
This is the **published version** of the master thesis:

Urrea Gracia, Inés; Aranda Rodríguez, Jesús (tut.). *Identificación de nuevos compuestos antimicrobianos a través del Drug repurposing*. (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Microbiologia Aplicada)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/336145>

under the terms of the  license.



Máster Oficial en Microbiología Aplicada

Departamento de Genética y de Microbiología

Universidad Autónoma de Barcelona

Trabajo de final de máster

Propuesta de Proyecto de Investigación

Título del trabajo

**Identificación de nuevos compuestos antimicrobianos a través del
*Drug repurposing***

Autora: Inés Urrea Gracia

Tutor: Jesús Aranda Rodríguez

Fecha: 08/06/2026

Resumen:

La resistencia a los antimicrobianos constituye una de las principales amenazas para la salud pública mundial, al reducir la eficacia de los tratamientos disponibles y aumentar la mortalidad asociada a infecciones bacterianas. Ante la escasez de nuevos antibióticos, el reposicionamiento de fármacos emerge como una estrategia prometedora para identificar nuevas actividades antimicrobianas en compuestos ya aprobados. Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en la identificación fenotípica de dicha actividad, sin profundizar en los mecanismos de acción, un aspecto clave en el contexto de los antimicrobianos para anticipar resistentes y desarrollar nuevas terapias. En este proyecto se propone el cribado de la librería LOPAC1280 para identificar fármacos no antibióticos activos frente a *Escherichia coli* K-12 MG1655, y la evaluación de los compuestos más prometedores frente a aislados clínicos multirresistentes, permitiendo priorizar los candidatos con mayor potencial terapéutico. El objetivo central del proyecto es la identificación y validación de las dianas moleculares responsables de la actividad de los compuestos en la cepa modelo. Finalmente, los candidatos seleccionados se evaluarán en un modelo in vivo de *Galleria mellonella*. El trabajo aportará información relevante sobre nuevos candidatos antimicrobianos contra cepas de *E. coli* multirresistente, así como sobre sus mecanismos de acción y su potencial terapéutico.

Palabras clave: Evolución dirigida, secuenciación, genómica comparativa, Recombinación homologa, modelo invertebrado

Title: Identification of Novel Antimicrobial Compounds through Drug Repurposing

Summary:

Antimicrobial resistance is one of the major global public health threats, as it reduces the effectiveness of available treatments and increases mortality associated with bacterial infections. Given the shortage of new antibiotics, drug repurposing has emerged as a promising strategy to identify novel antimicrobial activities in already approved compounds. However, most studies focus on the phenotypic identification of such activity without further investigating the underlying mechanisms of action, a key aspect in the field of antimicrobials to anticipate resistance and develop new therapies. This project proposes the screening of the LOPAC1280 library to identify non-antibiotic compounds active against *Escherichia coli* K-12 MG1655, followed by the evaluation of the most promising compounds against multidrug-resistant clinical isolates, allowing prioritization of candidates with the highest therapeutic potential. The main objective of the project is the identification and validation of the molecular targets responsible for the activity of the compounds in the model strain. Finally, the selected candidates will be evaluated in an in vivo *Galleria mellonella* model. This work will provide valuable information on new antimicrobial candidates against multidrug-resistant *E. coli*, as well as on their mechanisms of action and therapeutic potential.

Key words: Directed evolution, sequencing, comparative genomics, homologous recombination, invertebrate model

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Antecedentes y estado actual	4
1.2. Justificación de la propuesta	7
2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	13
2.1. Hipótesis	13
2.2. Objetivo general	13
2.3. Objetivos específicos	13
3. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO	14
3.1. Cribado de alto rendimiento (HTS):	14
3.2. Potencial de los compuestos seleccionados en cepas clínicas de <i>E. coli</i> 14	
3.3. Determinación del efecto antimicrobiano del compuesto	15
3.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	15
3.3.2. Concentración mínima bactericida (CMB)	15
3.4. Identificar posibles dianas moleculares y mecanismos de resistencia 15	
3.4.1. Obtención de mutantes resistentes espontáneos:	15
3.4.2. Ensayo de evolución a diferentes concentraciones	16
3.4.3. Secuenciación (WGS) y análisis bioinformático de los clones resistentes	16
3.5. Validación funcional de las mutaciones	17
3.6. Evaluación de la eficacia de los compuestos en <i>Galleria mellonella</i> ..	19
3.7. Plan de contingencia	20
4. CRONOGRAMA	24
5. IMPACTO Y RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS ESPERADOS	25
5.1. Impacto social	25
5.2. Impacto económico	25
5.3. Impacto científico	25
6. ÉTICA	26
7. PRESUPUESTO	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes y estado actual

La resistencia a los antimicrobianos constituye actualmente una de las principales amenazas para la salud pública mundial. La aparición y expansión de microorganismos resistentes compromete la eficacia de tratamientos previamente efectivos y limita las opciones terapéuticas disponibles(1). Se estima que, en la actualidad, la resistencia antimicrobiana es responsable de aproximadamente 700.000 muertes, y las proyecciones indican que esta cifra podría superar los 10 millones en el año 2050 (2–4).

Tradicionalmente, el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos se ha basado en procesos de descubrimiento *de novo*, que incluyen cuatro fases: descubrimiento, estudios preclínicos, ensayos clínicos y farmacovigilancia. Sin embargo, este proceso supone una gran inversión de tiempo y recursos económicos. Se estima que el tiempo de desarrollo de un nuevo fármaco puede requerir entre 12 y 17 años debido a requisitos regulatorios relacionados con la seguridad, eficacia y calidad en las fases de investigación en animales y clínicas. Además, gran parte de los compuestos evaluados fracasan debido a problemas relacionados con toxicidad, baja eficacia o perfiles farmacocinéticos inadecuados (1, 5, 6).

Este contexto ha impulsado la búsqueda de estrategias alternativas para acelerar la identificación de nuevos tratamientos antimicrobianos. El *drug repurposing* (también conocido como reposicionamiento de fármacos o redirección de fármacos) ha surgido como una estrategia prometedora para descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas. Esta aproximación se basa en la identificación de nuevas aplicaciones terapéuticas para fármacos ya aprobados o en investigación, distintas de la indicación original para la que fueron desarrollados (Figura 1) (7) . Este enfoque se fundamenta en dos principios. En primer lugar, numerosos compuestos presentan actividades biológicas crípticas inicialmente desconocidas y que pueden detectarse mediante observaciones clínicas o estudios posteriores en forma de efectos secundarios. En segundo lugar, distintas enfermedades pueden compartir vías moleculares o factores genéticos comunes, lo que permite que un mismo fármaco pueda ser eficaz en más de una indicación terapéutica (5, 8).

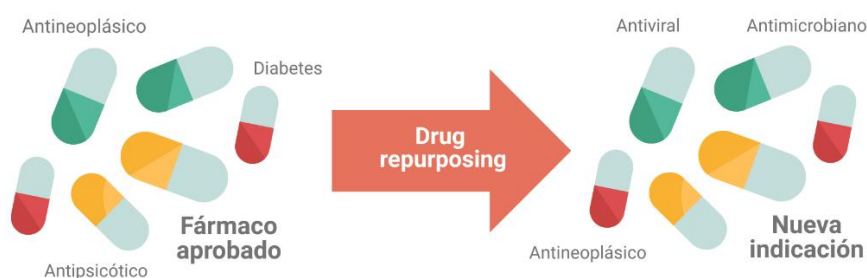


Figura 1: Representación gráfica del concepto general del drug repurposing. Creado con Biorender.com

Las principales ventajas del reposicionamiento de fármacos frente al desarrollo convencional incluyen la reducción del tiempo, los costes y el riesgo asociado al proceso de investigación y desarrollo. Al tratarse de compuestos previamente aprobados o evaluados clínicamente, existe información disponible sobre sus perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicidad, lo que facilita su evaluación para nuevas indicaciones terapéuticas. Como consecuencia, el tiempo necesario para su desarrollo suele ser considerablemente menor que el requerido para el descubrimiento de fármacos *de novo*, estimándose periodos de entre 3 y 12 años. Todo ello, en conjunto, permite acelerar el proceso de desarrollo de nuevos tratamientos (7, 9, 10).

Algunas limitaciones de la técnica se relacionan con la farmacología clínica, ya que este enfoque solo es viable cuando la dosis necesaria para la nueva indicación se encuentra dentro del mismo rango que la del uso original del fármaco. Otras están vinculadas a las propiedades farmacodinámicas, ya que parámetros como la semivida (*half-life*), la distribución tisular y la unión a proteínas plasmáticas pueden influir negativamente en la eficacia del fármaco en su nueva indicación (5, 11).

Aunque el *drug repurposing* no es una estrategia reciente, su aplicación ha experimentado un notable aumento en los últimos años. En la actualidad, con el objetivo de sistematizar la identificación de nuevas indicaciones terapéuticas, se han desarrollado diversas librerías con compuestos químicos que incluyen moléculas aprobadas para uso clínico o con información disponible de ensayos clínicos. Inicialmente, el acceso a estas colecciones estaba limitado debido a restricciones de propiedad intelectual, sin embargo, en los últimos años su disponibilidad para la comunidad científica ha aumentado de forma significativa (5).

Existen proveedores comerciales de estas librerías, como Microsource, Prestwick o Sigma-Aldrich. Asimismo, algunas grandes compañías farmacéuticas, como AstraZeneca, han puesto a disposición parte de sus colecciones de compuestos a través de iniciativas como el programa Open Innovation, lo que facilita su utilización en estrategias de reposicionamiento de fármacos. Paralelamente, se han desarrollado bases de datos y herramientas de análisis que facilitan la preselección (pre-screening) de estos compuestos, entre las que destacan DrugBank, PubChem y ChEMBL (12, 13).

Actualmente, diversos fármacos han sido reposicionados para nuevos usos terapéuticos. Entre los ejemplos más conocidos se encuentra el sildenafil, desarrollado inicialmente para el tratamiento de la angina de pecho, pero posteriormente utilizado para tratar la disfunción eréctil y la hipertensión arterial pulmonar (14, 15). Otro caso es la talidomida, un tratamiento desarrollado originalmente para tratar las náuseas matutinas durante el embarazo y retirada debido

a sus efectos teratogénicos, y posteriormente reutilizado para el tratamiento del eritema nudoso leproso y el mieloma múltiple (16). Estos casos ilustran el potencial del reposicionamiento de fármacos como estrategia para identificar nuevas aplicaciones terapéuticas a partir de compuestos ya conocidos.

Esta estrategia también ha despertado interés creciente en el ámbito de las enfermedades infecciosas, debido al incremento de la resistencia antimicrobiana y a la escasez de nuevos antibióticos disponibles. Esta necesidad es especialmente relevante en el caso de las bacterias multirresistentes entre las que destacan los patógenos del grupo ESKAPE, acrónimo que engloba a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.* En algunos casos este acrónimo puede incluir a *Escherichia coli* (ESKAPEE) (17). En este contexto, actualmente, *E. coli* representa una de las mayores cargas clínicas para la salud humana y animal. En humanos, *E. coli* multirresistente destaca como la causa principal de bacteriemias e infecciones del tracto urinario (UTI), con la sepsis como una de sus manifestaciones más graves tanto en el ámbito comunitario como en el nosocomial. A este hecho se suma que en los últimos años se ha dado una diseminación mundial de clones pandémicos uropatogénicos multirresistentes altamente exitosos. Además, se han descrito resistencias frente a aminopenicilinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cefalosporinas de tercera generación. Un hecho relacionado con la capacidad de estas bacterias de adquirir genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes. Asimismo, este escenario se ha visto agravado por el deterioro progresivo de la eficacia de los carbapenémicos y la emergencia de resistencias a antibióticos de último recurso como la colistina (18).

Diferentes artículos han demostrado la eficacia de fármacos reposicionados frente a diferentes bacterias multirresistentes. Los ejemplos más destacados en la literatura se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Compuestos no-antibióticos con actividad antimicrobiana descrita. En la primera columna se indican los compuestos, en la segunda su aplicación inicial, en la tercera los microorganismos frente a los que se ha descrito una actividad antimicrobiana de esos compuestos y en la última los artículos i/o estudios donde se ha descrito esa actividad.

Compuesto	Aplicación inicial	Eficacia antimicrobiana demostrada	Estudios
Niclosamida	Antihelmíntico	<i>P. aeruginosa</i> , Enterobacterias productoras de carbapenemases (<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>)	(19, 20)

Pentamidine	Antiprotosoario	Actividad sinérgica con otros antibióticos frente a <i>E. coli</i> y <i>A. baumannii</i>	(21)
Auranofin	Antirreumático	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>H. pylori</i>	(20)
Curcumina	Antineoplásico (Anticáncer)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	(22)
Zidovudina (AZT)	Antiretroviral (VIH)	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. flexneri</i> , y <i>E. aerogenes</i>	(23)
Ciclopirox	Antifúngico	Aislados clínicos de <i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>P. aeruginosa</i>	(23)
Diclofenac	Antiinflamatorio no esteroide	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> y aislados clínicos de <i>E. coli</i>	(23)
Ibuprofeno	Antiinflamatorio no esteroide	<i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	(23)
Clorexidina	Antiséptico	Bacterias gram negativas y positivas del grupo ESKAPE	(24)

1.2. Justificación de la propuesta

Aunque el reposicionamiento de fármacos ha emergido como una estrategia prometedora para la identificación de nuevos agentes antimicrobianos, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han basado principalmente en cribados fenotípicos de alto rendimiento orientados a la detección de la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano, sin profundizar en la caracterización del mecanismo de acción de los compuestos identificados. En el contexto de los antimicrobianos, la identificación del mecanismo de acción es un aspecto clave, ya que permite comprender las bases moleculares de la actividad, facilitar la posible optimización del compuesto, anticipar posibles mecanismos de resistencia y evitar fenómenos de

resistencia cruzada. Asimismo, esta información sobre los mecanismos de acción puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas o al diseño de nuevos compuestos basados en dichas interacciones (5).

Se ha descrito que bajas concentraciones de antibióticos presentes, tanto en contextos tisulares como en el ambiente, pueden favorecer la selección de poblaciones resistentes. Sin embargo, este tipo de condiciones han sido poco explorado en el contexto del reposicionamiento de fármacos. Su estudio podría aportar información relevante sobre la aparición de resistencias y la seguridad asociada a su posible utilización como antimicrobianos, así como aportar información sobre las posibles dianas moleculares de esos compuestos (25).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una lista de patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. En esta clasificación, el orden de *Enterobacterales* ocupa el grupo de Prioridad 1: Crítica, destacando cepas de *E. coli* resistentes a carbapenémicos, a cefalosporinas de tercera generación y betalactámicos de amplio espectro. Estos patógenos son responsables de infecciones nosocomiales y comunitarias graves, y presentan una elevada capacidad de adquirir y desarrollar resistencias a los tratamientos antimicrobianos de última línea. Este escenario pone de manifiesto la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y fundamenta la selección de *E. coli* como el microorganismo de estudio del proyecto (2).

En este contexto, el presente proyecto propone la identificación de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana mediante la estrategia del reposicionamiento de fármacos, utilizando la librería de compuestos LOPAC1280 del proveedor Sigma-Aldrich (13). Uno de los principales objetivos del estudio será la identificación de las posibles dianas moleculares de los compuestos activos en microorganismos, empleando como sistema modelo la cepa *Escherichia coli* K-12 MG1655, cuyo genoma se encuentra ampliamente caracterizado. Asimismo, se determinará la actividad antimicrobiana de estos compuestos más prometedores frente a cepas clínicas multirresistentes de *E. coli*. Finalmente, los compuestos seleccionados también serán evaluados en un modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*, con el fin de evaluar su eficacia y potencial terapéutico en un sistema biológico más complejo (26–28).

En resumen, el proyecto pretende contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente a patógenos multirresistentes mediante el uso del reposicionamiento de fármacos como herramienta aceleradora del descubrimiento de nuevos antimicrobianos.

Bibliografía

1. Hua Y, Dai X, Xu Y, Xing G, Liu H, Lu T, Chen Y, Zhang Y. 2022. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *Eur J Med Chem* 234:114239.
2. Tarín-Pelló A, Suay-García B, Pérez-Gracia M-T. 2022. Antibiotic resistant bacteria: current situation and treatment options to accelerate the development of a new antimicrobial arsenal. *Expert Rev Anti Infect Ther* 20:1095–1108.
3. Wu Z, Wang Y, Li L, Zhen S, Du H, Wang Z, Xiao S, Wu J, Zhu L, Shen J, Wang Z. 2023. New insights into the antimicrobial action and protective therapeutic effect of tirapazamine towards *Escherichia coli*-infected mice. *Int J Antimicrob Agents* 62:106923.
4. Jian Z, Zeng L, Xu T, Sun S, Yan S, Yang L, Huang Y, Jia J, Dou T. 2021. Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology* 61:1049–1070.
5. Farha MA, Brown ED. 2019. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol* 4:565–577.
6. Di Bonaventura G, Lupetti V, Di Giulio A, Muzzi M, Piccirilli A, Cariani L, Pompilio A. 2023. Repurposing High-Throughput Screening Identifies Unconventional Drugs with Antibacterial and Antibiofilm Activities against *Pseudomonas aeruginosa* under Experimental Conditions Relevant to Cystic Fibrosis. *Microbiol Spectr* 11:e0035223.
7. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilleams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. 2019.

- Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 18:41–58.
8. Somolinos FJ, León C, Guerrero-Aspizua S. 2021. Drug Repurposing Using Biological Networks. *Processes* 9:1057.
 9. Jampilek J. 2022. Drug repurposing to overcome microbial resistance. *Drug Discovery Today* 27:2028–2041.
 10. Wang Z-Z, Bei R-T, Xu H-H, Xu L-F, Sun X-T, Ye T, Wang L-L, Wu C, Wu X, Miao M-S, Pang X. 2025. Sono-triggered nanoamplifier mediates ferroptosis-immune regulation against bacterial pneumonia. *Journal of Controlled Release* 387:114234.
 11. Hamid A, Mäser P, Mahmoud AB. 2024. Drug Repurposing in the Chemotherapy of Infectious Diseases. *Molecules* 29:635.
 12. Cha Y, Erez T, Reynolds IJ, Kumar D, Ross J, Koytiger G, Kusko R, Zeskind B, Risso S, Kagan E, Papapetropoulos S, Grossman I, Laifenfeld D. 2018. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *Br J Pharmacol* 175:168–180.
 13. Jones LH, Bunnage ME. 2017. Applications of chemogenomic library screening in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 16:285–296.
 14. Novac N. 2013. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends in Pharmacological Sciences* <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.03.004>.
 15. Ala M, Jafari RM, Dehpour AR. 2021. Sildenafil beyond erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension: Thinking about new indications. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 35:235–259.

16. Richardson P, Hideshima T, Anderson K. 2002. Thalidomide in multiple myeloma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56:115–128.
17. Krul D, Negoseki BR da S, Siqueira AC, Tomaz AP de O, dos Santos ÉM, de Sousa I, Vasconcelos TM, Marinho ICR, Arend LNVS, Mesa D, Conte D, Dalla-Costa LM. 2025. Spread of antimicrobial-resistant clones of the ESKAPEE group: From the clinical setting to hospital effluent. *Science of The Total Environment* 973:179124.
18. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 33:e00181-19.
19. Imperi F, Massai F, Ramachandran Pillai C, Longo F, Zennaro E, Rampioni G, Visca P, Leoni L. 2013. New Life for an Old Drug: the Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:996–1005.
20. Aggarwal M, Patra A, Awasthi I, George A, Gagneja S, Gupta V, Capalash N, Sharma P. 2024. Drug repurposing against antibiotic resistant bacterial pathogens. *European Journal of Medicinal Chemistry* 279:116833.
21. Stokes JM, MacNair CR, Ilyas B, French S, Côté J-P, Bouwman C, Farha MA, Sieron AO, Whitfield C, Coombes BK, Brown ED. 2017. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. *Nat Microbiol* 2:17028.
22. Kamurai B, Mombeshora M, Mukanganyama S. 2020. Repurposing of Drugs for Antibacterial Activities on Selected ESKAPE Bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Microbiol* 2020:8885338.

23. Aloni-Grinstein R, Mamroud E, Gal Y. 2025. New Frontiers for Old Medications: Repurposing Approved Drugs Against Gram-Negative Bacterial Infections. *Microorganisms* 13.
24. Peyclit L, Baron SA, Hadjadj L, Rolain J-M. 2022. In Vitro Screening of a 1280 FDA-Approved Drugs Library against Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Bacteria. *Antibiotics* 11:291.
25. Wistrand-Yuen E, Knopp M, Hjort K, Koskiniemi S, Berg OG, Andersson DI. 2018. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nat Commun* 9:1599.
26. Pereira MF, Rossi CC, da Silva GC, Rosa JN, Bazzolli DMS. 2020. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathog Dis* 78:ftaa056.
27. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7:214–229.
28. Admella J, Torrents E. 2023. Investigating bacterial infections in *Galleria mellonella* larvae: Insights into pathogen dissemination and behavior. *Journal of Invertebrate Pathology* 200:107975.

2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

2.1. Hipótesis

Determinados compuestos no antibióticos presentes en la librería LOPAC1280 poseen actividad antimicrobiana frente a la cepa modelo *Escherichia coli* K-12 MG1655 mediante la interacción con dianas moleculares bacterianas específicas, pudiendo mantener dicha actividad frente a cepas clínicas de la misma especie.

2.2. Objetivo general

Inferir posibles dianas moleculares responsables del efecto antimicrobiano de compuestos reposicionados en la cepa modelo *E. coli* K-12 MG1655 mediante la obtención de mutantes resistentes, análisis genómico y validación funcional, así como evaluar potencial en un modelo *in vivo* de invertebrado.

2.3. Objetivos específicos

- 1) **Identificar compuestos con actividad antimicrobiana** frente a la cepa modelo *E. coli* K-12 MG1655 mediante el cribado de alto rendimiento de la librería de fármacos aprobados LOPAC1280.
- 2) Determinar el **potencial antimicrobiano** de los **compuestos** más prometedores sobre cepas clínicas de *E. coli* multirresistentes.
- 3) **Determinar** la naturaleza **bactericida o bacteriostática** de los compuestos seleccionados
- 4) **Identificar las posibles dianas moleculares** de los compuestos seleccionados mediante el análisis genómico de mutantes resistentes
- 5) **Validar funcionalmente el papel de las mutaciones identificadas** en el fenotipo de resistencia mediante mutagénesis dirigida y ensayos de complementación.
- 6) **Evaluar la efectividad** de los compuestos más prometedores **en un modelo *in vivo* de *Galleria mellonella***

Se proponen los siguientes paquetes de trabajo y el siguiente flujo de trabajo para dar respuesta a cada uno de los objetivos propuestos (Figura 2):

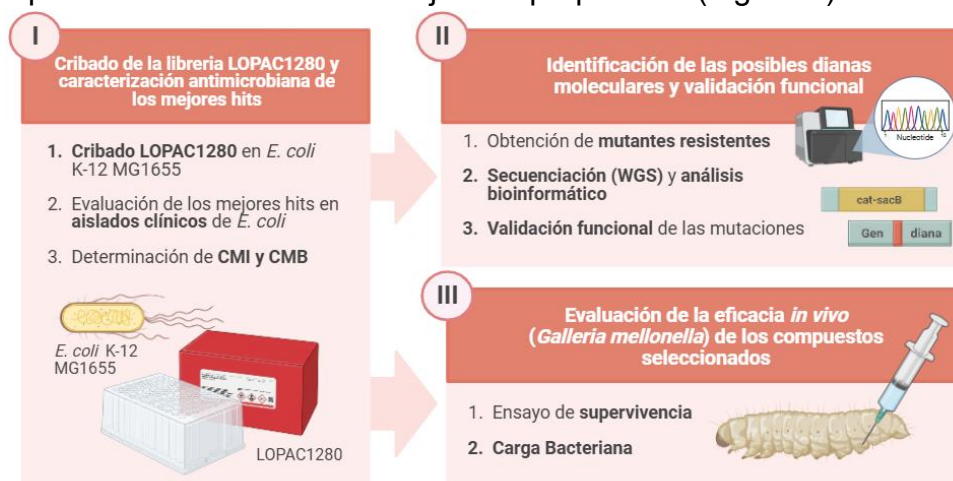


Figura 2: Flujo de trabajo del proyecto propuesto. Creado con Biorender.com

3. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

3.1. Cribado de alto rendimiento (HTS):

Para el cribado se utilizará la librería LOPAC1280 (Sigma-Aldrich), compuesta por 1280 compuestos farmacológicamente activos. La librería se organiza en 16 placas de 96 pocillos, conteniendo 80 compuestos por placa a una concentración de 10 mM en DMSO y un volumen de 250 µl. El almacenamiento se realizará a -20 °C hasta su uso (1).

Se utilizará una estrategia de dispensación directa de 0,5 µl del stock (10 mM) sobre 100 µl de inóculo bacteriano de la cepa modelo *E. coli* K-12 MG1655, estableciendo la concentración final del ensayo de 50 µM (µmol/L) y un porcentaje residual de DMSO del 0,5% para garantizar la observación de la actividad del compuesto y no la toxicidad del DMSO. La preparación del inóculo será la siguiente: ajuste de una suspensión bacteriana a 0,5 McFarland en NaCl, seguida de una dilución 1:100 en medio LB, asegurando una densidad celular de 10⁵ CFU por pocillo. Las placas incluirán un blanco del medio (control negativo) (columna 1) y controles de crecimiento (control positivo) (columna 12). Las placas serán incubadas a 37 °C durante 18-24 h (2).

El crecimiento bacteriano se medirá por espectrofotometría usando el fotómetro Multiskan™. Con los datos obtenidos en formato Excel, se calculará el porcentaje de inhibición de cada compuesto frente a la cepa modelo *E. coli* K-12 MG1655 usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 1 - \left(\frac{A \text{ muestra} - A \text{ control negativo}}{A \text{ control positivo} - A \text{ control negativo}} \right) \times 100 \quad (2)$$

En función del porcentaje de inhibición obtenido se clasificará la actividad antimicrobiana en: baja eficacia < 25%, eficacia moderada (25% ≤ x < 60%), alta eficacia (60% ≤ x < 90%) y eficacia excelente (90% ≤ x ≤ 100%) (3).

Se seleccionarán aquellos compuestos que presenten un porcentaje de inhibición igual o superior al 90 % y cuya diana molecular no haya sido previamente descrita en microorganismos.

3.2. Potencial de los compuestos seleccionados en cepas clínicas de *E. coli*

Para los compuestos más prometedores seleccionados en el apartado 3.1 de la metodología, se evaluará su actividad antimicrobiana frente a un panel de entre 5 y 10 aislados clínicos de *E. coli* multirresistentes, con diferentes perfiles de resistencia a antibióticos de uso clínico, obtenidos de los hospitales colaboradores de la zona. Este análisis permitirá establecer la relevancia clínica de los compuestos identificados en el cribado inicial y priorizar aquellos con mayor potencial terapéutico (4).

3.3. Determinación del efecto antimicrobiano del compuesto

3.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI) para aquellos compuestos que presenten un porcentaje de inhibición igual o superior al 90% frente a la cepa *E. coli* K-12 MG1655. Adicionalmente, los compuestos seleccionados serán evaluados frente a cepas clínicas multirresistentes de *E. coli* con el fin de comparar su actividad antibacteriana en un contexto clínicamente relevante.

El ensayo se llevará a cabo siguiendo el método de microdilución en caldo Mueller-Hinton en placas de 96 pocillos y de acuerdo con las guías de la Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). El procedimiento consistirá en realizar diluciones 1:2 de los compuestos evaluados, a las que se adicionarán 50 µl de suspensión bacteriana por pocillo. Las placas se incubarán a 37 °C durante un periodo de 18 a 24 h. Tras la incubación, se evaluará el crecimiento mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) en el fotómetro Multiskan™ Microplate. La CMI se definirá como la concentración más baja de compuesto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible, identificada como el primer pocillo ópticamente transparente (5–7). Todos los ensayos se realizarán, como mínimo, por triplicado de manera independiente con el fin de garantizar la reproducibilidad de los resultados (8).

Así mismo, de manera complementaria se realizará un ensayo de DMSO para todas las cepas estudiadas con el fin de determinar su posible toxicidad.

3.3.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

Para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB), se realizarán siembras por deposición puntual (spot plating) de 10 µl procedentes de aquellos pocillos en los que no se observe crecimiento durante la determinación de la CMI, sobre placas de agar LB, que se incubarán a 37 °C durante 24 h (7, 9).

La CMB se establecerá como la concentración mínima de compuesto que resulte en la reducción $\geq 99,9\%$ del inóculo bacteriano inicial, evidenciado por la ausencia de crecimiento en placa (7).

Para determinar si el compuesto tiene un efecto bactericida o bacteriostático se utilizará la relación CMB/CMI. Se considera que el efecto es bactericida si la relación es ≤ 4 y bacteriostático cuando es >4 (10).

3.4. Identificar posibles dianas moleculares y mecanismos de resistencia

3.4.1. Obtención de mutantes resistentes espontáneos:

Se prepararán cultivos *overnight* de la cepa *wild-type* (WT) de *E. coli* K-12 MG1655 en medio LB incubados a 37 °C bajo agitación. Posteriormente, se sembrarán 100 µL

en placas de agar LB suplementadas con una concentración del compuesto superior a la concentración mínima inhibitoria (CMI). En caso de obtener mutantes resistentes espontáneos, se determinará nuevamente la CMI, siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente, para confirmar el fenotipo resistente (11, 12).

3.4.2. Ensayo de evolución a diferentes concentraciones

El ensayo consistirá en la realización de dos réplicas idénticas del ensayo de determinación de la CMI descrito en el apartado 3.2.1. Tras 24 h de incubación a 37 °C, una de las réplicas será analizada mediante lectura en espectrofotómetro Multitaskan para la determinación del crecimiento bacteriano y la estimación de la CMI, mientras que la segunda placa será utilizada como fuente de inóculo para la preparación de dos nuevas réplicas de CMI.

En cada pase, se seleccionará el pocillo que presente crecimiento a la mayor concentración del compuesto, es decir, el pocillo inmediatamente inferior a la CMI determinada para esa población en ese pase. Tras realizar una dilución de este pocillo (1:100), este inóculo se empleará para iniciar un nuevo ensayo completo de determinación de la CMI bajo las mismas condiciones experimentales. De este modo, en cada pase se seleccionarán subpoblaciones capaces de crecer en la mayor concentración previamente tolerada, ejerciendo una presión selectiva continua sobre la población. La repetición sucesiva de este procedimiento permitirá evaluar la evolución de la resistencia bacteriana mediante el posible incremento progresivo de la CMI a lo largo del tiempo, como indicador de adaptación al compuesto estudiado (12).

De manera complementaria, se realizarán siembras por deposición puntual (spot plating) de 10 µl de los diferentes pocillos con crecimiento sub-CMI en placas de agar LB suplementadas con concentraciones del compuesto por encima de la CMI. Este análisis permitirá detectar la posible presencia o enriquecimiento de subpoblaciones con resistencia de alto nivel dentro de la población sometida a esta presión selectiva (13).

3.4.3. Secuenciación (WGS) y análisis bioinformático de los clones resistentes

La secuenciación del genoma completo y el análisis bioinformático de los clones resistentes se basará en metodologías previamente descritas por Wistrand-Yuen et al. (2018) y Pereira et al. (2023). El ADN genómico (gDNA) de los mutantes seleccionados y de la cepa WT de laboratorio será extraído a partir de cultivos *overnight* mediante un kit comercial de purificación de ADN genómico (DNeasy Blood & Tissue kit, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del ADN obtenido se evaluarán mediante espectrofotometría NanoDrop y

electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de gDNA serán enviadas a un servicio externo especializado para la preparación de librerías y la secuenciación completa del genoma mediante tecnología Illumina.

Los datos de secuenciación obtenidos (archivos FASTQ con las lecturas generadas) serán sometidos a control de calidad y analizados mediante un pipeline bioinformático adecuado. Este análisis incluirá el alineamiento de las lecturas frente al genoma de referencia de la cepa parental WT que permitirá la detección de variantes del tipo SNPs, inserciones/deleciones (indels) y posibles reordenamientos estructurales asociadas al proceso de selección tras la exposición a elevadas concentraciones de los compuestos evaluados.

Se filtrarán las variantes identificadas, con el fin de excluir polimorfismos preexistentes en la cepa parental WT respecto al genoma de referencia de la cepa, y seleccionar únicamente mutaciones *de novo* asociadas al fenotipo resistente, permitiendo así la identificación de posibles dianas moleculares implicadas en el mecanismo de resistencia (13, 14).

3.5. Validación funcional de las mutaciones

Las mutaciones identificadas mediante secuenciación de genoma completo se validarán funcionalmente mediante reconstrucción genética en la cepa salvaje y mediante complementación en los clones resistentes. Este enfoque permitirá determinar el papel de las mutaciones observadas en el fenotipo resistente (13, 14).

Para ello, se empleará recombinación homóloga mediada por el sistema λ -Red junto con un sistema de contraselección basado en el casete cat-sacB, lo que permitirá realizar mutaciones dirigidas sin dejar cicatrices genéticas (scarless). El casete cat-sacB será amplificado por PCR incorporando brazos de homología (aproximadamente 50bp) flanqueantes a la región genómica diana para facilitar la recombinación específica (15).

Se partirá de cultivos overnight de la cepa *E. coli* K-12 WT y de los mutantes resistentes obtenidos. Estas cepas se mantendrán en presencia de un plásmido termosensible portador del sistema λ -Red (pSIM5-Tet), que habrá sido previamente transformado y permite la expresión controlada de las proteínas Exo, Beta y Gam bajo condiciones de inducción térmica. La inducción del sistema se realizará mediante un choque térmico (42 °C, 15 min y en agitación a 185 rpm) (16).

Una vez activado el sistema λ -Red, se introducirá por electroporación el fragmento de DNA de doble cadena correspondiente al casete cat-sacB, generando así un primer evento de recombinación homóloga e integración del marcador en la región de interés (Figura 3). Este marcador contiene el gen *cat*, que confiere resistencia al cloranfenicol,

y el gen *sacB* que codifica para una enzima levansucrasa de *Bacillus subtilis*, la cual transforma la sacarosa a levano, un polímero tóxico para *E. coli*. Las bacterias transformadas serán sembradas en placas de agar LB suplementadas con cloranfenicol y tetraciclina, y se incubarán a 30°C. Adicionalmente, se verificará la correcta inserción del marcador y la presencia del plásmido Psim5-tet mediante amplificación por PCR y secuenciación por Sanger (15, 16).

Posteriormente, se llevará a cabo un segundo evento de recombinación homóloga para la eliminación del casete *cat-sacB* y la introducción de la mutación deseada (en el caso de la reconstrucción en la cepa salvaje) o del alelo revertido (complementación en los mutantes resistentes). Para ello, se generará mediante amplificación por PCR un fragmento de DNA doble cadena que contendrá el cambio deseado y estará flanqueado por brazos de homología del lugar de inserción. Este será introducido mediante electroporación y se realizará la siembra en placas de agar LB suplementadas con 5% de sacarosa, para seleccionar aquellos clones donde el segundo evento de recombinación se haya completado con éxito (13, 15).

Asimismo, las bacterias resultantes serán incubadas a 37°C en medio libre de antibióticos para curar el plásmido pSIM5-Tet (17).

Los clones obtenidos serán verificados mediante PCR y secuenciación Sanger. Finalmente, se evaluará la CMI para conocer el efecto de la mutación sobre el fenotipo resistente. Adicionalmente, se confirmará la pérdida del plásmido pSIM5-Tet mediante amplificación por PCR.

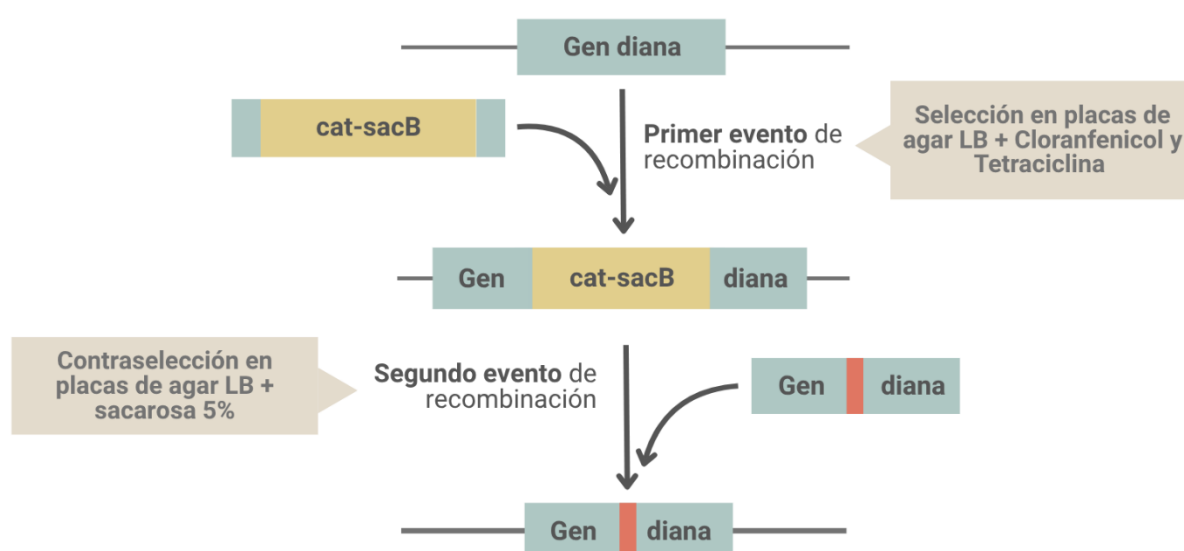


Figura 3: Representación gráfica del primer y segundo evento de recombinación homóloga. Adaptado de (15), creado con Biorender.com.

3.6. Evaluación de la eficacia de los compuestos en *Galleria mellonella*

Se evaluará la eficacia *in vivo* de las combinaciones bacteria-compuesto más prometedoras utilizando el modelo de invertebrado *Galleria mellonella*. Previamente al ensayo de eficacia, se determinará la dosis infectiva óptima para cada cepa bacteriana mediante la inoculación de larvas con un volumen fijo de 10 μ L de suspensiones bacterianas a concentraciones crecientes. Se seleccionará aquella dosis que induzca una mortalidad progresiva a las 72 h de seguimiento sin causar letalidad inmediata, permitiendo así discriminar el efecto terapéutico de los compuestos (6).

Para los ensayos de eficacia se seleccionarán 10 larvas en una etapa de desarrollo similar y con peso homogéneo (250-350 mg) para cada grupo. Las larvas serán infectadas con 10 μ L de la suspensión bacteriana correspondiente, administrada mediante la inyección en el hemocele a través de la última pseudopata izquierda. La concentración del inóculo será confirmada mediante un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en placas de agar. El tratamiento con el compuesto seleccionado se administrará 2 h después de la infección (6, 18).

Se incluirán los siguientes grupos experimentales: (i) control negativo inoculado con PBS, (ii) grupo infectado no tratado, (iii) grupo infectado y tratado con el compuesto candidato, y (iv) grupo no infectado tratado únicamente con el compuesto. Cada uno de los grupos estará constituido por un mínimo de 10 larvas. Las larvas se incubarán a 37 °C en oscuridad y se monitorizará su supervivencia cada 24 h durante 72 h. Los resultados se representarán en un gráfico mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre grupos se analizarán mediante test de log-rank. Se considerarán significativos valores de $p < 0,05$. Para asegurar la reproducibilidad, los experimentos se realizarán por triplicado utilizando diferentes lotes de larvas (19).

La carga bacteriana en el interior de las larvas de *G. mellonella* se evaluará utilizando las concentraciones de inóculo optimizados anteriormente. Se incluirán los siguientes grupos experimentales: (i) control negativo inoculado con PBS, (II) grupo infectado, pero no tratado, (iii) grupo infectado y tratado con el compuesto de estudio. De manera similar se infectarán 10 larvas para cada grupo. y para los grupos determinados, se administrará el tratamiento con los diferentes compuestos a las 2h. Las larvas serán incubadas en placas de Petri a 37 °C. En los tiempos establecidos (A las 24, 48 y 72 h post-infección), se seleccionarán aleatoriamente 2-4 larvas por condición experimental en cada punto temporal. Cada larva será sacrificada o anestesiada mediante la exposición a frío y posteriormente, desinfectadas externamente con etanol. A continuación, cada larva será homogeneizada individualmente en PBS estéril. Tras centrifugar el homogenado, se realizarán diluciones seriadas del homogeneizado, que se sembrarán en placas de agar LB. Este procedimiento ilustrará

la dinámica de la infección y el efecto del tratamiento sobre la reducción de la carga bacteriana en distintos tiempos post-infección (19, 20).

3.7. Plan de contingencia

En cuanto a la selección de compuestos activos tras el cribado, en caso de no obtenerse un número suficiente de compuestos con un porcentaje de inhibición igual o superior al 90 %, se ampliarán los criterios de selección para incluir aquellos compuestos que presenten porcentajes de inhibición comprendidos entre el 60 % y 90 %. Esta estrategia permitirá disponer de un número adecuado de candidatos para las siguientes fases del estudio.

En caso de no obtener mutantes resistentes mediante ninguna de las estrategias propuestas, se realizará un análisis transcriptómico mediante RNA-seq en condiciones de exposición al compuesto para identificar expresión diferencial de genes, tal como se ha descrito en estudios previos de respuesta bacteriana a compuestos antimicrobianos (21, 22).

Bibliografía:

1. Yason JA, Koh KARP, Tan KSW. 2018. Viability Screen of LOPAC1280 Reveals Phosphorylation Inhibitor Auranofin as a Potent Inhibitor of Blastocystis Subtype 1, 4, and 7 Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00208-18.
2. Peyclit L, Baron SA, Hadjadj L, Rolain J-M. 2022. In Vitro Screening of a 1280 FDA-Approved Drugs Library against Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Bacteria. *Antibiotics* 11:291.
3. Di Bonaventura G, Lupetti V, Di Giulio A, Muzzi M, Piccirilli A, Cariani L, Pompilio A. Repurposing High-Throughput Screening Identifies Unconventional Drugs with Antibacterial and Antibiofilm Activities against *Pseudomonas aeruginosa* under Experimental Conditions Relevant to Cystic Fibrosis. *Microbiol Spectr* 11:e00352-23.

4. Tarín-Pelló A, Suay-García B, Pérez-Gracia M-T. 2022. Antibiotic resistant bacteria: current situation and treatment options to accelerate the development of a new antimicrobial arsenal. *Expert Rev Anti Infect Ther* 20:1095–1108.
5. Tao J, Xiang J, Jiang M, Kuang S, Peng X, Li H. 2022. A Microtitre Plate Dilution Method for Minimum Killing Concentration Is Developed to Evaluate Metabolites-Enabled Killing of Bacteria by β -lactam Antibiotics. *Front Mol Biosci* 9:878651.
6. DeSarno AE, Parcell BJ, Coote PJ. 2020. Repurposing the anti-viral drug zidovudine (AZT) in combination with meropenem as an effective treatment for infections with multi-drug resistant, carbapenemase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Pathog Dis* 78:ftaa063.
7. Di Bonaventura G, Lupetti V, Di Giulio A, Muzzi M, Piccirilli A, Cariani L, Pompilio A. 2023. Repurposing High-Throughput Screening Identifies Unconventional Drugs with Antibacterial and Antibiofilm Activities against *Pseudomonas aeruginosa* under Experimental Conditions Relevant to Cystic Fibrosis. *Microbiol Spectr* 11:e0035223.
8. Pandey M, Singh AK, Thakare R, Talwar S, Karaulia P, Dasgupta A, Chopra S, Pandey AK. 2017. Diphenyleneiodonium chloride (DPIC) displays broad-spectrum bactericidal activity. *Sci Rep* 7:11521.
9. She P, Li Y, Li Z, Liu S, Yang Y, Li L, Zhou L, Wu Y. Repurposing 9-Aminoacridine as an Adjuvant Enhances the Antimicrobial Effects of Rifampin against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr* 11:e04474-22.
10. Ishak A, Mazonakis N, Spornovasilis N, Akinosoglou K, Tsioutis C. 2024. Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *J Antimicrob Chemother* 80:1–17.

11. Imai Y, Meyer KJ, Iinishi A, Favre-Godal Q, Green R, Manuse S, Caboni M, Mori M, Niles S, Ghiglieri M, Honrao C, Ma X, Guo JJ, Makriyannis A, Linares-Otoya L, Böhringer N, Wuisan ZG, Kaur H, Wu R, Mateus A, Typas A, Savitski MM, Espinoza JL, O'Rourke A, Nelson KE, Hiller S, Noinaj N, Schäberle TF, D'Onofrio A, Lewis K. 2019. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature* 576:459–464.
12. She P, Wang Y, Li Y, Zhou L, Li S, Zeng X, Liu Y, Xu L, Wu Y. 2021. Drug Repurposing: In vitro and in vivo Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Bithionol Against *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Front Microbiol* 12.
13. Pereira C, Warsi OM, Andersson DI. 2023. Pervasive Selection for Clinically Relevant Resistance and Media Adaptive Mutations at Very Low Antibiotic Concentrations. *Mol Biol Evol* 40:msad010.
14. Wistrand-Yuen E, Knopp M, Hjort K, Koskiniemi S, Berg OG, Andersson DI. 2018. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nat Commun* 9:1599.
15. Murphy KC. λ Recombination and Recombineering. *EcoSal Plus* 7:10.1128/ecosalplus.ESP-0011–2015.
16. Näsvall J, Knöppel A, Andersson DI. 2017. Duplication-Insertion Recombineering: a fast and scar-free method for efficient transfer of multiple mutations in bacteria. *Nucleic Acids Res* 45:e33.
17. Diner EJ, Garza-Sánchez F, Hayes CS. 2011. Genome Engineering Using Targeted Oligonucleotide Libraries and Functional Selection. *Methods Mol Biol* 765:71–82.

18. Cools F, Torfs E, Aizawa J, Vanhoutte B, Maes L, Caljon G, Delputte P, Cappoen D, Cos P. 2019. Optimization and Characterization of a *Galleria mellonella* Larval Infection Model for Virulence Studies and the Evaluation of Therapeutics Against *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol* 10:311.
19. Insua JL, Llobet E, Moranta D, Pérez-Gutiérrez C, Tomás A, Garmendia J, Bengoechea JA. 2013. Modeling *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis by Infection of the Wax Moth *Galleria mellonella*. *Infect Immun* 81:3552–3565.
20. Silva LN, Da Hora GCA, Soares TA, Bojer MS, Ingmer H, Macedo AJ, Trentin DS. 2017. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. *Sci Rep* 7:2823.
21. Bie L, Zhang M, Wang J, Fang M, Li L, Xu H, Wang M. Comparative Analysis of Transcriptomic Response of *Escherichia coli* K-12 MG1655 to Nine Representative Classes of Antibiotics. *Microbiol Spectr* 11:e00317-23.
22. Yuan Y, Hefner Y, Szubin R, Sung J, Palsson BO. 2026. Revealing transcriptomic responses in *Escherichia coli* during early antibiotic exposure. *mSystems* 11:e01584-25.

4. CRONOGRAMA

[illegible]

5. IMPACTO Y RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS ESPERADOS

5.1. Impacto social

El desarrollo de fármacos *de novo* es un proceso lento, incapaz de seguir el ritmo de la aparición de resistencias antimicrobianas. En este contexto, que el *drug repurposing* surge como una estrategia eficaz para acortar el tiempo entre la investigación y su aplicación clínica. Además, identificación de nuevas dianas moleculares puede impulsar el diseño de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. El descubrimiento de compuestos eficaces frente a patógenos multirresistentes contribuirá a reducir la incidencia de infecciones asociadas a estos microorganismos, cuyo control es crítico en entornos hospitalarios. Bajo el enfoque multidisciplinar One Health, el proyecto impactará positivamente en la salud humana, animal y ambiental.

5.2. Impacto económico

El reposicionamiento de fármacos representa una estrategia de elevada eficiencia económica frente a los altos costes y plazos del desarrollo de fármacos *de novo*. El uso de compuestos con perfiles de seguridad, farmacocinética y toxicología ya validados permite acortar significativamente las fases preclínicas. Asimismo, la identificación de nuevas terapias alternativas terapéuticas eficaces contra bacterias multirresistentes podría disminuir los costes derivados de tratamientos prolongados y hospitalizaciones.

5.3. Impacto científico

El proyecto generará conocimiento fundamental sobre nuevas dianas moleculares no descritas previamente. Asimismo, aportará información sobre la dinámica evolutiva bacteriana tras la exposición prolongada a concentraciones subinhibitorias, condición que simula escenarios de presión selectiva subóptima y permite anticipar rutas de resistencia clínica. Además, estos descubrimientos pueden sentar las bases para el diseño de futuras terapias combinadas basándose en la posible sinergia de estos compuestos con otros. Esta estrategia se alinea con los principios de las 3R mediante la validación in vivo utilizando *Galleria mellonella*.

6. ÉTICA

El proyecto se desarrollará siguiendo de manera estricta los criterios de bioética y bioseguridad vigentes. En el ámbito de la experimentación animal, la metodología se alineará con los principios de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) al emplear el modelo de invertebrado *Galleria mellonella*, lo que permitirá minimizar el uso de modelos animales.

Respecto a la bioseguridad, el manejo de la cepa modelo *Escherichia coli* K-12 MG1655 y de los aislados clínicos de *E. coli* se llevará a cabo bajo condiciones de contención en un laboratorio de Nivel de Bioseguridad 2 (NCB2). Se aplicarán rigurosamente las barreras de protección primaria y los protocolos de gestión, inactivación y eliminación de residuos biológicos y material genéticamente modificado (OGMs) resultante de los ensayos de mutagénesis, garantizando la protección del personal y la contención ambiental.

7. PRESUPUESTO

Items	Justificación/comentario	Coste (€)
Material fungible	Adquisición de librería comercial LOPAC1280 (Sigma-Aldrich) para el cribado y compuestos individuales seleccionados de 50 mg (Sigma-Aldrich). Antibióticos (cloranfenicol, tetraciclina), primers y plásmidos, sacarosa. Puntas de pipeta, tubos, material de electroforesis, placas microtiter y de Petri, cubetas electroporación, kits de extracción de DNA (DNeasy Tissue & Blood), PCR y plásmidos. Mantenimiento modelo <i>in vivo</i> de <i>Galleria mellonella</i> .	39.000
Adquisición de material inventariable (equipos)	Sustitución y actualización de pequeño equipamiento de uso diario en el laboratorio (micropipetas, microcentrifugas...)	4.000
Mantenimiento inventariable	Mantenimiento de equipamiento ya presente en el laboratorio (autoclave, cabinas de seguridad y calibración de micropipetas)	5.500
Servicios científicos-técnicos	Secuenciación de genoma completo (NGS) usando tecnología Illumina y secuenciación por Sanger	18.000

Participación en congresos y reuniones	Participación en congresos nacionales e internacionales, conferencias	5.000
Otros gastos (Publicaciones, licencias de software)	Publicación en open-access journals. Adquisición de programas para el análisis de las secuencias de ADN	6.500
TOTAL		78000