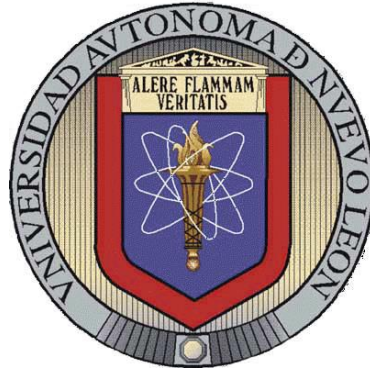


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS MreB Y LA  
FORMACIÓN DE FLAGELOS EN *Escherichia coli*, EN PRESENCIA DE  
CARVACROL**

**Por**

**LBG. ALONDRA MIROSLAVA TAMEZ HERNÁNDEZ**

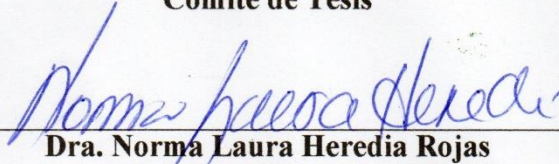
**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**ENERO, 2020**

**HOJA DE FIRMAS**

**ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS MreB Y LA  
FORMACIÓN DE FLAGELOS EN *Escherichia coli*, EN PRESENCIA DE  
CARVACROL**

**Comité de Tesis**



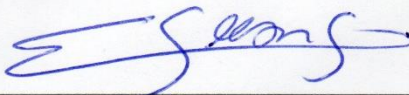
---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
**Presidente**



---

**Dr. José Ángel Merino Mascorro**  
**Secretario**



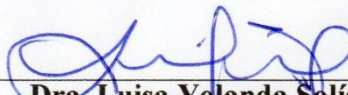
---

**Dr. Eduardo Franco Frías**  
**Vocal 1**



---

**Dr. José Santos García Alvarado**  
**Vocal 2**



---

**Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**  
**Vocal 3**

## **DEDICATORIA**

A Dios mi padre, porque solo el sabe el porque de las cosas, yo seguiré dejando que me guie como siempre lo ha hecho

A mi mama, porque sin ti nada de esto sería posible; gracias por ser mi mejor amiga.

A mi familia: Mi abuela Aurora, mi abuelo Manuel, mi bisabuela Aurora, mi tío Tomás y mi tía Aurora, siempre estaré en deuda por el apoyo que me han dado, gracias por todo su cariño

A ti, mi mejor amigo; porque siempre has estado para mi, gracias por tantos cafés Sergio. Siempre.

## **AGRADECIMIENTO**

A CONACYT por poseer los programas económicos y administrativos que facilitaron mi preparación académica durante la realización de este trabajo de investigación

A los doctores del Laboratorio de Bioquímica y genética de microorganismos por su apoyo orientación y consejos para la mejora continua de esta investigación: Dr.Santos, Dra Luisa, Dr. Angel, Dr. Eduardo y en especial a mi directora de tesis Dra Norma.

A la Dra Ma. Guadalupe Rojas verde del instituto de biotecnología, por estar siempre ahí para escucharme y apoyarme. Gracias Dra.

A mis amigos de laboratorio:

Yarita por siempre estar ahí, por tu amistad, por tantos cafés juntas.

Alberto gracias por siempre escucharme.

Anita por tu enorme ayuda siempre y tu amistad

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1 <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>5</b>
<b>3.1.1 Grupos patógenos de <i>E. coli</i> e incidencia</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1.2 Factores de virulencia</b> .....	<b>8</b>
<b>3.2 FUNCIÓN Y COMPOSICIÓN DEL FLAGELO</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3 BALSAS LIPÍDICAS Y PROTEÍNA MreB</b> .....	<b>11</b>
<b>3.4 ENSAMBLAJE DEL FLAGELO</b> .....	<b>12</b>
<b>3.5 IMPORTANCIA DEL FLAGELO</b> .....	<b>13</b>
<b>3.5.1 Movilidad tipo <i>swarming</i></b> .....	<b>14</b>
<b>3.6 CONTROL DE PATÓGENOS: ANTIMICROBIANOS NATURALES</b> ..	<b>14</b>
<b>3.6.1 Carvacrol</b> .....	<b>15</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>7.1 ÁREA DE TRABAJO</b> .....	<b>20</b>
<b>7.2 CEPAS</b> .....	<b>2</b>
<b>7.3 COMPUESTOS NATURALES</b> .....	<b>20</b>
<b>7.4 TRANSFORMACIÓN DE CEPAS Y RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA</b> .....	<b>20</b>

7.4.1	Diseño de fragmentos .....	20
7.4.2	Recombinación homóloga y transformación .....	21
7.4.3	Identificación de mutantes .....	21
7.5	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA .....	22
7.6	CONCENTRACION MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) .....	23
7.6.1	Preparación de soluciones de carvacrol .....	23
7.6.2	Ajuste del inóculo .....	23
7.6.3	Ensayo CMB .....	23
7.6.4	Curvas de crecimiento .....	23
7.7	ACTIVIDAD DEL CARVACROL EN LA FUNCIONALIDAD DEL FLAGELO .....	24
7.8	ANALISIS ESTADÍSTICO .....	24
8.	RESULTADOS.....	25
8.1	DISEÑO DE SECUENCIAS .....	25
8.2	GENERACION DE DOBLE MUTANTE.....	25
8.3	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA .....	26
8.4	CONCENTRACION MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) .....	27
8.5	CURVAS DE CRECIMIENTO .....	28
8.6	MOVILIDAD TIPO SWARMING .....	28
9.	DISCUSION.....	29
10.	CONCLUSIONES.....	36
11.	PERSPECTIVAS .....	37
12.	BIBLIOGRAFIA.....	38
	RESUMEN BIOGRAFICO.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Oligonucleótidos diseñados en este estudio para la identificación de las mutantes. .....	<b>22</b>
<b>Tabla 2:</b> Concentración mínima bactericida (CMB) del carvacrol para la cepa mutante y la cepa silvestre. ....	<b>27</b>
<b>Tabla 3:</b> Efecto de las concentraciones subinhibitorias de carvacrol en el diámetro de crecimiento de las colonias swarming de <i>E. coli</i> K12 MG1655 cepa silvestre y mutante ....	<b>28</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Componentes del flagelo bacteriano. ....	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b> Diseño de gblocks empleados en la recombinación homóloga. ....	<b>25</b>
<b>Figura 3</b> Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los fragmentos de interés en <i>E. coli</i> MG1655 doble mutante (C5). ....	<b>26</b>
<b>Figura 4</b> Microscopía de fluorescencia de los cultivos de <i>E. coli</i> MG1655 doble mutante. ....	<b>27</b>

## 1. RESUMEN

*Escherichia coli* es una bacteria considerada como microbiota normal en el intestino humano; sin embargo, algunas cepas son causantes de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año. Esto es debido a la existencia de seis grupos patogénicos de la especie (conocidos como patotipos) que pueden provocar diversos tipos de enfermedades en el tracto intestinal. El carvacrol es un compuesto que afecta la integridad de la membrana bacteriana al alterar su potencial y permeabilidad. Esta estructura se encuentra dividida en microdominios funcionales de membrana, caracterizados por la presencia de la proteína MreB la cual crea regiones con fluidez incrementada (RIFs), que están involucradas en la distribución de lípidos y proteínas integrales de membrana. Una de estas proteínas integrales es el flagelo bacteriano, componente clave en algunos tipos de movilidad como la de tipo *swarming*, la cual permite la colonización y persistencia en diferentes ambientes. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de mutantes con proteínas de fusión fluorescentes para los genes *mreB* y *fliC* de *E. coli*, a fin de analizar alteraciones en la membrana y el flagelo al estar en contacto con carvacrol. Se diseñaron secuencias de DNA de doble cadena (gblocks) que se integraron en el genoma de *E. coli* MG1655 mediante recombinación homóloga, generando una doble mutante con las proteínas de fusión (MreB-sfGFP, Flagelina-BFP). Se evaluó la concentración mínima bactericida de carvacrol para la mutante encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre la cepa silvestre y la doble mutante, obteniéndose una CMB más elevada para esta última ( $0.43 \pm 0.03$  mg/ml). Asimismo, se evaluó la funcionalidad del flagelo mediante ensayo de *swarming*, encontrándose que las concentraciones subinhibitorias de carvacrol promovieron el movimiento tipo *swarming* tanto en la cepa silvestre como la mutante. Mediante el presente trabajo se generó de manera correcta una doble mutante con proteínas de fusión, para su observación por microscopía fluorescente; la cual fue funcional y presentó un comportamiento similar a la silvestre, pudiendo así ser de utilidad en ensayos futuros.



## I. ABSTRACT

*Escherichia coli* is a bacterium considered as a normal microbiota in the human intestine; however, some strains are responsible for approximately 630 million cases of diarrhea in the world, and between 5 to 6 million deaths per year. This is due to the existence of six pathogenic groups of the species (also known as patotypes) that can cause various types of diseases in the intestinal tract. Carvacrol is a compound that affects the integrity of the bacterial membrane by altering its potential and permeability. This structure is divided into functional membrane microdomains, characterized by the presence of the MreB protein which creates regions with increased fluidity (RIFs), which are involved in the distribution of lipids and integral membrane proteins. One of these integral proteins is the bacterial flagellum, a key component in some types of mobility such as swarming, which allows colonization and persistence in different environments. The objective of this work was the development of mutants with fluorescent fusion proteins for the *mreB* and *fliC* genes of *E. coli*, in order to analyze alterations in the membrane and the flagellum when carvacrol. Double-stranded DNA sequences (gblocks) that were integrated into the *E. coli* MG1655 genome by homologous recombination were designed, generating a double mutant with fusion proteins (MreB-sfGFP, Flagelin-BFP). The minimum carvacrol bactericidal concentration for the mutant was evaluated by finding significant differences ( $P < 0.05$ ) between the wild strain against the double mutant, obtaining a higher CMB for the latter ( $0.43 \pm 0.03$  mg / ml). Likewise, the functionality of the flagellum was evaluated by swarming test, finding that subinhibitory concentrations of carvacrol promoted swarming movement in both the wild and mutant strains. Through this work, a double mutant with fusion proteins was correctly generated, for observation by fluorescent microscopy; which was functional and presented a behavior similar to the wild, thus being able to be useful in future trials.

## 2. INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática es una estructura compleja, esencial para proteger al organismo de su ambiente. Esta estructura está conformada por una bicapa fosfolipídica la cual rodea y contiene al citoplasma (Silhav *et al.* 2010). Además, es un sitio de anclaje de múltiples proteínas esenciales para la célula, y en donde la organización de sus lípidos y proteínas afecta a todos los procesos celulares (Grecco *et al.* 2011).

Debido a las afinidades fisicoquímicas de las diversas especies lipídicas presentes en la membrana, estas tienden a segregarse en microdominios membranales (Lingwood y Simons. 2010). Uno de estos microdominios lo constituyen las regiones con fluidez incrementada (RIFs por sus siglas en inglés), formadas por la interacción de la proteína MreB, con lípidos de la membrana citoplasmática.

La proteína MreB está implicada en el mantenimiento de la célula, la segregación cromosómica y los eventos de polarización celular en una variedad de especies bacilares como *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus* y *Escherichia coli* (Bendezú *et al.* 2009). Además, se cree que las RIFs están implicadas en la translocación de los constituyentes de otra estructura de gran relevancia para dichas especies, el flagelo (Alvarez & Georgellis, 2019)

El flagelo bacteriano es la estructura de movilidad procariota más estudiada, constituido por un filamento helicoidal con un motor en su base, el cual le permite girar a favor o en contra de las manecillas del reloj (Jarrell y McBride, 2008). Las bacterias flageladas presentan diversos tipos de movilidad, entre ellas la movilidad tipo *swarming*, que se presenta cuando se propagan en la superficie de un medio sólido (Harshey 1994).

Se ha observado que diversas especies como *Salmonella*, *Bordetella bronchiseptica*, *B. pertussis* y *E. coli* las cuales presentan este tipo de movilidad se favorecen durante las fases iniciales de infección, principalmente en el proceso de colonización, por esta capacidad de movimiento. Es por esto por lo que el entendimiento de los factores que influyen en la formación del flagelo es de interés para conseguir el establecimiento de mecanismos de bloqueo de dichos procesos de movilidad, disminuyendo de esta manera la capacidad virulenta de estas cepas.

Entre los microorganismos mencionados *E. coli* es el más estudiado, debido a que se encuentra presente en el intestino de la mayoría de los mamíferos, incluido el humano, como saprófito. Sin embargo, existen algunas cepas patogénicas las cuales algunas pueden producir toxinas causantes de enfermedades intestinales. Estas cepas se clasifican en grupos conocidos como patotipos, e incluyen *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC; Croxen *et al.* 2013), provocando diferentes patologías que en conjunto son conocidas como ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos).

Las ETAs han sido una importante preocupación para la salud pública. A fin de reducir los riesgos a la salud y las pérdidas económicas se ha incrementado el uso de productos naturales como fuente de compuestos antimicrobianos, reduciendo el uso de aditivos químicos. Los aceites esenciales, provenientes de plantas medicinales y especias son una fuente importante de compuestos antimicrobianos. Se ha reportado que el carvacrol, fenol monoterpénoide presente en el orégano (*Lippia graveolens*), posee actividad antimicrobiana contra cepas patogénicas de *E. coli* reduciendo la virulencia, movimiento tipo *swarming* y formación de biopelícula (García-Heredia *et al.* 2016). Esto pudiera ser de gran importancia para el control de estos microorganismos, ya que al bloquear el movimiento tipo *swarming*, pudiera disminuirse la colonización, y como consecuencia disminuir la virulencia de este patógeno.

En el presente estudio se buscó analizar el efecto del carvacrol en la morfología celular, a fin de establecer la localización y los cambios que se presenten en las RIFS, en la localización de las proteínas MreB y FliC.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 *Escherichia coli*

*E. coli* es un bacilo Gram negativo móvil, pertenece a la familia de las enterobacterias, anaerobio facultativo predominante en el colon humano (Chang *et al.* 2004). Es un miembro importante de la microbiota intestinal de humanos y animales, colonizando el intestino humano dentro de las primeras 40 horas de nacimiento mediante la adherencia de esta bacteria a la mucosa que cubre el intestino grueso (Kaper *et al.* 2004), teniendo papeles importantes como la síntesis de vitamina K y la mayoría de las vitaminas B solubles en agua (LeBlanc *et al.* 2013).

La amplia distribución de cepas de *E. coli* incluye tanto cepas avirulentas como patogénicas altamente especializadas (Kaper *et al.* 2004). Estas últimas se caracterizan por sus síntomas clínicos, mecanismos de patogenicidad, factores de virulencia o serotipos (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.* 2004).

Para determinar el grupo patogénico al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que varía continuamente y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez-Angeles 2002). La serotipificación de *E. coli* requiere de gran número de antisueros, por lo que se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando ensayos *in vitro* como, ensayos de adherencia en células Hep-2 y de toxigenicidad.

De forma general, está bien establecido que tres cuadros clínicos pueden ser provocados por las cepas patogénicas de *E. coli*: enfermedades entéricas/diarreas, infección del tracto urinario y sepsis/meningitis (Nataro y kaper 1998). Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea (DEC) se clasifican en seis patotipos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC).

### 3.1.1 Grupos patógenicos de *E. coli* e incidencia

*E. coli* enteropatógena (EPEC) fue el primer patotipo de las *E. coli* diarreogénicas que se descubrió; es causa importante de diarrea y muerte prematura en los niños, especialmente en los países en desarrollo. En un estudio en el 2010 de pacientes con diarrea hospitalizados en la India, EPEC fue responsable del 3.2% de la diarrea en niños menores de 5 años (Nair *et al.* 2010). Un fenotipo distintivo de EPEC incluye aquel que es capaz de producir lesiones de adherencia y esfacelamiento (A/E) en las cuales las bacterias se adhieren firmemente a la membrana de la célula hospedadora provocando una alteración de la superficie celular, lo que conduce a la destrucción de las microvellosidades (Ochoa y Contreras 2011).

*E. coli* enteroinvasiva (EIEC) se describió en 1944. Este patotipo provoca disentería bacilar, causando diarrea acuosa, con sangre y moco en adultos y niños. Sin embargo, se tienen menos reportes que otros agentes etiológicos en estudios de diarrea en todo el mundo. EIEC es altamente invasiva, empleando proteínas de adhesión para unirse y entrar en las células intestinales. Este grupo de bacterias no produce toxinas, pero daña gravemente la pared intestinal (Rico-Martínez, 1995), es descarboxilasa negativa, no móvil y lactosa negativa. En junio de 2014, se produjeron dos brotes de EIEC en Nottingham, Reino Unido, en donde se identificaron 157 casos probables; 27 fueron confirmados como EIEC O96:H19 (Newitt *et al.* 2016).

*E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las causas bacterianas más comunes de morbilidad y mortalidad asociadas con diarrea, particularmente entre bebés y niños pequeños en países en desarrollo. En el 2013, se estimó un total de 42,000 muertes a nivel mundial relacionadas con ETEC en niños menores de cinco años (Bourgeois *et al.* 2016). Las cepas de ETEC están compuestas por una gran cantidad de serotipos los cuales producen una variedad de factores de colonización y enterotoxinas. Una vez dentro del tracto gastrointestinal, ETEC se establece primero al adherirse al epitelio del intestino delgado a través de uno o más antígenos del factor de colonización o proteínas de superficie, y una vez que ya está establecido, ETEC expresa una o más enterotoxinas, provocando diarrea. Las enterotoxinas producidas por ETEC incluyen la enterotoxina termolábil (LT) y la termoestable (ST); (Sizemore *et al.* 2004).

En los últimos años el patotipo enterohemorrágico (EHEC) ha estado involucrado en brotes causados por contaminación en alimentos (CDC, 2017). El determinante de virulencia en EHEC es la toxina Shiga, o verotoxina, que produce efectos citotóxicos irreversibles en células Vero. EHEC puede producir dos diferentes toxinas Shiga (Stx 1 y Stx 2) y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. Estas toxinas son las responsables de la diarrea con sangre y de complicaciones graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH, Karpman *et al.* 2001).

La gran mayoría de las infecciones por EHEC son causadas por cepas pertenecientes a cinco serogrupos O, las más importantes comprenden O157, O26, O103, O111 y O145 (Eichhorn *et al.* 2015). El serotipo O157:H7 es el principal causante de brotes alimenticios en los Estados Unidos (Karmali *et al.* 2010) causando 73,000 casos anualmente.

Por otra parte, la primera asociación significativa de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) como patógeno se dio en el año de 1987 en Chile (Nataro *et al.* 1987). Este patotipo se ha asociado con diarrea endémica en niños, diarrea persistente, diarrea en pacientes VIH positivo, diarrea del viajero, brotes en agua/alimentos, así como diarrea esporádica (Harrington *et al.* 2006). En el 2008 tuvo lugar un brote de EAEC en Italia en un complejo vacacional en una granja, donde los invitados experimentaron gastroenteritis después de haber consumido queso no pasteurizado (Jensen *et al.* 2014). Su patogenicidad está determinada por su habilidad de colonizar el tracto intestinal empleando una fimbria de adherencia, provocando diarrea acuosa (Kaur *et al.* 2010).

Los miembros de este patotipo se caracterizan por la auto-aglutinación y la presencia de un patrón característico de adherencia conocido como “ladrillos apilados” en células HEp-2 (Nataro y Kaper 1998). Las cepas EAEC se adhieren a la mucosa intestinal formando una biopelícula; y algunos factores tales como adhesinas y toxinas contribuyen a la enfermedad, sin embargo, estos no son conservados en todas las EAEC, lo cual dificulta una definición fenotípica o el establecimiento de un modelo general de patogénesis (Bielaszewska *et al.* 2011).

*E. coli* de adherencia difusa (DAEC) fue el último patotipo del grupo de *E. coli* causante de diarrea (DEC) en ser reconocido. Se caracteriza por un patrón de adherencia difusa en

las células epiteliales cultivadas HeLa o HEp-2. Aproximadamente el 75% del grupo de DAEC lo constituye un grupo de cepas que albergan genes que codifican para las adhesinas Afa/Dr las cuales son capaces de causar enfermedades diarreicas en individuos (Mansan-Almeida *et al.* 2013). El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con cuadros diarreicos, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los síntomas que se presentan incluyen diarrea sin sangre y sin leucocitos. En un estudio en México DEC fueron los principales agentes bacterianos identificados entre niños y DAEC fue el grupo más prevalente (Patz-Vargas *et al.* 2013).

### **3.1.2 Factores de virulencia**

Los factores de virulencia bacteriana permiten a un huésped replicarse y diseminarse dentro del hospedero al subvertir o evadir las defensas del huésped, mediante dos mecanismos principales que ayudan a la bacteria a sobrevivir:

- Causando daños al huésped que comprenden a las toxinas bacterianas, incluyendo toxinas, hemolisinas y proteasas.
- Ayudando y promoviendo la colonización del huésped, comprendiendo adhesinas, invasinas y factores antifagocíticos.

Un grupo importante de factores de virulencia son las toxinas bacterianas. Estos se dividen en dos grupos: endotoxinas y exotoxinas (Ramachandran, 2014).

El lipopolisacárido (LPS), o endotoxina, es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas por lo que no es liberado activamente de la célula, causa fiebre, shock y otros síntomas generalizados. Este consta de 3 partes: polisacárido específico, core y lípido A. El lípido A es la endotoxina bacteriana, y es el responsable del desencadenamiento de la respuesta inmunitaria (Biswas y Lopez-Collazo 2009).

Las exotoxinas son polipéptidos que son liberados por la célula, un ejemplo es el determinante de virulencia en EHEC, la toxina Shiga, o verotoxina, que produce efectos citotóxicos irreversibles en células Vero (Konowalchuk *et al.* 1977). EHEC puede producir dos diferentes toxinas Shiga (Stx 1 y Stx 2) y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma (Karpman *et al.* 2001).

En EAEC se han encontrado las toxinas plasmáticas Pet y EST-1, esta última es un péptido conformado por 38 aminoácidos que provoca la acumulación celular de GMPc (Sukumar *et al.*, 1995). Pet es una proteína del tipo serina proteasa autotransportadora, codificada en el plásmido PAA, que presenta actividad de enterotoxina y citotóxica contra células epiteliales intestinales en cultivo (Chart *et al.* 1997, Czeczulin *et al.* 1999). Existen otras toxinas descritas como la proteína Pic, una mucinasa involucrada en la colonización intestinal; la proteína dispersina, la cual se une al lipopolisacárido neutralizando la carga negativa de la célula (Chaudhuri *et al.* 2010).

Los factores que ayudan y promueven la colonización del huésped incluyen la formación de biopelículas, la movilidad (principalmente aquella impulsada por flagelos), y las adhesinas, moléculas de superficie del patógeno que contribuyen a la fijación entre la bacteria y la superficie del tejido del hospedero, específicamente a receptores complementarios (estas son por lo general lectinas) (Boll *et al.* 2017).

La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas y pueden estar ubicadas en la glucocálix, o en otras estructuras de la superficie microbiana; como por ejemplo el pili, fimbrias y flagelos. EAEC presenta hemaglutinación de eritrocitos humanos, debido a la presencia de una fimbria o adhesina flexible, llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I) codificada en el plásmido de virulencia pAA (Czeczulin *et al.* 1997).

Las biopelículas están formadas principalmente por colonias de bacterias incrustadas en una matriz polimérica extracelular o glucocálix, las cuales son capaces de fijarse a superficies bióticas y abióticas (Nazar 2007). Estas asociaciones bacterianas tienen importancia debido a que confieren resistencia a los desinfectantes y antibióticos, proveyendo de protección a la célula (Parsek y Singh 2003).

Por último, el término movilidad bacteriana se refiere a la capacidad que tiene la bacteria de desplazarse aleatoriamente de un lugar a otro; el principal medio de motilidad son los flagelos. Estos son apéndices largos los cuales se encuentran fijos a la célula por uno de sus extremos y libres por el otro. El flagelo bacteriano afecta la virulencia bacteriana de diversas maneras, proporcionando movilidad hacia los objetivos del huésped, promoviendo la formación temprana de biopelículas y por lo tanto, la supervivencia



bacteriana, secretando factores de virulencia y promoviendo la adherencia y la invasión (Moens y Vanderleyden, 1996).

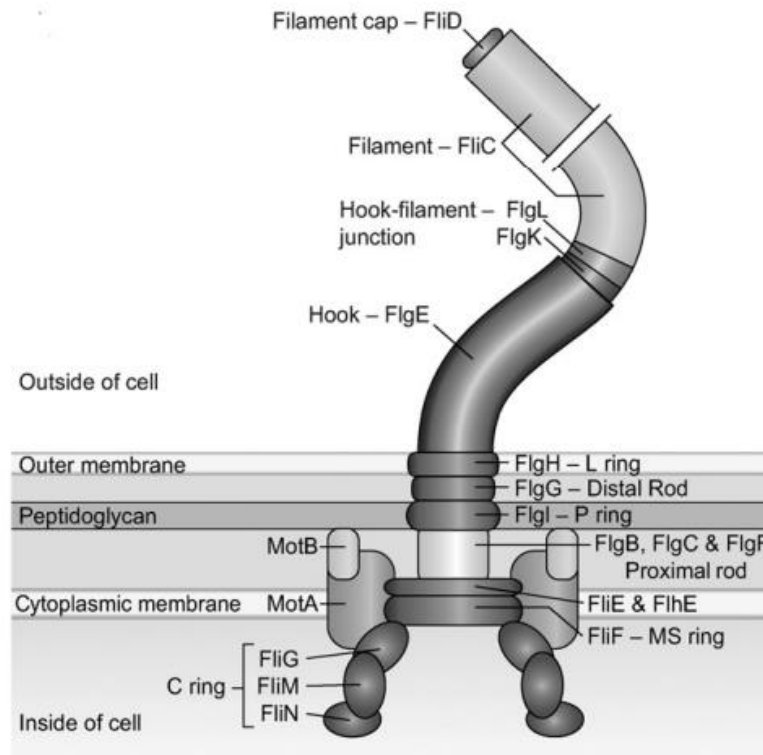
### 3. 2 FUNCIÓN Y COMPOSICIÓN DEL FLAGELO

El flagelo es la estructura de movilidad procariota usada tanto en ambientes acuosos (Jarrell y McBride 2008), como en sólidos (movilidad tipo swarming; Diepold y Armitage 2015).

La estructura del flagelo bacteriano consta de tres componentes principales, un filamento helicoidal, un gancho y un cuerpo basal junto con los componentes del motor (Figura 1):

- a) El filamento es un polímero de proteína flagelina (*fliC*), el cual termina en una cubierta (*fliD*).
- b) El gancho tiene un diámetro mayor que el filamento y se encuentra cerca de la superficie de la célula. Es el vínculo entre el cuerpo basal y el filamento. Su función es transmitir el movimiento del cuerpo basal al filamento.
- c) El cuerpo basal se encuentra embebido en la pared celular en las bacterias Gram negativas, y consta de 4 anillos y una barra, estos anillos se encuentran ubicados en diferentes regiones de la membrana. El motor rotatorio consiste en un estátor (MotA y MotB) y una barra (*flgB*, *flgF* y *flgG*, Copeland y Weibel, 2009).

La flagelina, codificada por el gen *fliC*, comprende cuatro dominios; dos dominios centrales de filamentos (D0, D1) y dos dominios de regiones hipervariables (D2, D3; Terashima *et al.* 2008). Las regiones terminales de las subunidades de flagelina están involucradas en la formación del filamento, mientras que la región central hipervariable que forma el dominio D3 está expuesta en la superficie del filamento (Yonekura *et al.* 2003). Este dominio no está en contacto con subunidades adyacentes y no tiene un rol significativo en la construcción de la estructura del filamento (Muskotál *et al.* 2010), por lo cual el dominio D3 es un blanco óptimo para la realización de estudios de ingeniería genética ya que puede ser removido o modificado sin afectar la actividad de auto ensamblaje.



**Figura 1-** Componentes del flagelo bacteriano (Copeland y Weibel, 2009).

El flagelo posee balsas lipídicas, las cuales se caracterizan por estar enriquecidas de lípidos específicos y, además, anclar proteínas particulares. Recientemente, se ha demostrado que *fliC* de STEC (*E. coli* productoras de toxina Shiga) está implicada en la invasión celular a través de estas balsas lipídicas (Rogers *et al.* 2012).

### 3.3 BALSAS LIPÍDICAS Y PROTEÍNA MreB

Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana eucariótica los cuales están enriquecidas en colesterol (32%) y esfingolípidos (14%), a niveles incrementados de hasta 50% comparándose con la membrana plasmática (Anchisi *et al.* 2013, Spira *et al.* 2012). Recientemente se demostró que las bacterias también pueden organizar muchas cascadas de transducción de señales y transporte de proteínas en microdominios funcionales de membrana (FMM) constituidos por lípidos específicos; es decir, las membranas bacterianas contienen balsas lipídicas similares a las encontradas en células eucariotas (Lingwood y Simons 2010).

Un aspecto crucial de las balsas lipídicas es la incorporación o exclusión de proteínas, basándose en su afinidad por estos dominios; siendo esta organización esencial para su función (Kraft 2013), una de estas proteínas es la proteína MreB. En *E. coli* MreB es la única proteína tipo actina conocida, posee motivos pertenecientes a la superfamilia de actina; presentando una estructura terciaria similar a la actina eucariótica (Van den Ent *et al.* 2001). Diversos estudios demostraron su localización debajo de la membrana citoplasmática en filamentos cortos, los cuales se mueven alrededor de la circunferencia de la célula, formando parte de la maquinaria de síntesis de la pared celular bacteriana (Jones *et al.* 2001, Domínguez-Escobar *et al.* 2011), siendo en *E. coli* necesaria para mantener su forma de bastón (Wachi *et al.* 1987).

Se ha observado que el movimiento activo y dirigido de MreB tiende a estimular la difusión de proteínas en la membrana celular (Strahl *et al.* 2014) creando regiones específicas con fluidez incrementada (RIFs), las cuales están involucradas en la distribución de lípidos y proteínas integrales de membrana; entre estas las proteínas que conforman el flagelo de la bacteria. Se han reportado que la delección del gen *mreb* y sus homólogos *mbI* y *mreBH*, provocan una disipación de las RIFs, disminuyendo los sitios de fluidez membranar (Salije *et al.* 2011).

### **3.4 ENSAMBLAJE DEL FLAGELO**

El ensamblaje del flagelo se realiza del interior al exterior de la célula de una manera altamente organizada. El cuerpo basal es el primer intermedio estructural construido dentro de la bicapa lipídica. En este se encuentran las proteínas motoras, que son canales iónicos que recogen la energía para la rotación flagelar. Una varilla atraviesa el cuerpo basal y el peptidoglicano (y la membrana externa en el caso de bacterias Gram negativas) hacia el exterior de la célula. Se agrega a la varilla a un gancho flexible, que cambia el ángulo de rotación y sirve como base para el filamento. El filamento es la última estructura ensamblada y forma una hélice semirrígida (Chevance y Hughes 2008). Los genes que codifican para los componentes flagelares se expresan aproximadamente en el mismo orden en el que se ensamblan, y las proteínas reguladoras maestras se ubican encima de toda la jerarquía para controlar la expresión génica flagelar (Macnab 1992).

Dentro del cuerpo basal, un aparato de secreción de tipo III secreta subunidades de la varilla en forma de eje que se extiende a través del peptidoglicano y la membrana externa (si está presente). Posteriormente, se polimeriza un gancho curvo corto de aproximadamente 200 subunidades de la proteína estructural de gancho. Finalmente, el filamento helicoidal largo se polimeriza a partir de aproximadamente 20,000 unidades de la proteína estructural llamada flagelina (Jones *et al.* 2001).

### **3.5 IMPORTANCIA DEL FLAGELO**

En muchas especies patógenas, los flagelos son generalmente aceptados como factores de virulencia importantes; se ha demostrado que la expresión, así como la represión de la flagelación y la virulencia están vinculadas (Moens y Vanderleyden, 1996).

La expresión de flagelos bacterianos es necesaria para una máxima adherencia, colonización y posterior invasión. El gen *fliC*, que codifica para la flagelina, se encuentra relacionado con la patogenicidad en diferentes serotipos de *E. coli* (Haiko y Wikström, 2003). Mahajan *et al.* (2008) reportaron que la eliminación de *fliC* en EPEC provocó que la célula no pudiera adherirse al tejido intestinal, causando la reducción de su patogenicidad.

El flagelo puede actuar directamente como una adhesina, pero también puede afectar la virulencia por otros medios. La movilidad hacia una célula huésped es un requisito previo para la adhesión y la invasión, y los flagelos pueden desempeñar un papel esencial en la colonización al facilitar la motilidad bacteriana. El flagelo también puede contribuir a la virulencia mediante la regulación de la expresión de otros factores de virulencia (Duan *et al.* 2013).

En muchas especies bacterianas, el flagelo es un factor de virulencia reconocido, ya que se ha observado que muchas cepas no flageladas son menos virulentas. En la EHEC O113:H21 productora de Shiga-toxina, un mutante *fliC* colonizó el intestino de ratones tratados con estreptomicina tan eficientemente como la cepa silvestre; sin embargo, mostró una capacidad reducida para formar la asociación íntima típica con el epitelio colónico y mostró ser menos virulenta que la cepa silvestre (Rogers *et al.* 2006).

La estructura y la implantación de los flagelos parecen estar relacionadas con los entornos específicos en los que viven las células. En algunos casos, las bacterias incluso adaptan su patrón de flagelación en respuesta a las condiciones ambientales en que se encuentran. La diferenciación de células swarming es un ejemplo notable de este fenómeno (Moens y Vanderleyden 1996).

### **3.5.1 Movilidad tipo *swarming***

Diversas bacterias flageladas presentan un tipo de movilidad conocida como *swarming* (Harshey, 1994). Este tipo de movilidad requiere un medio sólido o semisólido rico en energía; en concentraciones de agar del 0.3% se ha forzado este tipo de movimiento (Kearns 2010). Además, el movimiento tipo *swarming* requiere de la secreción de agentes lubricantes o una tensión superficial reducida (Chen *et al.* 2007; Copeland y Weibel 2009).

Existen diversos fenómenos relacionados con la movilidad tipo swarming que se pueden observar, el swarm lag se presenta en las células crecidas en medio líquido posteriormente inoculadas en medio sólido, permaneciendo inmóviles por un tiempo en el punto de inoculación; este fenómeno sucede antes de la expansión del swarming (Kearns y Losick 2003, Wang *et al.* 2004). Esta latencia puede representar un periodo de adaptación para las células en el cual se vuelven eficientes fisiológicamente para la movilidad swarming (Kearns y Losick 2003).

La capacidad de la *E. coli* patógena para causar infecciones se ve reforzada por la movilidad tipo swarming, ya que permite la colonización y la persistencia en diferentes ambientes (García-Heredia *et al.* 2016).

## **3.6 CONTROL DE PATÓGENOS: ANTIMICROBIANOS NATURALES**

Debido a todo lo anterior, el prevenir o minimizar la contaminación en alimentos por microorganismos es una de las mejores opciones a fin de reducir riesgos a la salud. Actualmente la inactivación térmica, así como conservadores químicos, están entre los métodos principales para el control bacteriano (García-Heredia *et al.* 2016).

El uso de productos naturales como compuestos antibacterianos parece ser una alternativa para controlar la presencia de microorganismos patógenos y extender la vida de anaquel de alimentos procesados (Dorman y Deans, 2000). De entre los productos naturales se

encuentran los aceites esenciales provenientes de especias y plantas medicinales las cuales han demostrado presentar actividad antimicrobiana (Klein *et al.* 2013).

Los aceites esenciales son productos naturales concentrados sintetizados por plantas aromáticas como metabolitos secundarios. Son líquidos volátiles, solubles en lípidos y solventes orgánicos con una densidad menor a la del agua. Estos aceites presentan una mezcla variada de compuestos, pero principalmente terpenoides (especialmente monoterpenos C10) y sesquiterpenos (C15), aunque también presentan diterpenos (C20), además de una variedad de compuestos con nitrógeno y sulfuro, y cumarinas (Bakkali *et al.* 2008). Poseen una amplia gama de metabolitos secundarios los cuales pueden inhibir o reducir el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos. Sus principales blancos son la membrana y el citoplasma, y pueden llegar a alterar completamente la morfología de las células (De Martino *et al.* 2009).

Compuestos activos tales como el timol, eugenol y en particular el carvacrol, han demostrado provocar una alteración en la membrana celular, inhibición de la actividad ATPasa y la liberación de ATP intracelular y otros constituyentes de diversos microorganismos como *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, y *Staphylococcus aureus* (Cetin-Karaca H. 2011).

### **3.6.1 Carvacrol**

El carvacrol es un fenol monoterpenoide presente principalmente en los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens*). Se caracteriza por su efecto en las células microbianas, provocando daño funcional y estructural a las membranas (Sikkema *et al.* 1995), lo cual trae como consecuencia el incremento en la permeabilidad.

Este compuesto es uno de los pocos componentes de los aceites esenciales que tiene un efecto desintegrador sobre la membrana externa de las bacterias Gram negativas (La Storia *et al.* 2011). Causa la liberación de LPS (Dorman y Deans, 2000), y también actúa sobre la membrana citoplásmica para alterar el transporte de iones. Su actividad parece estar relacionada con la presencia de un grupo hidroxilo que puede funcionar como un portador

transmembranal de cationes monovalentes al transportar  $H^+$  al citoplasma de la célula y  $K^+$  hacia el exterior (Ben *et al.* 2006).

El modo de acción del carvacrol parece ser el incremento de la fluidez y la permeabilidad de las membranas. Cuando las células microbianas están expuestas a carvacrol, pueden cambiar su composición de ácidos grasos de membrana (Ultee *et al.* 2010). Este es un mecanismo bien conocido que permite a las células mantener una estructura y función de membrana óptimas.

La alteración de la composición de los ácidos grasos en respuesta a carvacrol podría afectar no solo la fluidez de la membrana sino también a su permeabilidad (Di Pasqua *et al.* 2007). El efecto de carvacrol sobre la permeabilidad de la membrana se confirmó al monitorear la salida de  $H^+$ ,  $K^+$ , carboxifluoresceína, ATP y presencia de ácido nucleico (Xu *et al.* 2008). También se ha reportado que el carvacrol afecta las enzimas periplásmicas y las proteínas de membrana, pero también puede tener blancos intracelulares (Horváth *et al.* 2007).

Este compuesto inhibió la síntesis de otra proteína microbiana, la flagelina, dando lugar a células sin flagelos que posteriormente exhibieron una motilidad disminuida. Sin embargo, incluso las células con flagelos mostraron una disminución de la motilidad que dependía de la cantidad de carvacrol, lo que indicó que el compuesto también disminuyó la fuerza motriz de protones necesaria para impulsar el movimiento flagelar (Gabel y Berg 2003).

Du *et al.* (2008) evaluaron la actividad antimicrobiana del carvacrol contra cepas de *E. coli* O157:H7 al añadirse en la preparación de películas antimicrobianas elaboradas a partir de manzana, observando efectos inhibitorios del crecimiento bacteriano a la concentración de 1.0%. De manera similar, García-Heredia *et al.* (2016) evaluaron el efecto de concentraciones menores a las mínimas bactericidas de extractos naturales, uno de estos el carvacrol sobre *E. coli* O157:H7, EHEC O42 y O157:H7 observando que se veía afectada la movilidad tipo swarming, formación de biopelícula y virulencia.

## 4. JUSTIFICACIÓN

*E. coli* es una bacteria considerada como parte de la microbiota normal en el intestino humano; sin embargo, algunas de sus cepas, que pertenecen a seis grupos patogénicos de la especie las cuales pueden provocar diversos tipos de enfermedades en el tracto intestinal, son causantes de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo anualmente.

Las cepas patogénicas de *E. coli* poseen algunas estructuras que participan en los primeros pasos de la invasión intestinal, colonización y la persistencia en diferentes ambientes aumentando la virulencia de algunos patotipos. Se ha observado que la proteína MreB crea filamentos asociados a membrana, los cuales coordinan la síntesis de la pared celular, creando regiones membranales con fluidez incrementada (RIFs), y la interferencia con estos dominios lipídicos afectan la homeostasis lipídica global y la localización de las proteínas de membrana. Dichas regiones están involucradas en la translocación de los constituyentes del flagelo, modificando entonces el swarming, y afectando la capacidad de adhesión a la célula huésped.

Algunos patotipos de *E. coli*, presentan elevada resistencia a antibióticos, especialmente aquellos relacionados a  $\beta$ -lactamasa por lo que el uso de antimicrobianos naturales es una alternativa para lograr el control efectivo de estos microorganismos. El carvacrol es un fenol monoterpénico presente en el orégano el cual ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra *E. coli*. Por lo que en el presente trabajo se buscó establecer cómo el carvacrol afecta las regiones de fluidez incrementada y por consiguiente la estructuración de los flagelos y las proteínas MreB. Los resultados obtenidos en este trabajo van a permitir establecer la localización y los cambios que se presenten en las RIFs, tratando de asociarlo a posibles modificaciones en la virulencia en los patotipos de *E. coli*.



## 5. HIPÓTESIS

El carvacrol altera la formación de filamentos de la proteína MreB y la translocación de la flagelina a las RIFs en *E. coli*.

## 6. OBJETIVOS

Establecer el papel del carvacrol para provocar cambios en la membrana de *E. coli*: modificando la estructuración de filamentos de MreB y la función de flagelos en la membrana.

### 6.1 Objetivos específicos

- 1) Generar una doble mutante de las proteínas MreB y flagelina de *E. coli* con proteínas fluorescentes sfGFP y BFP respectivamente.
- 2) Establecer las concentraciones mínimas bactericidas de carvacrol en la cepa silvestre y la mutante.
- 3) Evaluar el papel del carvacrol en el movimiento tipo swarming en la cepa silvestre y la mutante.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 ÁREA DE TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **7.2 CEPAS**

Se empleó la cepa K12 MG1655 de *E. coli* la cual presenta integrados en su genoma los genes necesarios para la recombinación homóloga (*beta*, *exo*, *gama*). La cepa SIJ\_488 fue proporcionada por el Dr. Alex Nielsen de la Universidad Técnica de Dinamarca (plásmido Addgene # 68246) y se conservó en caldo infusión cerebro corazón con 20% glicerol a -80 °C.

### **7.3 COMPUESTOS NATURALES**

Se empleó carvacrol (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O), adquirido comercialmente con pureza del 99% (producto # W224511, Sigma-Aldrich, México), clasificado como fenol monoterpenoide.

### **7.4 TRANSFORMACIÓN DE CEPAS Y RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA**

Para determinar la localización y el efecto del carvacrol en las proteínas MreB y flagelina se diseñó una doble mutante la cual debería contener la proteína verde fluorescente en su variante “superfolded” (sfGFP) unida a la proteína MreB y la variante de color azul (BFP) unida a flagelina; con la finalidad de localizar estas proteínas en la célula por medio de microscopía de fluorescencia. Mediante la recombinación homóloga se realizó la inserción de las proteínas de fusión (MreB-sfGFP y Flagelina-BFP) al genoma bacteriano. El proceso se llevó a cabo en dos pasos, obteniéndose primero la mutante MreB-GFP y a partir de este cultivo se realizó una segunda transformación a fin de obtener una doble mutante MreB-sfGFP/fliC-BFP.

#### **7.4.1 Diseño de fragmentos**

Se diseñaron fragmentos de ADN de doble cadena (gblocks) las cuales se emplearon en el proceso de recombinación homóloga. Los fragmentos están compuestos por la

secuencia de la proteína fluorescente de interés flanqueada en su región 3' y 5' por 60 nucleótidos de homología con el gen que se deseaba fusionar. Se emplearon las secuencias nucleotídicas de los genes *fliC* y *mreB* de *E. coli* presentes en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés, Altschul *et al.* 1990). Para el diseño *in silico* de los fragmentos se utilizó el paquete informático *Serial Cloner* v2.6.1. El sitio específico donde se realizó la fusión para cada gen se menciona a continuación:

-*MreB*: región interna del gen, entre los dominios H6 y H7

-*FliC*: región interna del gen, reemplazando el dominio hipervariable D3.

#### **7.4.2 Recombinación homóloga y transformación**

Para los ensayos se activó la cepa en tubos con 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se incubó a 37°C por 24 h (García-Heredia, 2016).

A partir de este cultivo se inoculó un matraz con 200 ml de caldo LB suplementado con 7.5 ml de L-arabinosa 1 M, A<sub>600</sub> de 0.4; incubándose a 250 rpm y 37°C durante 2 h. A partir de este cultivo se prepararon células calciocompetentes y se transformaron mediante choque térmico a 42°C por 90 s, de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001). Después del choque térmico, las células se recuperaron en medio SOC durante 1 h a 250 rpm y 37°C, posterior a lo cual se sembraron 10 µl en placas Petri con agar LB, dejándose incubar durante 24 horas.

Se seleccionaron colonias aisladas y se crecieron en caldo LB por 24 h a 37°C, una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron y se lavaron 3 veces con solución salina; el precipitado se recuperó con amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y se lisó por calor colocándose en baño de agua a 100°C durante 20 min. Las alícuotas se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min y se recolectó el sobrenadante, el cual se transfirió a tubos nuevos y se almacenó a -20°C para su uso posterior.

#### **7.4.3 Identificación de mutantes**

Se realizó PCR punto final empleando como templado el sobrenadante obtenido previamente. Se diseñaron para el presente estudio dos pares diferentes de

oligonucleótidos para la identificación; un juego de oligonucleótidos se diseñó para amplificar la proteína fluorescente (sfGFP o BFP) mientras que un segundo juego de oligonucleótidos se les denominó “de posición” y se emplearon con la finalidad de amplificar solamente cuando la proteína fluorescente se encontrara insertada en la posición deseada. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti 96 well thermal cycler (Appl Biosystems, Thermo Fisher Scientific). La secuencia de los oligonucleótidos, el tamaño del amplicón y la temperatura de alineamiento se establecen en la tabla 1.

**Tabla 1:** Oligonucleótidos diseñados en este estudio para la identificación de las mutantes.

<b>Nombre del oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (3'-5')</b>	<b>Tamaño del amplicón</b>	<b>Temperatura de alineamiento</b>
<b>sfGFP</b>	GCCATGCCCGAAGGTTATGT CCATCTTCAACGTTGTGGCG	263 pb	55°C
<b>De posición Mreb-sfGFP</b>	TCCTGCGTATCTTGCCACAG CCATCTTCAACGTTGTGGCG	564 pb	55°C
<b>BFP</b>	ACCCAGCAGATGGAGGTTTG AGTCCTGCGTATCTTGCCAC	229 pb	53°C
<b>De posición FliC-BFP</b>	AATCCAGGTTGGCGCAAATG TCCTGCGTATCTTGCCACAG	592 pb	54°C

## 7.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Se corroboró el correcto funcionamiento de las proteínas reporteras mediante microscopía de fluorescencia. Se seleccionaron colonias aisladas de las mutantes y se prepararon para su observación en microscopio de fluorescencia (Axio Imager Z2 100x). La variante sfGFP tuvo un rango excitación-emisión de 485-510 nm. Mientras que para la variante BFP fue de 383-445 nm

Se prepararon alícuotas de los cultivos de las mutantes obtenidas y se preservaron en glicerol a -80°C

## **7.6 CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)**

### **7.6.1 Preparación de soluciones de carvacrol**

Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones; se suspendieron las cantidades requeridas de carvacrol en agua destilada y se esterilizó por filtración (filtro de nitrato de celulosa poro 0.45  $\mu\text{m}$ , Sartorius Stedmin, Francia). Estas se conservaron en frasco ámbar a 4°C por no más de 5 días.

### **7.6.2 Ajuste del inóculo**

Para los ensayos de CMB y curvas de crecimiento, las cepas se reactivaron a partir de una alícuota de reserva a -80°C, inoculándose en caldo infusión cerebro corazón (ICC), para posteriormente cultivarse en placas de ICC, e incubarse a 37°C por 24 h. A partir de estas placas se tomó una asada la cual se transfirió a 5 ml de caldo Mueller Hinton (MH) (Difco, Becton-Dickinson, USA.) y se incubó durante la noche a 37 °C. Las cepas fueron ajustadas a  $1 \times 10^7$  UFC/ml ( $A_{600}$  de 0.05).

### **7.6.3 Ensayo CMB**

La CMB se determinó utilizando el método estándar de microdilución descrito por Luber et al. (2002) y modificado por García-Heredia et al. (2013). Brevemente, las placas de microtitulación estériles (poliestireno de 96 pozos, con fondo en U, Corning Costar) se llenaron con 100  $\mu\text{l}$  de caldo 2X MH más 100  $\mu\text{l}$  de diversas concentraciones de carvacrol. Se incluyó un control negativo sin extracto, pero solo adicionando agua destilada. Cada pozo se inoculó con 20  $\mu\text{l}$  de una suspensión bacteriana ajustada a  $1 \times 10^8$  UFC/ml y se incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente se sembró por la técnica de goteo en placa (10  $\mu\text{l}$ ) en agar MH, y las placas incubaron a 37°C durante 24 h para determinar el crecimiento. La CMB se definió como la concentración más baja que impidió cualquier crecimiento visible en las placas de agar MH y no produjo ningún cambio de color en los pocillos.

### **7.6.4 Curvas de crecimiento**

El crecimiento de la doble mutante, así como de la cepa silvestre se evaluó a tres concentraciones subletales de carvacrol (0.025, 0.05 y 0.1 mg/ml), teniendo en cuenta la

concentración mínima bactericida (CMB). La velocidad de crecimiento se evaluó inoculando la cepa crecida durante la noche en caldo MH, con las diferentes concentraciones subletales de los antimicrobianos, seguido de incubación a 37°C y 150 rpm. La toma de muestra se realizó a la hora 0 y cada 2 horas durante 12 h. En cada caso se determinó la población bacteriana por el método de cuenta en placa en agar MH.

### **7.7 ACTIVIDAD DEL CARVACROL EN LA FUNCIONALIDAD DEL FLAGELO**

En estos ensayos se empleó la cepa silvestre y mutante, a fin de observar el efecto del carvacrol en la movilidad tipo swarming.

Se empleó agar LB suave (0.35% agar) en placas a las cuales se les agregaron las concentraciones de carvacrol usadas en el ensayo de CMB (0.025, 0.05 y 0.1 mg/ml ). Para este ensayo se usaron alícuotas de cultivo de 5 µl (1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml), los cuales se inocularon en el centro de la placa incubándose 24 h a 37°C (Garcia-Heredia *et al.* 2016). Se determinó el nivel de movilidad swarming mediante la medición de la distancia de migración del centro de la placa. Los resultados se compararon con el control, el cual no contuvo carvacrol. El ensayo se realizó por triplicado.

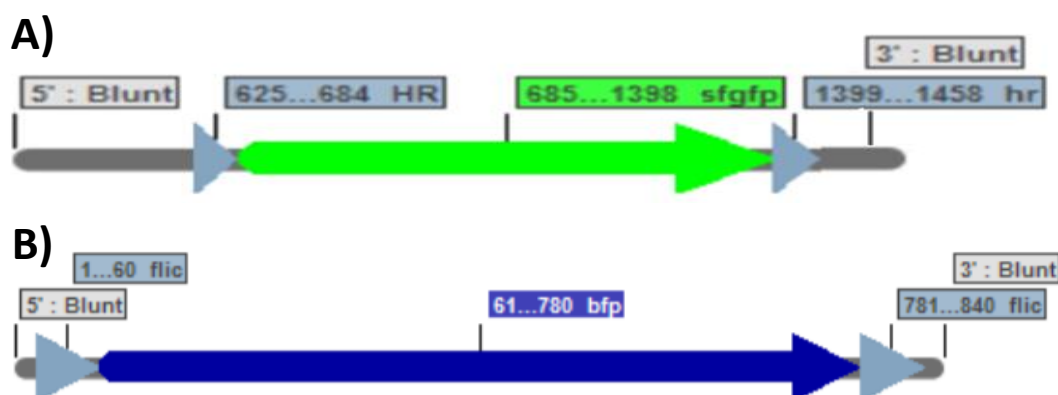
### **7.8 ANALISIS ESTADÍSTICO**

El diseño experimental fue realizado completamente al azar; se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Posteriormente se aplicó una prueba de Dunnet para realizar la comparación de las medias entre tratamientos y control. Se utilizó el software Minitab 18 Statistical Software (2018, State College, PA: Minitab, Inc).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 DISEÑO DE SECUENCIAS

El diseño de los fragmentos de ADN de doble cadena (gblocks) a emplear en la recombinación homóloga se llevó a cabo de acuerdo a reportes previos en la literatura. Encontrando que para el caso de MreB el sitio recomendable para una modificación genética se encontró entre las hélices 6 y 7 de la proteína. Con base en esto se diseñó un gblock con un total de 834 pb. Para el caso de la flagelina se optó por la eliminación del sitio D3, la cual es una región hipervariable y no forma parte importante en el plegamiento de los filamentos de flagelina. El gblock obtenido fue de 840 pb. En ambas construcciones se flanquearon las proteínas fluorescentes por 60 pb correspondientes a las regiones de homología con el gen de interés. En la Figura 2 se observa una representación gráfica del



diseño de los gblocks.

**Figura 2.** Diseño de gblocks empleados en la recombinación homóloga A) gblock MreB-sfGFP (color verde), B) gblock FliC-BFP (color azul). En ambas se muestran las regiones de homología con la proteína correspondiente (color azul claro).

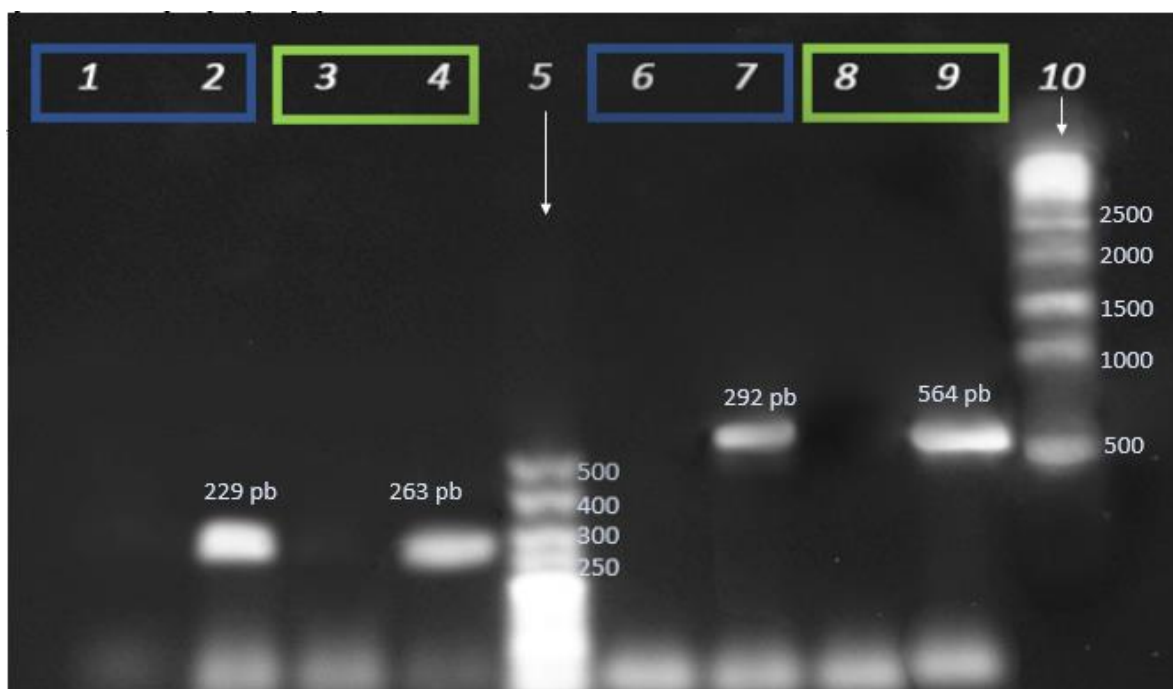
### 8.2 GENERACIÓN DE DOBLE MUTANTE

Una vez que se llevó a cabo la primera transformación correspondiente a la proteína de fusión MreB-sfGFP, se seleccionaron 50 colonias aleatoriamente, de las cuales 14 colias mostraron la inserción de la proteína sfGFP ya que poseían un producto de PCR de 263 pb (Figura 3, carril 4) en el que se utilizaron oligonucleótidos que se unían dentro de la



secuencia de la proteína fluorescente. Sin embargo, era necesaria la confirmación de que la inserción del gen hubiera ocurrido en el sentido correcto.

Al realizar una segunda PCR con el segundo par de oligonucleótidos diseñados a fin de analizar la inserción del gen (en la conformación posición Mreb-sfGFP), solamente 3 mostraron una correcta inserción dando lugar a una banda de 564 pb (Figura 3, carril 9). De estos tres aislados, uno fue seleccionado para realizar la segunda transformación. Luego de la segunda transformación se seleccionaron 50 colonias de las cuales 18 mostraron la presencia de la proteína BFP obteniéndose una banda de 229 pb (Figura 3, carril 2). Se seleccionaron 2 colonias que fueron positivas a una segunda reacción de PCR para confirmar la posición de la inserción en la proteína de fusión FliC-BFP, obteniéndose una banda de 592 pb, comprobando así la correcta integración (Figura 3, carril 7).

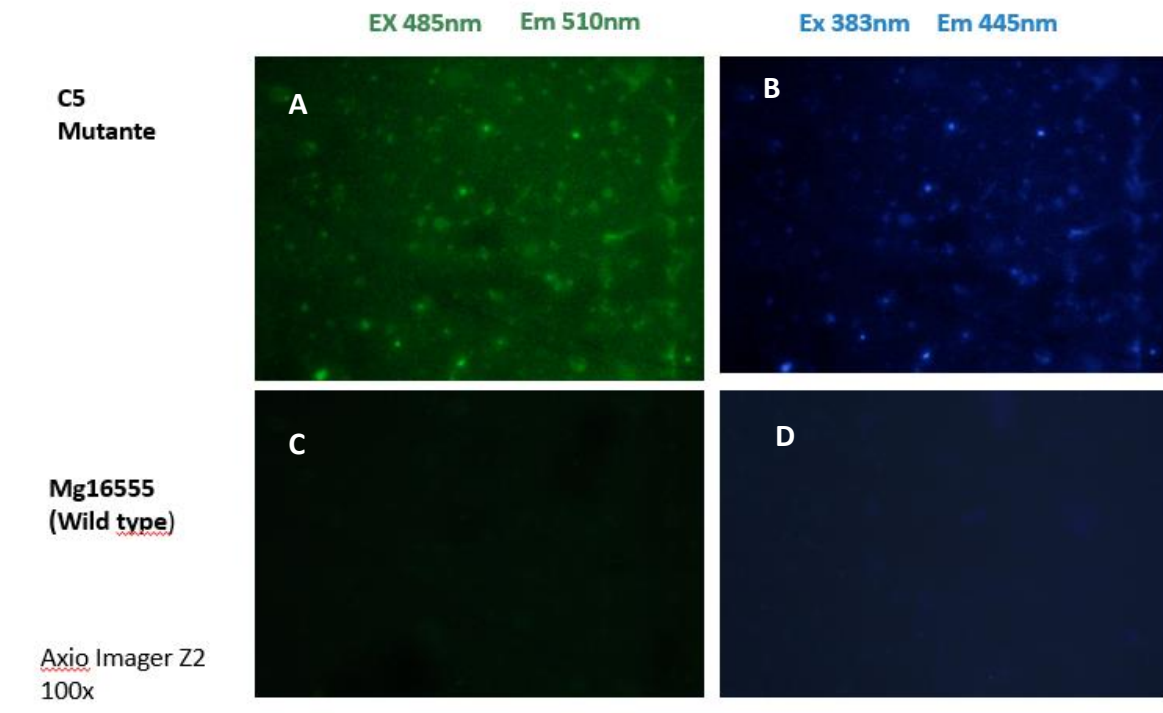


**Figura 3** Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los fragmentos de interés en *E. coli* MG1655 doble mutante (C5) **1.** Control negativo bfp **2.**bfp (229 pb) **3.**Control negativo sfgfp **4.** sfgfp (263 pb) **5.**-Marcador de peso molecular 25-500 pb (HyperLadder™ 25bp, Bioline)**6.** Control negativo flic-bfp **7.** flic-bfp (592 pb) **8.** Control negativo mreB-sfgfp **9.** mreB-sfgfp (564 pb) **10.** Marcador de peso molecular 500-5000 pb (HyperLadder™ 500bp, Bioline).

### 8.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La presencia de la doble mutación se corroboró mediante microscopía de fluorescencia en la cual se pudieron observar a 510 nm de emisión los destellos verdes

correspondientes a la presencia de la proteína sfGFP (Figura 4). Gracias a la evaluación a 445 nm de emisión se pudo observar la fluorescencia de color azul perteneciente a la proteína BFP.



**Figura 4** Microscopía de fluorescencia de los cultivos de *E. coli* MG1655 doble mutante, realizada con el equipo Axio Imager Z2, con un objetivo 100x de la cepa mutada con las secuencias MreB-sfGFP (A) y Flagelina-BFP (B). La cepa silvestreMg1655 se muestra como control de ambas mutaciones (C) y (D).

#### 8.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Se determinó la CMB del carvacrol para la doble mutante obtenida, así como para la cepa silvestre mediante el método de dilución en microplaca. Los resultados se muestran en la tabla 2. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre la cepa silvestre contra la doble mutante, obteniéndose una CMB más elevada para esta última. Los resultados de la tabla 2 corresponden al promedio de tres mediciones realizadas por triplicado.

**Tabla 2:** Concentración mínima bactericida (CMB) del carvacrol para la cepa mutante y la cepa silvestre.

CMB carvacrol (mg/ml)	
Cepa Silvestre	0.32 ±0.02
Doble Mutante	0.43 ± 0.03 *

Las diferencias significativas entre los valores del CMB del control (cepa silvestre) y del tratamiento se encuentran marcadas con un asterisco (\*)

## 8.5 CURVAS DE CRECIMIENTO

La evaluación del crecimiento del microorganismo se realizó por medio de curvas de crecimiento, con tres concentraciones subinhibitorias de carvacrol (0.025, 0.05, 0.1 mg/ml), con la finalidad de confirmar que estas concentraciones no afectaran el crecimiento de la cepa silvestre y/o de la mutante. El análisis de varianza demostró que no existía diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos en los cuales se realizaron las observaciones. Posteriormente se aplicó una prueba de Dunnet para realizar una comparación de cada una de las medias con el grupo control no obteniendo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos.

## 8.6 MOVILIDAD TIPO SWARMING

En general los resultados obtenidos muestran que la doble mutante presentó movilidad tipo swarming similar ( $P > 0.05$ ) a la cepa silvestre, por lo cual este tipo de movilidad no se vio afectada en la mutante al presentar una proteína de fusión en el flagelo (Flagelina-BFP). En ambos casos al aplicarse concentraciones sub inhibitorias (0.025, 0.05, 0.1 mg/ml) se observó un incremento ( $P < 0.05$ ) en este tipo de movilidad (tabla 3). Los resultados de la tabla 3 corresponden al promedio de los ensayos por triplicado.

**Tabla 3:** Efecto de las concentraciones sub-inhibitorias de carvacrol en el diámetro de crecimiento de las colonias swarming de *E. coli* K12 MG1655 cepa silvestre y mutante

Concentración (mg/ml)	Silvestre	Doble mutante
0.0	0.38±0.02	0.31±0.02
0.025	0.61 ±0.04	0.57±0.03
0.05	0.82*± 0.08	0.64*±0.07
0.01	0.73± 0.07	0.6± 0.06

Las diferencias significativas entre el control (cepa silvestre) y el tratamiento (cepa mutante) para cada una de las concentraciones se encuentran marcadas con un asterisco (\*).

## 9. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos constituye una grave preocupación en el tratamiento enfermedades infecciosas. Este fenómeno de resistencia aumenta la gravedad de la enfermedad, y se ha vuelto necesario buscar alternativas nuevas y más baratas con menos efectos secundarios. Los extractos de plantas crudos y sus derivados, como los aceites esenciales (EO), han sido utilizados por los humanos con fines medicinales y cada vez se investiga más sobre sus características (Valgas *et al.* 2007).

Los aceites esenciales son productos naturales concentrados con olores fuertes que son producidos por plantas aromáticas como metabolitos secundarios. Estos aceites están presentes como mezclas variables principalmente de terpenoides, especialmente monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), aunque también pueden estar presentes diterpenos (C20). Estos aceites contienen una amplia serie de metabolitos secundarios que pueden inhibir o retrasar el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos (Mambe *et al.* 2019).

El carvacrol es un monoterpenoide fenólico que se encuentra principalmente en los aceites esenciales del orégano. Junto con compuestos como el timol, el carvacrol es uno de los componentes más investigados. Se ha encontrado que el carvacrol interrumpe y desorganiza la arquitectura molecular de la membrana plasmática e induce el intercambio de protones, reduciendo el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática (Mohammedi, 2017). Se sabe que concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos producen efectos antibacterianos significativos; la virulencia bacteriana puede aumentar o disminuir por los cambios en la capacidad de las bacterias para adherirse a las células epiteliales o por alteraciones en la susceptibilidad bacteriana a las defensas inmunes del huésped (Zhanel *et al.* 1992), por lo cual resulta de sumo interés comprender cuales cambios se presentan en la membrana cuando se expone a concentraciones subinhibitorias de carvacrol, especialmente a nivel de la organización de las regiones de fluidez incrementadas caracterizadas por la presencia de la proteína MreB ya que estas son una parte esencial en la formación de los dominios en la membrana llamados regiones de fluidez incrementada que están directamente ligados con la organización y función de otras proteínas integrales de membrana, tal como son los componentes del flagelo.

Se ha visto que el carvacrol a concentraciones sub inhibitorias puede provocar el aumento en la movilidad tipo swarming en dos patotipos de *E. coli* (García-Heredia *et al.* 2016), por lo cual, es importante comprender como estas alteraciones en la membrana pueden contribuir al aumento de la virulencia en microorganismos patógenos. Por lo tanto, se planteó la creación de proteínas de fusión en un gen reportero a fin de que se pudiese observar el comportamiento de la proteína MreB y la presencia de regiones de fluidez incrementada, así como el ensamblaje del flagelo. Los genes reporteros son secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas que pueden ser fácilmente analizadas, representando herramientas muy eficientes para monitorear la expresión génica. Los genes reporteros también pueden "informar" sobre diferentes propiedades y eventos, como la fuerza de los promotores, el destino intracelular de un producto génico, el resultado del tráfico de proteínas y la eficiencia de las señales de inicio de la traducción (Herschman, 2004). El gen reportero se clona corriente abajo de una región reguladora (por ejemplo, promotor/potenciador) que generalmente es responsable de la expresión controlada de un gen específico. A su vez es común la fusión de estos genes con otros que codifican para proteínas de interés, lo que facilita la medición de los niveles de expresión de dichos genes (Sundaresan & Gambhir, 2002).

Las proteínas verdes fluorescentes (GFP) están atrayendo actualmente un enorme interés como el primer método general para crear fluorescencia visible por medios biológicos puramente moleculares. Hasta ahora, se han utilizado como informadores de la expresión génica, trazadores del linaje celular y como etiquetas de fusión para controlar la localización de proteínas dentro de las células vivas, creando proteínas de fusión que permitan investigar la redistribución de la proteína de interés en respuesta a señales externas (Müller-Taubenberger & Anderson, 2007). Una de las metodologías para la creación de estas proteínas de fusión es mediante la técnica denominada "*recombineering*".

El termino en inglés "*recombineering*" es una combinación de las palabras recombinación e ingeniería, y es el nombre que se le ha dado al método *in vivo* de ingeniería genética empleado principalmente en *E. coli*, el cual emplea homologías cortas (aprox. 50 pb) (Yu *et al.* 2000). Este método se basa en la recombinación homóloga, la cual permite la

inserción, delección o alteración de cualquier secuencia de forma precisa y no es dependiente de la localización de sitios para el corte con enzimas de restricción. El ADN linear ya sea de doble cadena (usualmente productos de PCR) o bien oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla son introducidos en la bacteria mediante técnicas como electroporación o choque térmico y proporcionan los sustratos homólogos (es decir, construcciones de direccionamiento) para dirigir y crear los cambios genéticos. Este método es catalizado por las funciones de recombinación homóloga presente en los bacteriófagos tales como los sistemas del colifago  $\lambda$  red y el sistema RecET del profago Rac 4 (Zhang *et al.* 2000).

El sistema del bacteriófago  $\lambda$  red incluye los genes de recombinación de fagos *gam*, *bet* y *exo*. La función del gen *gam* es evitar que una nucleasa de *E. coli*, RecBCD, degrade fragmentos de ADN lineales, permitiendo así la preservación del ADN lineal transformado *in vivo*. El producto del gen *bet*, Beta, es una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (ssADN) que promueve el alineamiento de dos moléculas de ADN complementarias, y el producto del gen *exo*, Exo, tiene una actividad de exonucleasa de ANs de 5' a 3'; trabajando juntas, estas dos últimas proteínas insertan ADN lineal en el objetivo deseado, creando recombinantes genéticos. En el caso del ADN de doble cadena, se cree que Exo degrada ambos extremos de 5' exponiendo ADN de cadena sencilla (ssADN) que está unido por Beta (Kowalczykowski *et al.* 1994).

La creación de sustratos de direccionamiento lineal de doble cadena o cadena sencilla apropiados y específicos es crucial para el éxito del experimento. A fin de realizar las proteínas de fusión, fue en primer lugar necesario identificar aquellas zonas del gen en donde la inserción de la proteína fluorescente no alterase el plegamiento y por ende la función de la proteína de interés, por lo cual se consultaron en la literatura reportes de transformaciones en las cuales se modificarían las proteínas Mreb y Flagelina; así como de las proteínas reporteras fluorescentes a emplear.

En primer lugar, para el caso de la proteína MreB se optó por colocar la proteína fluorescente entre las hélices 6 y 7 de la proteína. Se descartó la colocación en los extremos debido a estudios previos en los cuales encontraron que la obtención de una versión fluorescente de la proteína MreB en *E. coli* mediante la adición de la proteína fluorescente

*mcherry* RFP en los extremos C-terminal y N-terminal resultó infructuosa, dando como resultado alteraciones la forma de la bacteria (Bendezú *et al.*, 2009). Sin embargo, lograron la construcción de una proteína de fusión funcional (MreB-RFPW) insertando mCherryRFP entre las hélices 6 y 7 de la proteína, concluyendo que *E. coli* es capaz de tolerar, pero de manera afectada la presencia de un dominio extra entre las hélices 6 y 7, ya que previamente se logró la creación de una cepa mutante de *Bacillus subtilis* que expresaba la proteína MreB-gfp funcional (Strahl *et al.* 2014).

El reportero usado en este diseño fue la versión modificada de la proteína verde fluorescente (sfGFP) de la medusa *Aequorea victoria* que es una proteína reportera ampliamente utilizada en la investigación bioquímica (Tsien, 1998). GFP se compone de 238 aminoácidos, una secuencia clave de Ser – Tyr – Gly en los aminoácidos 65–67 funciona como el fluoróforo, en donde estos aminoácidos se someten a oxidación espontánea para formar un cromóforo ciclado que es responsable de la fluorescencia. GFP tiene una arquitectura de barril  $\beta$  y el cromóforo reside en el centro del barril. El plegamiento correcto del barril  $\beta$  de GFP parece ser un requisito previo para la formación del cromóforo fluorescente. La superfolder GFP (sfGFP) se desarrolló mediante evolución dirigida a fin de desarrollar un plegado robusto que contiene 11 mutaciones puntuales con respecto a la proteína de tipo silvestre (Pédelacq *et al.*, 2006), lo cual justificó la elección de esta variante para ser usada en el presente diseño.

En segundo lugar, para la flagelina la cual se encuentra codificada por el gen *FliC*, de acuerdo a estudios realizados previamente por Szabo *et al.* (2011) quienes llevaron a cabo el primer intento en la creación de una proteína de fusión de flagelina empleando la enzima xilanasas y obteniendo la mutante *FliC* (XynA). Se encontró que, si bien esta quimera era enzimáticamente activa, su habilidad de polimerización se encontraba de alguna forma paralizada. Estudios a profundidad sugirieron que el segmento N-terminal el cual contenía un tag de histidina His6 interfería con la adecuada formación de los filamentos centrales interiores.

Un análisis de secuencias aminoacídicas de la flagelina de *Salmonella typhimurium* realizado por Beatson *et al.* (2006) reveló que esta consta de 493 aminoácidos los cuales presentan un alto nivel de homología en la región terminal de la flagelina la cual contiene

~180 residuos en el extremo N terminal y 100 en el extremo C- terminal mientras que, por el contrario, los segmentos centrales son altamente variables (Beatson et al., 2006). Por lo cual, solo las regiones terminales de las subunidades de flagelina se encuentran conservadas y están implicadas en la formación del filamento, mientras que la parte central es hipervariable y forma el dominio D3 que se encuentra expuesto en la superficie del filamento (Yonekura et al., 2003). Al no estar en contacto con subunidades adyacentes y no tener un papel significativo en la construcción de la estructura de filamento, es un blanco óptimo para ensayos de ingeniería genética ya que puede ser modificado o removido completamente sin alterar el ensamblaje del flagelo. Para este diseño un alineamiento múltiple confirmó que las regiones conservadas de la flagelina de *Salmonella* se encontraban igualmente conservadas en *E. coli*, por lo cual se reemplazó completamente el dominio D3 por la secuencia de la proteína fluorescente en su versión azul (BFP) ya que esta presentaba un rango de emisión distinta a la variante verde, permitiendo observar la presencia de ambas proteínas en la generación de una doble mutante.

En base a las condiciones previamente mencionadas se diseñaron los fragmentos de ADN de doble cadena (gblocks), de por lo menos 60 pb con homología con la región a realizar el inserto a fin de introducir el material genético mediante recombinación homóloga, tomando en cuenta lo ya reportado por Sharan *et al.* (2009). La obtención de la doble mutante se logró mediante la transformación de células calciocompetentes aplicando un choque térmico de 42°C. La cepa de *E. coli* K12 MG1655 empleada presentó integrados cromosómicamente los genes del fago  $\lambda$  (*exo, beta, gamma*) necesarios para la recombinación homóloga expresados mediante inducción por arabinosa. *E. coli* K-12 es una bacteria modelo utilizada como huésped para una serie de aplicaciones de biología y biotecnología sintéticas. La integración del ADN sintético en el cromosoma de *E. coli* mitiga muchos problemas asociados con el mantenimiento del ADN en plásmidos o cromosomas artificiales bacterianos. La integración cromosómica evita complicaciones derivadas de problemas como la segregación de plásmidos o la carga metabólica asociada al mantenimiento de plásmido (Juhas & Ajioka, 2016). Por otra parte, las modificaciones en los genes *flic* y *mreb* se realizaron en el genoma por lo cual la expresión de las proteínas de fusión se encontró regulada por el promotor nativo, evitando con esto la inserción de



plásmidos, y el manteniendo la producción de las proteínas de fusión lo más similar posible a la cepa silvestre.

Con la finalidad de evaluar el crecimiento en concentraciones subinhibitorias de carvacrol se determinó la CMB del carvacrol para la cepa silvestre y la mutante obteniéndose valores de  $0.32 \pm 0.02$  y  $0.43 \pm 0.03$  mg/ml respectivamente. Si bien los valores obtenidos fueron superiores a lo previamente reportado por García-Heredia et al. (2016, EHEC O157:H7 0.08 mg/ml, EAEC O104:H4 0.08 mg/ml, EAEC 042 0.1 mg/ml) cabe destacar que estos resultados pertenecen a diferentes cepas pertenecientes a patotipos de *E. coli*, lo que concordó con lo reportado por Cosentino et al. (1999) obteniendo una CMB para carvacrol de 0.225 mg/ml en *E. coli* O157:H7; estos resultados parecen indicar que las cepas patógenas tienden a presentar CMBs más bajas; Valéria et al. (2016) trabajando con cepas no patógenas de *E. coli* obtuvieron una CMB de 4.8 mg/ml por el aceite esencial de orégano, al igual que Suza et al. (2016) quienes encontraron que valores de hasta 30 mg/ml de carvacrol fueron eficaces para inhibir el crecimiento de *E. coli* inoculado en la canal de reses.

El movimiento sobre las superficies puede permitir que las bacterias migren, se adhieran y se dispersen de los sitios de infección. Los ensayos de movilidad tipo swarming para la cepa mutante y la silvestre en ausencia de carvacrol mostraron un patrón de movimiento muy similar a la cepa silvestre a pesar de la proteína de fusión presente en la flagelina de la doble mutante; proteína de suma importancia en la constricción del flagelo bacteriano; por lo cual el modelo de doble mutante con gen reportero fluorescente resultó de utilidad al no observarse un comportamiento anormal que pudiese indicar problemas en el ensamblaje y polimerización de la flagelina; con lo cual es un modelo adecuado para ensayos en los que se requiera estudiar este patrón de movimiento especialmente si se busca correlacionar con cepas patógenas en donde se ha visto que el movimiento swarming es un proceso de adaptación complejo en respuesta a un ambiente viscoso que

resulta en un cambio sustancial en la expresión del gen de virulencia y la resistencia a los antibióticos (Overhage *et al.* 2008). Cabe mencionar que al adicionar concentraciones sub inhibitorias de carvacrol se observó que se presentaba un incremento en la movilidad swarming para ambos casos, lo cual concuerda con lo reportado por García-Heredia *et al.* (2016) en donde; el carvacrol presente en concentraciones sub inhibitorias promovió el movimiento swarming en EHEC O157:H7 y EAEC 042. Esto puede ser debido a que las células en estado *swarmer* son altamente activas metabólicamente, por lo que podrían mostrar un fenotipo resistente.

## 10. CONCLUSIONES

1. Se realizó el diseño y la transformación de la cepa no patógena de *E. coli* k12 MG1655, la cual presentó los genes para la recombinación homóloga integrados, mediante la inducción de estos genes con arabinosa, la integración de los gblocks diseñados, y la obtención de una doble mutante MreB – sfgfp y fliC-bfp funcional.
2. Se identificó como positiva la doble mutante mediante ensayos de PCR en los cuales se logró la amplificación del gen fluorescente; así como mediante ensayos de microscopía en los cuales fue posible la visualización *in vivo* de las proteínas.
3. Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas por el carvacrol fueron de  $0.32 \pm 0.02$  mg/ml para la cepa silvestre y  $0.43 \pm 0.03$  mg/ml para la doble mutante, encontrándose diferencia significativa; en ambos casos las CMBs obtenidas fueron superiores a lo reportado para patotipos de *E. coli*, pero similares a lo reportado en cepas silvestres.
4. Los análisis estadísticos demostraron que el movimiento tipo swarming presenta un incremento significativo en concentraciones subinhibitorias de carvacrol, tanto en la cepa silvestre como en la mutante.

## 11. PERSPECTIVAS

Las perspectivas que se pueden desprender a partir del proyecto de esta tesis giran en torno al planteamiento de los experimentos de los resultados obtenidos, además del diseño de los oligonucleótidos para la generación de las proteínas fluorescentes.

Primeramente, los experimentos para realizar la evaluación de la CMB y sus cambios, desde la preparación de las soluciones hasta los resultados de manera específica en cada una de las concentraciones utilizadas, servirán de referencia para realizar experimentos con otras cepas de *Escherichia coli* de interés por su patogenicidad.

Así mismo el proceso del diseño de los oligonucleótidos llevado a cabo en esta tesis podrá ser replicado para su realización en otras especies de enterobacterias cercanas a *E coli*, que presenten homología en la secuencia y función de los genes evaluados en este proyecto.

Los experimentos se podrán extender incluso a otras familias fuera de las enterobacterias que presentan una virulencia potenciada por el movimiento tipo swarming. Esto se podrá conseguir estableciendo un enfoque en el que se busque el bloqueo de este mecanismo de movilidad con el fin de reducir su patogenicidad.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3): 403-410.
- Alvarez, A. F., & Georgellis, D. 2019. Bacterial Lipid Domains and Their Role in Cell Processes. *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, 575-592.
- Anchisi L, Dessì S, Pani A, y Mandas A. 2013. Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. *Frontiers in physiology*, 3:486.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2): 446-475.
- Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology*, 43(2): 149-154.
- Bendezú FO, Hale CA, Bernhardt TG, De Boer PA. 2009. RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *The EMBO journal*, 28:193-204
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet infectious diseases*, 11:671–676.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology*, 30(10), 475-487.
- Boll EJ, Ayala-Lujan J, Szabady RL, Louissaint C, Smith RZ, Krogfelt KA, McCormick BA. 2017. Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence Fimbriae Drive Inflammatory Cell Recruitment via Interactions with Epithelial MUC1. *mBio*, 8(3):717-17.
- Bourgeois AL, Wierzbza TF, Walker RI. 2016. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 34(26), 2880-2886.
- Bramkamp M, Lopez D. 2015. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79:81–100.
- Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer F D, Boelter J, Petersen H, Gottschalk G, Daniel R. 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the

recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of microbiology*, 193(12):883-891.

Burkart M, Toguchi A, Harshey RM. 1998. The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5):2568-2573.

Center of Disease Control and Prevention (CDC). 2016. Signs and symptoms of O157 infections linked to Jack & the green sprouts alfalfa sprouts. Online. Disponible en <https://www.cdc.gov/ecoli/2016/o157-02-16/signs-symptoms.html> consultado el 27 de febrero de 2018.

Cetin-Karaca, Hayriye. 2011. "Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens". University of Kentucky Master's Theses. 652.

Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, *et al.* 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19):7427-7432.

Chart H, Spencer J, Smith HR, Rowe B. 1997. Magnesium ions are required for HEp-2 cell adhesion by enteroaggregative strains of *Escherichia coli* O126: H27 and O44: H18. *FEMS microbiology letters*, 148(1): 49-52.

Chaudhuri RR, Sebahia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, Cunningham AF, Scott-Tucker A, Ferguson PR, Thomas, CM, Frankel G. 2010. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PloS one*, 5(1):e8801.

Chen BG, Turner L, Berg, HC. 2007. The wetting agent required for swarming in *Salmonella enterica* serovar typhimurium is not a surfactant. *Journal of bacteriology*, 189(23):8750-8753.

Chevance FF, & Hughes KT. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6):455.

Copeland MF, Weibel DB. 2009. Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft matter*, 5(6):1174-1187.

- Croxen MA, Law R.J, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB, 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4):822-880.
- Czapski TR, Trun N. 2014. Expression of *csp* genes in *E. coli* K-12 in defined rich and defined minimal media during normal growth, and after cold-shock. *Gene*, 547(1): 91-97.
- Czczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP, 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 65(10): 4135-4145.
- Czczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. 1999. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 67(6):2692-2699.
- De Martino L, De Feo V, Nazzaro F. 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules*, 14(10): 4213-4230.
- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(12): 4863-4870.
- Diepold A, Armitage JP. 2015. Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical Transactions B*, 370: 1-19.
- Domínguez-Escobar J, Chastanet A, Crevenna A H, Fromion V, Wedlich-Söldner R, Carballido-López R. 2011. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science*, 333(6039):225-228.
- Dorman H J D, y Deans S G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2): 308-316.
- Du WX, Olsen CW, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Levin CE, Friedman M. 2008. Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157: H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3082-3088.
- Duan Q, Zhou M, Zhu, L, Zhu G. 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of basic microbiology*, 53(1):1-8.

- Eichhorn I, Heidemanns K, Semmler T, Kinnemann B, Mellmann A, Harmse D, Anjum MF, Schmidt H, Fruth A, Valentin-Weigand P, Heesemann J, Suerbaum S, Karch H, Wieler LH. 2015. Highly virulent non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes reflect similar phylogenetic lineages, providing new insights into the evolution of EHEC. *Applied and environmental microbiology*, 81(20): 7041-7047.
- El-Naggar W, Abd El-Aziz MA, Ali YM. 2011. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Flagellin from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 20(2).
- Gabel CV, Berg HC. 2003. The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with protonmotive force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15): 8748-8751.
- García-Heredia A, García S, Merino-Mascorro JÁ, Feng P, Heredia N. 2016. Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food microbiology*, 59: 124-132.
- Grecco HE, Schmick M, Bastiaens PI. 2011. Signaling from the living plasma membrane. *Cell*, 144:897–909.
- Haimes J, Kelley M. 2010. Demonstration of a  $\Delta\Delta$  Cq Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data. *Thermo Scientific Tech Note*: 1-4.
- Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters*, 254(1):12-18.
- Harshey RM. 1994. Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Molecular microbiology*, 13(3):389-394.
- Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1):249-273.
- Herschman, H. R. 2004. Noninvasive imaging of reporter gene expression in living subjects. *Advances in cancer research*, 92, 30-80.
- Horváth G, Kovács K, Kocsis B, Kustos I. 2009. Effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and its main constituents on the outer membrane protein composition of *Erwinia* strains studied with microfluid chip technology. *Chromatographia*, 70(11-12): 1645-1650.



- Huang DB, Okhuysen PC, Jiang, Z D, DuPont HL. 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *The American journal of gastroenterology*, 99(2), 383.
- Jones LJ, Carballido-Lopez R, Errington J. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 104: 913–922
- Juhas, M., & Ajioka, J. W. 2016. Lambda Red recombinase-mediated integration of the high molecular weight DNA into the *Escherichia coli* chromosome. *Microbial cell factories*, 15(1), 172.
- Kamio Y, Nikaido H. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 15(12):2561-2570.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2):123-140.
- Karpman D, Papadopoulou D, Nilsson K, Sjögren A. C, Mikaelsson C, Lethagen S. 2001. Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 97(10):3100-3108.
- Kearns DB. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9):634-644.
- Kearns DB, Losick R. 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 49(3):581-590.
- Klein G, Rüben C, Upmann M. 2013. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current microbiology*, 67(2):200-208.
- Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 18(3): 775-779.
- Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D., & Rehrauer, W. M. 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol.*
- Kraft ML. 2013. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Molecular biology of the cell*, 24(18): 2765-2768.
- La Storia A, Ercolini D, Marinello F, Di Pasqua, R, Villani F, Mauriello G. 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Research in microbiology*, 162(2): 164-172.

- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3): 453-462.
- Langhorst MF, Reuter A, Stuermer CA. 2005. Scaffolding microdomains and beyond: The function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and molecular life sciences*, 62: 2228–2240.
- LeBlanc JG, Milani C. de Giori GS, Sesma, F, Van Sinderen D, Ventura M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, 24(2):160-168.
- Lingwood D, Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327:46–50
- Macnab, R.M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology*, 57: 77–100.
- Macnab RM. Flagella and motility. 1996. En. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. 2nd edición American Society of Microbiology; Washington, DC. pp. 123–145.
- Macnab RM. 1992. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev Genet*, 26:131–158.
- Mambe, F. T., Na-Iya, J., Fotso, G. W., Ashu, F., Ngameni, B., Ngadjui, B. T., Kuete, V. 2019. Antibacterial and Antibiotic Modifying Potential of Crude Extracts, Fractions, and Compounds from *Acacia polyacantha* Willd. against MDR Gram-Negative Bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. 2013. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC microbiology*, 13(1): 22.
- Minamino, T, Namba K. 2004. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7:5–17.
- Moens S, Vanderleyden, J. 1996. Functions of bacterial flagella. *Critical reviews in microbiology*, 22(2): 67-100.
- Müller-Taubenberger, A., & Anderson, K. I. 2007. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 1-12.

Muniesa, M., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Appel, B., & Brüssow, H. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4: a new challenge for microbiology. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4065-4073.

Muskotál A, Seregélyes C, Sebestyén A, Vonderviszt F. 2010. Structural basis for stabilization of the hypervariable D3 domain of *Salmonella* flagellin upon filament formation. *Journal of Molecular Biology*, 403: 607–615.

Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Krishnan T, Ganguly S, Saha DR, Rajendran K, Manna B, Ghosh M, Okamoto K, Takeda Y. 2010. Emerging trends in the etiology of enteric pathogens as evidenced from an active surveillance of hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. *Gut Pathogens*, 2(1): 4.

Nataro JP, Deng YIKANG, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and immunity*, 60(6):2297-2304.

Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne ROY, Prado V, Vial P, Levine MM. 1998. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J*, 6(9): 829-831.

Navarro-Garcia, F. 2015. *Escherichia coli* O104: H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*. American Society of Microbiology, 11(9): 533-539.

Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 67(1):161-172.

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12): 1451-1474.

Newitt S, MacGregor V, Robbins V, Bayliss L, Chattaway MA, Dallman T, Hawker J. 2016. Two linked enteroinvasive *Escherichia coli* outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. *Emerging infectious diseases*, 22(7):1178.

Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157):382-388.

Ochoa TJ, Contreras CA. 2011. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Current opinion in infectious diseases*, 24(5): 478.

- Ottemann KM, Miller JF. 1997. Roles for motility in bacterial–host interactions. *Molecular microbiology*, 24(6):1109-1117.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., & Hancock, R. E. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2671-2679.
- Parsek MR, Singh PK. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1): 677-701.
- Patzi-Vargas S, Zaidi M, Bernal-Reynaga R, León-Cen M, Michel A, Estrada-Garcia T. 2013. Persistent bloody diarrhoea without fever associated with diffusely adherent *Escherichia coli* in a young child. *Journal of medical microbiology*, 62(12):907-1910.
- Pike L. J. 2003. Lipid rafts bringing order to chaos. *Journal of lipid research*, 44(4): 655-667.
- Ramachandran G. 2014. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence*, 5(1):213-218.
- Renner L D, D. B. Weibel. 2011. Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:6264–6269.
- Rico-Martínez MG. 1995. Biología molecular en la patogenia de *Shigella* sp y *Escherichia coli* enteroinvasiva. *Rev Latinoam Microbiol*, 37: 367-385.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Blake, P. A. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 308(12), 681-685.
- Rodríguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5):464-475.
- Rogers TJ, Thorpe CM, Paton AW, Paton JC. 2012. Role of lipid rafts and flagellin in invasion of colonic epithelial cells by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113: H21. *Infection and immunity*, 80(8), 2858-2867.
- Rogers TJ, Paton JC, Wang H, Talbot UM, Paton AW. 2006. Reduced virulence of an *fliC* mutant of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113: H21. *Infection and immunity*, 74(3): 1962-1966.

- Salje J, van den Ent F, de Boer P, Löwe J. 2011. Direct membrane binding by bacterial actin MreB. *Molecular cell*, 43(3): 478-487.
- Seidman CE, Struhl K, Sheen J, Jessen T. 2001. Introduction of plasmid DNA into cells. *Current protocols in molecular biology*, 1-8.
- Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2): 201-222.
- Silhav TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2: a000414.
- Sizemore D R, Roland K L, Ryan US. 2004. Enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors and vaccine approaches. *Expert review of vaccines*, 3(5):585-595.
- Smith DR, Chapman MR. 2010. Economical evolution: microbes reduce the synthetic cost of extracellular proteins. *MBio*, 1(3): e00131-10
- Sohlenkamp C, Geiger O. 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS microbiology reviews*, 40:133-159.
- Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich- Soldner R. 2012. Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Natural Cell Biology*, 14:640–648.
- Sundaresan, G., & Gambhir, S. S. 2002. Radionuclide imaging of reporter gene expression. In *Brain mapping: The methods* (pp. 799-818). Academic Press.
- Strahl H, Bürmann F, Hamoen LW. 2014. The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nature Communications*, 5:3442.
- Sukumar M, Rizo J, Wall M, Dreyfus LA, Kupersztoch YM, Gierasch LM. 1995. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Science*, 4(9):718-1729.
- Terashima, H, Kojima S, Homma M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *International Review of Cell and Molecular biology*, 270: 39–85
- Ultee A, Kets E P, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of microbiology*, 174(4):233-238.

- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
- Van den Ent F, Amos LA, Löwe J. 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413:39-44.
- Van de Vossenberg J L, Driessen A J, da Costa M S, Konings W N. 1999. Homeostasis of the membrane proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1419(1): 97-104.
- Wachi M, Doi M, Tamaki S, Park W, Nakajima-Iijima S, Matsushashi M. 1987 Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin- binding proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169: 4935-4940
- Wang Q, Frye JG, McClelland M, Harshey RM. 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Molecular microbiology*, 52(1):169-187.
- Witkowska AM, Hickey DK, Alonso-Gomez M, Wilkinson M. 2013. Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research*, 2(4): 37.
- World Health Organization (WHO), 2006. *E. coli* fact sheet (Online) Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/> consultado el 18 de febrero del 2018
- Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, 47(3): 174-179.
- Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424: 643-650.
- Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5978-5983.
- Zhanel, G. G., Hoban, D. J., & Harding, G. K. 1992. Subinhibitory antimicrobial concentrations: a review of in vitro and in vivo data. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 3(4), 193-201.

Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *The Journal of infectious diseases*, 181:664–670.

Zhang, Y., Muyrers, J. P., Testa, G., & Stewart, A. F. 2000. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 18(12), 1314.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Alondra Miroslava Tamez Hernández

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS MreB Y LA FORMACIÓN DE FLAGELOS EN *Escherichia coli*, EN PRESENCIA DE CARVACROL

Campo de Estudio: Microbiología de los Alimentos

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 22 de Marzo de 1994.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido

Licenciado en Biotecnología Genómica en 2016, titulada con tesis con enfoque microbiológico.

Experiencia Profesional: Servicio Social y Tesis de Licenciatura en laboratorio L8 del

Instituto de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL del 2014 al 2017.