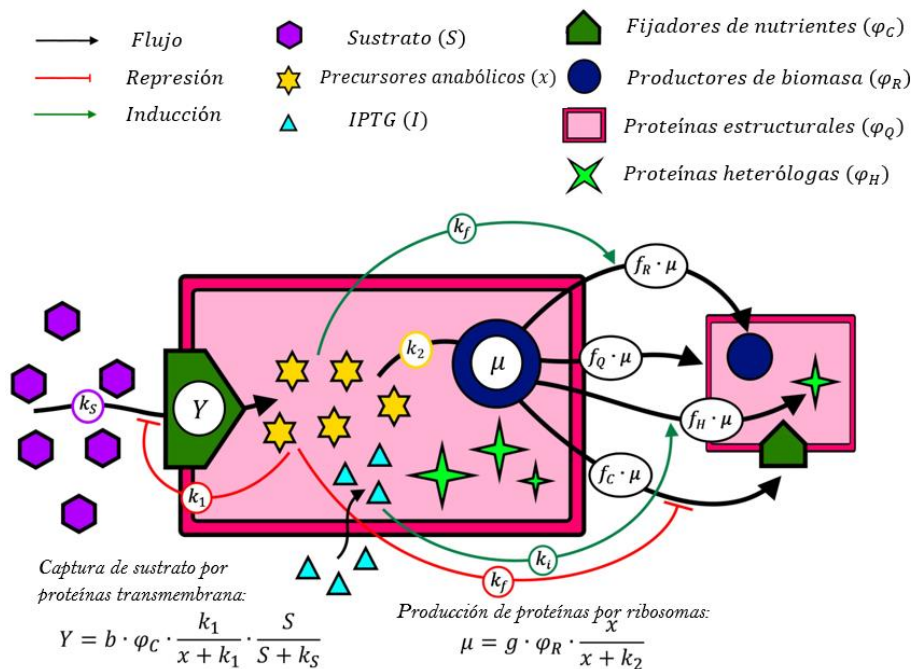
- $\Phi_H$  corresponde a la fracción heteróloga o producción de proteínas recombinantes

El flujo total de la producción de una bacteria ( $J_r$ ) contiene a cada una de las fracciones proteómicas. Por lo tanto, la descripción de la partición de  $J_r$  para un conjunto de proteínas  $i$  está dada de la siguiente manera:

$$J_i = J_r \cdot f_i$$

Donde  $f_i$  es la fracción del flujo total destinada a la proteína  $\phi_i$ , también denominada fracción de expresión.

En el siguiente diagrama, se muestra el flujo de producción de proteínas en una célula, distribuido en los 4 grupos presentados. Las proteínas estructurales son constitutivas y conforman la pared celular. Por otro lado, las proteínas heterólogas son inducidas en presencia de IPTG. Las proteínas fijadoras se encargarán de incorporar los sustratos del medio de cultivo al interior celular. Estos serán convertidos en precursores anabólicos (ej: aminoácidos y cetoácidos), los cuales posteriormente serán utilizados por los ribosomas para producir proteínas de diferente naturaleza. Estos pueden ser ribosomas, GFP, enzimas fijadoras o de importancia estructural.



**Figura 1. Diagrama esquemático del modelo matemático desarrollado por Arias & Guerra (72), inspirado en el trabajo de Towbin *et al.* (73). Se muestra la leyenda de cada símbolo en la parte superior.**

Para un cultivo bacteriano, la fracción  $\Phi_R$ , que representa la forma en que los ribosomas producen proteínas dentro de una célula, está expresada en la siguiente ecuación (71):

$$\mu = \gamma \cdot \Phi_R \cdot \frac{x}{x+k_2}$$

Donde:

- $\mu$  es la tasa de crecimiento del cultivo
- $x$  representa a los precursores anabólicos
- $\gamma$  es la constante de velocidad máxima
- $k_2$  es la concentración de precursores al momento en que la producción alcanza la mitad de la velocidad máxima

Esta fórmula indica que la tasa de crecimiento de un cultivo está directamente relacionada con la biomasa que representa a los ribosomas.

Por otra parte, la fracción  $\Phi_C$ , que representa la manera en que las proteínas transmembrana capturan el sustrato desde el exterior hacia el interior celular, y a su vez, la cantidad de precursores regula de forma alostérica esta captura, se encuentra expresada en la siguiente ecuación:

$$Y = \beta \cdot \Phi_C \cdot \frac{k_1}{x + k_1} \cdot \frac{S}{S + k_S}$$

Donde:

- $Y$  representa la tasa de consumo
- $S$  es el sustrato
- $\beta$  es la constante de velocidad máxima
- $k_1$  es la concentración de precursores a la que el consumo se reduce a la mitad
- $k_S$  es la concentración de sustrato a la que el consumo alcanza la mitad de su velocidad máxima

Para modelar el comportamiento de los precursores anabólicos  $x$ , es importante tener en cuenta los flujos de proteínas fijadoras (productores de  $x$ ) y proteínas productoras (agotadores de  $x$ ). Al construir una ecuación diferencial, se obtiene la tasa de  $x$ :



$$\frac{dx}{dt} = \zeta' \cdot Y - \frac{1}{\xi'} \cdot \mu$$

Donde  $\zeta'$  y  $\xi'$  corresponden a factores de rendimiento de la producción de  $x$  a partir de sustratos y el consumo de  $x$  por los ribosomas, respectivamente.

Ya con las ecuaciones previamente obtenidas, la derivada de una fracción  $i$  es equivalente a la siguiente ecuación:

$$\frac{d\varphi_i}{dt} = \mu \cdot (f_i - \varphi_i)$$

Donde  $f_i$  corresponde a la fracción de expresión, la cual está definida como la fracción de una función de regulación  $r_i$  sobre la sumatoria de todas las funciones de regulación modeladas:

$$f_i = \frac{r_i}{\sum r_j}$$

Una función de regulación intenta representar el modo de regulación de una fracción proteica, la cual puede ser:

**a. Constitutiva:** que no se encuentra regulada

$$r = \theta$$

**b. Represora:** que está siendo regulada negativamente por un inhibidor

$$r = \frac{k_{Rp}}{Rp + k_{Rp}} \cdot \theta$$

**c. Inductora:** que está siendo regulada positivamente por un inductor

$$r = \frac{I}{I + k_I} \cdot \theta$$

Donde:

- $\theta$  es una representación de la capacidad máxima de producción del sistema
- $Rp$  e  $I$  son concentraciones de represor e inductor, respectivamente
- $k_{Rp}$  y  $k_I$  son constantes de afinidad del inhibidor y del inductor, respectivamente

### **III. Hipótesis**

#### *Hipótesis general*

- En un sistema recombinante de expresión de ARN polimerasa de *M. tuberculosis* en *E. coli*, se pueden discernir los efectos de los antibióticos seleccionados que afectan a la actividad de esta enzima de aquellos que impactan la supervivencia de la célula hospedera.

#### *Hipótesis específicas*

- Aquellos antibióticos seleccionados en este trabajo que son capaces de reducir la viabilidad de *E. coli*, afectarán indirectamente la expresión de la GFP. Siendo así, se anticipa que agregar el antibiótico disminuirá la tasa de crecimiento, antes de reducir la tasa de producción de fluorescencia.
- Los antibióticos seleccionados que afectan la viabilidad de la célula hospedera no afectarán directamente a la enzima heteróloga, sino a la maquinaria celular que permite la síntesis de la proteína reportera. Por lo tanto, este antibiótico tendrá un efecto retardado en la tasa de producción de fluorescencia.
- Los antibióticos seleccionados que inhiben directamente la actividad de ARNP-Mtb generarán una caída en la expresión de GFP de manera relativamente temprana y no necesariamente acoplada a una reducción del crecimiento.

## **IV. Objetivos**

### *Objetivo general*

- Evaluar los efectos de antibióticos en un sistema recombinante mediante la actividad de la ARN polimerasa de *M. tuberculosis* en *E. coli*, con el objetivo de distinguir entre aquellos que inhiben la enzima heteróloga de aquellos que afectan a la célula hospedera.

### *Objetivos específicos*

- Establecer un protocolo eficaz para discernir los efectos de los antibióticos en el sistema recombinante, definiendo variables como concentraciones de antibiótico y tiempo de inoculación del antibiótico.
- Comparar las tasas de crecimiento bacteriano y fluorescencia de la *E. coli* reportera antes y durante la actividad inhibitoria de los antibióticos.
- Comparar los resultados obtenidos con los antibióticos que afectan a la célula hospedera, con datos reportados de antibióticos que inhiben la actividad de la enzima heteróloga.

## **V. Materiales y métodos**

### **A. Exploración en la literatura actual y selección de antibióticos**

Se realizó una extensiva búsqueda bibliográfica en reconocidos repositorios de artículos científicos, tales como el National Center for Biotechnology Information (NCBI), PubMed, Google Scholar y Scielo. El propósito de este primer paso fue revisar información actualizada sobre las distintas clases de antibióticos, por lo que se buscó en artículos de revisión (24,75). Posteriormente, se establecieron los siguientes criterios para seleccionar los antibióticos de este trabajo: a) El antibiótico tiene actividad antimicrobiana en *E. coli* y b) El mecanismo de acción del antibiótico no interfiere con la biosíntesis de proteínas. Tales requisitos fueron determinados debido a que el chasis del sistema es una cepa de *Escherichia coli*. Esta cepa, además de expresar la enzima ARNP de *M. tuberculosis*, ha sido modificada genéticamente para expresar la GFP cuando es inducida. Por este motivo, no podía ser seleccionado un antibiótico que inhiba la expresión de proteínas.

Se emplearon los antibióticos seleccionados (Cefuroxima y Cloranfenicol) para establecer las condiciones y variables de los ensayos de inhibición con el sistema recombinante. Para ello, previamente se obtuvo información acerca de sobre su Concentración Mínima Inhibitoria, mecanismo de acción, solubilidad y disponibilidad.

### **B. Estableciendo condiciones y variables en ensayos de inhibición**

#### **1. Materiales**

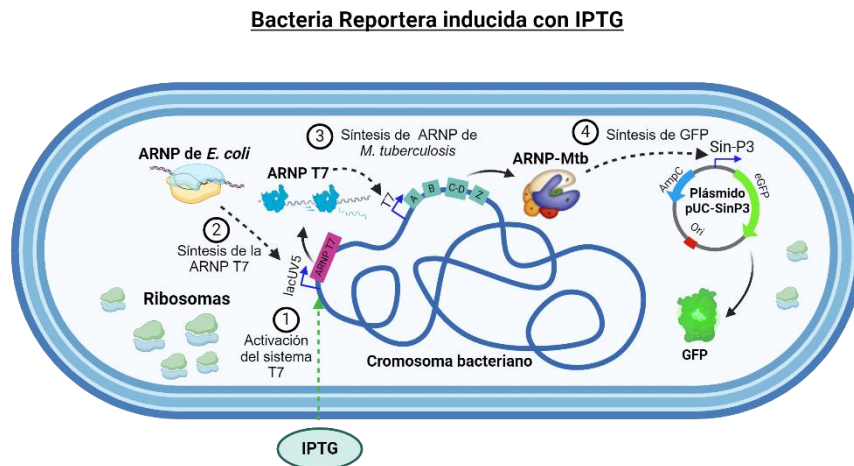
##### **a) Bacterias usadas**

Para hacer los ensayos de inhibición, se emplearon dos bacterias de la cepa *E. coli* BLR (DE3), diseñadas y optimizadas en el trabajo doctoral de K. Espinoza (76). Una de estas, denominada en este trabajo como la Bacteria Reportera (BR), alberga un sistema recombinante diseñado para evaluar la actividad de la ARNP de *M. tuberculosis in vivo*. La BR presenta una integración cromosómica de los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC-3Gly-rpoD* y *rpoZ*, que codifican las subunidades de la ARNP-Mtb. Además, contiene un plásmido pUC SinP3-GFP que incluye al promotor SinP3 (reconocido por la ARNP-Mtb), el gen

*EGFP* (codificante de la proteína fluorescente verde) y un marcador de resistencia a la Ampicilina (76).

### Inducción del sistema de expresión

Cuando se agrega el inductor IPTG al cultivo de la Bacteria Reportera, se induce la producción de la enzima ARN polimerasa de *M. tuberculosis*. Este proceso es iniciado mediante la activación del sistema DE3 y T7, donde la ARN polimerasa T7 (previamente sintetizada por la ARN polimerasa de *E. coli*) reconoce al promotor T7 y sintetiza la ARNP-Mtb. Posteriormente, la ARNP-Mtb activa reconoce al promotor SinP3 del plásmido y transcribe el gen de la GFP. La producción de esta proteína fluorescente proporciona una medida cuantitativa de la actividad de la enzima ARNP-Mtb heteróloga (sistema optimizado en el trabajo de tesis doctoral de K. Espinoza) (76). Este proceso secuencial también ha sido representado gráficamente en la Figura 2.



**Figura 2. Funcionamiento de la Bacteria Reportera cuando es inducida con IPTG.**

Figura hecha en Biorender.com.

La segunda bacteria *E. coli* empleada en este trabajo fue denominada Bacteria Control (BC). A diferencia de la BR, esta variante carece de la proteína heteróloga integrada y en su lugar, alberga dos plásmidos (76). Uno de estos es un pUC SinP3-GFP, el cual también está presente en la Bacteria Reportera. El segundo plásmido es un pAcyC AOS, que contiene a los genes *rpoA* y *rpoZ* de la enzima heteróloga ARNP-Mtb, así como un marcador de resistencia al Cloranfenicol. Durante los ensayos de inhibición, la Bacteria Control se empleó como un control negativo de la fluorescencia inducida por IPTG.

b) Reactivos

Agua MiliQ, Medio Luria Bertani, Agar-agar, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Cas-aminoácidos, glucosa, Medio M9, IPTG, DMSO, alcohol de 96°.

Antibióticos: Ampicilina y Cloranfenicol de ImmunoChem. Pastilla de Cefaloxime (Cefuroxima) 500 mg de Laboratorios AC Farma S.A.

c) Equipos

Lector de placas TECAN Infinite M Plex, refrigeradores de -20 °C y de -70°C, minicentrífuga y cabina de flujo.

## 2. Ensayos preliminares con antibióticos

Para evaluar el efecto de los antibióticos seleccionados sobre el sistema recombinante, primero se establecieron dos variables: concentración de antibióticos óptima y tiempo óptimo de inoculación de antibióticos. La primera variable fue definida para hallar concentraciones pre-inhedoras que afecten mínimamente el crecimiento del chasis y alteren la producción de fluorescencia. Para ello, se comenzó realizando un ensayo de punto final (ver Protocolo N°1 en Anexos), probando concentraciones alrededor de la MIC<sub>90</sub> de cada antibiótico para confirmar su efecto bactericida sobre la Bacteria Reportera.

Posteriormente, se realizaron ensayos de inhibición en placas multipozo (ver Protocolo N°2 ya establecido en Anexos), en los que se evaluó el crecimiento bacteriano y la fluorescencia en el tiempo. A partir de esta técnica también pudo definirse el tiempo óptimo de inoculación del antibiótico. Esta segunda variable fue definida con el fin hallar el tiempo adecuado en el que pueda observarse el efecto del ATB sobre el crecimiento y/o la fluorescencia.

a) Cefuroxima

La preparación del stock de Cefuroxima se hizo a partir de una pastilla de 500 mg de Cefuroxima Acetil. Esta se pulverizó y se calculó la cantidad requerida para preparar un stock de 1000 mg/L. Después, se resuspendió la Cefuroxima en DMSO al 100% P/V y se almacenó a -20 °C.

### *Concentración Óptima:*

Debido a que en el género *Enterobacteriaceae* Cefuroxima cuenta con un amplio intervalo de valores de MIC (27), se realizó un ensayo de punto final a una concentración de 20 mg/L. Al observarse una reducción en la OD final del cultivo con antibiótico a comparación del cultivo control, se desarrolló un primer ensayo de inhibición en placa multipozo para analizar los efectos de CFX en el crecimiento y la fluorescencia en el tiempo. Para dicho experimento se utilizaron concentraciones de CFX de 8 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L y 25 mg/L.

Ya que en ese momento no se había definido aún el tiempo óptimo para inocular el antibiótico, después de añadir el inductor se esperó observar en el registro del lector un momento en el que coincidiera el crecimiento exponencial y el inicio de la producción de GFP, lo cual ocurrió antes de las 4 horas con 15 minutos del ensayo (150 min después de la inducción). Por ello, se pausó el ensayo en aquel momento para añadir el antibiótico en esterilidad y luego se reanudó hasta completar las 13 horas.

### *Tiempo óptimo de inoculación de antibiótico:*

Para establecer el mejor tiempo de inoculación de ATB y observar el efecto inhibitorio de los antibióticos, se evaluaron tres puntos en el tiempo durante el ensayo:

Tabla 1. Condiciones para definir el tiempo de inoculación del antibiótico.

	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3
Tiempo transcurrido desde la adición de IPTG	0 min	45 min	90 min
Puntos registrados en el lector de placas (cada 15 min)	1.75	2.5	3.25
Tiempo equivalente al punto registrado en el lector *	<b>1 h 45 min</b>	<b>2 h 30 min</b>	<b>3 h 15 min</b>
Tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo	2 h	2 h 45 min	3 h 30 min

\* Se colocó en Negrita el tiempo considerado para la presentación de los resultados.

Llegado el momento de añadir el antibiótico, se pausó el ensayo en el lector de placas y se adicionó el volumen de antibiótico en un ambiente estéril. Después, la placa se colocó nuevamente en el equipo hasta completar las 13 h de ensayo.

b) Cloranfenicol

*Concentración óptima y tiempo de inoculación óptimo:*

Se realizó un ensayo de punto final utilizando las concentraciones de Cloranfenicol próximas a la MIC<sub>50</sub> para *E. coli*: 8.5 mg/L (26.4  $\mu$ M) y 17 mg/L (52.7  $\mu$ M). Posteriormente, se realizó un ensayo de crecimiento en placa multipozo, utilizando una concentración de 17 mg/L. Este experimento se hizo simultáneamente con los ensayos de tiempo óptimo de inoculación de Cefuroxima, por lo que también se evaluó si CAM tenía el mejor efecto inhibitorio a las 2 h 30 min. Al no observarse ningún indicio de crecimiento después de la adición del antibiótico, se evaluó su efecto a concentraciones pre-inhedoras, añadidas al mismo tiempo de inoculación.

Para este propósito, primero se preparó un stock de 1 M de CAM diluido en etanol al 96%. Después, se preparó otro stock de 20 mM diluido en agua filtrada, a partir del stock inicial. Adicionalmente, fueron elaborados dos stocks de trabajo: uno a 2 mM, a partir del stock de 20 mM, y otro a 0.4 mM a partir del stock de 2 mM (ambos también fueron diluidos en agua filtrada).

Finalmente, se procedió a desarrollar el primer ensayo de inhibición en placa multipozo, en presencia y ausencia de IPTG, agregando las siguientes concentraciones a las 2 h 30 min: 10  $\mu$ M, 12  $\mu$ M, 14  $\mu$ M y 16  $\mu$ M.

c) Efecto del solvente en ensayos con CFX: dimetilsulfóxido (DMSO)

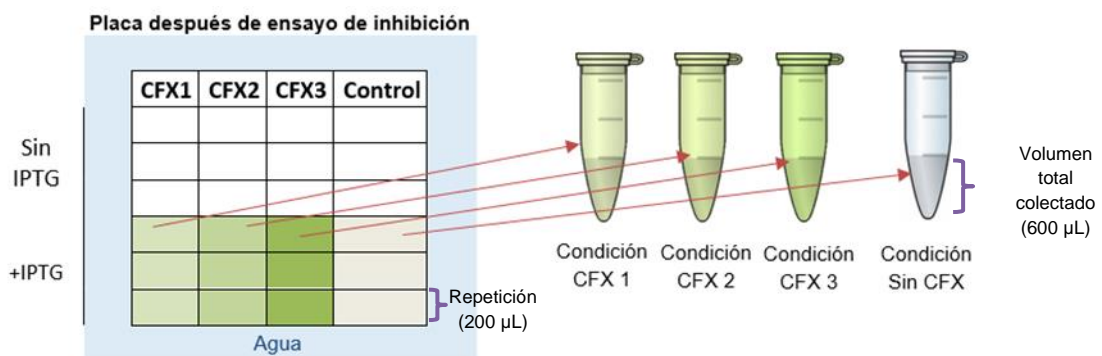
Para anular el efecto del solvente en los ensayos de Cefuroxima, se agregó más volumen DMSO en algunas condiciones, de forma que todas las concentraciones de antibiótico tuvieran la misma concentración final del solvente. Este procedimiento se realizó al momento de pausar el lector para añadir el antibiótico, al tiempo establecido de 2 h 30 min. La adición del solvente fue hecha en las condiciones con y sin inductor. Además, se añadió una condición control de DMSO, en la que se agregó sólo el solvente a la Bacteria



Reportera y a la Bacteria Control (Ver esquema de placa multipozo en Anexos: Figura A2).

d) Localización de fluorescencia

Los experimentos de localización de fluorescencia fueron realizados al día siguiente del ensayo de inhibición con Cefuroxima, aproximadamente 8 horas después de la finalización del experimento. Primero, se extrajo de la placa multipozo el volumen del cultivo correspondiente a las condiciones en que se adicionó CFX e IPTG y, cuidadosamente, fue transferido a tubos de 1.5 mL estériles. Este procedimiento se hizo individualmente para cada concentración de CFX en la que se aplicó el inductor (Figura 3).



**Figura 3. Esquema de distribución de cultivo para ensayo de localización de fluorescencia.** La gradiente de colores, tanto en la placa como en los tubos, refleja condiciones diferentes. Por lo tanto, de la placa se colectó individualmente el volumen total de cultivo de cada condición y se transfirió al tubo correspondiente de 1.5 mL. La imagen de la placa multipozo fue adaptada del trabajo de K. Espinoza (76).

Una vez preparados los tubos, estos fueron centrifugados a 4500 RPM durante 10 minutos. Después, el sobrenadante fue retirado cuidadosamente en esterilidad y transferido a un segundo tubo de 1.5 mL estéril, que se mantuvo reservado. Por otro lado, el pellet restante del primer tubo se resuspendió en 600 µL de nuevo medio M9 suplementado y se centrifugó de nuevo a las mismas condiciones para eliminar cualquier residuo del medio anterior. Después de esta segunda centrifugación, se eliminó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el pellet bacteriano en 600 µL de medio nuevo. Al final, por cada condición o concentración de CFX se generaron dos tubos: el

primero con el sobrenadante, donde se esperó encontrar la GFP liberada en el medio de cultivo y el segundo tubo, conteniendo a las bacterias resuspendidas con GFP intracelular.

En una nueva placa multipozo estéril, se adicionó por cada condición: 200  $\mu$ L del sobrenadante y 200  $\mu$ L de la bacteria resuspendida. Además, se incluyó 200  $\mu$ L de medio M9 suplementado como blanco. Posteriormente, se midió tanto la OD como la fluorescencia de la GFP y se calcularon los porcentajes de fluorescencia para cada condición.

### 3. Curvas dosis – respuesta del antibiótico: Efecto en el crecimiento y la fluorescencia

Se realizaron los ensayos de inhibición utilizando varias concentraciones subletales de Cefuroxima y Cloranfenicol sobre la Bacteria Reportera, tanto en presencia como en ausencia de IPTG. Para ello, se siguió el Protocolo N°2 detallado en Anexos. Por cada antibiótico, se hizo dos experimentos a diferente tiempo de inoculación: a) 45 minutos después de añadir el inductor (equivalente al Tiempo 2: 2 h 30 min) y b) simultáneamente con la adición del inductor (Equivalente al Tiempo 1: 1 h 45 min). En este último caso, la Cefuroxima y el solvente (en ese orden) fueron añadidos inmediatamente después del IPTG. En cada uno de los cuatro experimentos, se designaron condiciones sin antibiótico tanto para la Bacteria Reportera como para la Bacteria Control. Para CFX, estas condiciones también incluyeron la misma concentración de DMSO.

Tabla 2. Concentraciones finales para los ensayos de inhibición con Cloranfenicol y Cefuroxima.

<b>Cloranfenicol (Tiempo 1 y Tiempo 2*)</b>	2 $\mu$ M	4 $\mu$ M	6 $\mu$ M	8 $\mu$ M	10 $\mu$ M	12 $\mu$ M	14 $\mu$ M	16 $\mu$ M
<b>Cefuroxima** (Tiempo 1 y Tiempo 2*)</b>	4 mg/L	8 mg/L	16 mg/L	20 mg/L	24 mg/L	28 mg/L	32 mg/L	

\*Tiempo 1 y Tiempo 2 de inoculación del ATB: 1 h 45 min y 2 h 30 min, respectivamente.

\*\*Ver esquema de placa multipozo para CFX en Anexos: Figura A3.

Al finalizar los ensayos, se examinó el crecimiento de la BR a través de las curvas de OD a 600 nm, y la actividad de ARNP-Mtb se analizó mediante las curvas de fluorescencia normalizada (Fluorescencia de GFP dividida entre la OD). Asimismo, se elaboraron gráficas de crecimiento y fluorescencia para cada curva de concentración de antibiótico, así como las tasas de crecimiento y fluorescencia para cada condición.

a) Ensayo de susceptibilidad para Cefuroxima

Para confirmar la actividad bactericida del antibiótico, se hizo un ensayo adaptado de susceptibilidad antibiótica por el método de microdilución en caldo. Como base de este experimento, se siguieron las indicaciones del manual del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (77). Se preparó un preinóculo de la Bacteria Reportera un día antes del ensayo, al día siguiente se midió la OD y se preparó una dilución para una OD inicial de 0.0004 (equivalente a una concentración de  $5 \times 10^5$  CFU/mL). Se sembró el cultivo en la placa multipozo y se prepararon 3 condiciones: una sin antibiótico y dos en las que se añadió el antibiótico al comienzo del ensayo. Las condiciones con antibiótico contenían concentraciones de Cefuroxima equivalentes a la MIC90 reportada: 4 mg/L y 8 mg/L (27). Las tres condiciones fueron hechas por triplicado.

**C. Tratamiento de datos: Gráficos de crecimiento y fluorescencia**

Se elaboraron gráficos a partir de los datos experimentales para describir la evolución del crecimiento y la fluorescencia producida por el cultivo en el tiempo. Se empleó el software Microsoft Excel para generar las curvas de crecimiento y fluorescencia normalizada. Además, se calcularon las tasas de crecimiento bacteriano y producción de fluorescencia utilizando los programas Microsoft Excel y R Studio (76).

Se denomina Fluorescencia Normalizada al cociente de la fluorescencia total dividida entre la densidad óptica correspondiente a la población bacteriana (76). Esto se hizo para cada punto medido con la finalidad de representar aproximadamente una cantidad de señal por unidad de población bacteriana.

$$\text{Fluorescencia Normalizada} = \frac{\text{Fluorescencia total (UF)}}{\text{Densidad óptica (OD}_{600})}$$

Normalizar la fluorescencia facilita la comparación de la fluorescencia producida por la GFP en diferentes cultivos bacterianos, independientemente de su densidad. De esta manera, es posible evaluar la actividad de la ARNP-Mtb en diferentes ensayos.

Por otro lado, la tasa de crecimiento refleja la variación en la duplicación bacteriana, mientras que la tasa de producción de fluorescencia indica la variación en la producción de GFP. Al representar estas tasas en gráficos, es posible observar el impacto del antibiótico mediante cuán rápido aumenta o disminuye la densidad bacteriana y/o la producción de fluorescencia. Las gráficas fueron generadas utilizando un script de R Studio creado por N. Arias, en el cual se calculan las pendientes de las curvas de densidad óptica y de fluorescencia total. Las gráficas resultantes fueron comparadas en condiciones previas y posteriores a la adición del antibiótico y del inductor.

#### *Configuración de ganancia*

Cabe resaltar que los datos de fluorescencia generados por el lector de placas TECAN podían ser de dos tipos: ganancia 50 (valores de 0-1,000) y ganancia 100 (valores de 0 - 10,000,000) (78). La ganancia es una configuración del fotomultiplicador del lector, el cual afecta la sensibilidad del equipo y los valores de fluorescencia que este mide. Sin embargo, esta diferencia en la ganancia no implica características físicas de la muestra.

Se le advierte al lector que la ganancia configurada durante cada ensayo está indicada en el pie de página de las figuras de fluorescencia normalizada y tasas de crecimiento. Además, se destaca que sólo son comparables aquellos ensayos en los que se haya utilizado la misma configuración de ganancia.

#### **D. Comparación de la actividad antibiótica en *E. coli*, ARNP-Mtb y ribosomas**

Se comparó el efecto de cuatro antibióticos (Cefuroxima, Rifampicina, Rifaximina y Cloranfenicol) con diferente mecanismo de acción sobre el crecimiento y la fluorescencia producida por la Bacteria Reportera.

Primero, se hizo una comparación directa de las gráficas de crecimiento y fluorescencia normalizada de los cuatro antibióticos, bajo las mismas condiciones experimentales. Para

ello, los experimentos de inhibición con Rifampicina (RIF) y Rifaximina (RFX) reportados en el trabajo de K. Espinoza (76) fueron citados y comparados con los resultados del presente trabajo. Como complemento, se realizó un ensayo en el que se comparó el impacto de los antibióticos CAM y CFX (a la misma concentración) sobre el crecimiento y la fluorescencia de la BR (Ver Anexos: Figuras A4-A6).

La segunda parte de esta sección incluyó el uso de un modelo matemático titulado Modelo de Asignación de Biosíntesis, el cual fue desarrollado por Arias & Guerra (72). A diferencia de la comparación directa de curvas, este modelo matemático fue aplicado para modelar y entender el efecto regulatorio de los cuatro antibióticos sobre la fracción de la biosíntesis total que es destinada a la producción de GFP (Ver Marco Teórico).

Para ello, se procesaron los datos de la fluorescencia normalizada y de la OD. Posteriormente, se seleccionaron los valores más altos de la fluorescencia normalizada para cada concentración de ATB (ver Anexos: Figuras A7-A10). En el caso de RIF y RFX, los datos de fluorescencia fueron previamente convertidos a ganancia 50 para ser comparables con los datos de CFX y CAM. Cabe resaltar que para el modelo se igualaron las unidades de concentración de antibióticos a molaridad, de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 3. Concentraciones de los antibióticos utilizados para el modelo matemático.

Antibiótico*	Concentración ( $\mu\text{M}$ )									
<b>Cefuroxima</b>	0	5	10	20	25	30	35	40		
<b>Cloranfenicol</b>	0	2	4	6	8	10	12	14	16	
<b>Rifaximina</b>	0	0.26	0.38	0.4	0.51	0.64	0.77	0.89	1.02	1.15
<b>Rifampicina</b>	0	0.12	0.24	0.3	0.48	0.6				

\* En todos los ensayos el tiempo de adición de ATB fue a la 1 h 45 min.

## **VI. Resultados**

### **A. Selección de antibióticos**

Se realizó una búsqueda bibliográfica en la literatura actual y se seleccionó un antibiótico que cumpliera con los siguientes requisitos: a) El antibiótico tiene actividad antimicrobiana sobre *E. coli* y b) El mecanismo de acción del antibiótico no interfiere con la biosíntesis de proteínas. A partir de estas informaciones, se seleccionó la clase de los betalactámicos.

Ya que la Bacteria Reportera presenta un plásmido que contiene un marcador de resistencia a Ampicilina (un betalactámico), se seleccionó Cefuroxima. La Cefuroxima es otro betalactámico del grupo de las cefalosporinas de segunda generación, lo que le brinda mayor estabilidad ante la actividad de betalactamasas (26). Por otro lado, también se seleccionó al antibiótico Cloranfenicol (CAM). A pesar de que su función es inhibir la actividad de los ribosomas (inhibición de la traducción), se incluyó en los ensayos para observar diferencias en la traducción de GFP (afectando la fluorescencia) con respecto a la traducción de proteínas nativas de la Bacteria Reportera (afectando la viabilidad).

### **B. Estableciendo condiciones y variables de prueba de inhibición**

#### *1. Ensayos preliminares con los antibióticos seleccionados*

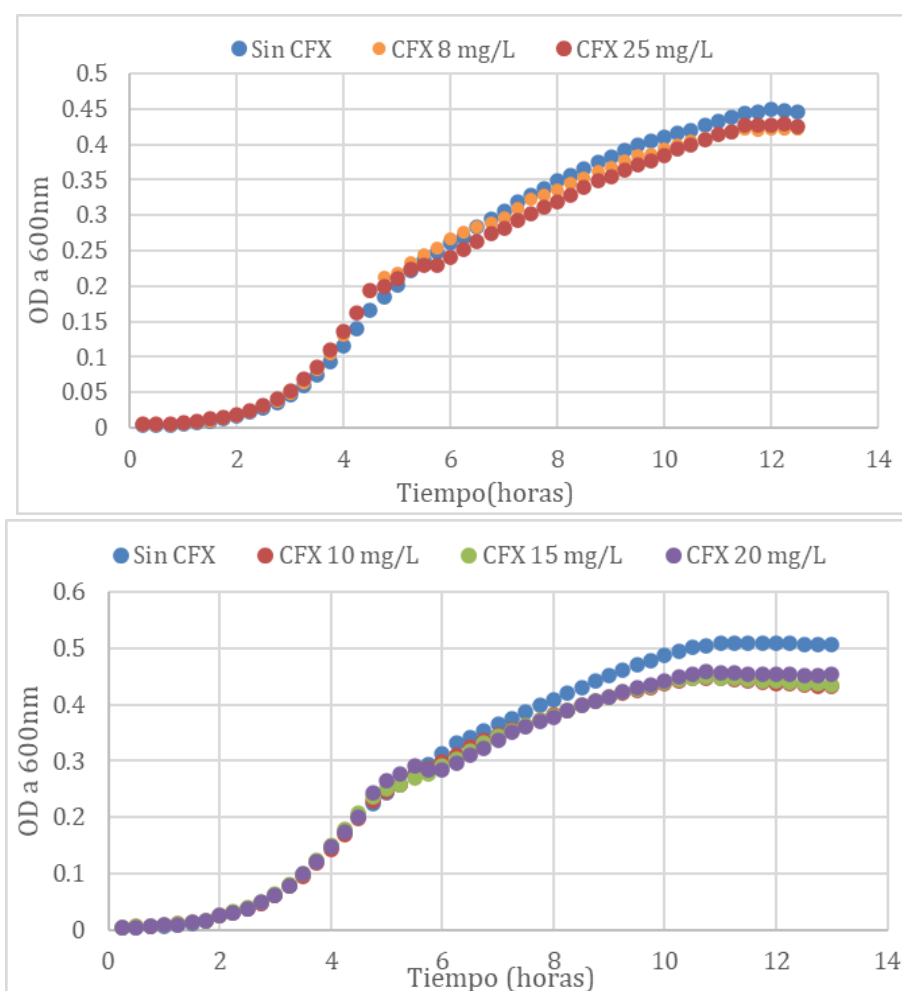
Se evaluó preliminarmente el efecto de los antibióticos seleccionados sobre el sistema recombinante. Para ello, se establecieron dos variables para los futuros ensayos de inhibición: concentración óptima y tiempo óptimo de inoculación del antibiótico.

##### 1.1. Ensayos preliminares de Cefuroxima

###### a) Concentración Óptima

Se realizó un ensayo de punto final para evaluar la susceptibilidad de la Bacteria Reportera al añadir una concentración de 20 mg/L de Cefuroxima. Al medir la OD final, se observó un crecimiento diez veces menor en la condición con CFX (OD: 0.1) que en la condición sin antibiótico (OD: 1). Por lo tanto, a la concentración evaluada se confirmó el efecto inhibitorio de CFX.

Posteriormente, se realizaron dos ensayos en placa multipozo, en los que se evaluó otras concentraciones alrededor de 20 mg/L. Dado que no se había definido el tiempo de inoculación de antibiótico, se añadió la CFX a las 4 h 15 min. Sin embargo, no se observó una reducción significativa en el crecimiento bacteriano (Figura 4).

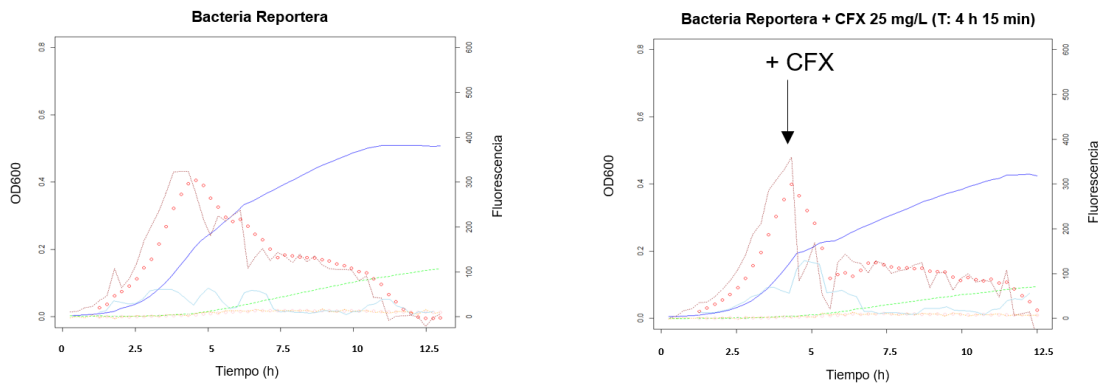


**Figura 4. Crecimiento de Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (CFX) a partir las 4 h 15 min.** Se probaron 5 valores mayores a la MIC90 para analizar el rango de sobrevivencia. Densidad óptica inicial: 0.01.

b) Tiempo óptimo de inoculación del antibiótico

En un principio, se estimó que un momento propicio para la adición del antibiótico debía abarcar parte de la fase de crecimiento exponencial y coincidir con la detección de fluorescencia en el ensayo. Con esta elección, se esperaba observar efectos generados por el antibiótico, ya sea en el crecimiento o en la fluorescencia. Este intervalo de tiempo fue

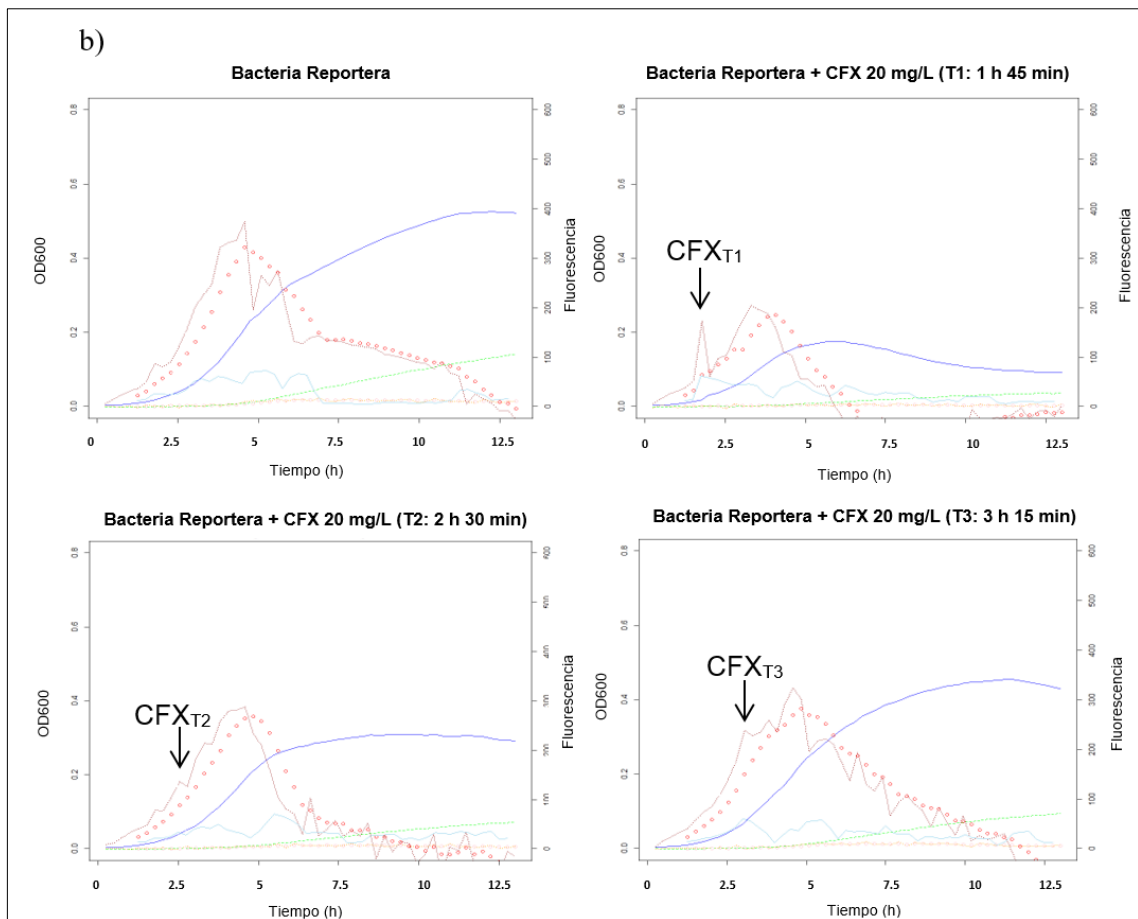
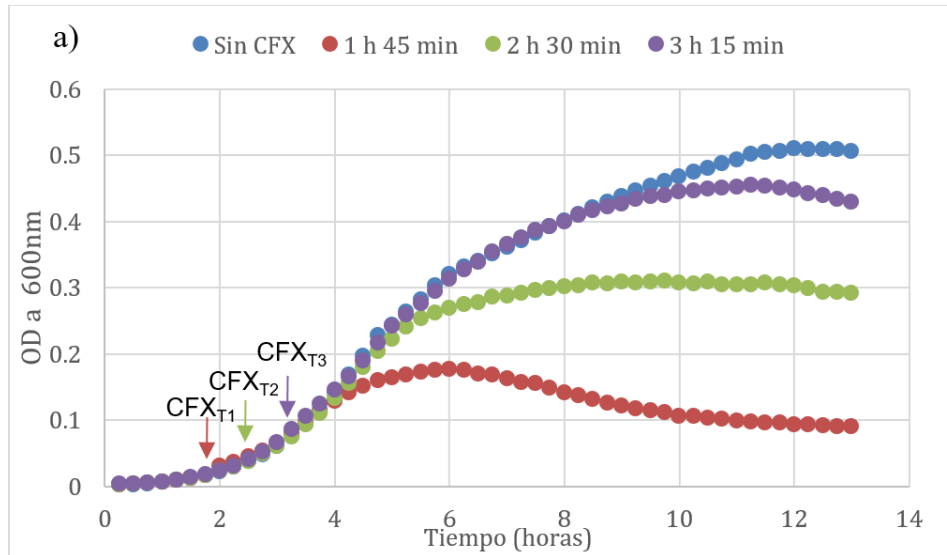
equivalente a 150 min después de la inducción (4 h 15 min desde el inicio del ensayo). Sin embargo, se observó que agregar tardíamente el antibiótico no inhibía más el crecimiento que en la condición sin antibiótico (Figura 5).



**Figura 5. Comparación de las tasas de crecimiento de la Bacteria Reportera en ausencia de antibiótico y a 25 mg/L de Cefuroxima (Adicionado a 4 h 15 min).** Líneas de la gráfica: Tasa de crecimiento (rojo), tasas de fluorescencia (amarillo), la densidad óptica (azul) y la fluorescencia (verde). Datos de fluorescencia obtenidos a ganancia 50. CFX: Cefuroxima. T: tiempo de adición. La flecha indica el momento en que fue añadido el antibiótico. Densidad óptica inicial: 0.01.

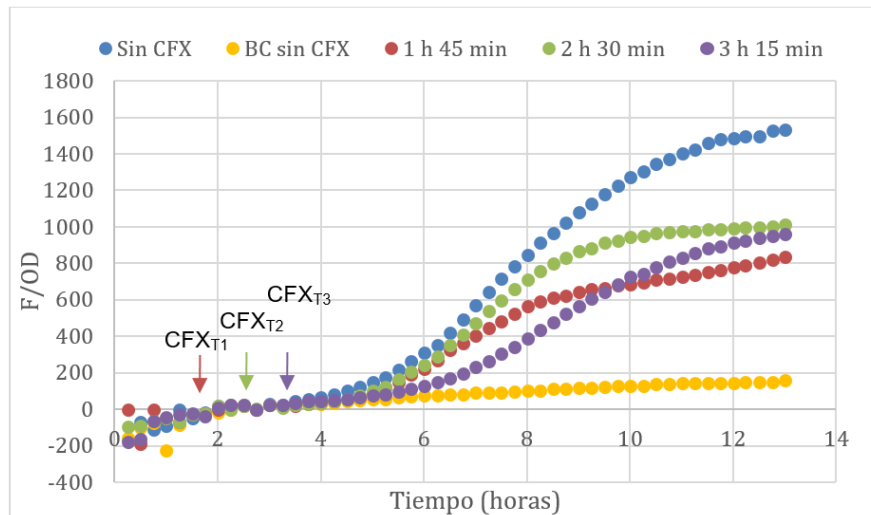
Por ello, se decidió evaluar el efecto de 20 mg/L de CFX, en 3 momentos de inoculación del antibiótico: al mismo tiempo de la inducción (1 h 45 min), 45 min después de la inducción (2 h 30 min) y 90 min después de la inducción (3 h 15 min). Este ensayo se realizó asumiendo que añadir el antibiótico cuando la densidad bacteriana aún es baja podría resultar en un efecto bactericida más pronunciado.





**Figura 6. Crecimiento de la Bacteria Reportera en diferentes tiempos de inoculación de Cefuroxima (CFX) 20 mg/L.** Arriba (a): Curva de crecimiento bacteriano en los 3 tiempos de inoculación evaluados. Abajo (b): Tasas de crecimiento (línea roja) en los 3 tiempos en que se colocó el antibiótico. Datos de fluorescencia obtenidos a ganancia 50. Densidad óptica inicial: 0.01.

De los tres tiempos evaluados, el segundo tiempo fue escogido como el más apropiado para añadir el antibiótico. A diferencia del resto, a 2 h 30 min se pudo observar una reducción significativa en la población bacteriana (Figura 6), sin inhibir completamente la producción de fluorescencia (Figura 7). Por lo tanto, fue este el tiempo escogido para añadir Cefuroxima para los siguientes ensayos.



**Figura 7. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, a diferentes tiempos de inoculación de Cefuroxima (CFX) 20 mg/L.** Se muestra la fluorescencia normalizada en los 3 tiempos con antibiótico y la Bacteria Control (BC). Resultados a ganancia 50.

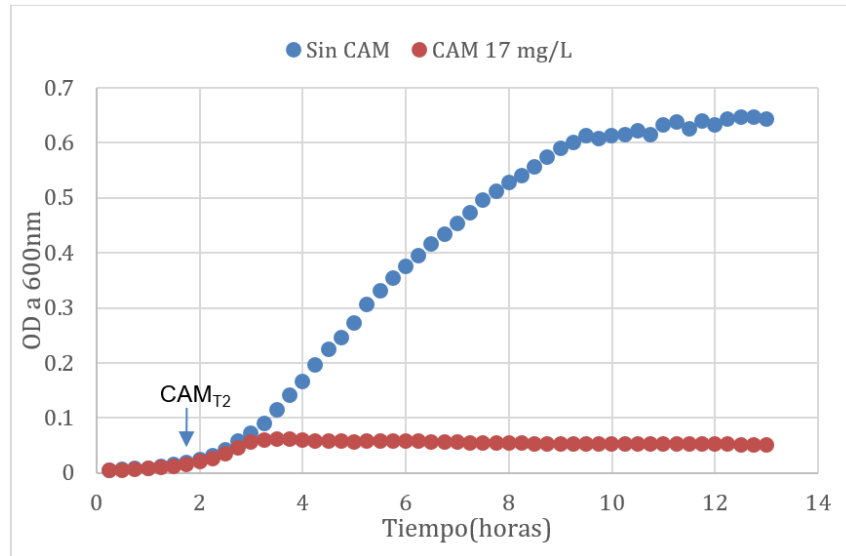
## 1.2. Ensayos preliminares de Cloranfenicol

### a) Concentración Óptima y tiempo óptimo para inocular el antibiótico

Al igual que con Cefuroxima, se desarrolló un ensayo de punto final en el que se evaluaron concentraciones alrededor de la MIC50 y la MIC90 de CAM: 17 mg/L (52.7  $\mu$ M) y 8.5 mg/L (26.4  $\mu$ M). Ya que a ambas concentraciones no se observó crecimiento bacteriano ( $OD < 0.006$ ), se confirmó el efecto bactericida de Cloranfenicol.

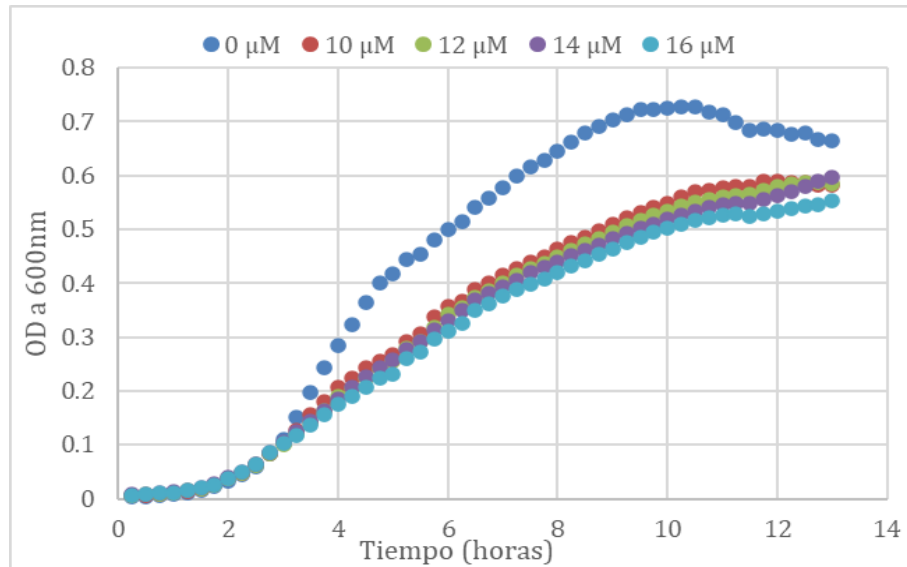
Se procedió a realizar un ensayo de crecimiento bacteriano en placa multipozo. Para ello, se utilizó 17 mg/L (52.7  $\mu$ M) de CAM y se añadió el antibiótico al tiempo establecido para Cefuroxima (2 h 30 min). Bajo esas condiciones, se observó que ya no hubo crecimiento media hora después de añadir del antibiótico (Figura 8). Este resultado

confirmó que la actividad de CAM, al tiempo previamente establecido para CFX y a la concentración seleccionada, tuvo una actividad letal sobre la Bacteria Reportera.

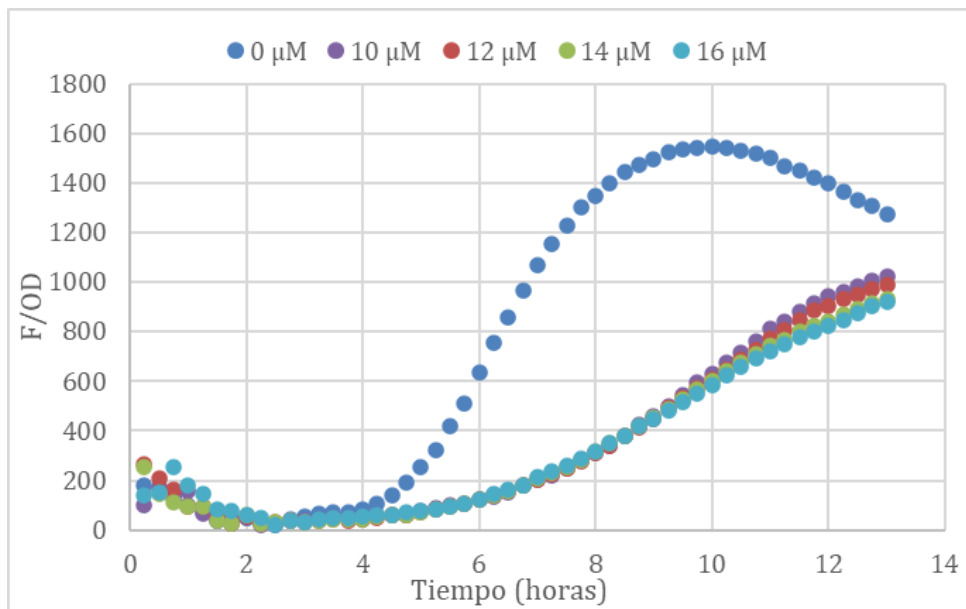


**Figura 8. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol.** Nótese el rápido efecto del antibiótico en el crecimiento a comparación de la condición sin antibiótico. Tiempo de inoculación de CAM: 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01.

El experimento en placa multipozo se replicó usando concentraciones pre-inhedoras de CAM. En esta ocasión, se evaluó el impacto del antibiótico en el crecimiento y la fluorescencia de la BR. Se evidenció una reducción en el crecimiento y en la fluorescencia que fue proporcional a la concentración suministrada del antibiótico (Figuras 9 y 10).



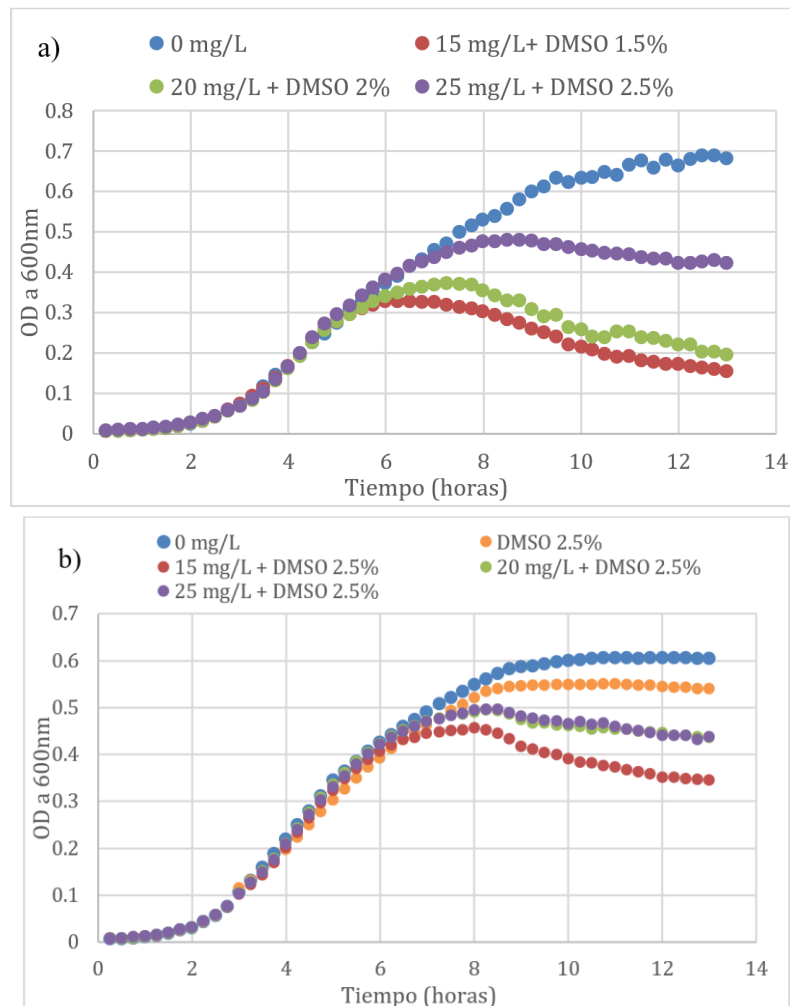
**Figura 9. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol.** Se observa una reducción proporcional a mayor cantidad de antibiótico. Tiempo de inoculación de CAM: 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01.



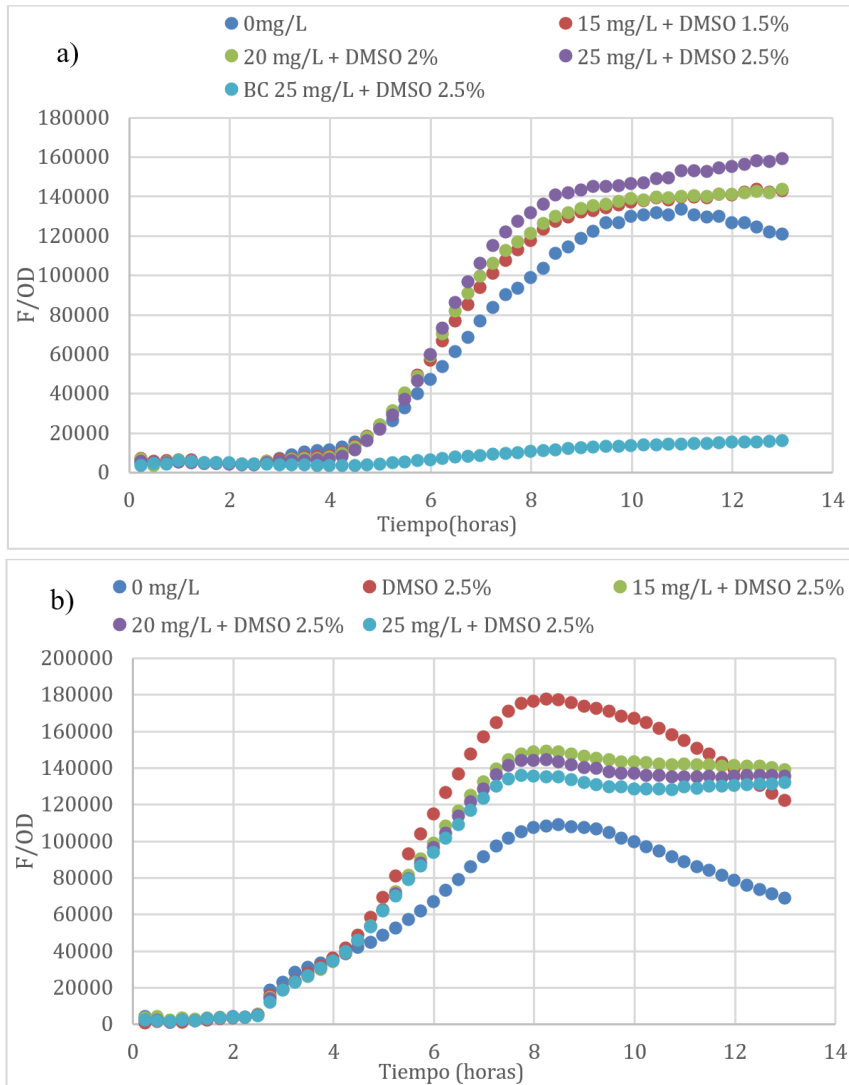
**Figura 10. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cloranfenicol.** Nótese el mismo comportamiento visualizado en la gráfica de crecimiento. Resultados a ganancia 50. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min. Tiempo de inoculación de CAM: 2 h 30 min.

## 2. Efecto del solvente en ensayos con CFX: dimetilsulfóxido (DMSO)

Durante los ensayos preliminares con Cefuroxima, observó que a concentraciones más elevadas del antibiótico, la OD y la fluorescencia también aumentaban (Figuras 11a y 12a). Dado que una concentración más alta del antibiótico implicaba una mayor dilución con solvente, se sospechó que los resultados tengan relación con el volumen de DMSO. Por esta razón, se replicó el ensayo con Cefuroxima, sólo que esta vez se agregó un volumen adicional de DMSO en ciertas condiciones. Esta medida fue tomada para igualar la concentración final del solvente en todas las concentraciones de Cefuroxima y eliminar los efectos provocados por el solvente. Además, se incluyó una condición control para el solvente, en la que se les añadió a las bacterias el mismo volumen de DMSO.

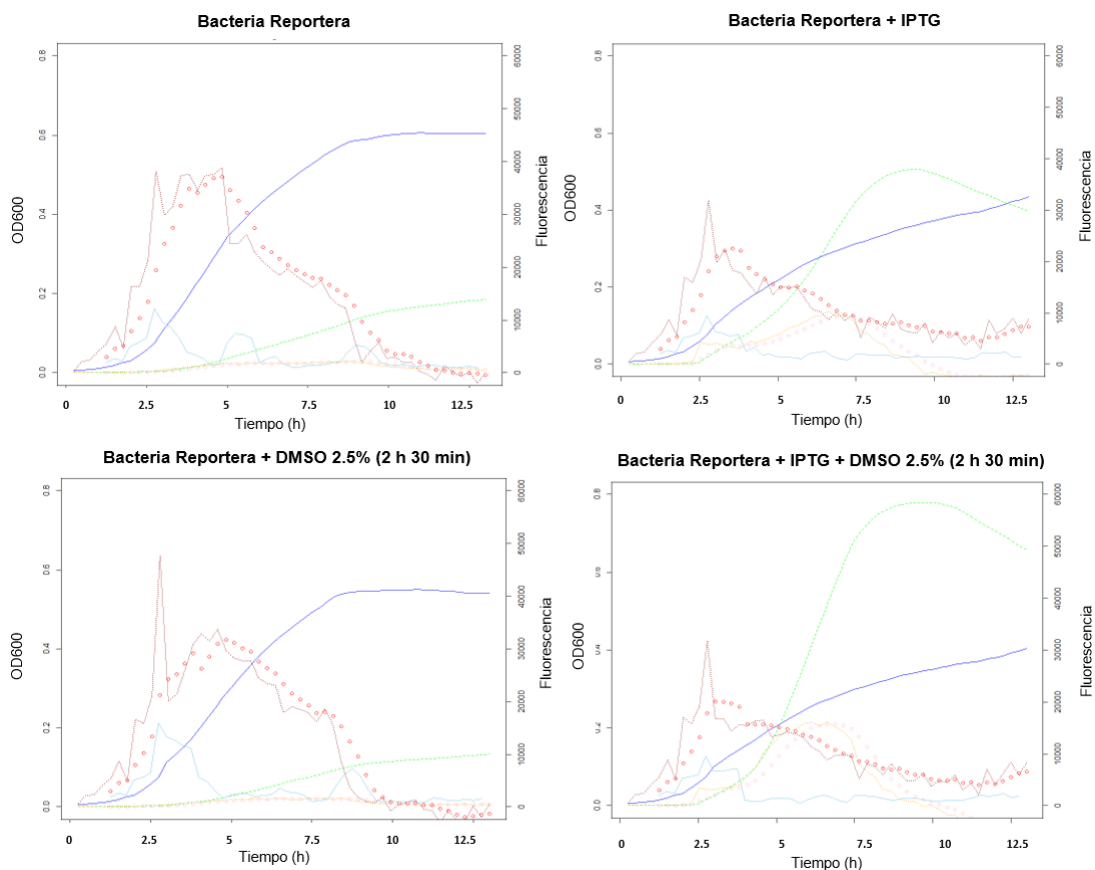


**Figura 11. Comparación del crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (CFX) y del solvente DMSO.** Arriba (a): A diferentes concentraciones de antibiótico y del solvente. Abajo (b): Sólo varían las concentraciones del antibiótico. Tiempo de adición de CFX: 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01.



**Figura 12. Comparación de la Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cefuroxima (CFX) y el solvente DMSO.** Arriba (a): A diferentes concentraciones del antibiótico y del solvente. Abajo (b): Sólo varían las concentraciones del antibiótico. Resultados a ganancia 100. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min. Tiempo de inoculación de CFX: 2 h 30 min.

Realizando este ajuste en el ensayo, se eliminó el efecto del DMSO y en su lugar, se vio una disminución en la fluorescencia que era producido por las concentraciones más altas de Cefuroxima (Figura 12b). Por otro lado, en este experimento se evidenció que el solvente por sí solo no alteró el crecimiento bacteriano, pero sí produjo un aumento en la fluorescencia (Figura 13).

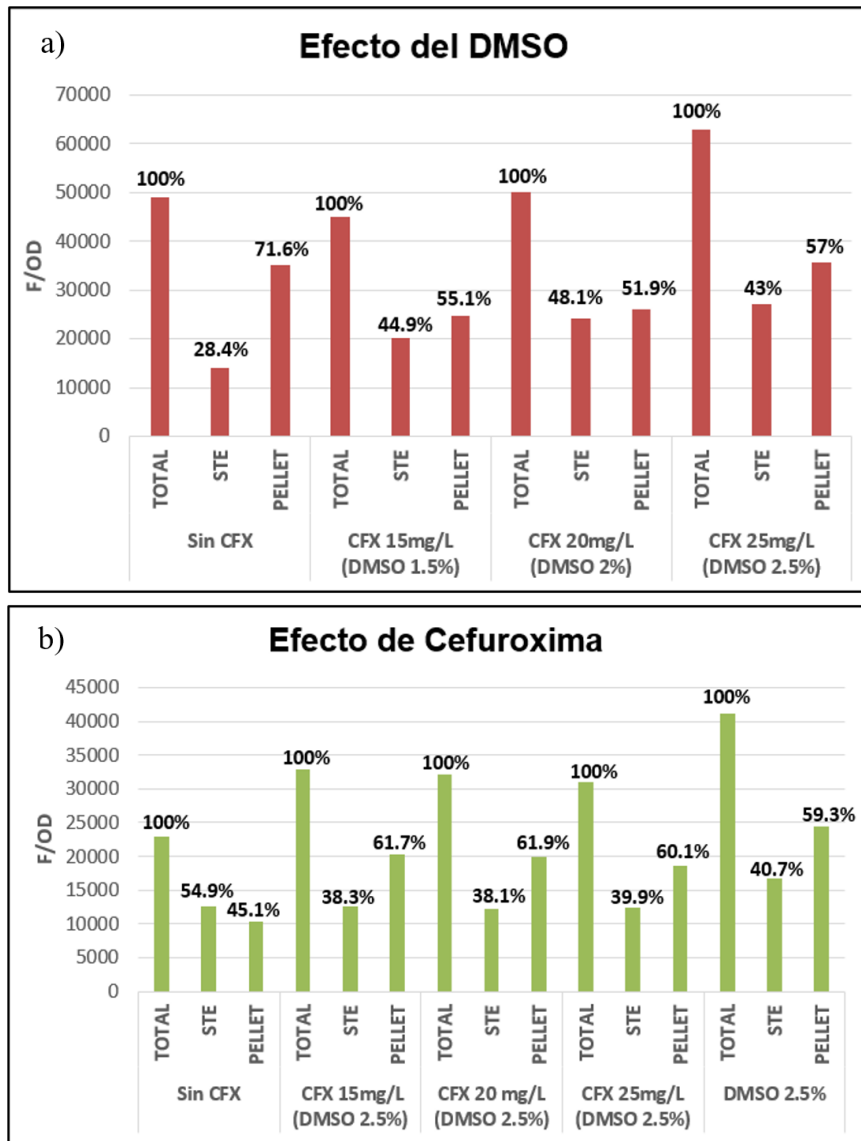


**Figura 13. Comparación de tasas de crecimiento de la Bacteria Reporta sin inducir e inducida, en presencia y ausencia del solvente DMSO.** Con el solvente, no se observa diferencia en la tasa de crecimiento (línea roja) ni en la densidad óptica (línea azul); mientras que al cuando se indujo a la BR, sí hubo un gran aumento de fluorescencia (línea verde). Datos de fluorescencia obtenidos a ganancia 100. Densidad óptica inicial: 0.01.

### 3. Ensayos de localización de fluorescencia

Teniendo en cuenta los resultados de fluorescencia con Cefuroxima (Figura 12b), se hipotetizó que las células podrían estar liberando GFP al medio extracelular debido al efecto del antibiótico sobre la pared bacteriana. Por ello, se desarrolló un pequeño ensayo al finalizar los experimentos en la placa multipozo, con el propósito de comparar la fluorescencia en el medio extracelular y dentro de la bacteria.

Se comparó la localización de la GFP bajo el efecto de Cefuroxima y DMSO, y sólo bajo el efecto de Cefuroxima (misma concentración de DMSO). En el primer ensayo, se observó que la mayor parte de la fluorescencia estaba localizada dentro de la bacteria (Figura 14a). Cuando se repitió el ensayo, esta vez evaluando sólo el efecto del antibiótico, se observó el mismo comportamiento (Figura 14b). En base a estos resultados, no se pudo determinar una diferencia en la localización de fluorescencia asociada al efecto del antibiótico ni al solvente.



**Figura 14. Resultados del ensayo de localización de fluorescencia.** Las concentraciones de Cefuroxima (CFX) y DMSO fueron añadidas al tiempo establecido de 2 h 30 min. Arriba (a): se muestran los porcentajes de fluorescencia normalizada incluyendo el efecto del DMSO. Abajo (b): se muestran los porcentajes de fluorescencia normalizada sólo bajo el efecto del antibiótico. Resultados obtenidos a ganancia 100.

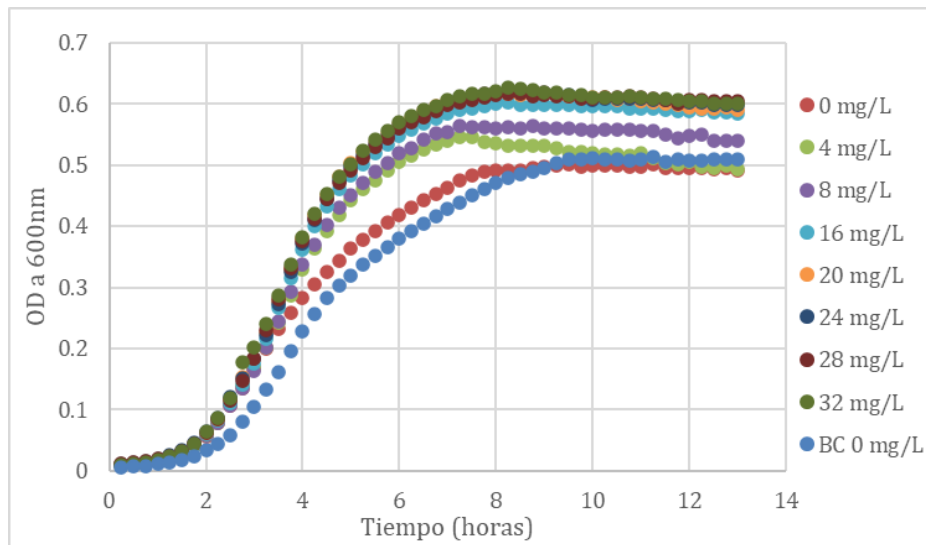


### C. Ensayos de inhibición

Al tener todas las condiciones establecidas, se desarrollaron los ensayos de inhibición. Tales experimentos fueron realizados con la Bacteria Reportera y la Bacteria Control mediante una curva dosis – respuesta. Además, se utilizaron varias concentraciones para cada antibiótico y se analizó su efecto en el crecimiento del chasis y en la fluorescencia de GFP.

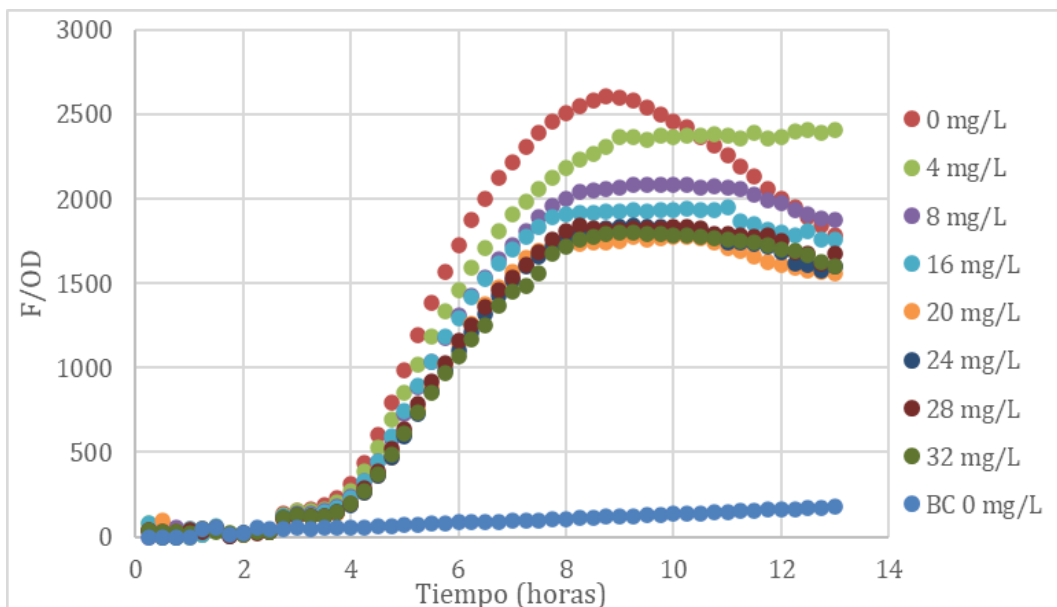
#### 1. Curva dosis – respuesta con Cefuroxima

Se realizó una curva dosis - respuesta para ver los efectos de diferentes concentraciones de Cefuroxima sobre el crecimiento y la fluorescencia. Como se indicó previamente, se igualó la concentración de DMSO en todas las condiciones, incluyendo al grupo sin antibiótico de las bacterias.



**Figura 15. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (adicionado a 2 h 30 min).** Nótese un aumento constante en la OD a medida que aumenta la concentración del antibiótico. BC: Bacteria Control. Densidad óptica inicial: 0.01.

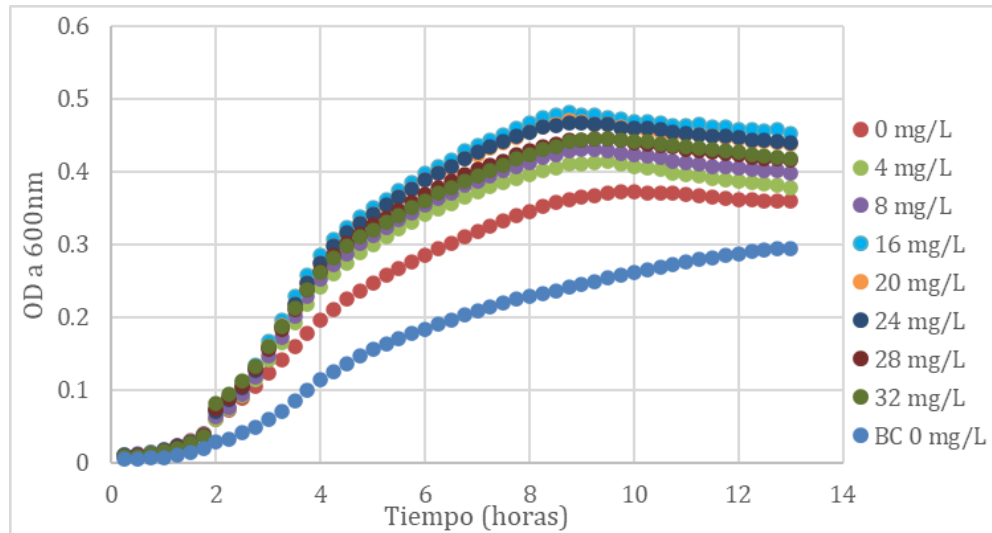
Se observó un incremento en la densidad óptica directamente proporcional a la concentración de Cefuroxima (Figura 15). Asimismo, en las tasas de crecimiento se vio que la tasa máxima de crecimiento ocurría a las 3 h 15 min para la BR en ausencia de antibiótico y al añadir Cefuroxima, ocurría a las 4 h (Figura 19). Sin embargo, a medida que se agregaba más antibiótico, la Bacteria Reportera producía cada vez menos fluorescencia (Figura 16).



**Figura 16. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cefuroxima (adicionado a 2 h 30 min).** Se observa una reducción en la fluorescencia producida a mayor concentración de antibiótico. Resultados a ganancia 50. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min.

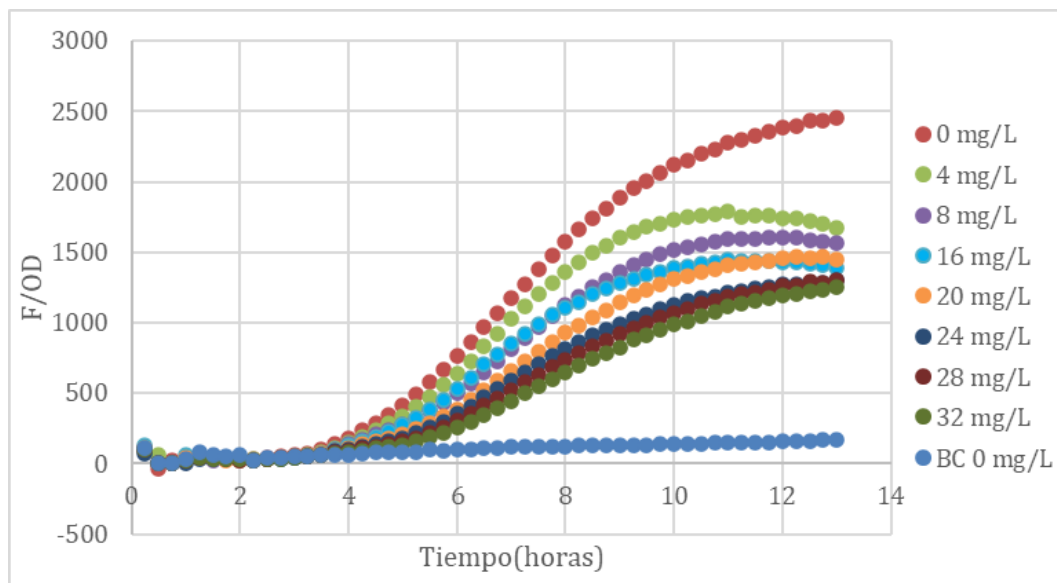
Debido al resultado anterior, el experimento se repitió bajo las mismas concentraciones de Cefuroxima y DMSO, pero cambiando el tiempo de adición del antibiótico a 1 h 45 min. Esta modificación hizo que el crecimiento se redujera a casi una unidad de OD respecto al ensayo previo. Sin embargo, esto no impidió que el crecimiento continuara aumentando a concentraciones más altas de antibiótico (Figura 17).

Mientras que la Bacteria Reportera y la Bacteria Control presentaron menor crecimiento sin Cefuroxima, al añadir el antibiótico más temprano se visualizó el mismo aumento en el crecimiento. A diferencia del ensayo anterior, la tasa máxima de crecimiento para la Bacteria Reportera, con o sin CFX, ocurrió a las 3 h 45 min (Figura 20).



**Figura 17. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cefuroxima (adicionado a 1 h 45 min).** BC: Bacteria Control. Densidad óptica inicial: 0.01.

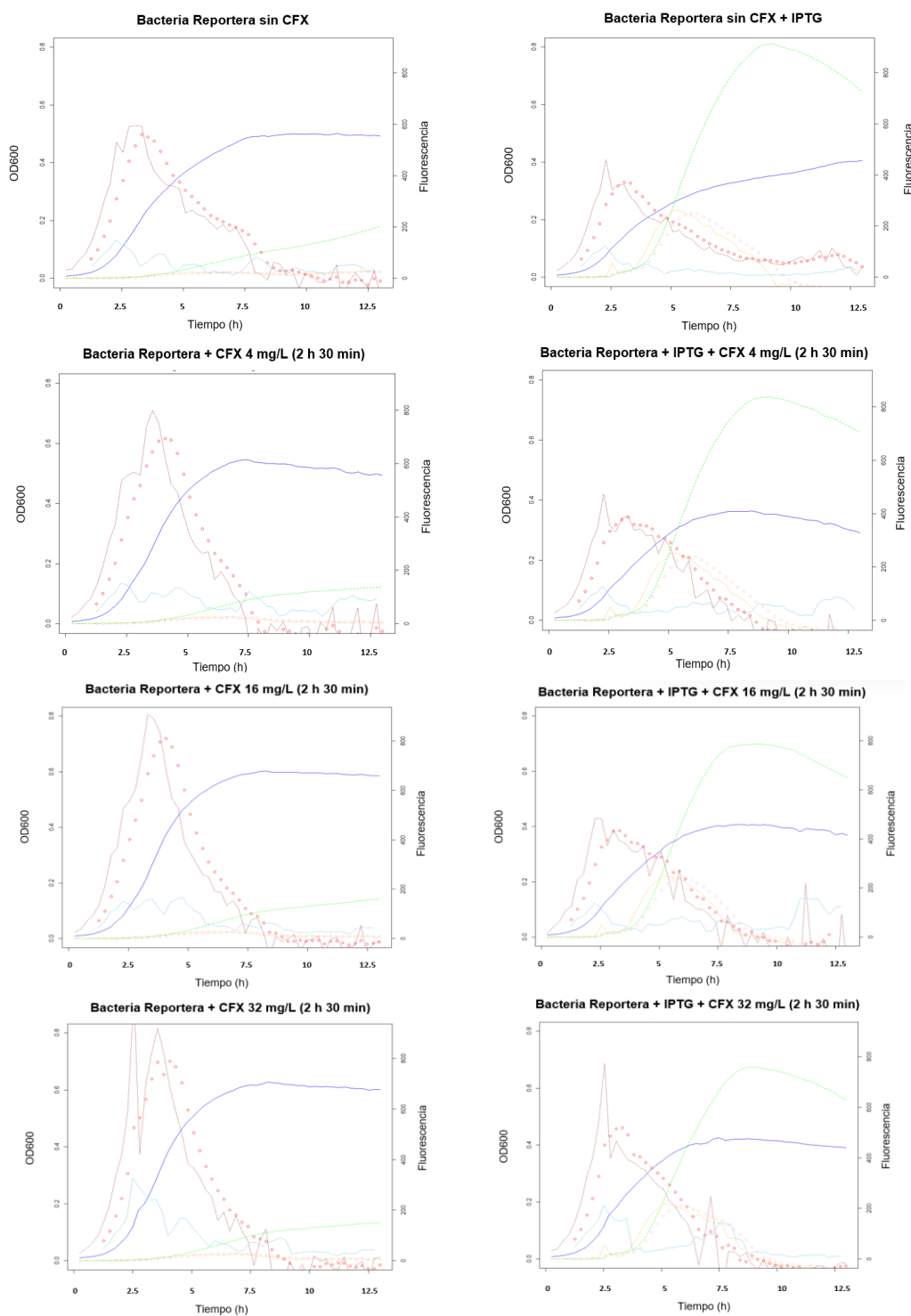
En cuanto a la fluorescencia, nuevamente se observó una reducción provocada por la Cefuroxima (Figura 18). A diferencia del resultado de fluorescencia anterior, las fluorescencias tuvieron un comportamiento más gradual en este segundo experimento. Por otro lado, como era esperado, la Bacteria Control no produjo fluorescencia en ninguno de los dos ensayos (Figura 16 y 18).



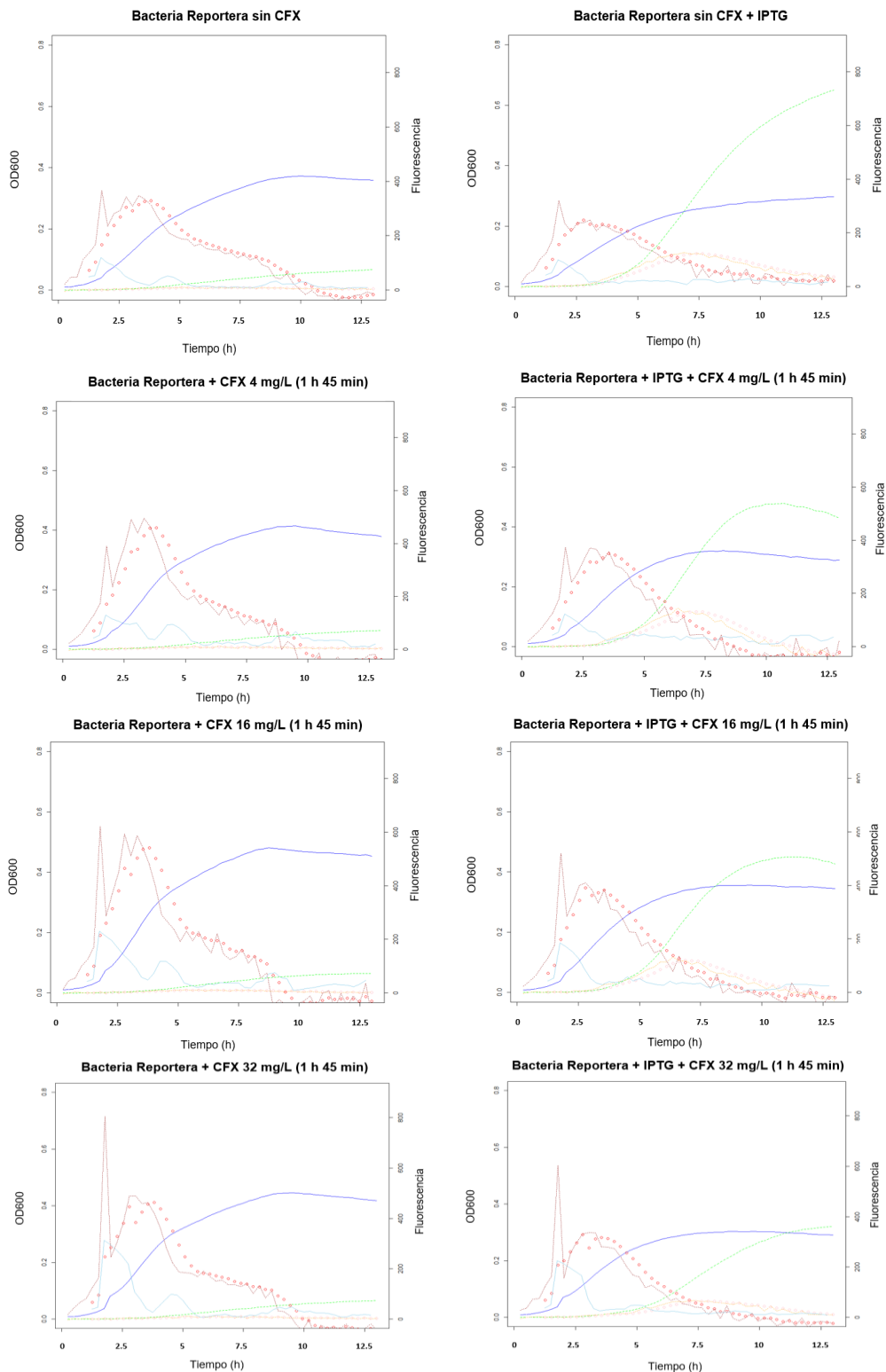
**Figura 18. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cefuroxima (adicionado a 1 h 45 min).** Resultados a ganancia 50. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min.

Al comparar las tasas de crecimiento en ambos momentos de inoculación del antibiótico, se observó una tendencia consistente: la Bacteria Reportera experimentaba un aumento en su velocidad de su crecimiento, particularmente en las dos primeras horas después de inocular la CFX (Figuras 19 y 20). Este comportamiento se manifestaba de manera más pronunciada cuando CFX se añadía a las 2 h 30 min. En contraste, la tasa de fluorescencia mostró una disminución constante con el aumento de las concentraciones del antibiótico.

Además, se observó una reducción en el crecimiento bacteriano de un poco más de la mitad cuando se añadió tanto el antibiótico como el inductor, en comparación con la bacteria expuesta únicamente al antibiótico (Figuras 19 y 20, columna derecha).

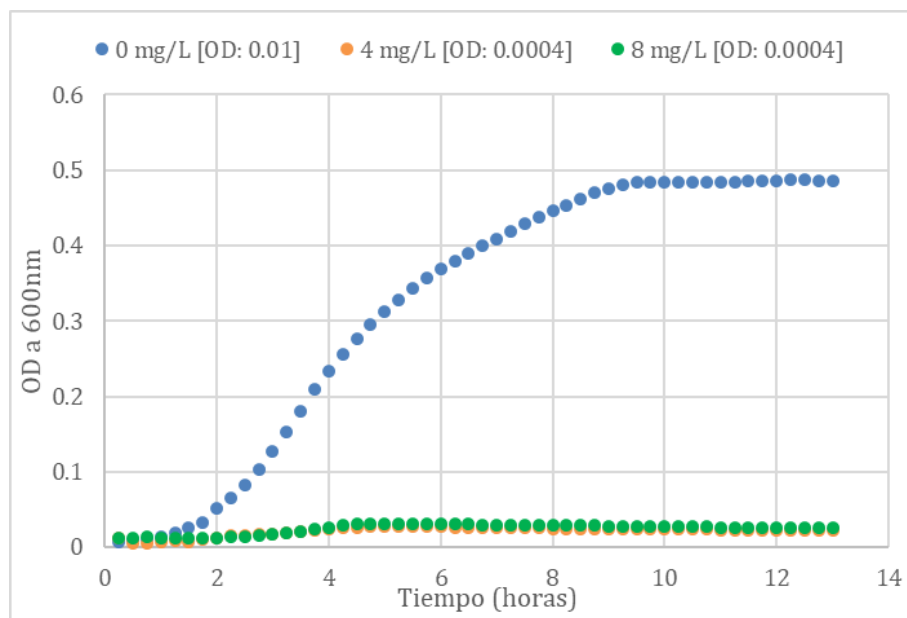


**Figura 19. Tasas de crecimiento (rojo) y producción de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a diferentes concentraciones de Cefuroxima (adicionadas a 2 h 30 min). Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CFX: Cefuroxima. Densidad óptica inicial: 0.01.**



**Figura 20. Tasas de crecimiento (rojo) y producción de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a diferentes concentraciones de Cefuroxima (adicionadas a 1 h 45 min). Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CFX: Cefuroxima. Densidad óptica inicial: 0.01.**

Debido a los resultados de crecimiento con Cefuroxima, se realizó un ensayo de susceptibilidad antibiótica para confirmar la letalidad del antibiótico sobre la Bacteria Reportera. Para ello, se preparó un cultivo bacteriano con una OD inicial de 0.0004 y antes de iniciar el ensayo se le adicionó la concentración de CFX equivalente a la MIC90 para *E. coli*. Con estos resultados (Figura 21), se pudo comprobar que el antibiótico sí tenía una actividad bactericida a una baja densidad bacteriana.

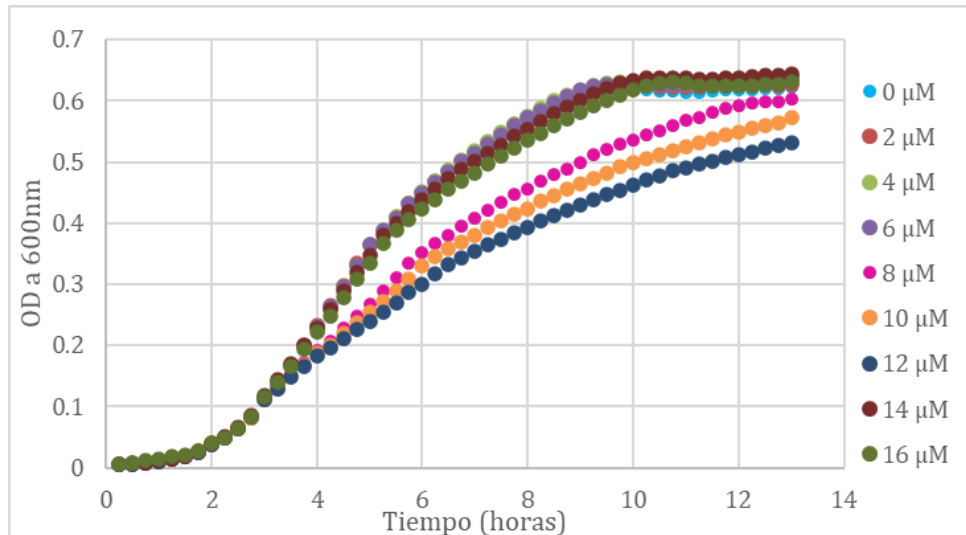


**Figura 21. Prueba de Susceptibilidad Antibiótica con la Bacteria Reportera para Cefuroxima.** Se muestra la Densidad óptica inicial de cada cultivo en los corchetes. No se observó sobrevivencia al antibiótico añadido al inicio del experimento.

## 2. Curva dosis – respuesta con Cloranfenicol

Se realizó una curva dosis – respuesta con Cloranfenicol, con el objetivo de comparar la actividad del antibiótico sobre la célula hospedera y la enzima heteróloga, a un mayor rango de concentraciones.

Cabe mencionar que durante el primer ensayo de inhibición hubo una desconfiguración en el lector de placas, por lo que el ensayo no se pausó al tiempo establecido para añadir el antibiótico, sino 15 minutos después (2 h 45 min). Sin embargo, comparando con los resultados anteriores (Figuras 9 y 10), no se vio diferencias en la actividad del antibiótico a este tiempo. Por lo tanto, la curva de concentraciones realizada a 2 h 45 min fue mantenida y analizada en este trabajo.

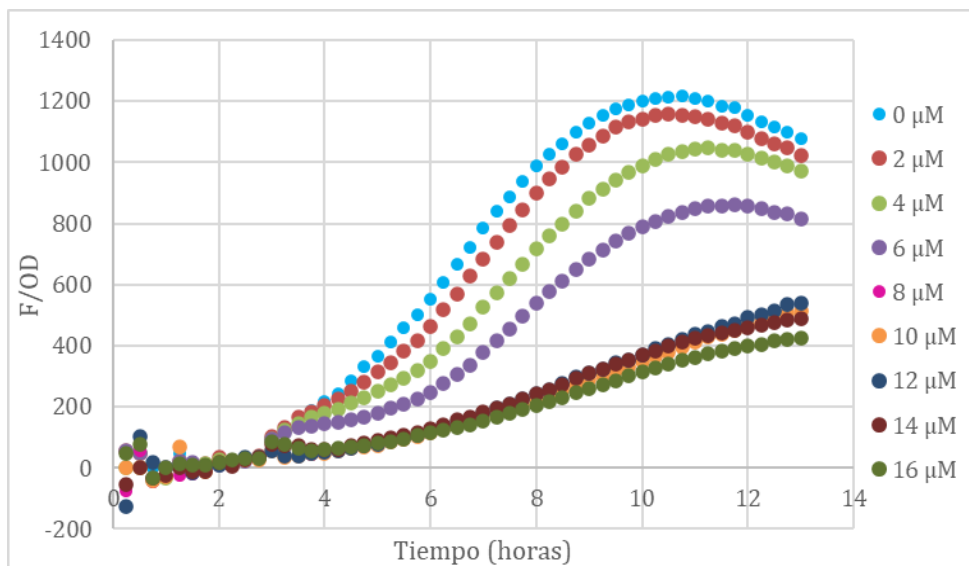


**Figura 22. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol.** Se adicionó el antibiótico a las 2 h 45 min. Se observa el mismo efecto inhibitorio cuando CAM es añadido a 2 h 30 min. Densidad óptica inicial: 0.01.

Al igual que en el ensayo preliminares, se observó una inhibición tanto en el crecimiento como en la fluorescencia (Figuras 22 y 23). Las diferencias en el crecimiento pudieron distinguirse 30 minutos después de añadir el antibiótico, mientras que para la fluorescencia fue luego de 15 minutos. A concentraciones menores de 8 µM, las diferencias fueron muy sutiles con respecto a la condición sin antibiótico. En cambio, a concentraciones de 8 µM a más, la reducción fue más drástica.

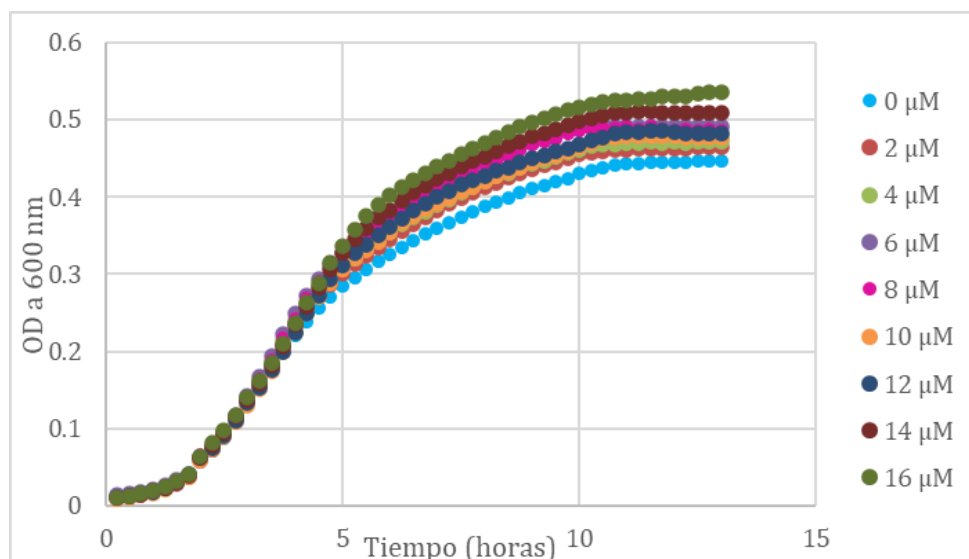
Cabe mencionar que, para las dos concentraciones más altas, 14 µM y 16 µM, se visualizó un crecimiento mayor que a 8 µM (Figura 22), a pesar de que la fluorescencia normalizada es menor (Figura 23). Esto se debería a que posiblemente hubo una mayor densidad bacteriana en ambas condiciones, por lo que al dividir el valor de fluorescencia total entre OD para obtener la fluorescencia normalizada, se visualiza la producción de GFP real que se debe al antibiótico.



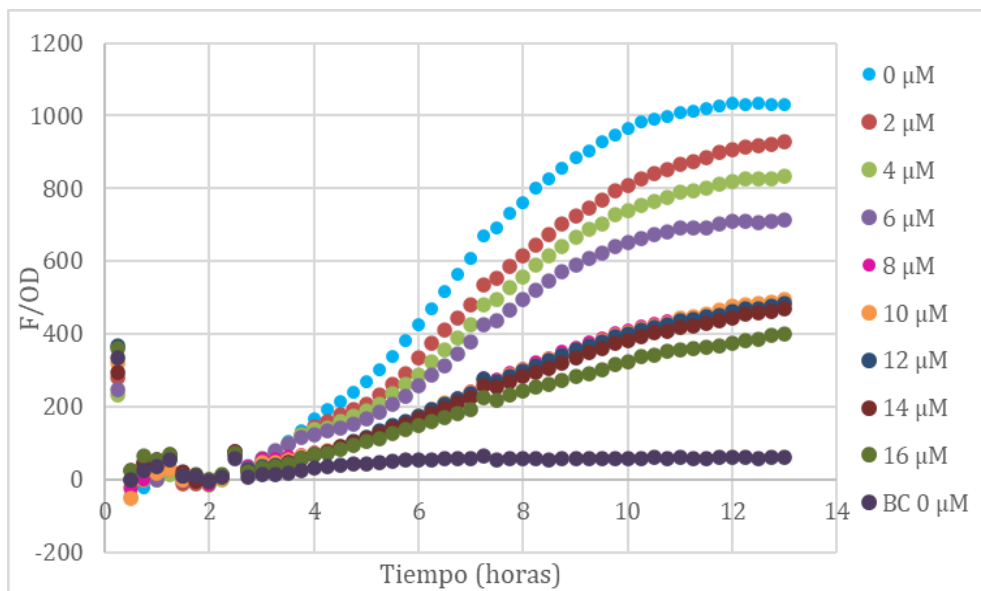


**Figura 23. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cloranfenicol (adicionado a 2 h 45 min).** Se observa una reducción rápida y gradual a mayor cantidad de CAM. Resultados a ganancia 50. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min.

Se repitió el ensayo con CAM, esta vez inoculando el antibiótico a 1 h 45 min. Nuevamente, se observó una reducción en la fluorescencia (Figura 25). Sin embargo, el crecimiento fue más estable bajo las mismas concentraciones de antibiótico (Figura 24).

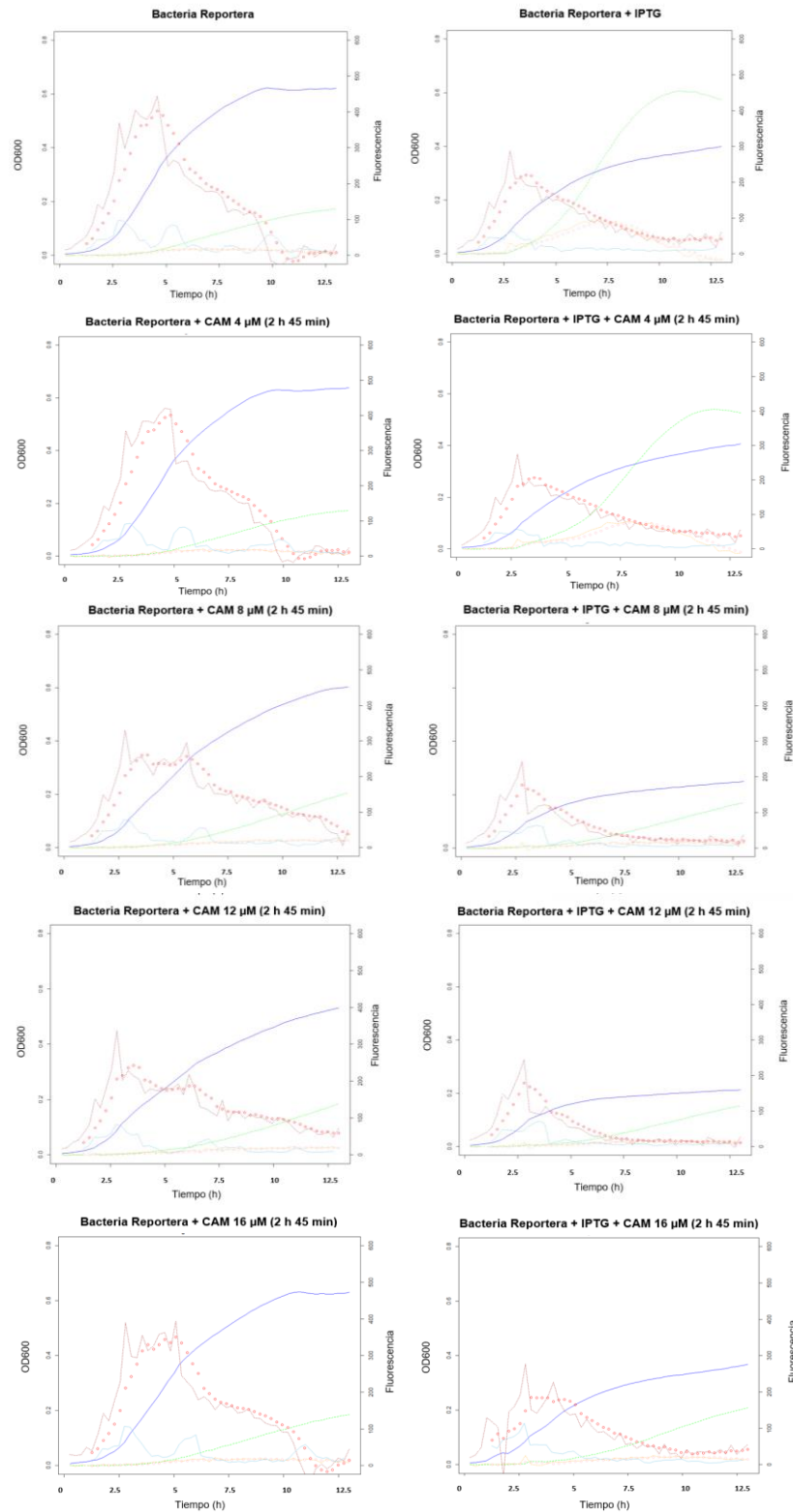


**Figura 24. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol (adicionado a 1 h 45 min).** A diferencia del tiempo de inoculación a 2 h 45 min, se visualiza un crecimiento muy similar a todas las concentraciones. Densidad óptica inicial: 0.01.

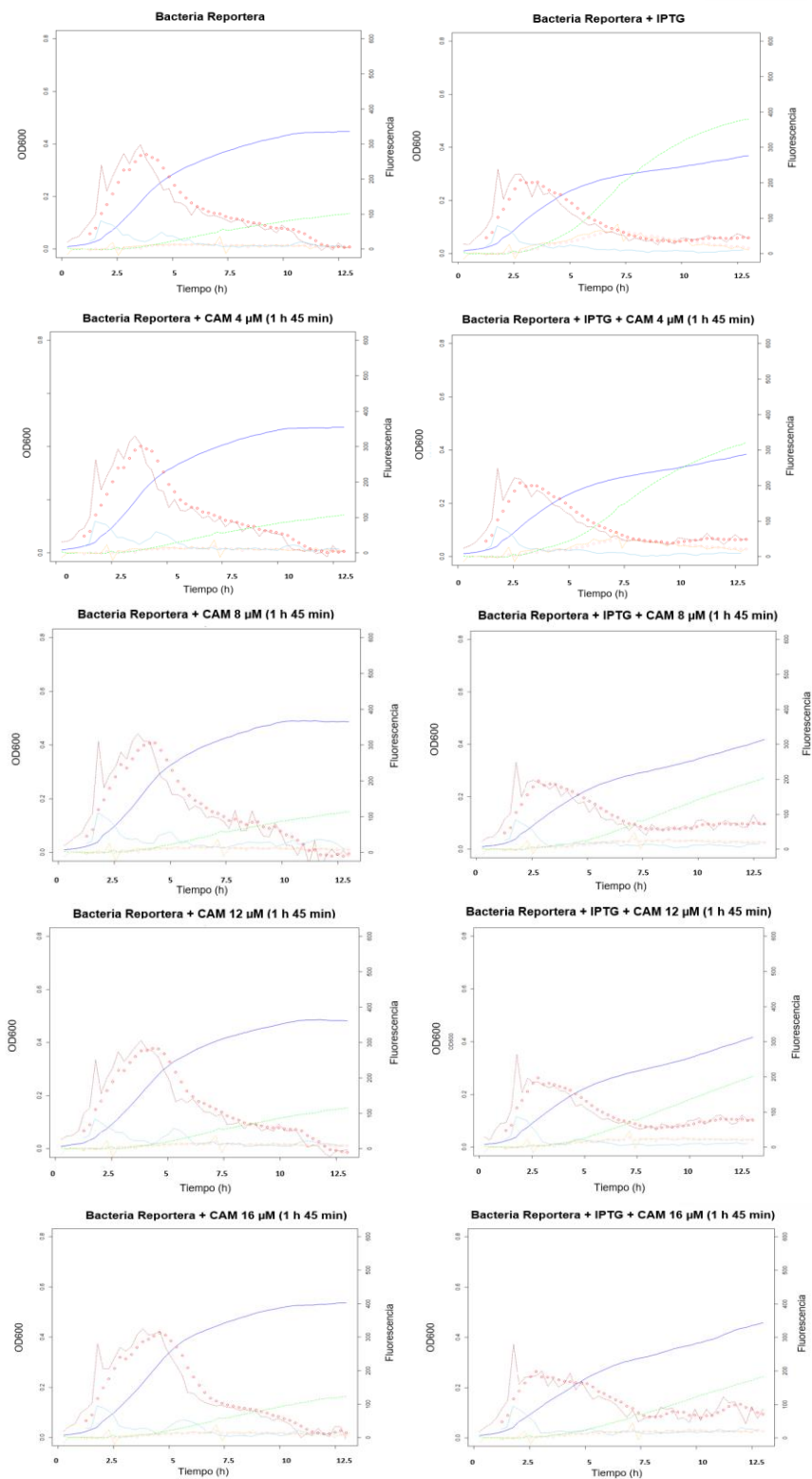


**Figura 25. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cloranfenicol (adicionado a 1 h 45 min). Resultados a ganancia 50. BC: Bacteria Control. Tiempo de inducción con IPTG: 1 h 45 min.**

Además, se calcularon las tasas de crecimiento y de producción de fluorescencia de la Bacteria Reportera en ambos momentos de adición de Cloranfenicol. En el primer ensayo, se evidenció una reducción notable en ambas tasas a partir de la concentración de 8 μM (Figura 26). Esta tendencia también se vio tanto en presencia como en ausencia del inductor. Sin embargo, en el segundo ensayo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento en las condiciones con antibiótico (Figura 27). Además, se destacó una tasa de crecimiento relativamente constante en presencia del inductor.



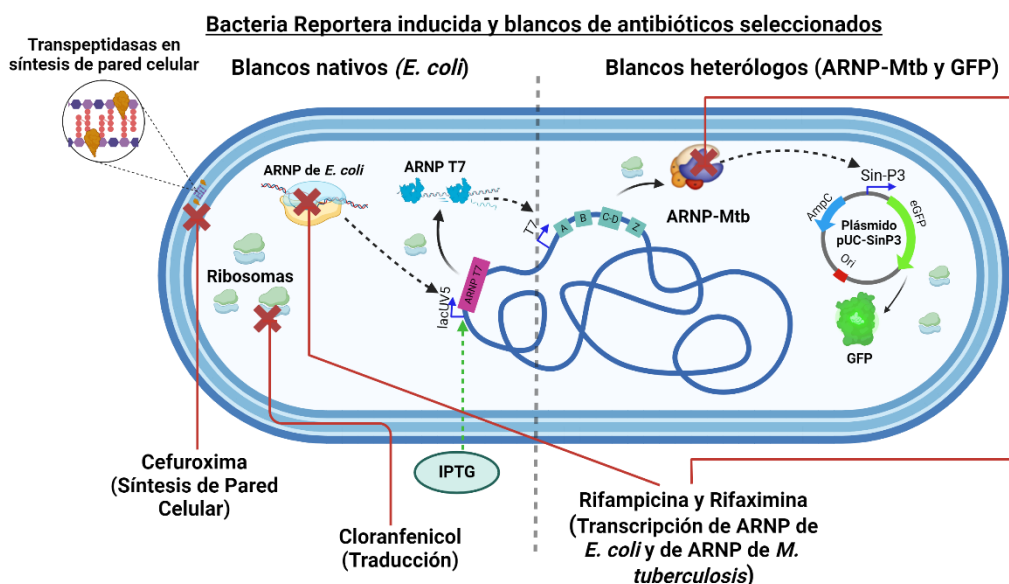
**Figura 26.** Tasas de crecimiento (rojo), tasas de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la **Bacteria Reportera** a diferentes concentraciones de **Cloranfenicol** (adicionado a 2 h 45 min). Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CAM: Cloranfenicol. Densidad óptica inicial: 0.01.



**Figura 27. Tasas de crecimiento (rojo), tasas de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a diferentes concentraciones de Cloranfenicol (adicionado a 1 h 45 min). Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Dato de fluorescencia a ganancia 50. CAM: Cloranfenicol. Densidad óptica inicial: 0.01.**

#### D. Comparación de actividad antibiótica en *E. coli*, ARNP-MTb y ribosomas

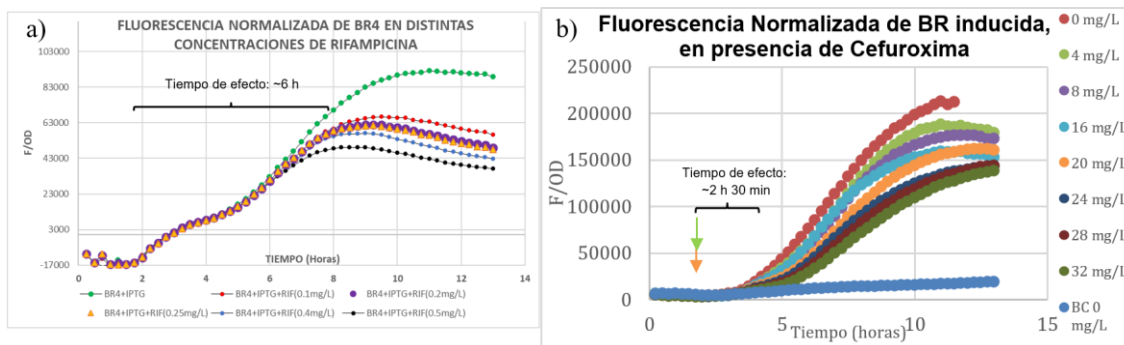
Se comparó el mecanismo de acción de cuatro antibióticos (Cefuroxima, Cloranfenicol, Rifampicina y Rifaximina) en función de su efecto sobre el crecimiento de la célula hospedera y sobre su fluorescencia producida. Los resultados comparados fueron desarrollados bajo las mismas condiciones experimentales.



**Figura 28. Blancos de acción de los antibióticos seleccionados para los experimentos con la Bacteria Reportera.** Figura hecha en Biorender.com

#### *Cefuroxima (CFX) vs Rifampicina (RIF)*

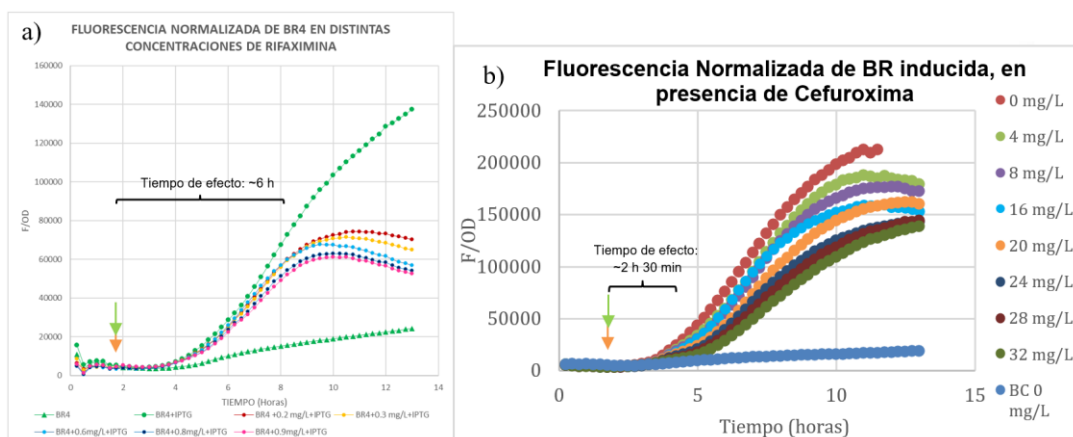
En primer lugar, se observó que la producción de GFP es afectada de forma distinta por RIF y por CFX. En el caso de RIF, a concentraciones menores de la MIC50 para *M. tuberculosis*, la fluorescencia normalizada demora en disminuir alrededor de 6 horas desde el momento en que se añadió el antibiótico. Fue a las casi 8 h de ensayo que se visualizó una caída drástica en la fluorescencia con respecto a la condición sin antibiótico (Figura 29a). En cambio, al emplear CFX a concentraciones superiores a la MIC90 para *E. coli*, se notó que la fluorescencia experimentó una alteración rápida provocada por el antibiótico (aproximadamente a las 2 horas y 30 minutos después de la adición de CFX) pero este cambio se produjo de manera progresiva (Figura 29b).



**Figura 29. Fluorescencia Normalizada a diferentes concentraciones de a) Rifampicina y b) Cefuroxima.** Las flechas indican tiempo de inoculación (naranja) e inducción (verde): 1 h 45 min. Figuras a ganancia 100. Gráfico de Rifampicina adquirido del trabajo de K. Espinoza (76), donde BR4 corresponde a la BR en este trabajo.

### *Cefuroxima (CFX) vs Rifaximina (RFX)*

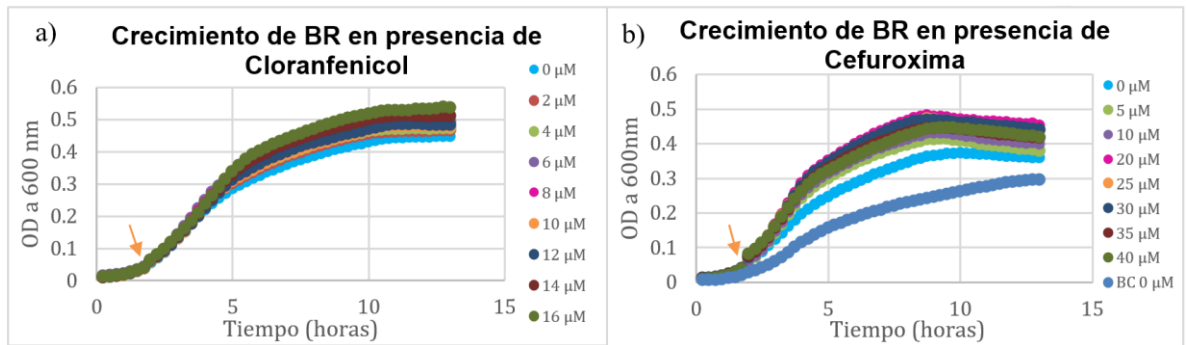
Así como sucedió con RIF, la Rifaximina a concentraciones inferiores a la MIC90 para *M. tuberculosis* provocó una disminución abrupta en la fluorescencia normalizada, observada seis horas después de la adición del antibiótico. A pesar de que ambos antibióticos inhibieron la producción de fluorescencia, se observó que la inhibición causada por RFX fue más pronunciada a medida que aumentaba la concentración (Figura 30a). En contraste, con CFX, la producción de GFP fue rápidamente alterada y de manera progresiva en el tiempo (Figura 30b).



**Figura 30. Fluorescencia Normalizada a diferentes concentraciones de a) Rifaximina y b) Cefuroxima.** Las flechas indican tiempo de inoculación (naranja) e inducción (verde): 1 h 45 min. Figuras a ganancia 100. BC: Bacteria Control. Gráfico adquirido del trabajo de K. Espinoza (76), donde BR4 corresponde a la BR en este trabajo.

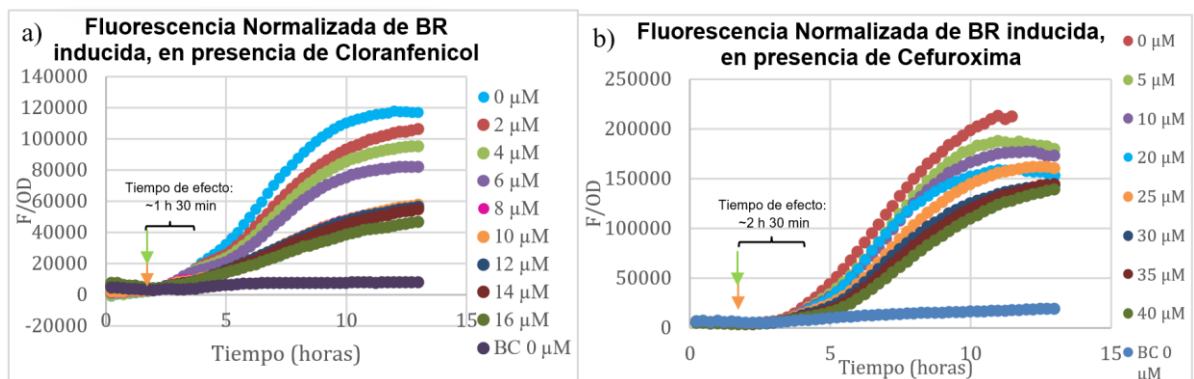
### Cefuroxima (CFX) vs Cloranfenicol (CAM)

El crecimiento bacteriano fue relativamente parecido entre ambos antibióticos. Con Cloranfenicol a concentraciones menores a la MIC50 para *E. coli*, el crecimiento aumentó de manera gradual a medida que se incrementaba la concentración, exhibiendo una mayor estabilidad en comparación con Cefuroxima (Figura 31a). De manera similar, con este último antibiótico se observó un incremento notorio en la densidad óptica, el cual también fue directamente proporcional a la concentración del antibiótico (Figura 31b).



**Figura 31. Crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de a) Cloranfenicol y b) Cefuroxima.** La flecha naranja indica tiempo de inoculación: 1 h 45 min. BC: Bacteria Control. Densidad óptica inicial: 0.01.

Respecto a la fluorescencia, la incorporación de cada uno de los antibióticos condujo a una rápida y progresiva disminución en la producción de GFP. Mientras que Cefuroxima generó una reducción en la fluorescencia después de 2 horas y 30 minutos (Figura 32b), Cloranfenicol manifestó un efecto más rápido, evidenciándose a tan solo 1 hora y 30 minutos después de añadir el antibiótico (Figura 32a).

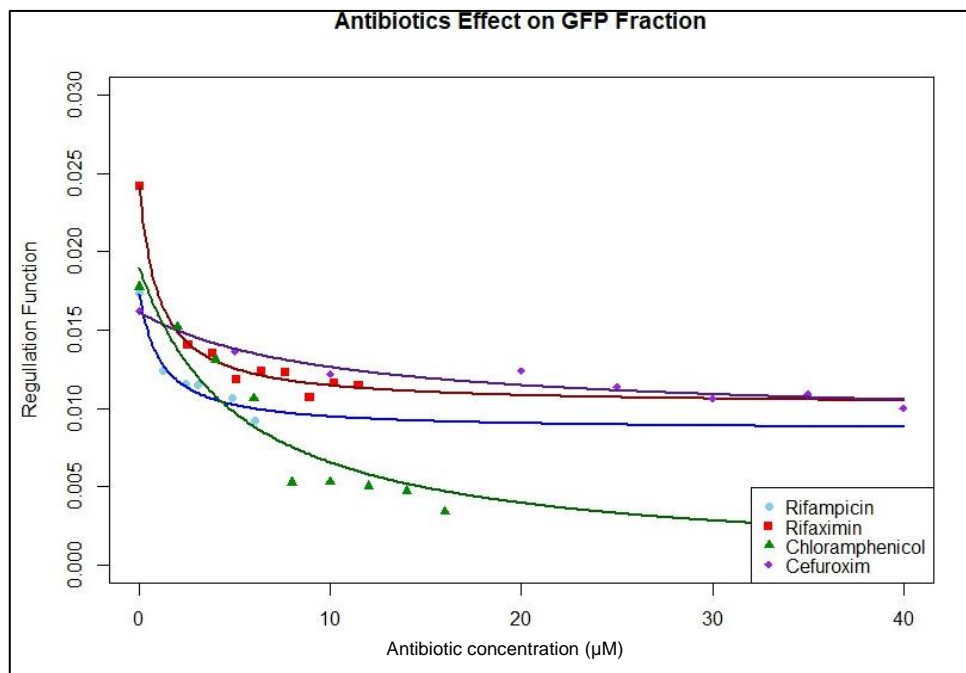


**Figura 32. Fluorescencia Normalizada a diferentes concentraciones de a) Cloranfenicol y b) Cefuroxima.** Las flechas indican tiempo de inoculación (naranja) e inducción (verde): 1 h 45 min. Figuras a ganancia 100. BC: Bacteria Control.

### Modelo matemático

Se utilizó un modelo matemático con el fin de comprender y visualizar cómo cada antibiótico altera la fracción de biosíntesis asociada a las proteínas heterólogas. En términos generales, se identificó una relación de hipérbola negativa para los cuatro antibióticos, señalando que redujeron la fracción total de biosíntesis destinada a las proteínas heterólogas (Figura 33).

Asimismo, se destacó principalmente la actividad de RFX ya que, con muy poca concentración de antibiótico, consiguió reprimir rápidamente la fracción. El segundo antibiótico que presenta esta rápida acción inhibitoria es RIF. Por otro lado, a pesar de que CFX no afecta directamente la síntesis proteica de GFP, se observó que también presentaba un comportamiento inhibitorio según el modelo. Sin embargo, a diferencia de los antibióticos previos, esta actividad sería dependiente de una mayor concentración de CFX. Esto también fue evidente para CAM, pues se observó una reducción gradual a fuerte en la velocidad de inhibición a mayores concentraciones.



**Figura 33. Función de regulación del efecto de antibióticos en la fracción heteróloga (GFP).**



## VII. Discusión

En este trabajo se aborda un sistema biológico modificado con componentes genéticos de diferentes orígenes (*E. coli*, *M. tuberculosis*, y bacteriófago T7) que lo alejan de sus funciones naturales. El manejo de este organismo sintético y la interpretación de su comportamiento es un reto complejo, especialmente debido a que la información que obtenemos aquí consiste únicamente en la producción de una proteína reportera (medida con una señal fluorescente) y la tasa de crecimiento (medida como un cambio en la densidad óptica).

Para facilitar el análisis de la totalidad de los datos presentados en este estudio, primero daremos cuenta de las hipótesis específicas declaradas en la sección III, que formularemos aquí a modo de premisas. Con este formato, pretendemos ofrecer respuestas directas y sencillas basadas en los supuestos iniciales.

En una segunda parte de esta discusión, haremos una revisión de los procedimientos que se realizaron para llegar a un protocolo bien pautado que permita comparar la acción de diferentes antibióticos. Finalmente, en la tercera parte, nos aproximaremos a los experimentos realizados con cada antibiótico con mayor detalle para realizar un análisis más profundo, sopesando los supuestos iniciales y posibles interpretaciones alternativas.

### A. Comprobación de hipótesis: Identificando el efecto de los antibióticos sobre ARNP-Mtb y sobre *E. coli*

***En relación con la disminución del crecimiento antes de la reducción de fluorescencia, cuando se utiliza un antibiótico que afecta la viabilidad de la célula hospedera:***

Si bien el aumento en la concentración de Cefuroxima generó una caída en la fluorescencia (Figuras 16 y 18), previamente no se observó una reducción en el crecimiento de la Bacteria Reportera (Figuras 15 y 17). Por el contrario, después de añadir el antibiótico, la tasa de crecimiento demostró un rápido aumento (Figuras 19 y 20). Esto evidenciaría que no hay una afección de la célula hospedera antes de la inhibición de la enzima heteróloga.

Se especula que el aumento en el crecimiento sea producto de una deficiencia de antibiótico para la alta densidad bacteriana (efecto de inóculo) o consecuencia de un aumento de masa celular (cambio de forma celular a filamentos) y no necesariamente de un aumento en el número de bacterias.

***Con respecto al retraso en la reducción de fluorescencia cuando se utilizan antibióticos que afectan la viabilidad de la célula hospedera:***

Los resultados de Cefuroxima (blanco: pared celular) demostraron una caída de fluorescencia más rápida y progresiva que con aquellos antibióticos que inhiben la transcripción o traducción (Figuras 29-32).

Así como otros betalactámicos, la caída de fluorescencia con Cefuroxima se debería a la actividad del antibiótico sobre diversos blancos del metabolismo celular, no asociados necesariamente a la producción de la proteína fluorescente.

***Con respecto a una reducción temprana en la fluorescencia sin alterar el crecimiento, al añadir antibióticos que inhiben directamente la actividad de la ARNP-Mtb:***

Aunque los antibióticos utilizados y analizados afectaron la producción de fluorescencia, su relación con el crecimiento fue distinta. Con antibióticos que afectan directamente a la ARNP-Mtb, Rifampicina y Rifaximina, se observó que la reducción de fluorescencia fue lenta y sólo después de 6 h se observó una caída abrupta, sin una reducción del crecimiento (Figuras 29a, 30a y 33). En cambio, con un antibiótico que afecta la traducción de proteínas como Cloranfenicol, siempre se observó una reducción rápida y progresiva en la fluorescencia (Figuras 23 y 25), mientras que el comportamiento sobre el crecimiento depende del tiempo en que el antibiótico es añadido. Cuando se adicionó CAM durante la inducción (con IPTG) el crecimiento fue normal, y cuando se añadió 45 minutos después de la inducción, el crecimiento se redujo (Figuras 22 y 24). Finalmente, con un antibiótico que no afecta a la producción de proteínas (Cefuroxima), la caída de fluorescencia también ocurrió de forma rápida y progresiva.

Este comportamiento podría estar relacionado al blanco de acción y a su sensibilidad. En el caso de Rifaximina y Rifampicina, ambos afectan tanto a las ARNPs de *E. coli* y *M. tuberculosis* (esta última más sensible a ambos ATBs). Dado que las concentraciones no

letales inhibieron sólo la actividad de la enzima heteróloga, la producción de fluorescencia dependería sólo de la cantidad de transcritos de GFP y del número de ARNPs de Mtb no inhibidas. Por otro lado, al añadir Cloranfenicol, la rápida caída en la fluorescencia se atribuiría a una reducción en el número de ribosomas disponibles y el efecto en el crecimiento en función del tiempo dependería de la adaptación metabólica de la bacteria.

***En relación con la evaluación del sistema recombinante para discernir la actividad de un antibiótico sobre la célula hospedera E. coli de un antibiótico que afecta a la ARNP-Mtb:***

El modelo matemático aquí utilizado está basado en la asignación de flujo de biosíntesis en el punto de equilibrio entre el inductor y la maquinaria de expresión. En estas condiciones, se observó el mismo comportamiento para todos los antibióticos probados: una reducción en la fracción heteróloga (Figura 33). Por tanto, no sería distinguible su acción.

Por otro lado, según la comparación directa entre las curvas de fluorescencia, sí fue posible diferenciar el efecto de antibióticos con distintos blancos de acción. No obstante, esta diferencia sólo fue observada mediante la rapidez en que la fluorescencia disminuía. Aquellos antibióticos que afectaban la actividad de la ARNP-Mtb, como RIF y RFX, causaron una caída lenta y posteriormente abrupta. En cambio, Cefuroxima y Cloranfenicol, que afectan a *E. coli*, causaron una caída más rápida y progresiva, probablemente producto del estrés ejercido sobre la bacteria.

## **B. Discusión detallada de los experimentos**

### **1. Estableciendo condiciones y variables de los ensayos de inhibición**

En este proyecto, se determinaron condiciones como en qué momento y cuánto del antibiótico seleccionado hay que añadir al cultivo para ver efectos significativos en el crecimiento del chasis y en la actividad de la ARNP-Mtb. Para ello, primero se comprobó la susceptibilidad antibiótica de la Bacteria Reportera mediante un ensayo de punto final, utilizando concentraciones cercanas a la MIC de Cefuroxima y Cloranfenicol para *E. coli*.

En segundo lugar, se realizaron ensayos basados en el tiempo y concentración adecuados para ver efectos en el crecimiento y/o la fluorescencia. De acuerdo con los resultados, al tiempo de 2 h 30 min y utilizando concentraciones pre-inhedoras en una curva dosis-respuesta, se observó la acción de cada antibiótico sobre la viabilidad de la Bacteria Reportera y/o sobre la actividad de la ARNP-Mtb. En esta segunda parte, se analizará con mayor profundidad el establecimiento de condiciones para un protocolo eficaz orientado al cribado de antibióticos.

*Diferencias del protocolo propuesto para el uso de la Bacteria Reportera, con respecto a un protocolo convencional de susceptibilidad antibiótica*

Las concentraciones de trabajo seleccionadas para Cefuroxima y Cloranfenicol fueron determinadas a partir de ensayos de punto final en los que se confirmó un efecto bactericida en la Bacteria Reportera. Estos fueron seguidos de ensayos en placa multipozo en los que se añadió el antibiótico al cultivo y se observó su efecto en el tiempo, tanto en el crecimiento como en la fluorescencia. Para ello, el rango de concentraciones analizadas fue escogido en base a las diluciones dobles seriadas que son empleadas comúnmente en los ensayos de susceptibilidad del tipo microdilución en caldo (79).

No obstante, en dichos ensayos de susceptibilidad se usa una concentración bacteriana de  $5 \times 10^5$  CFU/mL (OD: 0.0004) y el antibiótico es agregado al inicio para medir su efecto en el tiempo (79). En cambio, durante los ensayos de inhibición realizados con este sistema recombinante, se utilizó como concentración inicial del cultivo  $12,5 \times 10^6$  CFU/mL (OD: 0.01). Esto representa un cultivo 25 veces más concentrado que la cantidad indicada para los ensayos de susceptibilidad.

Conforme al trabajo doctoral de K. Espinoza, la concentración inicial del cultivo en el ensayo de inhibición fue establecida para rápidamente reactivar el crecimiento del cultivo y para posteriormente priorizar la síntesis de la proteína heteróloga (76). Al igual que en los cultivos productivos bifásicos (Revisar Marco Teórico), estas condiciones fueron previamente establecidas para maximizar el rendimiento de las proteínas recombinantes.

De acuerdo con nuestros resultados, a la concentración bacteriana establecida por K. Espinoza (OD:0.01) se evidenciaron alteraciones en el crecimiento y/o en la producción

de fluorescencia después de inocular el antibiótico. Por el contrario, trabajar con concentraciones de cultivo más bajas implicaría prolongar el tiempo antes de añadir el inductor o que las bacterias sobrevivientes no generen una cantidad significativa de fluorescencia.

#### *Concentración óptima*

Si bien en el ensayo de punto final la adición de cada antibiótico consiguió inhibir el crecimiento de la Bacteria Reportera, en los ensayos en placa multipozo para CFX y CAM se observaron resultados distintos. Este contraste se debería a que en cada experimento se utilizaron diferentes concentraciones de cultivo bacteriano. Para el experimento de punto final, se picó una colonia para añadirla en medio líquido y después se incubó por una hora antes de añadir el antibiótico. Esto indicaría que la densidad óptica debe haber sido considerablemente más baja que la empleada para el ensayo de placa multipozo (OD:0.01).

Además, la actividad farmacodinámica de cada antibiótico es distinta. CFX inhibe la formación de la pared celular durante el crecimiento bacteriano, por lo que presenta una actividad dependiente del tiempo (80). Por otro lado, CAM es un antibiótico que inhibe a los ribosomas de manera reversible, por lo que su actividad es dependiente de la concentración de antibiótico (80). Por esta razón, tanto la concentración inicial del cultivo como la actividad de cada antibiótico serían las razones por las que se observaron comportamientos tan diferentes en dichos experimentos.

#### *Tiempos de inoculación del antibiótico*

Se evaluó el impacto del antibiótico sobre la Bacteria Reportera en tres momentos del experimento, para identificar el momento en que se pueda observar efectos significativos en el crecimiento y/o en la fluorescencia (Figuras 6 y 7). Los primeros experimentos en las placas multipozo con Cefuroxima indicaron que agregar el antibiótico a las 4 h 15 min resultaba en una reducción insignificante en la tasa de crecimiento (Figura 5). Esta observación podría estar relacionada con la fase de crecimiento en el momento en que se añade el antibiótico al cultivo. De hecho, la adición del antibiótico a 4 h 15 min fue considerablemente tardía. En cambio, en el ensayo de susceptibilidad antibiótica (Figura

21), Cefuroxima se añadió desde el comienzo de la fase de adaptación (al inicio del ensayo), momento en el cual se verificó su máxima eficacia antibacteriana (81).

En fases de crecimiento posteriores a la fase de adaptación, también podría haber ocurrido un efecto de inóculo. Este fenómeno, conocido en compuestos betalactámicos como Cefuroxima (82), se percibe como una disminución en la actividad antibiótica a medida que la población bacteriana aumenta (83). Esto genera que la cantidad de moléculas de antibiótico por bacteria sea cada vez menor, haciendo que la dosis administrada al cultivo se vuelva insuficiente (83,84). Dicho comportamiento es semejante al visto en el experimento en el que se adicionó Cefuroxima a mayor tiempo.

Adicionalmente, es probable que en el cultivo haya habido bacterias metabólicamente inactivas (85). Se ha documentado que esta divergencia en el crecimiento del cultivo brinda una ventaja de supervivencia a la población en momentos de estrés como la adición de antibióticos (85,86). Al no haber división celular en estas bacterias, la transcripción de las PBP se reduce y la Cefuroxima se vuelve ineficaz (87). En el caso de la fluorescencia, la menor producción de la GFP se debería a una reducción en la síntesis de proteínas, causado por el estado de baja energía de las bacterias.

Por el contrario, al añadir el antibiótico en fases tempranas, se observó un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento y en la fluorescencia (Figuras 6 y 7). Esto también fue corroborado para Cloranfenicol (Figura 8), un antibiótico cuya actividad no es perjudicada por el efecto de inóculo (88). Los ensayos de inhibición con las condiciones establecidas para cada antibiótico serán discutidos detalladamente en las secciones posteriores.

#### *Efecto del solvente en los ensayos de Cefuroxima*

Durante los ensayos preliminares con Cefuroxima, se observó un efecto acumulativo en la fluorescencia, el cual se sospechó que podría estar relacionado con la presencia del solvente DMSO (Figuras 11 y 12). Investigaciones previas han reportado que la exposición al DMSO aumenta la fluorescencia de GFP (89,90). Además, se ha observado en estudios *in vivo* e *in vitro* que este solvente puede actuar como un agente aclarador, es decir, incrementando la emisión de fluorescencia y reduciendo la dispersión de luz (91).

Por otro lado, se ha documentado que el DMSO altera el transcriptoma de *E. coli* aun a concentraciones inocuas, regulando positiva o negativamente la expresión de diversos genes (92). Estas observaciones conducen a la hipótesis de que este solvente tendría un efecto físico en la visualización de GFP y además, que podría mejorar la eficiencia de transcripción de genes heterólogos. Sin embargo, para confirmar estas hipótesis, se requerirá realizar investigaciones adicionales.

Respecto al crecimiento bacteriano, se observó que las concentraciones de DMSO evaluadas en los ensayos no produjeron cambios (Figura 13). Aunque el DMSO tiene un efecto bacteriostático en *E. coli* a concentraciones superiores a 8% (93), se ha reportado que también posee un efecto protector (92,94). En efecto, un estudio reportó que el DMSO contrarrestaba la muerte causada por ROS (especies reactivas de oxígeno) cuando este fue añadido a células de *E. coli* junto con cuatro antibióticos, incluida la Ampicilina (94). Sin embargo, este efecto dependería de la dosis administrada. Otra investigación demostró que incluso a concentraciones mínimas del 1% y 2.5%, la producción de ROS en *E. coli* se redujo en casi un 78% y un 74%, respectivamente (92).

En los ensayos con CFX no se observó una reducción concreta en el crecimiento bacteriano, por lo que no puede descartarse que el solvente haya interferido en la actividad del antibiótico. No obstante, es importante recordar que con el propósito de eliminar la influencia del DMSO en la fluorescencia y el crecimiento, en este trabajo se igualaron las concentraciones finales del solvente para todas las concentraciones de CFX.

#### *Ensayo de localización de fluorescencia*

Para evaluar el mecanismo de acción de la Cefuroxima, se llevó a cabo un experimento de localización de GFP después del ensayo de inhibición. En presencia de diferentes concentraciones de DMSO, se observó una proporción ligeramente mayor de fluorescencia en el interior de la bacteria (Figura 14a). De igual manera, esta proporción se mantuvo cuando las concentraciones del solvente fueron igualadas y solo variaba la concentración del antibiótico (Figura 14b).

Naturalmente, la proteína GFP no es excretada al medio extracelular (60). A su vez, la tolerancia de *E. coli* hacia solventes orgánicos depende de su membrana externa, la cual

actúa como una barrera para sustancias apolares mediante modificaciones en la composición lipídica de la membrana y en la proporción de bombas de eflujo (95,96). Según el trabajo de Dyrda *et al.* (97), la exposición a partir de 4.8% de DMSO puede alterar mínimamente la fluidez de la membrana externa de *E. coli*. Esta información podría explicar por qué no se observaron diferencias entre ambas condiciones. Por otro lado, esto también indicaría que el solvente a diferentes concentraciones no habría afectado la permeabilidad de la bacteria (se mantiene la misma proporción de fluorescencia en ambas condiciones).

## 2. Efecto de diferentes concentraciones de Cefuroxima

Se evaluó a la Bacteria Reportera a varias concentraciones de Cefuroxima para analizar su efecto sobre el chasis y sobre la ARN-Mtb. Una vez establecidas las concentraciones y el tiempo, se desarrollaron ensayos de inhibición con diferentes concentraciones de Cefuroxima y a dos tiempos de inoculación del ATB: a) al mismo tiempo en que se agrega el IPTG (1 h 45 min) y b) 45 min después de añadir IPTG (2 h 30 min).

En la primera hipótesis se postuló que un antibiótico que afecta únicamente la viabilidad de la Bacteria Reportera tendría un efecto indirecto en la fluorescencia, el cual se debería a la reducción del crecimiento bacteriano. Efectivamente, se observó que a mayor concentración de CFX, hay una reducción en fluorescencia (Figuras 16 y 18). Sin embargo, no hubo una previa disminución en el crecimiento (Figuras 15 y 17). Por el contrario, se observó un rápido aumento en la tasa crecimiento después de añadir el antibiótico (Figuras 19 y 20). Además, sólo en el experimento de susceptibilidad antibiótica se confirmó muerte celular causada por Cefuroxima (Figura 21).

Bajo condiciones de estrés, como cambios de temperatura o la adición de antibióticos (98–100), la morfología bacteriana puede ser alterada. Uno de estos fenómenos se llama filamentación celular, un proceso por el cual la bacteria es incapaz de dividirse al ser impedida la formación de un septo en la pared celular (101). Sin embargo, esto no limita su proliferación celular o la síntesis de biomasa. En consecuencia, las bacterias filamentosas crecen sin capacidad de separarse, aumentando su probabilidad de morir por lisis celular (38).



Se ha reportado que la actividad de betalactámicos en *E. coli* genera filamentación, lo que resulta en un aumento en la densidad óptica. Según el estudio de Spratt (102), los betalactámicos que inhiben a las transpeptidasas de *E. coli* PBP3 y PBP1 evitan la división celular y la elongación celular, respectivamente. Por lo tanto, la unión de CFX a PBP3 produce filamentación, mientras que a mayores concentraciones, su unión a otras PBPs causa otras alteraciones morfológicas (formación de esferoplastos y lisis celular sucesiva) (27,29).

Asimismo, los resultados del estudio de Stevenson *et al.* (103) demostraron que la adición de concentraciones subletales de Ampicilina incrementaba la densidad óptica, debido al mayor tamaño de los filamentos y no por un aumento en el número de células. Esto puede provocar que los valores de OD se desvíen de los valores reales del crecimiento, por causa de la mayor dispersión de luz producida por el tamaño de las bacterias (104). Estas informaciones podrían explicar el aumento en el crecimiento y en las tasas de crecimiento con este antibiótico.

Teniendo en cuenta los fenómenos descritos, se recomienda tomar con precaución los datos de densidad óptica. Dado que no se pudo distinguir si la turbidez medida en el cultivo con CFX corresponde a células vivas o muertas, no fue posible determinar la actividad del antibiótico sobre el chasis. A su vez, probablemente las tasas de crecimiento hayan sido simplemente un reflejo directo de los datos de OD registrados y que fueron usados para generar las gráficas. En futuros ensayos de inhibición, la calibración del espectrofotómetro y/o la revisión del cultivo mediante microscopía ayudarían a confirmar si realmente ocurrió una reducción en la densidad bacteriana por causa del antibiótico.

Por otro lado, la fluorescencia normalizada experimentó una reducción progresiva a mayores concentraciones de Cefuroxima (Figuras 16 y 18). Aunque su mecanismo de acción no está directamente relacionado con la actividad de ARNP-Mtb, es probable que la Cefuroxima haya afectado indirectamente la fluorescencia al inhibir procesos metabólicos asociados al ensamblaje de la pared celular (33,34) y mediante la producción de ROS en el citoplasma (35,37). Adicionalmente, esta última actividad habría dañado a múltiples macromoléculas. Bajo estas condiciones de estrés metabólico, la producción de GFP podría haber pasado a un segundo plano para priorizar la supervivencia de la célula.

Adicionalmente, la inducción con IPTG generó un gasto metabólico importante en la bacteria (105), lo que podría haber incrementado el estrés causado por el antibiótico. Por ende, estas informaciones respaldarían la disminución de fluorescencia causada por CFX.

Finalmente, de acuerdo con los métodos descritos, la obtención del stock del antibiótico fue realizada de forma artesanal y sin confirmación de ningún estándar. Por lo tanto, se considera que el uso de este antibiótico fue exploratorio y sería necesario repetir los ensayos con un antibiótico estándar de Cefuroxima a futuro para confirmar lo reportado en este trabajo.

### **3. Efecto de diferentes concentraciones de Cloranfenicol**

Se utilizó Cloranfenicol para evaluar la inhibición de la traducción y su efecto tanto en la producción de la proteína heteróloga como de las proteínas nativas del chasis.

Como tercera hipótesis, se postuló que aquellos antibióticos que inhiben directamente la actividad de ARNP-Mtb generarían una reducción en la expresión de GFP de manera relativamente temprana y no necesariamente acoplada a una reducción del crecimiento. A diferencia de los antibióticos anteriores, la actividad de Cloranfenicol está dirigida a los ribosomas. Esto quiere decir que suprimirá la traducción de todos los transcritos producidos por la ARNP de *E. coli*, la ARNP del sistema T7 y la ARNP de *M. tuberculosis*. Durante los ensayos preliminares con CAM añadido a 2 h 30 min, se demostró una función muy rápida y letal por parte de este antibiótico (Figura 8). Esto se debería a la gran afinidad por los ribosomas y rápida difusión al interior de *E. coli* (106,107). Por tanto, para ver variaciones leves en la fluorescencia y crecimiento, fue necesario definir las concentraciones adecuadas de antibiótico (Figuras 9 y 10).

Como fue esperado, al agregar concentraciones sub-inhedoras de CAM 45 minutos después de la inducción, se visualizó una reducción rápida y de forma simultánea en el crecimiento y en la fluorescencia (Figuras 22, 26 y 23). Por otro lado, cuando se agregó CAM al mismo tiempo de la inducción (como fue hecho para Rifampicina y Rifaximina), la fluorescencia también disminuyó (Figura 25). Sin embargo, el crecimiento se mantuvo constante y la tasa de crecimiento no se redujo a mayores concentraciones (Figuras 24 y 27).

Estas diferencias en los resultados podrían atribuirse al estrés generado por el antibiótico. Se ha reportado que Cloranfenicol es muy eficaz durante el crecimiento exponencial (108), etapa en donde casi la mitad de la energía total es invertida en la traducción de proteínas (109). Dentro de un sistema recombinante como la Bacteria Reportera, parte del pool de ribosomas activos sería empleado para sintetizar las proteínas que conforman el circuito sintético: la ARNP-T7, ARNP-Mtb y GFP. Esta demanda adicional representaría una carga metabólica para el metabolismo y generaría una respuesta de estrés celular (69). Asimismo, esta situación sería exacerbada al añadir el antibiótico tiempo después de la inducción, ya que el número de ribosomas activos se reduciría aún más, limitando la producción de fluorescencia (110).

Por otra parte, cuando se adicionó simultáneamente el inductor y el antibiótico, se vio mayor estabilidad en el crecimiento y poca reducción en la tasa de crecimiento. Se ha reportado que las bacterias son capaces de adaptar rápidamente su metabolismo cuando son expuestas tempranamente a eventos de estrés, como es la adición de antibióticos (111). Ya que al momento de añadir el antibiótico no estaba activo el circuito de IPTG y el cultivo aún estaba relativamente fresco, las células bacterianas podrían haber modificado su metabolismo de forma que puedan maximizar su crecimiento bajo esa condición de estrés. Esto podría explicar por qué la bacteria no experimentó cambios mayores en su crecimiento, pero sí en la producción de proteínas.

#### **4. Comparación de actividad antibiótica en *E. coli*, ARNP-Mtb y ribosomas**

##### *Actividad de antibióticos en el tiempo*

Rifampicina, Rifaximina, Cloranfenicol y Cefuroxima tuvieron efectos distintos ya sea en el chasis o en la actividad de la enzima heteróloga de Mtb. En este trabajo se evaluó la actividad de CAM y CFX, midiendo su efecto en el chasis a través del crecimiento bacteriano y para pensar el efecto sobre la proteína heteróloga se midió fluorescencia. Posteriormente, los resultados fueron comparados con los reportados para RIF y RFX, bajos las mismas condiciones.

En las condiciones en las que se compararon los efectos de CAM y CFX (Tiempo de adición: 1 h 45 min), no se detectó una disminución en el crecimiento (Figuras 31a y 31b). Como se mencionó en secciones anteriores, ante la posibilidad de fenómenos como el

efecto de inóculo y filamentación, no es posible determinar el efecto real de CFX en la viabilidad de la bacteria. De forma semejante, cuando se añadió CAM se observó poca reducción en la tasa de crecimiento. Los resultados fueron confirmados por un ensayo de inhibición con ambos antibióticos a 5  $\mu$ M bajo las mismas condiciones (ver Anexos: Figuras A4-A5). Dado que aparentemente el crecimiento del chasis no fue afectado, se procedió a comparar los efectos de los antibióticos sobre la actividad de la enzima de *M. tuberculosis*.

A diferencia del crecimiento, se observaron diferencias en la producción de fluorescencia con todos los antibióticos evaluados. Al comparar los datos reportados de RIF y RFX con los resultados de CFX, fue notable primero la caída lenta y posteriormente abrupta en la producción de fluorescencia en los dos primeros (Figuras 29a y 30a). Este comportamiento no se esperaba, dado que ambos antibióticos actúan inhibiendo directamente el inicio de la transcripción. En el caso de CAM, su blanco de acción se encuentra en la última etapa de la expresión proteica, la traducción, por lo que se esperaba una reducción temprana en la producción de la fluorescencia (Figura 32a). En contraste, CFX interfiere en la construcción de la pared de peptidoglucano; por ende, no se esperaba una disminución directa en la producción de GFP. Aun así, se observó que en su presencia hubo una reducción rápida y progresiva (Figuras 29b, 30b y 32b), lo que podría deberse a un efecto indirecto en la maquinaria interna (concordando parcialmente con la segunda hipótesis postulada).

Probablemente para Cefuroxima, la caída rápida y progresiva en la producción de fluorescencia fue causada por un conjunto de cambios metabólicos en la bacteria, una característica de la forma en que actúan los antibióticos bactericidas (112). Uno de los efectos principales es el aumento de ROS (36,37), promovido por alteraciones en la respiración celular (113) y ciclos metabólicos fútiles (34,114). Aunque estos procesos no estén ligados directamente a la expresión de GFP, es posible que el estrés oxidativo perjudique la estabilidad de macromoléculas como el ADN y el correcto funcionamiento de varias proteínas, que incluso podrían estar asociadas a la producción de fluorescencia. A su vez, para contrarrestar el efecto de CFX, la célula activaría mecanismos de sobrevivencia, como la respuesta SOS y respuesta al estrés oxidativo (100,115). Esta

acción también podría haber desplazado cualquier otro circuito metabólico que no sea vital para la bacteria, como la actividad de la enzima heteróloga.

Por otro lado, según la tercera hipótesis, con CAM, RIF y RFX se esperaba una reducción temprana en la fluorescencia debido a sus mecanismos de acción. Sin embargo, dicha característica sólo fue observada con CAM. En el caso de RIF y RFX, los ensayos fueron realizados a concentraciones cercanas a la MIC50 y la MIC90 para *M. tuberculosis*, siendo esta bacteria más sensible que *E. coli* (40,43). Probablemente, esta observación de una demora en la reducción de la fluorescencia se deba a factores como la vida media de los transcritos de GFP y la disponibilidad de enzimas heterólogas no inhibidas. En el caso de CAM, es posible que la menor cantidad de ribosomas disponibles para la traducción de las proteínas recombinantes haya limitado la fluorescencia (110).

#### *Actividad de antibióticos de acuerdo con un modelo matemático*

El análisis de los datos de crecimiento y producción de fluorescencia es complejo, y para su interpretación es útil observarlo a través de un modelo que explica con parámetros cinéticos la producción de biomasa y la producción de proteínas heterólogas. Un modelo de asignación de biosíntesis (71–74) describe cómo la bacteria regula su capacidad de producción de proteínas, dividida en fracciones de proteoma, donde cada una de estas tiene una función de regulación en conjunto (p.ej. cAMP, ppGpp) y cumple un rol en la célula (p.ej. fijación de carbono, o síntesis de proteínas). Dado que el modelo indica cuánto de la biosíntesis total corresponde a la fracción heteróloga, se consideró que su aplicación ayudaría a descifrar el comportamiento de los antibióticos analizados sobre dicha fracción.

Se comparó la actividad inhibitoria de 4 antibióticos sobre la fracción heteróloga: Cefuroxima, Cloranfenicol, Rifampicina y Rifaximina. Los datos experimentales fueron usados para generar la función de regulación a través del modelo (72). La hipótesis principal del presente trabajo postulaba que el sistema recombinante sería útil para discernir la actividad de antibióticos que afectan al chasis de los que afectan únicamente a la ARNP-Mtb. Sin embargo, en todos los casos, se observó un comportamiento inhibitorio sobre la fracción de la biosíntesis total correspondiente a la producción de GFP (Figura 33).

### *Cefuroxima*

Con Cefuroxima, en el modelo matemático se vio una disminución progresiva sobre la fracción heteróloga. Esto es semejante a lo observado en las gráficas de fluorescencia cuando Cefuroxima es añadida a 1 h 45 min (Figura 19). No obstante, en el modelo se esperaba observar que este antibiótico no modificara la fracción heteróloga, ya que su actividad está asociada a la fracción estructural ( $\Phi_Q$ ). Dicho resultado podría deberse a que el modelo utiliza como base los datos de densidad óptica y fluorescencia, por lo que este comportamiento en la gráfica no necesariamente se debería un efecto inhibitorio sobre la fracción heteróloga, sino más bien, a una consecuencia de la reducción en la fluorescencia.

Asimismo, teniendo en cuenta el efecto multifuncional de los betalactámicos antes descrito (34,37,113), es posible que este haya impactado a otras moléculas del metabolismo celular de *E. coli*. El aumento de estrés en la bacteria causaría una reducción de forma indirecta en la actividad de ARNP-Mtb y, por ende, menos GFP sería producida.

### *Rifaximina y Rifampicina*

Los antibióticos con mayor efecto represor en la síntesis de la proteína heteróloga fueron Rifaximina y Rifampicina. Este efecto fue diferente al observado en las gráficas de fluorescencia normalizada citadas del trabajo de K. Espinoza (76), en donde se visualizó una reducción más lenta en la fluorescencia. Esta información apoyaría que, aun no estando a una concentración letal para *M. tuberculosis* y no letal para *E. coli*, ambos antibióticos inhiben directamente la actividad de ARNP-Mtb y con ello, reducen fuertemente la fracción heteróloga.

### *Cloranfenicol*

Finalmente, Cloranfenicol presentó una actividad inhibitoria más fuerte a medida que la concentración aumentaba. Al ser un represor ribosomal, afecta la expresión de la proteína heteróloga y del resto del proteoma, aumentando el ratio de ARN/proteínas o la fracción proteómica productora ( $\Phi_R$ ) (74,113). A su vez, esta modulación reprimiría a la fracción de consumo ( $\Phi_C$ ) (74), debido a la acumulación de precursores en el interior celular. Por ende, no se esperaba que hubiera una reducción en la fracción heteróloga.

Es probable que esta disminución se deba a que la cantidad limitada de ribosomas activos fue redistribuida principalmente entre los procesos metabólicos asociados a la supervivencia bacteriana y al estrés (110). En consecuencia, dicho comportamiento habría reducido la producción de fluorescencia, aunque la fracción heteróloga no haya sido afectada directamente.

### *Perspectivas*

Analizando los resultados de las comparaciones directas de curvas y del modelo matemático, podemos decir que no hay una respuesta exacta que confirme que en este sistema recombinante se pueda discernir los efectos de los antibióticos seleccionados que afectan a la actividad de esta enzima de aquellos que impactan la supervivencia de la célula hospedera. Por un lado, el modelo matemático señala que todos presentan un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis que corresponde a la fracción heteróloga. Sin embargo, las comparaciones directas en las gráficas de fluorescencia muestran comportamientos específicos para aquellos antibióticos que afectan a la ARNP-Mtb y los que afectan a *E. coli*. Por ejemplo, aquellos que afectan a la ARNP-Mtb producen una caída lenta y abrupta, mientras que aquellos que afectan al chasis producen un efecto rápido y de manera progresiva en el tiempo.

Siendo solo 4 los antibióticos comparados, sería necesario evaluar otros fármacos de las mismas familias para determinar si estas características se agrupan de manera consistente con sus mecanismos de acción. Por lo tanto, se requiere analizar más antibióticos para continuar evaluando sus efectos sobre el chasis y en la enzima heteróloga. Algunas de las posibles de opciones de antibióticos a ser probados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Antibióticos que podrían ser empleados para continuar evaluando al sistema recombinante.

<b>Clase</b>	<b>Blanco de acción</b>
Aminoglucósidos	Unión a LPS, ribosomas y a mRNA
Quinolonas	Replicación de ADN
Trimetropin-sulfametoxazol	Metabolismo de precursores de ácidos nucleicos
Carbapenems / Penicilinas	Síntesis de pared celular

### *Limitaciones y recomendaciones*

Ciertamente, con la metodología empleada en este proyecto, no se logró determinar con exactitud qué ocurría en el interior de la Bacteria Reportera. Por consiguiente, se investigó sobre las posibles causas de los efectos vistos en el crecimiento bacteriano y/o en la fluorescencia durante los ensayos de inhibición.

En relación con los ensayos de inhibición con Cefuroxima, no se observó una disminución en el crecimiento bacteriano bajo las condiciones establecidas. Únicamente en el ensayo de susceptibilidad antibiótica pudo comprobarse que el tiempo de inoculación y la concentración de inóculo eran factores determinantes para ver un efecto bactericida sobre el crecimiento. Además, en los ensayos de punto final, no se midió la concentración inicial del cultivo antes de añadir el antibiótico. Esta información habría sido útil para comparar el efecto de Cefuroxima a diferentes concentraciones del inóculo. Por lo tanto, se sugiere considerar la farmacodinámica del antibiótico en futuros ensayos, evaluando si el efecto del antibiótico varía en función del tiempo o de la concentración.

En caso se desee explorar el uso del sistema recombinante para analizar otros antibióticos betalactámicos, se recomienda modificar la concentración inicial del cultivo o suministrar más dosis del antibiótico en menos tiempo para evitar efectos de inóculo.

Adicionalmente, el sistema recombinante actual no posibilita la observación directa del efecto de los antibióticos sobre la transcripción. Esto se debe a que en los ensayos de inhibición se mide únicamente la fluorescencia de la GFP, que corresponde al producto final de la transcripción (mediada por la ARNP-Mtb) y de la traducción. Sin embargo, los transcritos de la GFP pueden ser traducidos múltiples veces, lo que impide que la fluorescencia medida sea un reflejo directo de la actividad de la ARN polimerasa de *M. tuberculosis*. Por ello, se propone a futuro modificar el sistema para medir directamente la síntesis de los ARN mensajeros producidos por la enzima heteróloga.

Este trabajo también evidenció que es necesario implementar algunas mejoras en el modelo matemático presentado. Actualmente, el modelo está diseñado para un circuito sintético simple. Sin embargo, la Bacteria Reportera produce una proteína heteróloga y una proteína reportera (ARNP-Mtb y GFP, respectivamente), en la que una es sintetizada



en función de la otra. Como fue observado en este trabajo, sólo se está representando la fracción heteróloga mediante la expresión final de GFP. Por tal motivo, es probable que la gráfica obtenida del modelo no sea muy precisa describiendo la actividad de los antibióticos evaluados en el sistema recombinante. Aun así, esta retroalimentación contribuirá a la mejora de esta herramienta para explicar, a través de un abordaje matemático, el comportamiento de sistemas recombinantes más complejos.

## VIII. Conclusiones

Se utilizó la Bacteria Reportera desarrollada en el Laboratorio de Moléculas Individuales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con el objetivo de evaluar el efecto de diversos antibióticos y discernir entre aquellos que inhiben la producción de la proteína heteróloga de los que afectan a la bacteria hospedera.

En base a nuestros resultados, se puede concluir lo siguiente:

- Los antibióticos que afectan a la proteína heteróloga y los que afectan al chasis (Cefuroxima, Rifampicina, Rifaximina y Cloranfenicol) causaron una caída de la producción de fluorescencia, sin necesariamente generar siempre una reducción en el crecimiento.
- A pesar de que se observó el mismo comportamiento inhibitorio entre los antibióticos comparados, estos presentaron diferencias en la rapidez con que disminuía la producción de fluorescencia.
- Como fue observado en las curvas y tasas de crecimiento, la Bacteria Reportera es sensible a pequeñas variaciones en la concentración de antibiótico, siendo posible observar cambios en el crecimiento y en la producción de fluorescencia.
- El protocolo establecido para los ensayos de inhibición es adaptable para el desarrollo, por ejemplo, de ensayos de susceptibilidad antibiótica dirigidos a la actividad de la ARNP-Mtb.
- Con las variables establecidas, el sistema puede ser útil para evaluar compuestos con actividad antibiótica sobre la ARNP-Mtb, sin tener que emplear organismos que representen mayor riesgo a la salud, altos costos por equipamiento y experiencia del personal.
- Aun así, se requiere evaluar más antibióticos con actividad sobre el chasis, con el propósito de continuar estudiando su actividad sobre el sistema heterólogo.

## IX. Referencias Bibliográficas

1. Global tuberculosis report 2023 [Internet]. 2023. Disponible en: <https://iris.who.int/>.
2. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*. 2001;104:901–12.
3. World Health Organization. Global Tuberculosis report 2022 [Internet]. Geneva; 2022. Disponible en: <http://apps.who.int/bookorders>.
4. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: Mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 1 de mayo de 2017;41(3):354–73.
5. Paleckyte A, Dissanayake O, Mpagama S, Lipman MC, McHugh TD. Reducing the risk of tuberculosis transmission for HCWs in high incidence settings. *Antimicrob Resist Infect Control*. 1 de diciembre de 2021;10(1).
6. Sedamano J, Schwalb A, Cachay R, Zamudio C, Ugarte-Gil C, Soto-Cabezas G, et al. Prevalence of positive TST among healthcare workers in high-burden TB setting in Peru. *BMC Public Health*. 3 de mayo de 2020;20(1).
7. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the EU: Updated 2022 [Internet]. Stockholm; 2023 sep. Disponible en: [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)
8. Xu Y, Wang G, Xu M. Biohazard levels and biosafety protection for Mycobacterium tuberculosis strains with different virulence. *Biosaf Health*. 1 de septiembre de 2020;2(3):135–41.
9. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, et al. The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. *PNAS*. 2003;100(13):7877–82.
10. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, et al. Physiology of Mycobacteria. *Adv Microb Physiol*. 2009;55:81–319.
11. Zhu M, Dai X. On the intrinsic constraint of bacterial growth rate: M. tuberculosis's view of the protein translation capacity. *Crit Rev Microbiol*. 4 de julio de 2018;44(4):455–64.
12. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int J Genomics*. 2016;2016.
13. Malaghini M, Thomaz-Soccol V, Probst CM, Krieger MA, Preti H, Kritski A, et al. Recombinant antigen production for assays of intradermoreaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis. *J Biotechnol*. 20 de octubre de 2011;156(1):56–8.
14. Yoshida M, Nakata N, Miyamoto Y, Fukano H, Ato M, Hoshino Y. A rapid and non-pathogenic assay for association of Mycobacterium tuberculosis gyrBA mutations and fluoroquinolone resistance using recombinant Mycobacterium smegmatis. *FEMS Microbiol Lett*. 2018;365:266.
15. Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy BC. Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. En: *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. Springer Singapore; 2017. p. 77–101.
16. Abramovitch RB. Mycobacterium tuberculosis Reporter Strains as Tools for Drug Discovery and Development. *IUBMB Life*. 1 de septiembre de 2018;70(9):818–25.
17. Ollinger J, Kumar A, Roberts DM, Bailey MA, Casey A, Parish T. A high-throughput whole cell screen to identify inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One*. 1 de enero de 2019;14(1).

18. Chopra I. Bacterial RNA polymerase: a promising target for the discovery of new antimicrobial agents. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 1 de agosto de 2007;8(8):600–7.
19. Zenkin N, Kulbachinskiy A, Bass I, Nikiforov V. Different rifampin sensitivities of *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerases are not explained by the difference in the  $\beta$ -subunit rifampin regions I and II. *Antimicrob Agents Chemother*. abril de 2005;49(4):1587–90.
20. Muliaditan M, Davies GR, Simonsson USH, Gillespie SH, Della Pasqua O. The implications of model-informed drug discovery and development for tuberculosis. *Drug Discov Today*. 1 de marzo de 2017;22(3):481–6.
21. Banerjee R, Rudra P, Saha A, Mukhopadhyay J. Recombinant reporter assay using transcriptional machinery of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 2015;197(3):646–53.
22. Sharma S, Kumar R, Jain A, Kumar M, Gauttam R, Banerjee R, et al. Functional insights into *Mycobacterium tuberculosis* DevR-dependent transcriptional machinery utilizing *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 27 de agosto de 2021;478(16):3079–98.
23. Silva F, Queiroz JA, Domingues FC. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. Vol. 30, *Biotechnology Advances*. 2012. p. 691–708.
24. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. Vol. 8, *Nature Reviews Microbiology*. 2010. p. 423–35.
25. Baquero F, Levin BR. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. Vol. 19, *Nature Reviews Microbiology*. *Nature Research*; 2021. p. 123–32.
26. Lima LM, Silva BNM da, Barbosa G, Barreiro EJ.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*. 15 de diciembre de 2020;208:1–25.
27. Amicosante G, Marchetti F. Stabilità di cefuroxime alle  $\beta$ -lattamasi: implicazioni per il suo impiego terapeutico Cefuroxime stability to  $\beta$ -lactamases: clinical implications. *Infez Med*. 2000;(2):66–73.
28. Castle SS. Cefuroxime. Huntington; 2007.
29. Fontana R, Cornaglia G, Ligozzi M, Mazzariol A. The final goal: Penicillin-binding proteins and the target of cephalosporins. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 de diciembre de 2000;6(S3):34–40.
30. Tomasz A. From Penicillin-Binding Proteins to the Lysis and Death of Bacteria: A 1979 View. *Rev Infect Dis*. 1979;1(3):434–67.
31. Curtis NAC, Orr D, Ross GW, Boulton MG. Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;16(5):533.
32. Scott LJ, Ormrod D, Goa KL, Alexander K, Amsden GW. Cefuroxime Axetil An Updated Review of its Use in the Management of Bacterial Infections. *Drugs*. 2001;61(10):1455–500.
33. Uehara T, Dinh T, Bernhardt TG. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. agosto de 2009;191(16):5094–107.
34. Cho H, Uehara T, Bernhardt TG. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*. 4 de diciembre de 2014;159(6):1300–11.

35. Hong Y, Zeng J, Wang X, Drlica K, Zhao X. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *PNAS*. 14 de mayo de 2019;116(20):10064–71.
36. Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, Cody MacDonald I, Martell JD, Takahashi N, et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *PNAS*. 20 de mayo de 2014;111(20):100–9.
37. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*. 7 de septiembre de 2007;130(5):797–810.
38. Wong F, Wilson S, Helbig R, Hegde S, Aftenieva O, Zheng H, et al. Understanding Beta-Lactam-Induced Lysis at the Single-Cell Level. *Front Microbiol*. 27 de julio de 2021;12:712007.
39. Sutherland C, Murakami KS. An Introduction to the Structure and Function of the Catalytic Core Enzyme of Escherichia coli RNA Polymerase. *EcoSal Plus*. 8 de febrero de 2018;8(1).
40. Rothstein DM. Rifamycins, alone and in combination. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 de julio de 2016;6(7).
41. Getahun M, Blumberg HM, Ameni G, Beyene D, Kempker RR. Minimum inhibitory concentrations of rifampin and isoniazid among multidrug and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia. *PLoS One*. 1 de septiembre de 2022;17(9 September).
42. Novoa-Farias O, Frati-Munari AC, Peredo MA, Flores-Juárez S, Novoa-García O, Galicia-Tapia J, et al. Susceptibilidad a la rifaximina y otros antimicrobianos de bacterias aisladas en pacientes con infecciones gastrointestinales agudas en el sureste de México. *Rev Gastroenterol Mex*. 1 de julio de 2017;82(3):226–33.
43. Adachi J, DuPont H. Rifaximin: A Novel Nonabsorbed Rifamycin for Gastrointestinal Disorders. *Reviews of Anti-Infective Agents* [Internet]. 2006;541–7. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article/42/4/541/384424>
44. Wehrli W. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Reviews of Infection Diseases*. 1983;5(3):408–11.
45. Morales Y, Herrera M, Muñoz J. Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2007;38(1):58–69.
46. Long KS, Porse BT. A conserved chloramphenicol binding site at the entrance to the ribosomal peptide exit tunnel. *Nucleic Acids Res*. 15 de diciembre de 2003;31(24):7208–15.
47. Kostopoulou ON, Kourelis TG, Mamos P, Magoulas GE, Kalpaxis DL. Insights into the Chloramphenicol Inhibition Effect on Peptidyl Transferase Activity, Using Two New Analogs of the Drug. *Open Enzym Inhib J*. 2011;4:1–10.
48. Reyes M, Durán C, Prado V. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E coli* productoras de Shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. *Rev Méd Chile*. 2004;132:1211–6.
49. Hughes D, Karlén A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):162–9.
50. da Cunha BR, Zoio P, Fonseca LP, Calado CRC. Technologies for high-throughput identification of antibiotic mechanism of action. *Antibiotics*. 1 de mayo de 2021;10(5).
51. Szymański P, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *Int J Mol Sci*. 2012;13(1):427–52.

52. Martis EA, Radhakrishnan R, Badve R. High-Throughput Screening: The Hits and Leads of Drug Discovery-An Overview. *J Appl Pharm Sci.* 2011;1:02–10.
53. Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol.* septiembre de 2007;152(1):53–61.
54. Younes RN, Drauzio Varella A, Suffredini IB. Discovery of New Antitumoral and Antibacterial drugs from brazilian plant Extracts using High Throughput Screening. *Clinics.* 2007;62(6):763–71.
55. Tegazzini D, Díaz R, Aguilar F, Peña I, Presa JL, Yardley V, et al. A Replicative In Vitro Assay for Drug Discovery against *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de junio de 2016;60(6):3524–32.
56. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* septiembre de 2006;72(2):211–22.
57. Studier FW, Moffattf BA. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J MoZ Biol.* 1986;189:113–30.
58. Studier FW. T7 Expression Systems for Inducible Production of Proteins from Cloned Genes in *E. coli*. *Curr Protoc Mol Biol.* 1 de octubre de 2018;124(1).
59. Inouye S, Tsuji FI. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 1994;341:277–80.
60. Zou J, Ye Y, Welshhans K, Lurtz M, Ellis AL, Louis C, et al. Expression and optical properties of green fluorescent protein expressed in different cellular environments. *J Biotechnol.* 10 de octubre de 2005;119(4):368–78.
61. Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev.* marzo de 2002;102(3):759–81.
62. Tsien RY. The Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:509–53.
63. Heim R, Prasher DC, Tsien RY, Kandel ER. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:12501–4.
64. Yang TT, Cheng L, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(22):4592–3.
65. Day RN, Davidson MW. The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev.* 21 de septiembre de 2009;38(10):2887–921.
66. Yoon SK, Choi SL, Song JY, Lee GM. Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0°C. *Biotechnol Bioeng.* 5 de febrero de 2005;89(3):345–56.
67. Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, et al. Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation - A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 20 de agosto de 2006;94(6):1045–52.
68. Kaisermayer C, Reinhart D, Gili A, Chang M, Aberg PM, Castan A, et al. Biphasic cultivation strategy to avoid Epo-Fc aggregation and optimize protein expression. *J Biotechnol.* 10 de junio de 2016;227:3–9.
69. Glick BR. Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. *Biotechnol Adv.* 1995;13(2):247–61.
70. Chou CP. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* septiembre de 2007;76(3):521–32.

71. Towbin BD, Korem Y, Bren A, Doron S, Sorek R, Alon U. Optimality and sub-optimality in a bacterial growth law. *Nat Commun.* 19 de enero de 2017;8:14123.
72. Arias Vaccari N, Guerra Giraldez D. A time-resolved proteome allocation model for evaluating heterologous systems. Lima, Peru; 2022.
73. Arias Vaccari N, Guerra Giraldez D. Influences of Induction Time and Additional LacI on the Growth Rate and Yield of the T7 Expression System in Three Escherichia Coli Strains. Research Square. 2022.
74. Scott M, Gunderson C, Mateescu E, Zhang Z, Hwa T. Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origin and Consequences. *Science* (1979). 19 de noviembre de 2010;330:1099–102.
75. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran T Bin, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. Vol. 14, *Journal of Infection and Public Health.* Elsevier Ltd; 2021. p. 1750–66.
76. Espinoza K. Desarrollo y validación de una bacteria recombinante para la evaluación específica de la transcripción de M. tuberculosis. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2023.
77. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition [Internet]. 9ª ed. Vol. 32. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. 18–19 p. Disponible en: [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
78. TECAN. Tecan Knowledge Portal. [citado 17 de mayo de 2023]. What does an overflow or an “OVER” result mean? Disponible en: <https://www.tecan.com/knowledge-portal/what-does-overflow-or-over-mean>
79. Pankey GA, Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *CID.* 2004;38:864–70.
80. Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infect Dis Clin North Am.* diciembre de 2009;23(4):791–815.
81. Eng RHK, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal Effects of Antibiotics on Slowly Growing and Nongrowing Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(9):1824–8.
82. Tartaglione TA, Polk RE. Review of the New Second-Generation Cephalosporins: Cefonicid, Ceforanide, and Cefuroxime. *Drug Intell Clin Pharm.* 1985;19:188–98.
83. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 de octubre de 2019;74(10):2825–43.
84. Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2009;63(4):745–57.
85. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* (1979). 10 de septiembre de 2004;305(5690):1622–5.
86. Manuse S, Shan Y, Canas-Duarte SJ, Bakshi S, Sun WS, Mori H, et al. Bacterial persisters are a stochastically formed subpopulation of low-energy cells. *PLoS Biol.* 1 de abril de 2021;19(4).
87. Stevens DL, Van S, Bryant AE, Stevens DL, Van S, Bryant AE, et al. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy in vitro and in vivo: an explanation for the inoculum effect. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1401–5.

88. Feldman WE, Manning NS, Feldman [ W E, Sprow NS, Moffitt S. Effect of Growth Phase on the Bactericidal Action of Chloramphenicol Against Haemophilus influenzae Type b and Escherichia coli K-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23(4):551–4.
89. Lin J, Zhu LQ, Qin T, Yu QH, Yang Q. Enhancement of gene transfer efficiency in the Bcap-37 cell line by dimethyl sulphoxide and menthol. *Mol Med Rep.* diciembre de 2012;6(6):1293–300.
90. Lynch J, Chung JW, Huang Z, Pierce V, Saunders NS, Niu L. Enhancing transient protein expression in HEK-293 cells by briefly exposing the culture to DMSO. *J Neurosci Methods.* 15 de febrero de 2021;350.
91. Karma S, Homan J, Stoianovici C, Choi B. Enhanced fluorescence imaging with DMSO-mediated optical clearing. *J Innov Opt Health Sci.* julio de 2010;3(3):153–8.
92. Tunçer S, Gurbanov R. Non-growth inhibitory doses of dimethyl sulfoxide alter gene expression and epigenetic pattern of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 de enero de 2023;107(1):299–312.
93. Ansel HC, Norred WP, Rothi IL. Antimicrobial Activity of Dimethyl Sulfoxide Against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Bacillus megaterium. *J Pharma Sci.* 1969;58(7):836–9.
94. Mi H, Wang D, Xue Y, Zhang Z, Niu J, Hong Y, et al. Dimethyl sulfoxide protects Escherichia coli from rapid antimicrobial-mediated killing. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de agosto de 2016;60(8):5054–8.
95. Nikaido H, Rosenberg E, Foulds J. Porin Channels in Escherichia coli: Studies with 13-Lactams in Intact Cells. *Journal of Bacteriology.* 1983;153(1):232–40.
96. Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-González MI, Rojas A, et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:743–68.
97. Dyrda G, Boniewska-Bernacka E, Man D, Barchiewicz K, Słota R. The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. *Mol Biol Rep.* 2019;46:3225–32.
98. Van De Putte P, Van J, Nd DA, Rorsch A. The selection of mutants of Escherichia coli with impaired cell division at elevated temperature. *Mutat Res.* 1964;106:121–8.
99. Greenwood D, Pearson N, Eley A, O’Grady F. Comparative in vitro activities of cefotaxime and ceftizoxime (FK749): new cephalosporins with exceptional potency. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;17(3):397.
100. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by  $\beta$ -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science (1979).* 10 de septiembre de 2004;305(5690):1629–31.
101. Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultgren SJ. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol.* febrero de 2008;6(2):162–8.
102. Spratt BG. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of Escherichia coli K12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(8):2999–3003.
103. Stevenson K, McVey AF, Clark IBN, Swain PS, Pilizota T. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci Rep.* 13 de diciembre de 2016;6:38828.
104. Koch AL, Ehrenfeld E. The size and shape of bacteria by light scattering measurements. *BBA.* 3 de septiembre de 1968;165(2):262–73.
105. Dvorak P, Chrast L, Nikel PI, Fedr R, Soucek K, Sedlackova M, et al. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in Escherichia coli BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microb Cell Fact.* 21 de diciembre de 2015;14(1).



106. Harvey RJ, Koch AL. How partially inhibitory concentrations of chloramphenicol affect the growth of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;18(2):323–37.
107. Vazquez D. Uptake and binding of Chloramphenicol by sensitive and resistant organisms. *Nature*. 1964;203(4942):257–8.
108. Gupta RS. Killing and Lysis of *Escherichia coli* in the Presence of Chloramphenicol: Relation to Cellular Magnesium. *Antimicrob Agents Chemother*. 1975;7(6):748–53.
109. Russell JB, Cook GM. Energetics of Bacterial Growth: Balance of Anabolic and Catabolic Reactions. *Microbiol Rev*. 1995;59(1):48–62.
110. Levin BR, McCall IC, Perrot V, Weiss H, Ovesepian A, Baquero F. A numbers game: Ribosome densities, bacterial growth, and antibiotic-mediated stasis and death. *mBio*. 1 de enero de 2017;8(1).
111. Zampieri M, Zimmermann M, Claassen M, Sauer U. Nontargeted Metabolomics Reveals the Multilevel Response to Antibiotic Perturbations. *Cell Rep*. 9 de mayo de 2017;19(6):1214–28.
112. Belenky P, Ye JD, Porter CBM, Cohen NR, Lobritz MA, Ferrante T, et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell Rep*. 11 de noviembre de 2015;13(5):968.
113. Lobritz MA, Belenky P, Porter CBM, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, et al. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 de julio de 2015;112(27):8173–80.
114. Adolfsen KJ, Brynildsen MP. Futile cycling increases sensitivity toward oxidative stress in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 1 de mayo de 2015;29:26–35.
115. Chiang SM, Schellhorn HE. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys*. 15 de septiembre de 2012;525(2):161–9.

## X. Anexos

Tabla A1. Preparación de medio mínimo suplementado

Reactivos	Concentración de Stock	Concentración final
Medio M9	5X	1X
MgSO <sub>4</sub>	1M	1mM
CaCl <sub>2</sub>	1M	0.1mM
Glucosa	20%	0.24%
Cas aminoácidos	10%	0.2%
Agua MiliQ (para enrazar a volumen deseado)	--	--

### **Protocolo N°1: de ensayo de punto final**

Se preparó un preinóculo de 3 mL a partir de una colonia picada de la BR, y se dejó incubando por aproximadamente una hora, a 220 RPM y a 30°C. Transcurrido este tiempo, se adicionó un mililitro de preinóculo a dos tubos de 1.5 mL. En seguida, a uno de estos tubos se le añadió la concentración seleccionada de antibiótico, mientras que el otro se mantuvo como la condición control (sin antibiótico). Ambos tubos fueron incubados durante toda la noche bajo las mismas condiciones y al siguiente día se midió su densidad óptica final.

### **Protocolo N°2: de ensayo de inhibición**

Se siguió el protocolo de transcripción *in vivo* detallado en la tesis doctoral de K. Espinoza (76). Primero, se prepararon placas Petri con aproximadamente 20 mL de medio LB junto con el antibiótico correspondiente para cada bacteria. Las concentraciones de Ampicilina y Cloranfenicol fueron 0.1 mg/L y 0.034 mg/mL, respectivamente. Una vez que el medio se solidificó, las bacterias fueron sembradas a partir de un cultivo criopreservado y posteriormente fueron incubadas a 30°C durante toda la noche para su crecimiento. Al día siguiente, se preparó un preinóculo para cada bacteria; para ello, se tomó una colonia de la placa Petri y se inoculó en un tubo con medio mínimo suplementado (ver componentes en Anexos: Tabla A1) junto con el antibiótico correspondiente y se incubó durante toda la noche a 30°C y a 200 RPM.

Al siguiente día, se extrajo un volumen de 450 µL de cada preinóculo y se diluyó a la mitad con medio fresco sin antibiótico en tubos de 1.5 mL. Este paso se hizo para medir la absorbancia del cultivo a 600 nm. Posteriormente, las diluciones fueron centrifugadas

durante 10 minutos a 4500 RPM. Durante este intervalo, se realizaron los cálculos de los volúmenes de cada dilución y del medio requeridos para que el cultivo de cada bacteria tenga una densidad óptica de 0.01 al inicio del experimento en placa multipozo. Cabe resaltar que la concentración inicial del inóculo fue previamente establecida en el trabajo de K. Espinoza (76). Tras la centrifugación, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo y el pellet bacteriano fue resuspendido en medio fresco con su antibiótico correspondiente. Con los cálculos hechos, en tubos estériles se preparó las nuevas diluciones con una OD igual a 0.01.

Posteriormente, los volúmenes de cultivo resultantes fueron sembrados en una placa multipozo estéril (esquema completo de la placa del experimento en Anexos: Figura A1), colocando 200  $\mu$ L de cultivo por pozo. Las condiciones, tanto con IPTG como sin IPTG, se evaluaron por triplicado (3 pozos). Una vez preparada la placa, esta fue incubada en un lector de placas con agitación, previamente configurado para efectuar mediciones de densidad óptica y fluorescencia de la GFP (GFP, excitación 485nm / emisión 510 nm) cada 15 minutos durante 13 horas, a una temperatura constante de 30°C. Para los ensayos fue utilizado el lector de placas multipozo TECAN Infinite M Plex.

Para la inducción, se pausaba el lector momentos antes de cumplirse las dos horas desde el inicio del experimento (aproximadamente a una OD equivalente a 0.02), tiempo establecido por K. Espinoza (76) y se adicionaba 0.25 mM de IPTG a la zona de la placa asignada para esta condición.

Para la evaluación de inhibidores, primero se probaron concentraciones cercanas o iguales a la MIC reportada sobre el crecimiento y se estableció que el tiempo más adecuado para inocular el antibiótico sería a las 2 h 30 min. Al terminar el ensayo en el lector de placas, se extrajeron los datos y se realizaron los análisis de curvas, tasas de crecimiento y producción de fluorescencia.

**Placa: Ensayo de inhibición**

Bacterias empleadas		BR	BC	BR	BR	BR	BR	BR	BR	BR	BR	
CON INHIBIDOR X		[0]	[0]	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	
Sin IPTG	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
Con IPTG	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Figura A1. Esquema convencional de la placa multipozo para los ensayos de inhibición.** Se muestra una placa de 96 pozos, en la cual se evalúan 8 concentraciones de un inhibidor (el número de concentraciones puede variar por ATB), en presencia y ausencia de IPTG, cada condición se mide por triplicado. BR: Bacteria Reportera. BC: Bacteria control. M: Medio M9 suplementado (Blanco). Adaptado del trabajo de K. Espinoza (76).

**Placa: Ensayo de inhibición para Cefuroxima (sin efecto de DMSO)**

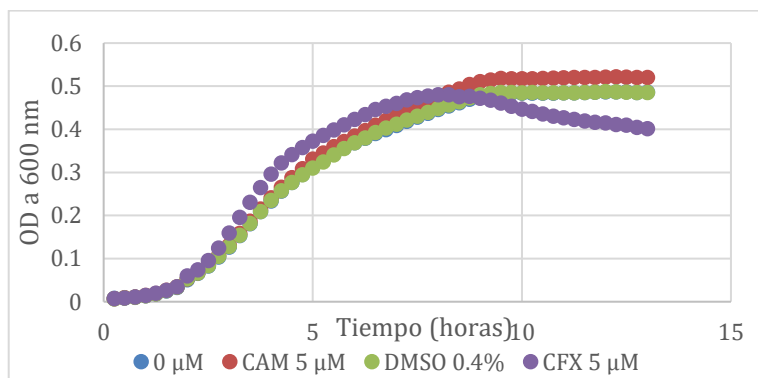
Bacterias empleadas		BR	BC	BR	BC	BR	BC	BR	BC	BR	BC	
CON INHIBIDOR X		[0]		[0]		[1]		[2]		[3]		
CON % DMSO		0%		2.5%		2.5%		2.5%		2.5%		
Sin IPTG	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
Con IPTG	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Figura A2. Esquema de la placa multipozo para los ensayos de inhibición con Cefuroxima (Efecto del solvente).** Se muestra una placa de 96 pozos, en el cual se evalúan 3 concentraciones de Cefuroxima, en presencia y ausencia de IPTG, cada condición se mide por triplicado. A diferencia del anterior esquema, este muestra una condición control para DMSO, así como una misma concentración del solvente para todas las concentraciones de Cefuroxima. BR: Bacteria Reportera. BC: Bacteria Control. M: Medio M9 suplementado (Blanco).

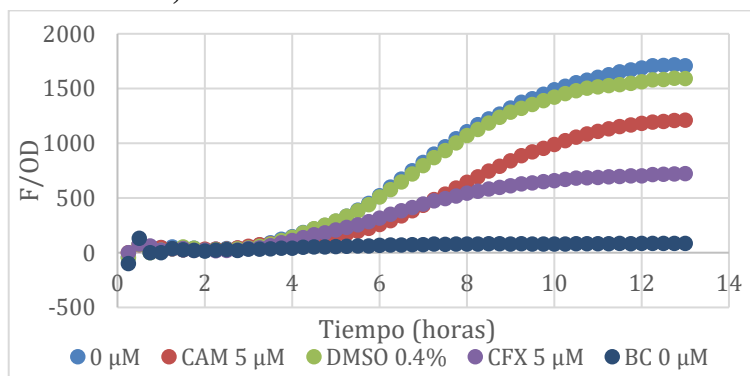
Placa: Ensayo de inhibición para Cefuroxima (sin efecto de DMSO)

Bacterias empleadas		BR	BC	BR	BR	BR	BR	BR	BR	BR	BR	
CON INHIBIDOR X		[0]		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	
% DMSO FINAL		2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	
Sin IPTG	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O
Con IPTG	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O											M
	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

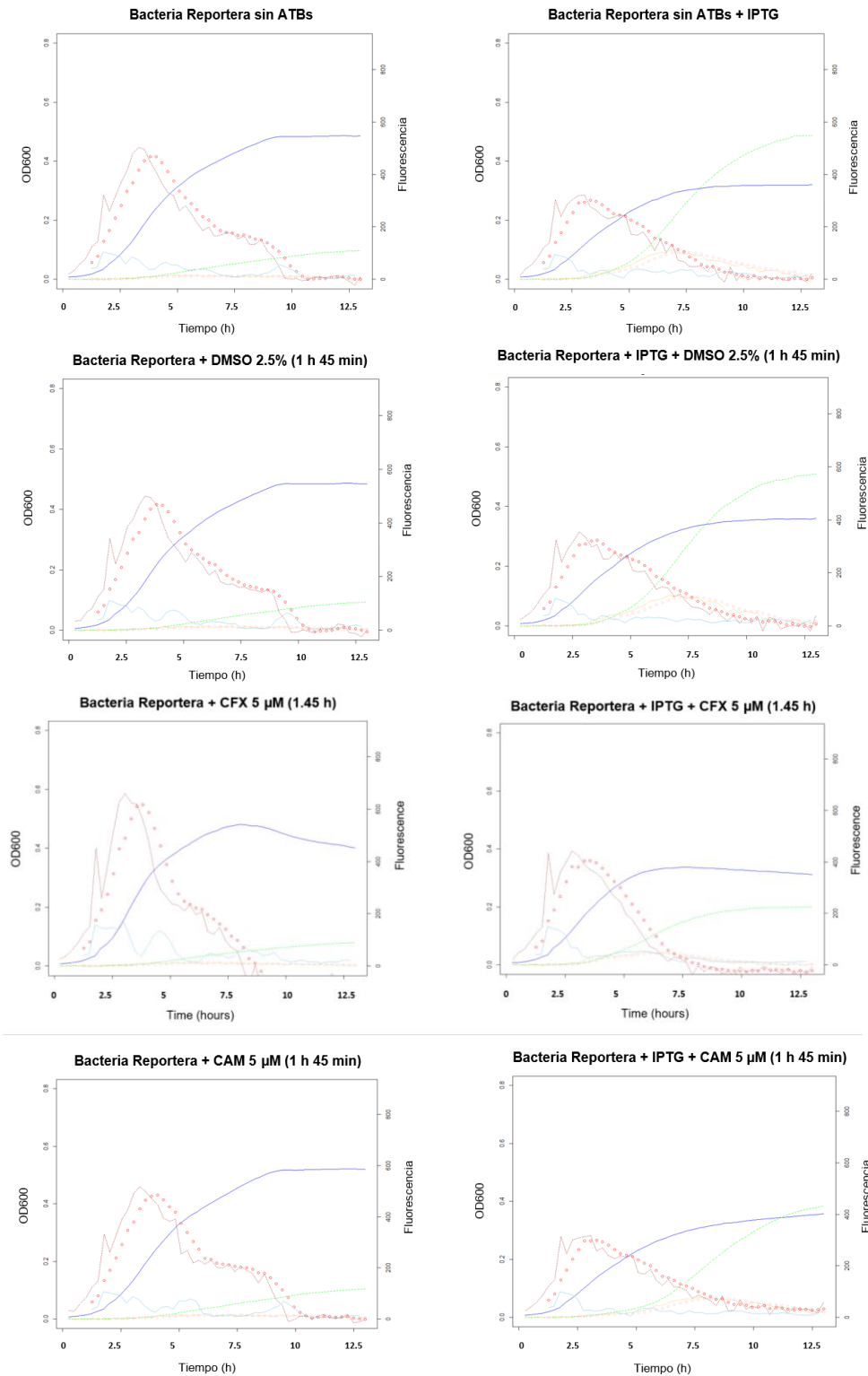
**Figura A3. Esquema de la placa multipozo para los ensayos de inhibición con curva de Cefuroxima.** Se muestra una placa de 96 pozos, en el cual se evalúan 8 concentraciones de Cefuroxima, en presencia y ausencia de IPTG, cada condición se mide por triplicado. Después de determinar el efecto del solvente, se utilizó este esquema para realizar las curvas de concentración de Cefuroxima. El porcentaje de DMSO final mostrado es referencial. BR: Bacteria Reportera. BC: Bacteria Control. M: Medio M9 suplementado (Blanco).



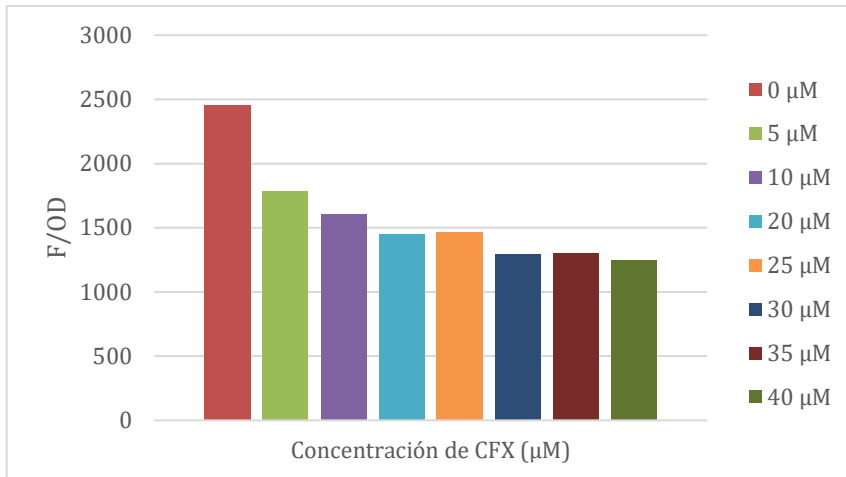
**Figura A4. Crecimiento de la Bacteria Reportera en presencia de Cloranfenicol y Cefuroxima, desde 1 h 45 min.**



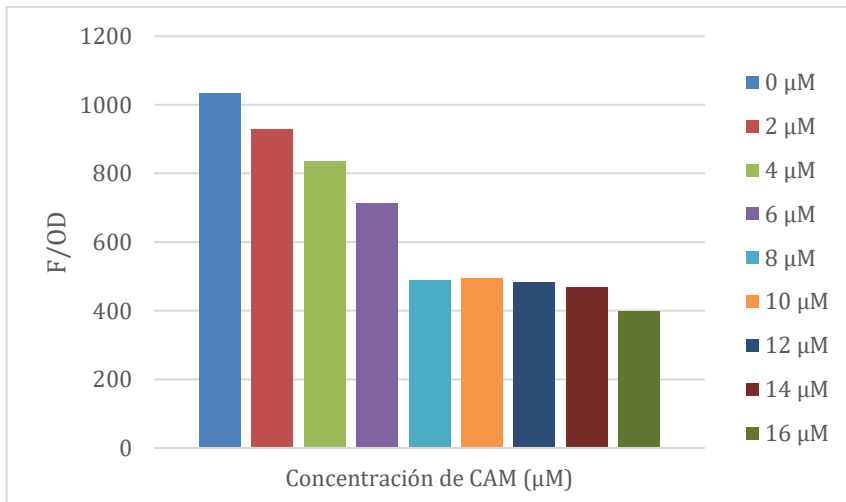
**Figura A5. Fluorescencia Normalizada de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de Cloranfenicol y Cefuroxima, a 5 μM (ganancia 50).**



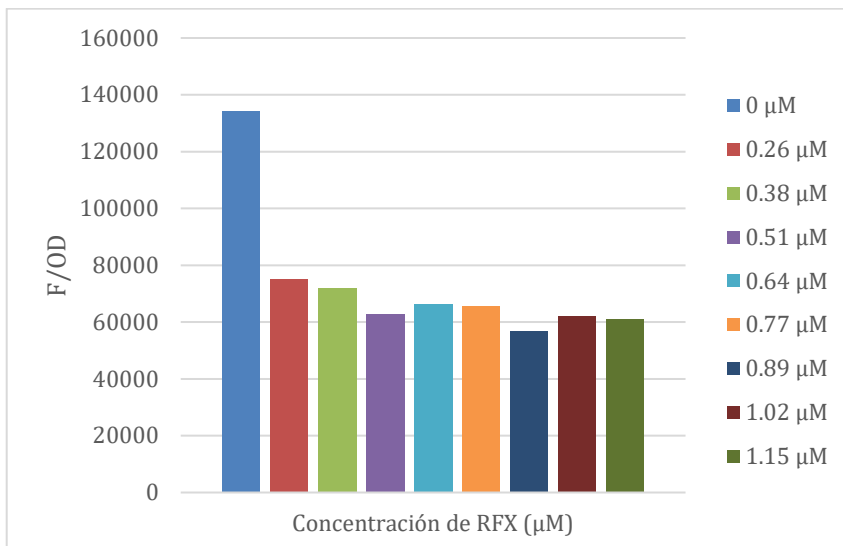
**Figura A6. Tasas de crecimiento y fluorescencia de la Bacteria Reportera a 5 µM de Cloranfenicol (CAM) y Cefuroxima (CFX).** Tasas de crecimiento (rojo), tasas de fluorescencia (amarillo), densidad óptica (azul) y fluorescencia (verde) de la Bacteria Reportera a la misma concentración de Cloranfenicol y Cefuroxima (adicionados a **1 h 45 min**). Columna izquierda: Bacteria sin inducir. Columna derecha: Bacteria inducida. Datos de fluorescencia en ganancia 50.



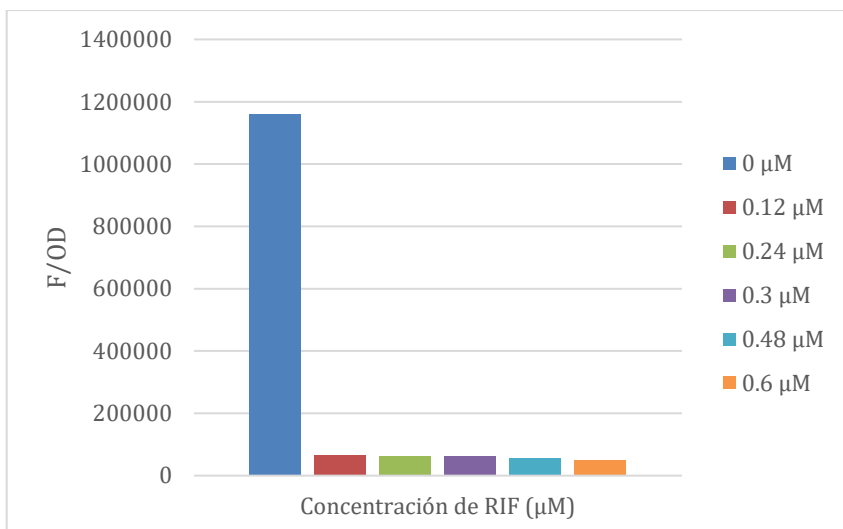
**Figura A7. Fluorescencia máxima de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de diferentes concentraciones de Cefuroxima a 1 h 45 min (ganancia 50).**



**Figura A8. Fluorescencia máxima de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de diferentes concentraciones de Cloranfenicol a 1 h 45 min (ganancia 50).**



**Figura A9. Fluorescencia máxima de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de diferentes concentraciones de Rifaximina a 1 h 45 min (ganancia 100).**



**Figura A10. Fluorescencia máxima de la Bacteria Reportera inducida, en presencia de diferentes concentraciones de Rifampicina a 1 h 45 min (ganancia 100).**



## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia y a mis mascotas, por su compañía tan necesaria a lo largo de este proceso. Su amor, paciencia y ánimo continuo fueron fundamentales para mantenerme motivada durante los desafíos de esta tesis.

Además, quiero agradecer a mis amigos más próximos, por estar siempre dispuestos a escuchar mis preocupaciones y alegrías a lo largo de este viaje académico. También agradezco a mi enamorado Gui, por ser un gran apoyo y brindarme consejos cuando más lo necesitaba.

Asimismo, no puedo dejar de agradecer al PhD. Daniel Guerra, quién muy amablemente aceptó ser mi asesor y me dio la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio. Su orientación y experiencia fueron esenciales para el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, agradezco al cálido equipo del Laboratorio de Moléculas Individuales, con quienes pude intercambiar conocimiento, anécdotas, risas y ayuda cuando fue necesario. Doy gracias especialmente a la MSc. Keren Espinoza, por ser una increíble co-asesora y a Nicolás Arías, por su paciencia y ayuda constante durante el análisis y la interpretación del modelo matemático.