

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“EVALUACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS  
MreB y ESTRUCTURA DE LOS FLAGELOS EN *Escherichia coli*, EN  
PRESENCIA DE CARVACROL”**

**POR**

**L.B.G. HÉCTOR OZIEL GARCÍA CHÁVEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**2024**

**“EVALUACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS MreB y  
ESTRUCTURA DE LOS FLAGELOS EN *Escherichia coli*, EN PRESENCIA DE  
CARVACROL”**

**COMITÉ DE TESIS**



Dra. Norma Laura Heredia Rojas

**Director de tesis**



Dr. Eduardo Franco Frías

**Secretario**




Dr. José Santos García Alvarado

**Vocal 1**



Dr. José Ángel Merino Mascorro

**Vocal 2**



Dra. Yaraymi Ortiz Reyes

**Vocal 3**



Dra. Katiushka Arevalo

**Subdirector de Posgrado**



DIRECCIÓN  
DE POSGRADO

DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado durante mi etapa en maestría y así poder continuar con mis estudios profesionales.

A Dios, por darme fuerza y determinación de continuar en cada paso que doy en mi vida.

A mis padres, por siempre apoyarme en mis decisiones y brindarme el sustento para que pueda cumplir mis objetivos personales y académicos.

A los doctores, Dr. Santos y Dra. Norma por brindarme la confianza y aceptarme en el laboratorio, además de demostrarme el valor del trabajo y perseverancia.

También agradezco a todos los doctores del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos por siempre aportar sus ideas y enriquecer los trabajos, de los cuales siempre se aprende algo nuevo. En especial agradezco a los doctores miembros de mi comité, Dr. Merino, Dr. Franco y Dra. Yaraymi, por su paciencia y orientación en mi trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, tanto a alumnos tesistas y de servicio social, por siempre impulsarme a seguir adelante y facilitar mi permanencia durante el posgrado.

## **DEDICATORIAS**

*A Dios, por siempre guiarme por el camino correcto.*

*A mis padres y mi hermana por siempre creer en mí y brindarme su apoyo incondicional.*

*A los doctores Santos y Norma y a todo el equipo de trabajo del LABGEM, por sus consejos y enseñanzas que hicieron que este proyecto y muchos otros salgan adelante.*

# ÍNDICE

PORTADA.....	1
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1. Características y clasificación de <i>E. coli</i></b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.1. Principales factores de virulencia</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.1.1. Características y composición del flagelo</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Envoltura celular bacteriana</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.1 Características y composición</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.2. Pared celular</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.3 Membrana celular</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3 Descripción del citoesqueleto bacteriano</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3.1 Proteína MreB</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 Antimicrobianos naturales utilizados para el control de patógenos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.1 Carvacrol</b> .....	<b>25</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>6. MATERIAL Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>31</b>
<b>6.1 Lugar de trabajo</b> .....	<b>31</b>
<b>6.2 Cepas</b> .....	<b>31</b>
<b>6.3 Activación de cepas</b> .....	<b>31</b>
<b>6.4 Ensayo de transformación por calcio competencia</b> .....	<b>31</b>

<b>6.5 Confirmación de mutante</b> .....	32
<b>6.5.1 Extracción de ADN por el método de ebullición</b> .....	32
<b>6.5.2 Detección de <i>mreB</i> por PCR punto final</b> .....	32
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de <i>mreB</i> por PCR punto final. ....	33
<b>6.6 Compuestos naturales</b> .....	33
<b>6.5 Preparación de Laurdan</b> .....	33
<b>6.6 Concentración mínima bactericida (CMB)</b> .....	33
<b>6.6.1 Soluciones de carvacrol</b> .....	33
<b>6.6.2 Ajuste del inóculo</b> .....	33
<b>6.6.3 Ensayo de CMB</b> .....	33
<b>6.6.4 Índice de viabilidad y determinación de concentraciones subinhibitorias</b> .....	34
<b>6.7 Espectroscopia con lauridan</b> .....	34
<b>6.8 Motilidad Tipo <i>Swarming</i></b> .....	35
<b>6.9. Análisis estadístico</b> .....	35
<b>7. RESULTADOS</b> .....	36
<b>7.1 Generación de mutante</b> .....	36
<b>7.2 Identificación de cepas</b> .....	38
<b>7.3 Determinación de CMB</b> .....	38
<b>7.4 Motilidad tipo <i>swarming</i></b> .....	39
<b>7.5 Análisis de las RIFs en presencia de carvacrol</b> .....	39
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	41
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	46
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Oligonucleotidos utilizados para la detección de mreB por PCR Punto final...33	33
<b>Tabla 2.</b> Determinación de la concentración mínima bactericida para la cepa control y mutada.....38	38
<b>Tabla 3:</b> Desplazamiento de <i>E. coli</i> durante la movilidad tipo swarming en presencia de diferentes tratamientos con Carvacrol..... 39	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del flagelo en <i>E. coli</i> , conformada por tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal.. ..... 17	17
<b>Figura 2.</b> Estructura del filamento conformado por monómeros de flagelina de <i>E. coli</i> K-12 y los dominios globulares presentes..... 18	18
<b>Figura 3.</b> Ilustración de la envoltura celular. La fuga intencional de productos puede desencadenar en una lisis celular..... 20	20
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo de <i>E. coli</i> y la maquinaria de elongación, MreB..... 21	21
<b>Figura 5.</b> Interacción de MreB con otras proteínas..... 21	21
<b>Figura 6.</b> Representación de la estructura cristalina de MreB. Se muestra una arquitectura típica de cuatro subdominios (diferentes colores). ..... 24	24
<b>Figura 7.</b> Estructura química del carvacrol. Fuente de la imagen López et al., (2016). 27	27
<b>Figura 8.</b> Gblock obtenido de Tamez-Hernandez (2020). ..... 36	36
<b>Figura 9.</b> Imagen obtenida posterior a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. ..... 37	37
<b>Figura 10.</b> Producto de PCR detectando el tamaño del gen MreB ..... 38	38
<b>Figura 11.</b> (1) Agar MacConkey colonias color rosa-rojizo presuntivas de <i>E. coli</i> . (2) Agar EMB, colonias negro azulado presuntivas de <i>E. coli</i> ; (3) Agar ICC, colonias típicas de <i>E. coli</i> . ..... 38	38



**Figura 12.** Gráfico que representa el grado de polarización de la membrana de *E.coli* K-12 MG 1655 y *E.coli* K-12 MG 1655 ( $\Delta$ mreB). ..... 40

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
%.....	Porcentaje
μl.....	Microlitros
μm.....	micrometros
μM.....	Micromolar
°C.....	Grados Celsius
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
pb.....	pares de bases
cm.....	centímetros
CMB.....	Concentración Mínima Bactericida
DMF.....	Dimetilformamida
EDTA.....	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB.....	Eosina y Azul de Metileno
<i>gfp</i> .....	Green fluorescent protein
<i>Gp</i> .....	Grado de polarización
h.....	hora
HCl.....	Ácido Clorhídrico
ICC.....	Infusión Cerebro Corazón
M.....	Molar
MCK.....	MacConkey
mg.....	Miligramos
MH.....	Mueller-Hinton
min.....	minutos
ml.....	Mililitros
mM.....	Milimolar
NaCl.....	Cloruro de sodio
nm.....	nanómetros
PCR.....	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH.....	potencial de Hidrogeno

PPM.....Marcador de Peso Molecular  
rpm.....revoluciones por minuto  
UFC/ml.....Unidades Formadoras de Colonia por mililitro  
URF.....Unidades Relativas de Fluorescencia

## RESUMEN

*Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, incluidos los seres humanos, aunque algunas cepas han sido relacionadas con enfermedades transmitidas por los alimentos. Es el microorganismo más estudiado en cuanto al crecimiento bacteriano y la morfogénesis; y en donde se ha involucrado a la proteína MreB en diversos procesos celulares como la biosíntesis y morfogénesis de la pared, mantenimiento de la forma bacteriana, la división, segregación cromosómica y la polaridad celular. Además, se le ha asociado con la creación de regiones de fluidez incrementada (RIFs por sus siglas en inglés) a nivel de membrana. Así mismo, se ha observado que cuando MreB, proteína conservada entre las bacterias en forma de bacilo, se ve afectada, se generan irregularidades en la membrana lipídica, causando la localización aberrante de otras proteínas membranales, como la flagelina (codificada en parte por el gen *fliC*) involucrada en procesos de adhesión y de motilidad, siendo pocos los reportes que existen sobre la acción de compuestos naturales en estos procesos fisiológicos. En el presente trabajo se utilizó una mutante de la cepa *E. coli* K-12 MG 1655 que tiene acoplada la proteína de fusión fluorescente GFP en el gen *mreB*. Al insertar una proteína de fusión como GFP en el gen *mreB* nos permitiría establecer la colocalización y cambios que presenten las RIFs. Se realizaron ensayos de CMB (Concentración Mínima Bactericida); así como de motilidad tipo swarming, finalizando en un ensayo para visualizar alteraciones en MreB por espectroscopia; estos ensayos se realizaron exponiendo a la bacteria a distintas concentraciones subinhibitorias de carvacrol (0.025, 0.05, 0.1 mg/mL). Las CMBs fueron  $0.41 \pm 0.02$  y  $0.47 \pm 0.03$ , para la cepa mutante y la silvestre, respectivamente. En el ensayo de motilidad tipo swarming se observó incremento ( $P < 0.05$ ) al exponer la bacteria a todas las concentraciones probadas de carvacrol, así como un fenotipo de desplazamiento colectivo. Finalmente, en los ensayos de espectroscopia se detectaron variaciones en la fluidez de la membrana por efecto del carvacrol; en la cepa silvestre se observó aumento en la rigidez de la misma a los 30 min de exposición; sin embargo, a las 4 h se demostró disminución en la rigidez; mientras que para la cepa mutada se observó aumento en la fluidez a los dos tiempos, evidenciando que la bacteria puede modular la fluidez de la membrana tras la exposición a las concentraciones subinhibitorias de carvacrol.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is a bacterium found in the intestinal tract of warm-blooded animals, including humans, although some strains have been linked to foodborne diseases. It is the most studied microorganism in terms of bacterial growth and morphogenesis; and where the MreB protein has been involved in various cellular processes such as biosynthesis and morphogenesis of the wall, maintenance of bacterial shape, division, chromosome segregation and cell polarity. In addition, it has been associated with the creation of regions of increased fluidity (RIFs) at the membrane level. Likewise, it has been observed that when MreB, a protein conserved among bacteria in bacillus form, is affected, irregularities are generated in the lipid membrane, causing the aberrant localization of other membrane proteins, such as flagellin (encoded in part by the *fliC* gene) involved in adhesion and motility processes, with few reports on the action of natural compounds in these physiological processes. In the present work we used a mutant of the *E. coli* K-12 MG 1655 strain that has the fluorescent fusion protein GFP coupled to the *mreB* gene. Inserting a fusion protein such as GFP into the *mreB* gene would allow us to establish colocalization and changes in the RIFs. CMB (Minimum Bactericidal Concentration) assays were performed, as well as swarming motility assays, ending with an assay to visualize alterations in *mreB* by spectroscopy; these assays were performed by exposing the bacteria to different subinhibitory concentrations of carvacrol (0.025, 0.05, 0.1 mg/mL). The CMBs were  $0.41 \pm 0.02$  and  $0.47 \pm 0.03$ , for the mutant and wild-type strain, respectively. In the swarming motility assay, an increase ( $P < 0.05$ ) was observed upon exposure of the bacteria to all tested concentrations of carvacrol, as well as a collective displacement phenotype. Finally, in the spectroscopy assays, variations in membrane fluidity due to the effect of carvacrol were detected; in the wild-type strain an increase in membrane stiffness was observed at 30 min of exposure; however, at 4 h a decrease in stiffness was demonstrated; while for the mutated strain an increase in fluidity was observed at both times, evidencing that the bacterium can modulate membrane fluidity after exposure to sub-inhibitory concentrations of carvacrol.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es un microorganismo que ha ayudado a la comprensión del crecimiento y la morfogénesis de bacterias (Shi *et al.*, 2018), se clasifica como bacteria Gram-negativa, en forma de bastón, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que habita principalmente en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, incluidos los seres humanos (Jang *et al.*, 2017). Sin embargo, se han reportado que algunas cepas pueden ser patógenas, las que se han agrupado en seis patotipos (Croxen *et al.*, 2013) responsables de brotes de diarrea en humanos (Liu *et al.*, 2020), algunos con complicaciones graves. Las principales rutas de transmisión para estos microorganismos es el consumo de alimentos o agua contaminados, así como por vía fecal/oral (Vila & Zboromyrska, 2012).

Se conoce que *E. coli* utiliza dos sistemas esenciales para la biogénesis de la pared celular y mantener así la integridad y viabilidad de la célula, uno es el sistema Rod (elongasoma), que utiliza la proteína MreB, similar a la actina, para promover el alargamiento y mantener la forma celular, mientras que el segundo es el anillo citocinético (divisoma), donde la proteína FtsZ, similar a la tubulina, organiza la división celular y la construcción de los polos de las células hijas (Rohs *et al.*, 2018).

La proteína MreB se ha descrito como una molécula esencial para el alargamiento y supervivencia celular (Ranjit *et al.*, 2020), se encuentra localizada debajo de la membrana celular en forma de filamentos (Saikia *et al.*, 2017) desempeñando un papel vital en el mantenimiento de la morfología bacilar (Awuni *et al.*, 2016) y muchos procesos asociados a la membrana celular (Strahl *et al.*, 2014) como son: biosíntesis de la pared, mantenimiento de la forma, división, segregación cromosómica, morfogénesis de la pared y la polaridad celular que en la mayoría de los casos permite la forma de bastón (Awuni, 2020). Estos procesos se obtienen mediante la formación de polímeros cortos que rotan dinámicamente alrededor de la circunferencia celular (Morgenstein *et al.*, 2015), organizando una estructura helicoidal (Sacanelles & Garay, 2017).

Además, se ha relacionado a MreB con el desarrollo de regiones de mayor fluidez (RIFs) a nivel de membrana (Zielińska *et al.*, 2020); esta característica altamente asociada al movimiento activo de MreB (Strahl *et al.*, 2014), permite organizar otras proteínas de membrana en ubicaciones específicas, generando “balsas lipídicas” (Zielińska *et al.*, 2020).

MreB es sensible a los cambios en el potencial de membrana (Strahl *et al.*, 2014), tras exponer la bacteria a ciertos antibióticos, como el A22 [S- (3,4-diclorobencil) isotiourea], una molécula pequeña similar a un antibiótico que perturba la forma de las células de bastón (Awuni, 2020) y se ha sugerido que inhibe MreB al dirigirse a la hidrólisis de ATP (Awuni *et al.*, 2016), o la rodomirtona que causa la alteración de varias funciones celulares incluidas la cadena respiratoria y el complejo ATP sintasa (Saeloh *et al.*, 2018). Además, se ha observado que la utilización de compuestos naturales puede tener como sitio de acción la membrana celular.

Por lo anterior, se ha reportado que el carvacrol [2-metil-5-1-metiletil fenol], un compuesto natural y mayoritario del orégano, presenta actividad relacionada con la inhibición de la síntesis de ATP y de ácidos nucleicos (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002); provocando desestabilización de la membrana e incrementando la permeabilidad (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012); lo que trae consigo irregularidades en la membrana lipídica (Saeloh *et al.*, 2018).

Estos análisis han identificado que cuando se originan estas irregularidades, MreB se ve afectada, lo que causa la localización aberrante de proteínas a nivel de membrana (Saeloh *et al.*, 2018), entre las que se encuentra la flagelina (*fliC*) involucrada en procesos de adhesión y de motilidad. La flagelina forma parte de un complejo proteínico que atraviesa la membrana bacteriana, donde la fluidez juega un rol importante en la estabilización de esta proteína.

Por lo anterior, se deduce que puede existir una relación directa entre MreB (gen *mreB*) y la flagelina (gen *fliC*), ya que la interferencia con las RIFs creadas por MreB puede ocasionar una disipación de las estructuras de membrana; lo que traería consigo la perturbación de las fracciones lipídicas, originando una desestabilización en la fluidez y afectando directamente a la flagelina (*fliC*).

Para evaluar los cambios morfológicos en la membrana en presencia de compuestos desestabilizantes, en el presente estudio se analizó el efecto que tiene el carvacrol en la membrana utilizando como modelo la cepa *E. coli K-12* y la mutante de *mreB*. Lo anterior nos permitió analizar el efecto que tiene sobre la localización y cambios que presenten las RIFs, en la colocalización de la proteína MreB.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Características y clasificación de *E. coli*.

*E. coli* es una bacteria ubicua, Gram (-), anaerobia facultativa, oxidasa negativa, fermentadora de lactosa y glucosa; que presenta forma de bastón y se clasifica como miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de la clase *Gammaproteobacteria* (Jang *et al.*, 2017). Es móvil debido a la presencia de flagelos peritricos y no forma esporas. Además, es el habitante comensal más prevalente del tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente; sin embargo, también algunas de las cepas pertenecientes a esta especie son consideradas patógenas importantes (Allocati *et al.*, 2013), debido a que son responsables de enfermedades asociadas a humanos y animales. Los miembros de esta especie se dividen en tres grupos principales: comensales, patógenos diarreogénicos y patógenos extraintestinales (ExPEC, por sus siglas del inglés, J Vila *et al.*, 2016). Recientemente se han reportado cepas de *E. coli* asociada a meningitis (NMEC, Liu *et al.*, 2020) y/o vinculada a otras infecciones del aparato excretor como cistitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía.

La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, por tanto viven sin causar daño en el intestino; sin embargo, el grupo diarreogénico (DEC, por sus siglas del inglés) contempla cepas patógenas asociadas a enfermedades intestinales, las cuales se han clasificado en seis patotipos: enteropatogénica (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), de adherencia difusa (DAEC) y enterohemorrágica (EHEC, Gomes *et al.*, 2016). Cabe mencionar que el término *E. coli* productora de Shiga toxina (STEC) incluye todas las cepas que presenten este factor de virulencia. En general, los brotes epidémicos causados por cepas DEC se asocian con el consumo de alimentos o agua contaminados (Vila & Zboromyrska, 2012); aunque la OMS, también ha descrito como ruta de transmisión el contacto persona-persona transmitiéndose por vía oral-fecal.

Las cepas de *E. coli* patógenas están identificadas por serogrupos específicos, en el caso de las patogénicas poseen un conjunto de factores de virulencia responsables de las diferentes manifestaciones clínicas que presentan los pacientes. La serotipificación es el método principal para identificar las cepas patógenas de *E. coli* de las comensales (Reid *et al.*, 1999); este método fue desarrollado por Kauffman y en donde en ocasiones, los



serotipos se asocian con un cuadro clínico en particular (Calvo *et al.*, 2012). Actualmente, se conocen más de 200 serotipos (Rodríguez-Ángeles, 2002).

### **2.1.1. Principales factores de virulencia.**

Usualmente las cepas patogénicas contienen diferentes factores de virulencia (Kim, 2016), como adhesinas, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción, formación de biopelículas y otros factores que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Faleiro, 2009). Es importante destacar que las adhesinas participan tanto en procesos de adhesión, como en colonización en las células del hospedero y se ubican en la membrana externa microbiana, formando parte de estructuras como el pili, fimbrias y flagelo. Sin embargo, el contacto entre *E. coli* y la célula del huésped se relaciona directamente con el flagelo; aunque también se ha descrito que este último favorece la motilidad, así como el desplazamiento bacteriano hacia ambientes benéficos o el alejamiento de nichos adversos que están directamente relacionados con su sobrevivencia (Avelino *et al.*, 2013), siendo el estudio del flagelo y su correspondiente motilidad importante para ayudar a comprender el curso de la patogénesis en este microorganismo (González & Georges, 2017).

#### **2.1.1.1. Características y composición del flagelo.**

El flagelo, es el apéndice responsable de la motilidad en *E. coli* y consta de subunidades repetidas de la proteína flagelina expresados por el gen *fliC* (Moura *et al.*, 2013). En general, es una estructura proteínica compleja y eficiente que participa en procesos como la formación de biopelículas. En *E. coli* el flagelo está formado por un filamento unido a la célula mediante la sección denominada gancho, que, a su vez, recibe la fuerza de torsión o rotación generada por un motor rotatorio, donde dicha fuerza proviene directamente del gradiente transmembranal de protones, que involucra al complejo Mot (Figura 1, Avelino, 2014); permitiendo cambiar aleatoriamente de dirección; ya sea en un movimiento tipo *swimming* o *swarming*.

El movimiento tipo *swarming* es el más estudiado, debido a que involucra un proceso multicelular que tiene lugar en superficies sólidas o en medios con elevada

viscosidad, permitiendo a las bacterias moverse de forma coordinada, posterior a la formación de células elongadas-hiperflageladas (Molero, 2014).

Como se observa en la Figura 1, este complejo proteínico atraviesa la membrana interna, la pared celular y la membrana externa (González & Georges, 2017), los dos anillos externos, L y P, reciben su nombre por su ubicación en el lipopolisacárido y peptidoglicano respectivamente, mientras que el anillo MS está en contacto con la membrana plasmática y el espacio periplásmico (Molero, 2014).

Este complejo forma microdominios y/o compartimientos con lípidos específicos, en regiones muy particulares dentro de la membrana celular. Se han caracterizado a estas regiones como balsas lipídicas (“*lipid rafts*”, en inglés) que en organismos modelo como *E. coli* se ha demostrado que son cruciales para varios procesos celulares importantes, como la promoción de la adhesión bacteriana a la células huésped (Cazzola *et al.*, 2020), así como la división celular y la transducción de señales, esporulación, formación de biopelículas, segregación cromosómica, secreción y formación del citoesqueleto (Barák & Muchová, 2013)

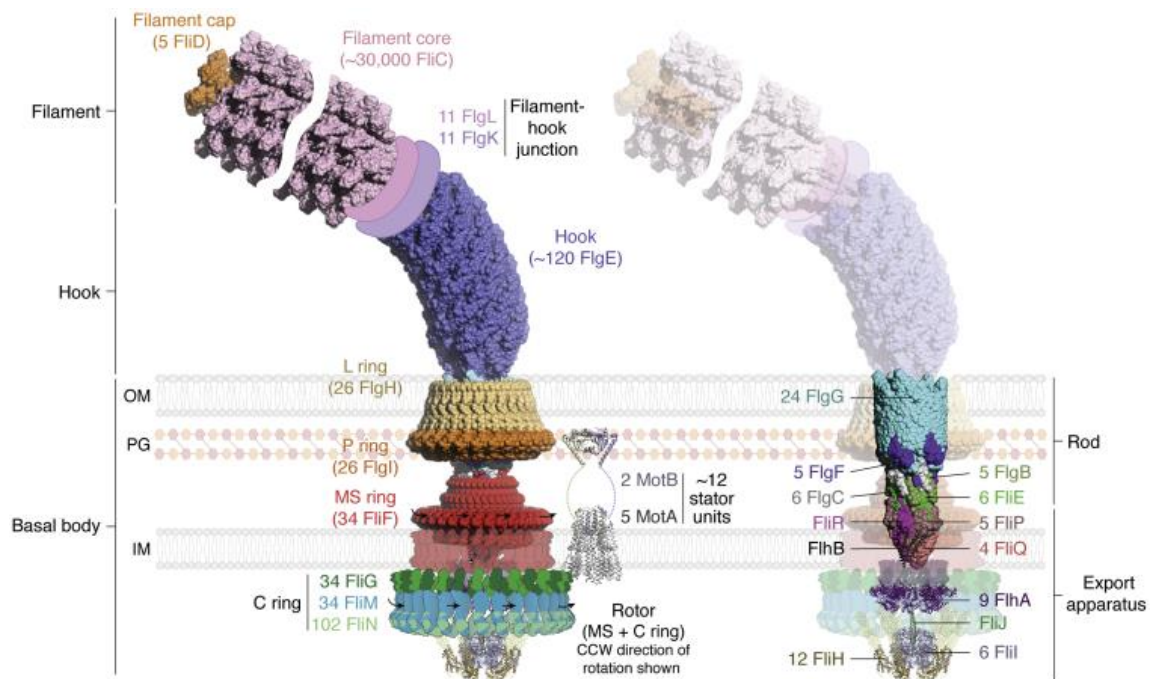


Figura 1. Estructura del flagelo en *E. coli*, conformada por tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. Superficies moleculares solidas del apéndice bacteriano (panel izquierdo). Composición interna del aparato (panel derecho) Fuente de la imagen Mondino et al., (2022).

La estructura del filamento del flagelo (Figura 2) se compone de

aproximadamente 20,000 subunidades de monómeros de flagelina (*fliC*) con un peso molecular entre 50 y 60 kDa y se caracteriza por presentar 4 dominios globulares distintos denominados D0, D1, D2 (con los subdominios D2a y D2b) y D3. Las regiones N y C-terminal de los dominios D0 y D1 están altamente conservadas entre distintas especies bacterianas y resultan fundamentales para el ensamble del flagelo, ubicándose ambos dominios hacia el interior del mismo. Contrariamente, los dominios D2 y D3 se ubican hacia el exterior y constituyen una región hipervariable entre cepas y especies en tamaño y secuencia (Yonekura *et al.*, 2003).

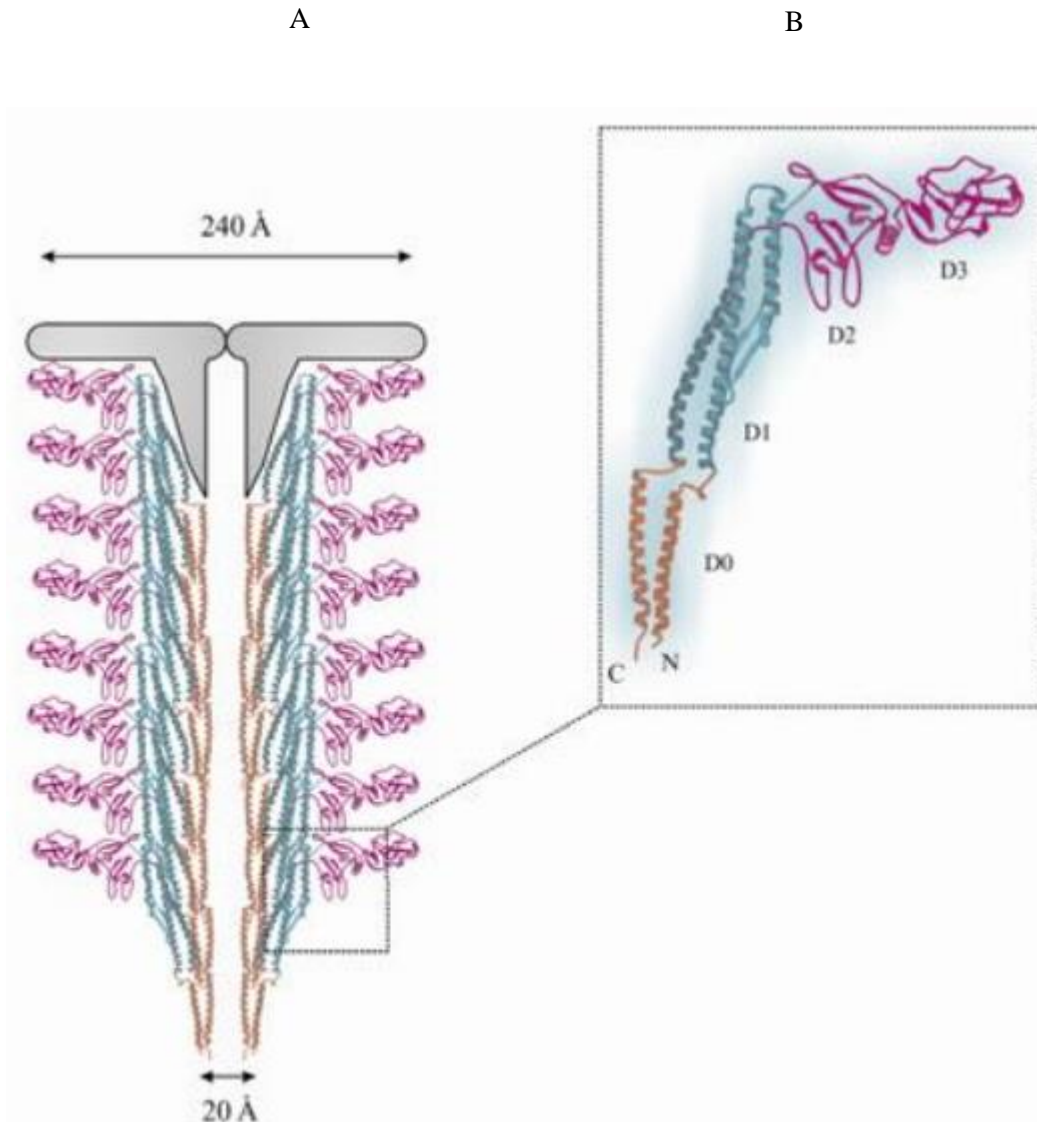


Figura 2. (A) Estructura del filamento conformado por monómeros de flagelina de *E. coli* K-12. (B). Dominios globulares presentes. Fuente de la imagen, Barettino Luengo, 2016.

## **2.2 Envoltura celular bacteriana.**

### **2.2.1 Características y composición**

La estructura externa o envoltura celular bacteriana está dispuesta con la membrana citoplasmática, pared celular y una sustancia extracelular denominada glicocálix (Lucana & Huanca, 2014); además, existen las estructuras superficiales como cápsulas, flagelos y fimbrias, que sólo se encuentran en algunas especies. La composición de la pared celular y la membrana, permite la clasificación de bacterias en dos tipos, Gram-positivas y Gram-negativas.

La pared celular de las bacterias Gram-positivas consta de una capa gruesa de peptidoglicano y una sola membrana, mientras que en bacterias Gram-negativas es más compleja, formada por dos membranas, una externa (OM, por sus siglas del inglés) y una interna o membrana citoplasmática (IM, por sus siglas del inglés); entre estas dos membranas se intercala el espacio periplásmico, que actúa como un amortiguador entre las muy diferentes condiciones del entorno externo y el interior de la bacteria (Figura 3; Barák & Muchová, 2013). Cabe destacar, que el espacio periplásmico de las bacterias Gram-negativas contiene proteínas que participan en la captación de nutrientes, como enzimas hidrolíticas ( $\beta$  lactamasas) que convierten las macromoléculas en productos más pequeños que pueden ser metabolizados por la bacteria, así como enzimas que participan en la síntesis del peptidoglicano (punto 2.2.2) y en la modificación de compuestos tóxicos que podrían lesionar la célula (Pérez & Mota, 2006). Por otra parte, la OM es una capa protectora y presenta una barrera de permeabilidad para moléculas grandes, por lo que su función principal es en gran medida retener las proteínas dentro del periplasma. Mientras que la IM, debe mantenerse intacta, ya que es fundamental para la viabilidad (y por lo tanto la productividad) de la célula y es una barrera para las impurezas no deseadas de la célula huésped que se liberarían tras la lisis celular (Kastenhofer *et al.*, 2021)

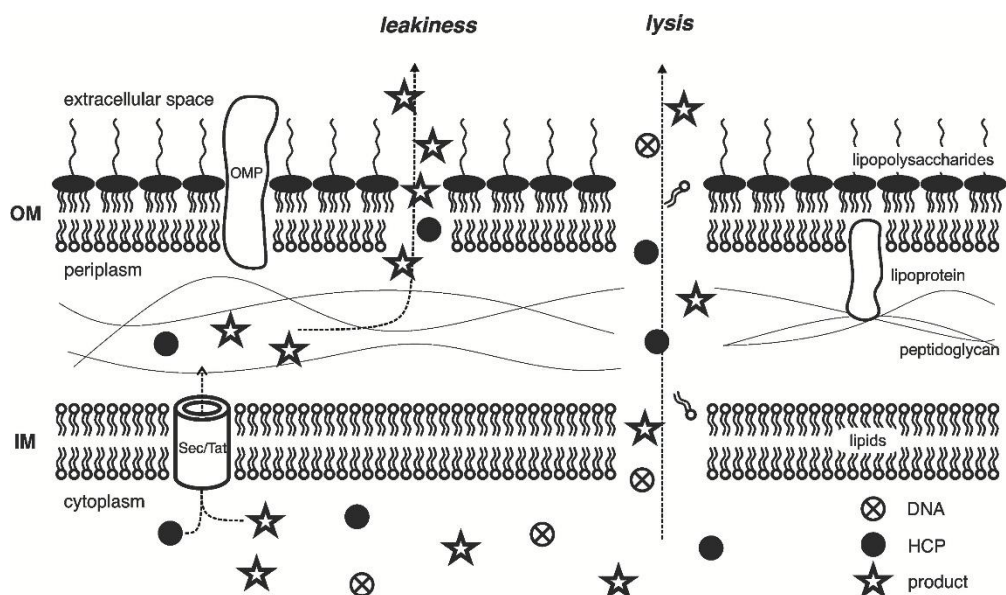


Figura 3. Ilustración de la envoltura celular. La fuga intencional de productos puede desencadenar en una lisis celular. Fuente de la imagen: (Kastenhofer et al., 2021).

### 2.2.2. Pared celular

La pared celular es la estructura que le da forma y rigidez a la bacteria, protegiéndola de la lisis osmótica. Está formada por peptidoglicano, también denominado mureína (Castro, 2014). El peptidoglicano (PG) es un polímero que requiere ser sintetizado por dos sistemas especialmente distintos: el divisoma y las maquinarias de elongación de PG (PGEM, siglas en inglés, Billaudeau *et al.*, 2019). El complejo multienzimático PGEM está formado por proteínas de unión a penicilina (PBP), proteínas de membrana (MreBCD, RodA, RodZ) y otras proteínas relacionadas a forma, elongación, división y esporulación bacteriana (SEDS, siglas en inglés, Wong, 2017). En este complejo, las proteínas SEDS realizan reacciones de glicosil-transferasa y las proteínas de unión a penicilina (PBP) catalizan reacciones de glicosiltransferasa, transpeptidasa y modificaciones en el peptidoglicano (Zielińska *et al.*, 2020).

Otro miembro de la familia SEDS es RodA, el cual recientemente se ha demostrado que es una polimerasa de peptidoglicano (Sjodt *et al.*, 2018) que forma un complejo estable junto a PBP2, y proporcionan actividad GTasa y TPasa, respectivamente, durante la síntesis de peptidoglicano cilíndrico y esta coordinación es llevada a cabo por MreB (Hussain *et al.*, 2019; Zielińska *et al.*, 2020). En específico, MreB se polimeriza en filamentos cortos, interactuando con MreC, mientras que RodZ interactúa fuertemente con MreB y MreC, estas interacciones son esenciales para

mantener la morfología bacteriana (Figura 4, Sjodt *et al.*, 2018).

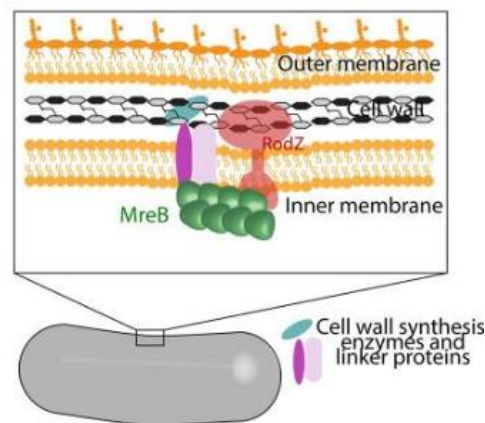


Figura 4. Esquema representativo de *E. coli* y la maquinaria de elongación, *MreB* se localiza en parches debajo de la membrana citoplasmática y recluta otras proteínas elongasómicas. La capa de peptidoglicano está intercalada por la membrana citoplasmática y la membrana externa. Fuente de la imagen Shi et al., 2018.

La relación entre estas proteínas ha sido demostrada en estudios previos (Figura 5, Xiaolong Liu *et al.*, 2020) donde *MreB* interactúa con proteínas adyacentes. El modelo representado en la (figura 5B) está respaldado por los fenotipos de cepas mutantes, sin embargo, se desconoce la composición exacta de estos complejos y cómo funcionan en la célula y es de suponer que aún no se conocen todas las proteínas involucradas. Asimismo, los mecanismos por los cuales las bacterias agrandan y dividen la pared de PG durante el crecimiento y la división celular son poco conocidos (Egan A *et al.*, 2020).

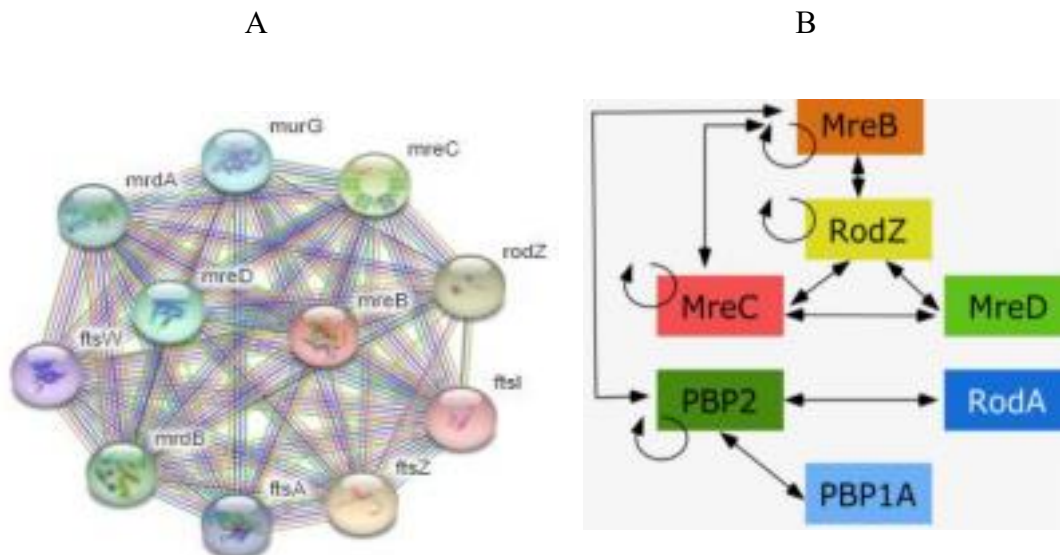


Figura 5. Interacción de MreB con otras proteínas (A). Fuente de la imagen: <https://string-db.org>. Interacciones identificadas entre las proteínas elongasomas (B), las líneas de flechas dobles representan la interacción entre diferentes proteínas, las flechas circulares indican auto-interacción. Fuente de las imágenes <https://string-db.org> (A) y Xiaolong Liu et al., (2020, B).

### 2.2.3 Membrana celular

La membrana plasmática es la estructura que delimita a la célula, es un elemento dinámico y fundamental en el mantenimiento de su integridad (Ulises Meza *et al.*, 2010) y está compuesta principalmente por lípidos y proteínas.

En los últimos años se ha hecho evidente que los complejos de proteínas y los lípidos no se distribuyen uniformemente (Zielińska *et al.*, 2020), existe evidencia de que ciertos lípidos interactúan preferentemente entre sí, se involucran en un comportamiento colectivo y generan dominios laterales, siendo llamados “balsas lipídicas”. Las balsas lipídicas son nanodominios de membranas que tienen el potencial de formar dominios microscópicos (> 300 nm) que reclutan selectivamente lípidos y proteínas (Sezgin *et al.*, 2017).

Anteriormente se había demostrado por microscopía de fluorescencia que *E. coli* contiene microdominios con distintas propiedades físicas en su membrana plasmática (Oswald *et al.*, 2016); esta propiedad de formación de balsas lipídicas es atribuida a la proteína MreB; por lo tanto, alteraciones en la dinámica de MreB trae consigo la disminución de la fluidez de la membrana y, como consecuencia, en la síntesis de peptidoglicanos (Zielińska *et al.*, 2020); así como la perturbación de la homeostasis general de los lípidos afectando la localización de las proteínas de la membrana (Strahl *et al.*, 2014).

## 2.3 Descripción del citoesqueleto bacteriano

### 2.3.1 Proteína MreB

Los procariontes poseen proteínas homologas a la tubulina y a la actina. La primera evidencia de un homólogo de tubulina, se determinó en 1992, la proteína FtsZ requerida para la división celular. En 2001 Jones *et al.*, describieron que la proteína MreB organiza estructuras helicoidales y le proporciona forma a la célula (Sacanelles & Garay, 2017), siendo un homólogo de actina conservado entre las bacterias en forma de bastón (Kurita

*et al.*, 2018).

La proteína MreB se caracteriza por dos dominios (I y II) que mantienen un sitio de unión a nucleótidos en la hendidura. Cada dominio se subdivide en dos subdominios (A y B, Figura 5). Los dos subdominios más grandes IA y IIA, tienen un pliegue común que comprende una hoja beta de cinco hebras rodeada por tres hélices alfa. Estos subdominios están conectados a través de una hélice, H4. Los subdominios más pequeños IB y IIB son más diversos en la superfamilia de actina y probablemente sean exclusivos de la función específica de las proteínas (Van den Ent *et al.*, 2001). Cabe destacar, que existen estudios que exponen a las hélices 6 y 7 como sitios permisivos que pudieran permitir la inserción de dominios extraños como sitios de fusión, ya que se encuentra a cierta distancia de los residuos implicados en la polimerización de MreB (Reshes *et al.*, 2008).

MreB es una proteína asociada con procesos subcelulares que incluyen división celular, segregación cromosómica, morfogénesis de la pared celular y polaridad celular (Awuni, 2020); y más recientemente se ha demostrado que participa en la motilidad de tipo deslizamiento en la bacteria *Myxococcus xanthus* (Fu *et al.*, 2018).

Se conoce además que es una proteína muy dinámica moviéndose a lo largo del eje corto de las células, presumiblemente reflejando el movimiento de las maquinarias sintéticas de la pared celular durante el ensamblaje enzimático de la malla de peptidoglicano (Billaudeau *et al.*, 2019).

Debido a su alto dinamismo, se le ha relacionado con las RIFs a nivel de membrana (Zielińska *et al.*, 2020); la interferencia con estos dominios perturba la homeostasis general de los lípidos y afecta la localización de las proteínas de la membrana (Strahl *et al.*, 2014), surgiendo el concepto balsas de lípidos, descritas con anterioridad. Strahl *et al.*, (2014) mediante la aplicación de diferentes técnicas de tinción de lípidos y el uso de una variedad de cepas mutantes, estableció que el citoesqueleto MreB de *B. subtilis* está asociado con dominios de lípidos fluidos y participa en la distribución de lípidos y proteínas.



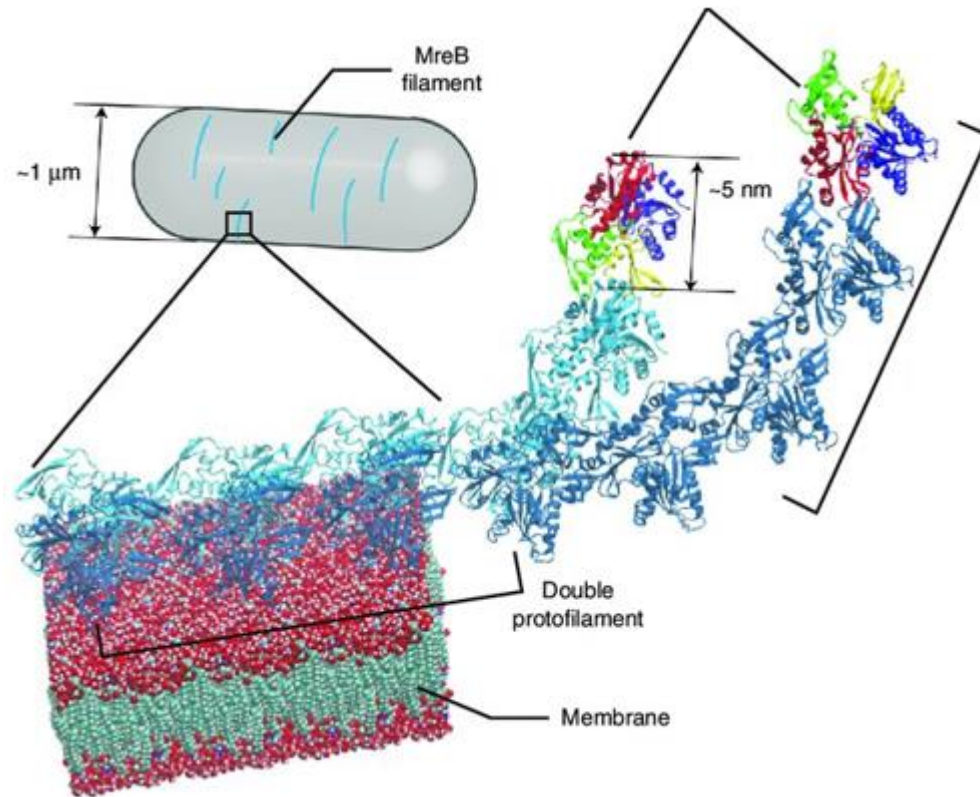


Figura 6. Representación de la estructura cristalina de MreB. Se muestra una arquitectura típica de cuatro subdominios (diferentes colores). Fuente de la imagen Shi et al., 2020.

## 2.4 Antimicrobianos naturales utilizados para el control de patógenos.

La aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos ha aumentado drásticamente en los últimos años, conocidas como cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE, Imran *et al.*, 2020) lo que ha resultado en la necesidad de encontrar nuevos agentes antibacterianos (Awuni, 2020). Una estrategia prometedora como alternativa a los antibióticos son los compuestos fitoquímicos, productos vegetales producidos como metabolitos secundarios de los cuales algunos poseen efectos antimicrobianos interesantes (Al-Mnaser & Woodward, 2020; Di Pasqua *et al.*, 2006). Aceites esenciales como carvacrol, timol, eugenol, perilaldehído, cinamalaldehído y ácido cinámico son algunos de los fotoquímicos a los que se les ha reportado tener capacidad antimicrobiana debido a la presencia en su estructura química del grupo fenol (Burt, 2004; Ben Arfa *et al.*, 2006).

La eficacia de estos compuestos se ha probado *in vitro* en contra de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, en donde se han realizado ensayos dando como resultado que según la dosis se puede inhibir el crecimiento de estos microorganismos (Burt, 2004).

Además, se ha reportado que el aceite esencial de orégano induce la alteración de la permeabilidad en las membranas de microorganismos (como *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*) con la consiguiente fuga de protones, fosfatos y potasio. Sin embargo, entre los compuestos fenólicos, el carvacrol tiene una de las actividades antimicrobianas más fuertes (Ben Arfa *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio se encontró que los extractos de orégano (*Lippia graveolens*), palo de Brasil (*Haematoxylon brassiletto*) y carvacrol mostraron actividad bactericida y efecto sobre el crecimiento, motilidad y expresión de genes de virulencia de *E. coli* (García-Heredia *et al.*, 2016). Así mismo, se determinó que el carvacrol es un compuesto activo contra *E. coli* O104: H4, alterando incluso su patrón de adherencia agregativa (Ortiz *et al.*, 2021).

Dado lo anterior, se estima que el carvacrol, pudiera tener actividad antimicrobiana debido a que es uno de los pocos compuestos naturales que tiene efecto desintegrador de la membrana externa de bacterias Gram-negativas (La Storia *et al.*, 2011).

### **2.4.1 Carvacrol**

El carvacrol [2-metil-5-1-metiletil fenol] es un monoterpenoide fenólico, presente en numerosas plantas aromáticas, entre las que se encuentran el tomillo y el orégano. En la actualidad, el carvacrol se utiliza en concentraciones bajas como ingrediente aromatizante y conservador de alimentos, así como como ingrediente de fragancia en formulaciones cosméticas (Suntres *et al.*, 2014); posee una amplia gama de bioactividades útiles para aplicaciones clínicas, tales como antimicrobiano, antioxidante y anticancerígeno (Figura 6, Sharifi-Rad *et al.*, 2018); además en ciertas concentraciones puede inhibir el crecimiento, motilidad, expresión de genes de virulencia y la adhesión a células epiteliales (García Heredia *et al.*, 2016).

Se ha reportado que el carvacrol (monoterpeno) tiene actividad antimicrobiana

mayor que la de otros compuestos volátiles como los sesquiterpenos (Huamán *et al.*, 2016); debido a la presencia de un grupo hidroxilo libre, la hidrofobicidad y el grupo fenol (Sharifi Rad *et al.*, 2018). Recientemente se ha descrito que este compuesto, es capaz de incrementar la fluidez de la membrana celular al actuar sobre la bicapa de fosfolípidos, lo que trae consigo el aumento de la permeabilidad (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012) produciendo poros en esta, y lisando a la bacteria (Carhuallanqui *et al.*, 2020). Dicha permeabilidad ha sido confirmada mediante el monitoreo del eflujo de H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y ATP, y la entrada de colorantes de ácidos nucleicos (Hyldgaard & Meyer, 2012), encontrando además la disminución en el potencial de membrana (Ultee *et al.*, 2002).

También se ha propuesto que el carvacrol interactúa con las proteínas de membrana y las enzimas periplásmicas, pero la evidencia de esto es limitada. Además, se estima que el carvacrol tiene objetivos intracelulares, pero los estudios que lo documentan son pocos y no identifican estos posibles objetivos. Por lo anterior, las evidencias de la membrana como sitio de acción del carvacrol son muchas y los resultados sugieren que el modo de acción del carvacrol es aumentando la fluidez y la permeabilidad de las membranas (Hyldgaard & Meyer, 2012); aunque, muchos estudios reportan que el carvacrol actúa sobre la membrana externa, se cree que su sitio de acción es la membrana citoplasmática. Con este último punto, existen estudios que demuestran que durante la exposición de *E. coli* a concentraciones subletales de carvacrol, se han observado cambios en la proporción ácidos grasos saturados e insaturados de la membrana celular, influyendo en el perfil de composición de ácidos grasos de cadena larga de este microorganismo (Di Pasqua *et al.*, 2006).

En un estudio, las células de *E. coli* cultivadas en presencia de carvacrol produjeron cantidades significativas de GroEl, lo que indica que el plegamiento de proteínas se vio afectado. Además, inhibió la síntesis de flagelina, lo que provocó que las nuevas células carecieran de flagelos (Burt *et al.*, 2007). Las células que tenían los flagelos mostraron una motilidad disminuida al aumentar la concentración de carvacrol, lo que indicó que el carvacrol interrumpe el potencial de membrana y, por lo tanto, la fuerza protón motriz necesaria para impulsar el movimiento flagelar (Gabel y Ver, 2003; Burt *et al.*, 2007).

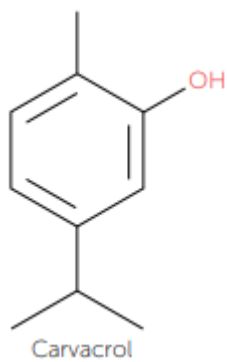


Figura 7. Estructura química del carvacrol. Fuente de la imagen López et al., (2016).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los aceites esenciales presentes en vegetales son ricos en compuestos bioactivos; siendo un ejemplo el carvacrol, este monoterpenoide fenólico presente en numerosas plantas aromáticas, presenta una serie de aplicaciones entre las que destaca inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Existe evidencia que la capacidad antimicrobiana del carvacrol es atribuida a la desestabilización de la membrana bacteriana provocando un incremento en la permeabilidad del ATP, produciendo poros y lisando a la bacteria. A nivel de membrana, cuando sucede este efecto se perturba la homeostasis general de los lípidos, afectando la localización de las proteínas de la membrana y por consiguiente, teniendo un efecto sobre la disminución en la síntesis de peptidoglicano.

Por otro lado, se ha visto que la proteína MreB, juega un rol importante en la supervivencia celular, a través del mantenimiento de la forma celular, motilidad, división celular y en el transporte intracelular; este último relacionado a su función de organización de las proteínas y lípidos presentes en membrana, atribuido a su alto dinamismo. Esta capacidad le ha ayudado a crear RIFs en la membrana bacteriana, quedando demostrado que las interferencias con la proteína MreB traen consigo la perturbación general de los lípidos, afectando directamente la colocación de las proteínas de membrana, entre ellas los flagelos. Si bien, MreB es una proteína que se ha estudiado ampliamente y existen muchos reportes sobre sus interacciones con proteínas adyacentes y el control de la síntesis de PG, todavía carece de una función aprobada, por lo tanto, se ha vuelto cada vez más importante descubrir los factores moleculares que gobiernan las propiedades estructurales y las propiedades mecánicas.

Ante esto, hemos visto la oportunidad de contribuir a la ciencia a partir del estudio del efecto que tienen concentraciones subinhibitorias de carvacrol sobre las RIFs, la localización de los filamentos de MreB y en la formación de flagelos, lo que nos permitirá hacer un análisis de las alteraciones en la membrana y el flagelo, utilizando como modelo bacteriano *E. coli*.

## 4. HIPÓTESIS

El carvacrol altera la formación de filamentos de MreB y la translocación de flagelos en la membrana bacteriana modificando las RIFs en *E. coli*.

## 5. OBJETIVOS

### **General:**

- Identificar los cambios morfológicos que presenta *E. coli* K-12 en su membrana, en la estructuración de filamentos de MreB y la formación de flagelos, por exposición a concentraciones subinhibitorias de carvacrol.

### **Específicos:**

- Generar una mutante de MreB que contenga acoplada la proteína GFP (proteína verde fluorescente)
- Estudiar la disociación de los RIFs y la formación de los filamentos de la proteína MreB en presencia de concentraciones subinhibitorias de carvacrol.
- Evaluar el papel del carvacrol en el movimiento bacteriano tipo *swarming*.
- Establecer la localización de los flagelos y las RIFs creadas por MreB en presencia de carvacrol.

## 6. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### 6.1 Lugar de trabajo

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

### 6.2 Cepas

Se utilizó la cepa *E. coli* K-12 MG 1655 como control, esta cepa no presenta ninguna modificación. Además, la cepa de *E. coli* K-12 MG 1655 que contiene la mutación en *mreB*, es decir que presenta la proteína de fusión fluorescente, fue amablemente proporcionada por el Dr. Cho pertenecientes a la Universidad de Harvard.

### 6.3 Activación de cepas.

A partir de las cepas mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC, Bioxon, BD de México) con 20% de glicerol (Sigma-Aldrich, México), se realizó la activación de acuerdo al protocolo descrito por García-Heredia *et al* (2016), en tubos que contenían 5 ml de caldo Luria Bertani (LB), los cuales fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ . Posteriormente se prepararon cultivos transfiriendo una asada a tubos con 16 ml de agar ICC y estos fueron incubados durante 24 h/ $37^{\circ}\text{C}$ . Los cultivos se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante no más de 8 semanas. A partir de estos, se inoculó una asada por estría en cuatro cuadrantes en los medios MCK y EMB. Se seleccionarán como presuntas *E. coli* aquellas colonias que en el agar MCK presentaron color rosa a rojo con una ligera zona de precipitación, y color negro azulado con brillo verde metálico en agar EMB.

### 6.4 Ensayo de transformación por calcio competencia

Previamente se buscó generar una mutante de *mreB* que contuviera acoplada la proteína de *gfp*. Para esto se utilizó la cepa de *E. coli* K-12 MG 1655, la cual se activó en



5 ml de caldo LB por 24 h a 37°C, para posteriormente inocularse en un matraz estéril que contenía 45 ml de caldo LB suplementado con L-arabinosa, hasta llegar a una  $A_{600nm}$  0.4. A partir de este, se prepararon células calcio-competentes y se transformaron mediante choque térmico a 42°C por 90s, tratando de insertar el gBlock de *gfp* previamente diseñado en nuestro laboratorio (Tamez-Hernandez, 2020). Posteriormente, se incubó en medio SOC, a 37°C/1 h/200 rpm, para después sembrar y realizar la selección de transformantes y finalmente realizar la confirmación de las mutantes por medio de su extracción y PCR punto final.

## 6.5 Confirmación de mutante

### 6.5.1 Extracción de ADN por el método de ebullición

Se tomaron colonias de cada placa y con ayuda de un asa bacteriológica se colocaron de manera individual en tubos Eppendorf de 600 µl que contenían 15 µl de amortiguador de lisis (EDTA 0.2 M, TRIS HCl 1 M pH 7.4, NaCl 1 M y Tritón al 2 %). Se homogeneizaron todos los tubos con la ayuda del asa hasta obtener una solución blanquecina. Los tubos fueron colocados en un recipiente con agua hirviendo por 10 min. Pasado el tiempo, se llevaron a centrifugar (Eppendorf 5415C) a 13,000 rpm por 10 min. Después, se tomó el sobrenadante y se depositó en tubos nuevos de 200 µl y se dejaron en congelación hasta su uso.

### 6.5.2 Detección de *mreB* por PCR punto final

A partir del producto de la extracción de ADN, se realizó una PCR empleando un cebador para amplificar a *gfp* y *mreB*. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Veriti 96 well thermal cycler, Appl Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial (95°C, 2 min, 1 ciclo); desnaturalización (95°C, 40s, 35 ciclos); alineamiento (58°C, 40s, 35 ciclos); extensión (72°, 2 min, 35 ciclos); y extensión final (72°C, 5 min, 1 ciclo).

	Oligonucleótido	Tamaño (pb)
<b>Posición <i>mreB</i>-</b>	F - GGCAGTGTCCAGTGCAACC	672
<b>sfGFP</b>	R - CCATCTTCAACGTTGTGGCG	

<b>Posición mreB-</b>	F - GGCAGTGTCCAGTGCAACC	1133
<b>sfGFP-mreB</b>	R - CCTGATTGAAGAACCGATGG	

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de mreB por PCR punto final.

## 6.6 Compuestos naturales

Se utilizó el carvacrol, el cual fue adquirido comercialmente con grado de pureza del 99% (Sigma-Aldrich, México). Diluciones fueron realizadas en agua y Tween al 0.5% y se conservaron en frasco ámbar a 4 °C por un período no mayor a dos semanas.

## 6.5 Preparación de Laurdan

Se preparó un stock de Laurdan (Thermofisher Scientific) a 10 mM por dilución en DMF (N-N Dimetilformamida, Fermont). El producto se almacenó a -20 °C (lapso no mayor a 3 meses) en microtubos cubiertos con papel aluminio para evitar su exposición a la luz. A partir stock de Laurdan, se preparó una solución de trabajo de 0.5 μM en DMF.

## 6.6 Concentración mínima bactericida (CMB)

### 6.6.1 Soluciones de carvacrol

Se preparó la solución madre de carvacrol (5 mg/ml) con agua y tween al 0.5 %, se realizaron diluciones de trabajo que fueron disueltas en agua. Posteriormente se esterilizaron por filtración con membranas de nitrocelulosa 0.45 μm (Sartorius Stedmin, Francia).

### 6.6.2 Ajuste del inóculo

Las cepas fueron inoculadas en caldo Müeller Hinton (MH). Para los ensayos, las cepas se ajustaron a  $1 \times 10^8$  UFC/ml ( $A_{600nm}$  0.5).

### 6.6.3 Ensayo de CMB

La CMB fue determinada utilizando el método de microdilución en caldo estándar descrito por Luber *et al.* (2002) y modificado por García Heredia *et al.* (2013). Brevemente, se llenaron placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos estériles (BD Falcon, San José CA, EUA) con 100  $\mu$ l de caldo MH 2X, 80  $\mu$ l de las diferentes concentraciones de carvacrol a probar y 20  $\mu$ l de la suspensión bacteriana ajustada (punto 6.6.2) para un volumen total de 200  $\mu$ l y se incubó por 24 h a 37 °C. Después se tomaron 10  $\mu$ l de cada pozo y fueron inoculados sobre placas de agar MH para incubar por 24h/37°C. Se consideró como CMB la concentración mínima en la cual no se observó crecimiento microbiano. El control negativo fue medio + compuesto y el positivo medio + agua (en lugar de solución de carvacrol) + cepa.

#### **6.6.4 Índice de viabilidad y determinación de concentraciones subinhibitorias**

Las concentraciones sub-inhibitorias seleccionadas fueron las siguientes 0.025, 0.05 y 0.1 mg/ml, dichas concentraciones fueron utilizadas para desarrollar los ensayos *in vitro* subsiguientes.

#### **6.7 Espectroscopia con laurdan**

Se mantuvo la cepa silvestre de *E. coli* con las concentraciones subinhibitorias de carvacrol a 37°C en agitación a 190 rpm por 4 h. En cambio, para la cepa mutada fue necesario mantener el cultivo toda la noche para su adecuado crecimiento, después se le colocaron las concentraciones subinhibitorias de carvacrol y de manera similar se dejó a 37°C en agitación a 190 rpm por 4 h. Las suspensiones bacterianas se diluyeron en caldo nutritivo hasta obtener una  $A_{600}$  de 0.4. De estas se tomaron alícuotas de 1.5 ml y se centrifugaron a 10 000 rpm X 8 min y se lavaron dos veces en 1.5 ml de amortiguador Tris-HCl pH 7.4 (15 mM). Finalmente, se resuspendieron en 1.5 ml de 0.5  $\mu$ M de Laurdan. Los tubos fueron cubiertos con aluminio y se dejaron en agitación a 500 rpm x 1.5 h. Después se procedió con la medición fluorimétrica transfiriendo las suspensiones de células teñidas a una placa de microtitulación de 96 pocillos negra de fondo plano precalentada a 37°C (250  $\mu$ l/pocillo). La lectura se realizó en un fluorómetro (Perkin Elmer 2030) ajustado a una excitación de 355 nm y las emisiones de 485 nm y 535 nm.

Por último, se calculó el valor de la polarización generalizada con los datos obtenidos.

### **6.8 Motilidad Tipo *Swarming***

La motilidad tipo *swarming* se determinó mediante el procedimiento descrito por Lai *et al.*, (2009), con algunas modificaciones. Se prepararon placas Petri con agar LB blando (0.35%) con las distintas concentraciones subinhibitorias de carvacrol. Se empleó una alícuota de 10  $\mu$ l de cultivos ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) y se inoculó en el centro de la placa incubándose por 24h a 37°C (García-Heredía *et al.*, 2016). El grado de motilidad se basó en la distancia de migración a partir del centro de la placa. Esta metodología se realizó por triplicado.

### **6.9. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estimar el efecto que tiene el carvacrol sobre las distintas cepas. La cepa de *E. coli* K-12 WT se empleó como control. Posteriormente, se aplicó una prueba de Dunnett's para ver si existían diferencias significativas en el comportamiento de la mutante con respecto al control. Para este análisis se utilizó el programa IBM SPSS Versión 20 y los gráficos fueron realizados mediante el programa *ImageJ*.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Generación de mutante

Se buscó generar una mutante de MreB que tuviera acoplada la proteína *gfp*. Para esto se utilizó la cepa *E. coli* K-12 MG 1655 que permite la recombinación homóloga, debido a que posee los genes de recombinación de fagos *gam*, *bet* y *exo*, del bacteriófago  $\lambda$  red. A fin de insertar la proteína de fusión en dicha cepa, fue necesario en primer lugar identificar aquellas zonas de la proteína en donde la inserción de *gfp* no alterase el plegamiento y por ende la función de *mreB*. Por lo tanto, se determinó que entre los residuos G228 y D229 de la proteína *mreB* se encontraban sitios permisivos, ya que estaban lejos del sitio de polimerización de la proteína y no afectaba el plegamiento de la misma (Ursell *et al.*, 2014). En base a estas condiciones se amplificó la *gfp* presente en el gblock (secuencia de ADN con la proteína fluorescente) de Tamez-Hernandez (2020), para con esto obtener un nuevo gblock.

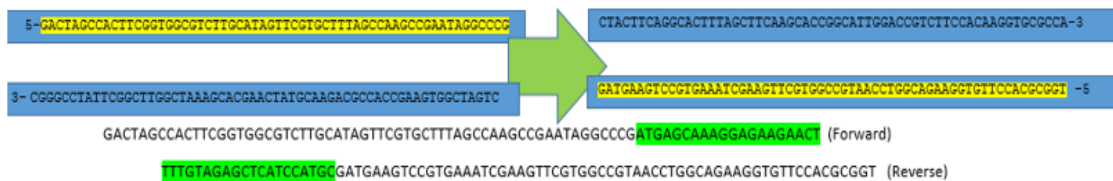


Figura 8. Gblock. La secuencia en color azul corresponde a la secuencia de *mreB* y la flecha en color verde corresponde a la proteína *gfp*.

Se le realizó una PCR al producto de *gfp* para identificar su presencia (Fig. 9, carril 2). La reconstrucción del nuevo gblock se muestra en la Fig. 8, en donde se observa la presencia de la proteína verde fluorescente y la secuencia de la proteína *mreB*. Después mediante el diseño de oligonucleótidos, se flanquearon 60 nt arriba y debajo de *gfp*. Los resultados de la PCR realizada mostraron que se obtuvo un amplicon de la proteína *gfp* (714 pb) más 120 pb, la cual se cortó y purificó (Fig. 9, carril 3), para posteriormente ser utilizado para los ensayos de transformación.

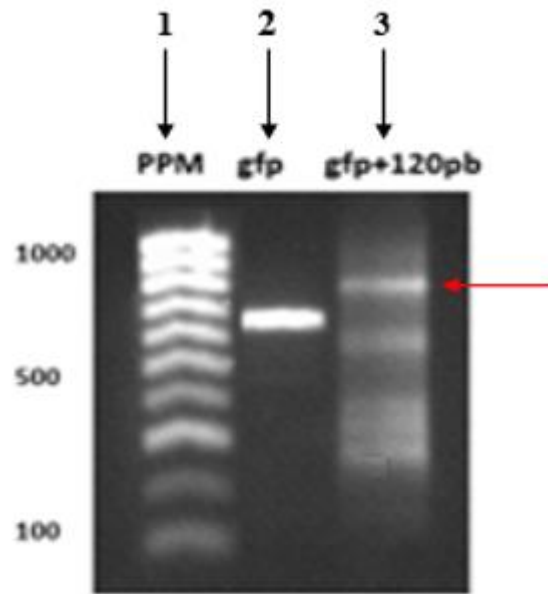


Figura 9. Gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 marcador de peso molecular 1 kb. Carril 2 *gfp* amplificado (714 pb). Carril 3 *gfp* amplificado más 120 pb forward y reverse presentes en el gblock de Tamez-Hernandez (2020).

Una vez obtenida la secuencia con regiones flanqueantes marcada en el carril 3 con flecha roja en la Fig 9, se trató de insertar dentro de *E. coli* K-12 mediante ensayos de transformación por calcio-competencia empleando el método descrito por Sambrook *et al.* (2001). Asimismo, se le insertó el plásmido pKD46 que contiene el gen de resistencia a kanamicina para incrementar la especificidad. En los ensayos se seleccionaron colonias y a estas se les realizó extracción de ADN por el método de ebullición y posteriormente una PCR empleando un cebador que involucraba a *gfp* y *mreB*. Sin embargo, en ningún ensayo de transformación se observaron colonias transformantes (Fig. 10).

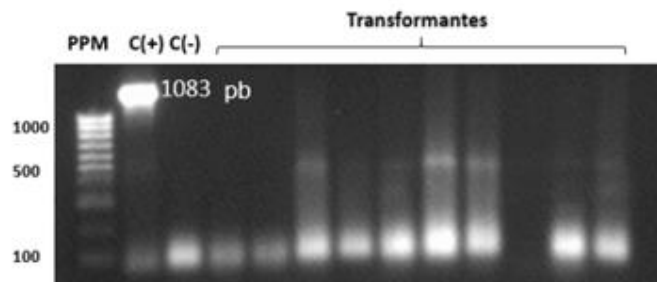


Figura 10. Producto de PCR detectando el tamaño del gen *MreB* posterior a la transformación. Carril 1 Marcador de peso molecular (1 kb). Carril 2 control positivo (*mreB* 1083 pb). Carril 3 control negativo (agua). Carril 4 resultados de los ensayos de transformación.

Por lo anterior y dado que no se consiguió la mutante de interés, se obtuvo la cepa que contiene la secuencia de *gfp*, que se encuentra en el locus nativo de *mreB*, donada por el Dr. Cho (2016, punto 6.2).

## 7.2 Identificación de cepas

Se comprobó la pureza de la cepa mutante donada. Para esto la cepa se activó y se creció en los agares selectivos MCK y EMB. En el agar MCK se obtuvieron colonias de color rosa a rojo rodeadas de una zona de precipitación; mientras que en agar EMB se observaron colonias negras azuladas con un brillo verde metálico (Fig. 11).

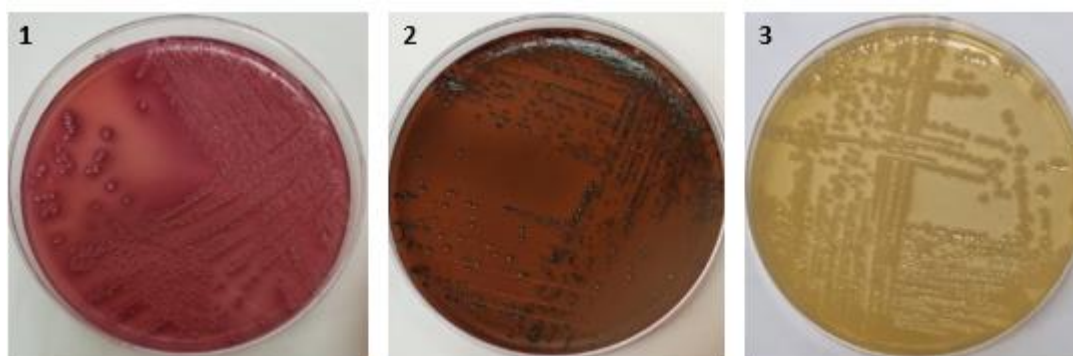


Figura 11. (1) Agar MCK colonias color rosa-rojizo presuntivas de *E. coli*. (2) Agar EMB, colonias negro azulado presuntivas de *E. coli*; (3) Agar ICC, colonias típicas de *E. coli*.

## 7.3 Determinación de CMB

Se determinó la CMB del carvacrol sobre las cepas de *E. coli* mediante el método de microdilución en caldo estándar. Se encontró que la CMB para la cepa mutante fue de  $0.41 \pm 0.02$  mg/ml; mientras que para la silvestre fue de  $0.47 \pm 0.3$  mg/ml.

Cepa	CMB carvacrol (mg/ml)
Cepa <i>E. coli</i> K-12 MG 1655	$0.47 \pm 0.3$
Cepa <i>E. coli</i> K-12 MG 1655 con <i>gfp</i>	$0.41 \pm 0.02$

Tabla 2. Concentración mínima bactericida del carvacrol en dos cepas de *E. coli*.

## 7.4 Motilidad tipo *swarming*

Los resultados de los ensayos de la motilidad tipo *swarming* demostraron que el carvacrol incrementó significativamente la motilidad tanto para la cepa silvestre como la mutante (Tabla 2). Este incremento fue dosis dependiente.

Tabla 3: Movilidad tipo *swarming* de *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de carvacrol.

Cepa	Tiempo de exposición Carvacrol (h)		Concentración de carvacrol (µl/ml) / desplazamiento bacteriano (cm)			
	Pre-exp	todo el ensayo*	Control	0.25	0.5	1.0
<b>K12 MG 1655</b>	4.0	24	3.41±0.12	4.33±0.2	4.72±0.2	5.85±0.2
	0.5	-	3.41±0.12	4.21±0.3b	5.10±0.5	6.04±0.2
<b>K12 MG 1655 mutante EU</b>	4.0	24	2.01±0.1	3.08±0.3	3.67±0.1	3.41±0.2
	0.5	-	2.01±0.1	3.24±0.5	3.41±0.2	4.02±0.4

Pre-exp = Pre-exposición (periodo de tiempo en que la bacteria se expuso a carvacrol antes del ensayo de *swarming*) de tiempo; \* = exposición de la bacteria a carvacrol durante el ensayo de movilidad.

## 7.5 Análisis de las RIFs en presencia de carvacrol

Los resultados demostraron variación en la fluidez de membrana al exponer a la cepa silvestre en distintos tiempos a carvacrol; ya que a los 30 min de exposición se observó aumento en el *Gp* (Grado de polarización), lo que se asocia a un aumento en la rigidez de la membrana; en tanto que a las 4 h de exposición se observó disminución en el *Gp*, lo que se asocia a aumento en la fluidez de la membrana. Lo anterior, hace suponer que la bacteria moduló estos cambios en la membrana entre los 30 min y se estabilizó para las 4 h (Fig. 12). Para la cepa mutante, también se demostró variación en la fluidez de la membrana, sin embargo, tanto a los 30 min y a las 4 h se observó aumento en la fluidez de membrana.



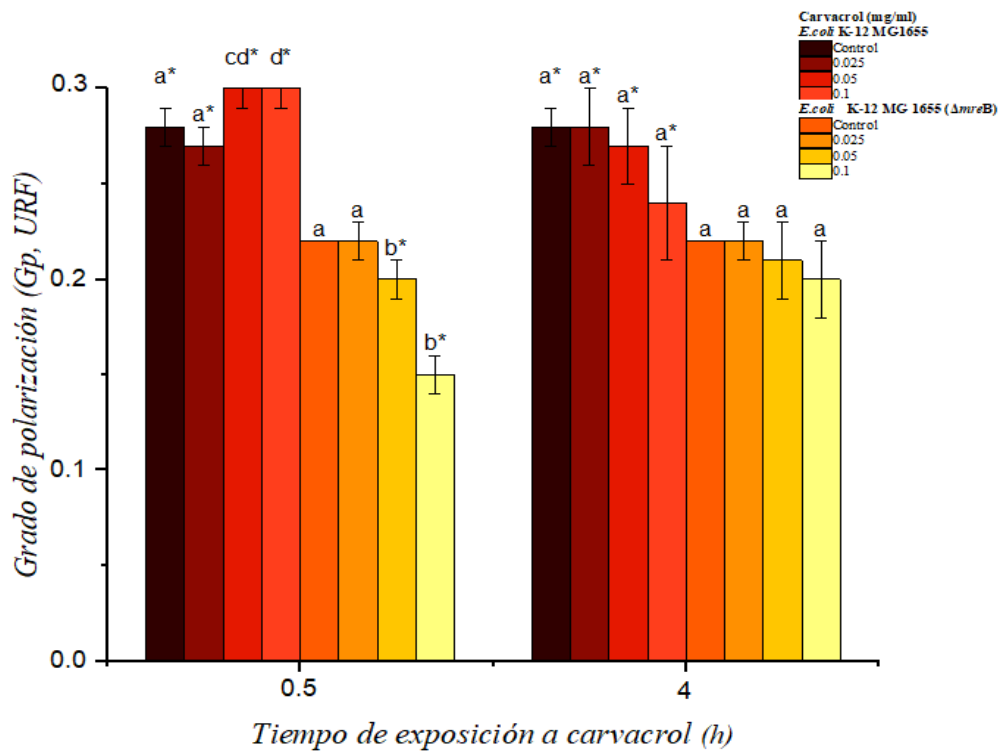


Figura 12. Grado de polarización de la membrana de *E. coli* K-12 MG 1655 y *E. coli* K-12 MG 1655 ( $\Delta mreB$ ). Concentraciones utilizadas 0.025 mg, 0.05 y 0.1 mg/mL de carvacrol.

## 8. DISCUSIÓN

Uno de los principales componentes del AE de orégano es el carvacrol (monoterpeno). El mecanismo preciso de acción antibacteriana del carvacrol aún no está plenamente establecido, algunos artículos reportan que la acción antimicrobiana es atribuida a la presencia de su radical hidroxilo, el cual le permite actuar como intercambiador de protones. Además, se conoce que ocasiona cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana celular bacteriana, incrementando los ácidos grasos insaturados.

Se ha mencionado que el carvacrol interactúa con la membrana exterior, disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, lo que causa la desestabilización de la misma, aumentando su fluidez y permeabilidad (Parra-Sepúlveda, 2020); y como consecuencia la fuga de protones e iones de potasio inhibiendo la ruta de síntesis de ATP con la posterior lisis del microorganismo (Gill y Holley, 2006; Fisher y Phillips, 2008). Sin embargo, hasta ahora existen pocos reportes de la acción antibacteriana del carvacrol a concentraciones subinhibitorias y su efecto en la membrana; aunque se ha mencionado que el carvacrol a concentraciones subletales es capaz de aumentar la fluidez de la membrana (García-García & Palou-García, 2008; Ochoa *et al.*, 2019). Dicha fluidez está directamente ligada a la proteína MreB que permite la organización y función de otras proteínas integrales de membrana, como la que sostiene al flagelo, que participa en la patogénesis del microorganismo, de allí la importancia del estudio a nivel de membrana.

Para esto primeramente realizamos ensayos de CMB para las cepas de *E. coli*. En nuestro estudio, determinamos CMBs de 0.47 y 0.41 mg/ml para la cepa silvestre y la mutante de *E. coli* respectivamente. Se han reportado CMBs de 0.32 mg/ml y 0.43 mg/ml en *E. coli* K-12 silvestre y una doble mutante de sfGfp en *mreB* y bfp en *fliC* respectivamente (Tamez-Hernandez, 2020), lo que concuerda con nuestro trabajo, mientras que se ha reportado la CMB de carvacrol en 0.3 mg/ml en *E. coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE, Khan *et al.*, 2017). En otro estudio, se encapsuló carvacrol en nanoliposomas y la CMB fue de 5.3 mg/ml en *E. coli* (Ayres *et al.*, 2020). Asimismo, se han reportado CMBs de 0.06 a 0.08, 0.05 a 0.08 y 0.06 a 0.1

mg/ml en EHEC O157:H7, EAEC O104 y EAEC042 respectivamente (García-Heredia *et al.*, 2016, Ortiz *et al.*, 2021). Por lo anterior, se observa la tendencia de que las cepas patógenas tienden a presentar CMBs más bajas. Se ha mencionado que cepas como la de *E. coli* O157: H7 se caracterizan por ser más resistentes a la exposición de compuestos antimicrobianos o ácidos; en cambio la cepa ATCC 25922 tiende a ser más sensible a la exposición a antimicrobianos, al no ser patógena (Otero & Vivanco, 2022). Estas variaciones en las CMBs se pueden atribuir a la adquisición de diferentes mecanismos moleculares de resistencia mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos genéticos tales como los integrones (Susan *et al.*, 2011). También se ha demostrado que la eficacia antimicrobiana del carvacrol se puede afectar debido a las condiciones de uso, modo de aplicación y tiempo de almacenamiento, ya que es un compuesto altamente volátil y es susceptible a degradarse por factores ambientales fácilmente (Espinosa-Carranza, 2011) por lo que se pueden presentar variaciones en los distintos ensayos reportados.

También se ha reportado que el carvacrol afecta la síntesis de componentes estructurales, inhibiendo la producción de flagelos en *E. coli* (García *et al.*, 2008) y reduciendo la motilidad (Tapia Rodríguez, 2018). Burt *et al.* (2007) señalaron que *E. coli* crece en presencia de carvacrol a 0.05 mg/ml sin síntesis de flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad. Los flagelos son las estructuras que más se han relacionado con motilidad y quimiotaxis en bacterias (Gil-Solís, 2018). Existen reportes que señalan que *E. coli* en presencia de carvacrol a 1 mM no sintetiza flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad; sin embargo, a 5 mM cesa inmediatamente la movilidad y ocurre la muerte celular (García-García & Palou-García, 2008). También Silvia-Vega *et al.*, (2020) probaron distintas concentraciones de carvacrol (0.3, 1 y 5 mM) y encontraron que a 0.3 mM no se inhibió la movilidad en *E. coli* O157:H7. Nuestros resultados demostraron el incremento en la motilidad tipo *swarming* a concentraciones subinhibitorias (0.00016, 0.00033 y 0.00066 mM) de carvacrol, concordando con lo reportado por Tamez-Hernandez (2020). Además, García-

Heredia *et al.*, (2016) demostraron que el carvacrol promovió la motilidad tipo *swarming* en los patotipos de *E. coli* EHEC O157:H7 y EAEC 042, pero no en EAHEC 0104:H4.

Todos estos resultados se pueden atribuir a variaciones fisiológicas entre las distintas cepas de *E. coli*. También, cuando la célula bacteriana está sujeta a un estrés ocasionado por sustancias tóxicas y está en riesgo su viabilidad, la bacteria es capaz de suprimir funciones secundarias, como la formación del flagelo, y así conservar energía para otras funciones primordiales. Esto coincide con lo reportado por Gallegos-Flores *et al.*, (2019) en donde 0.05 y 0.15 mg/ml de carvacrol no afectaron la movilidad de *E. coli*, sin embargo a 0.75 mg/ml, el crecimiento y la movilidad fue inhibido. En contraparte, Khan *et al.*, (2017) encontró que a 0.15 mg/ml de carvacrol *E. coli* mostró motilidad mínima (39%), al compararlo con el control al igual que Hossain *et al.*, (2017) a 0.01% de carvacrol.

Burt *et al.*, (2007) probaron distintas concentraciones de carvacrol (0, 0.5, 0.8, 1 mM) sobre *E. coli* en fase exponencial, observando disminución en la cantidad de flagelina conforme fueron incrementando la concentración de carvacrol, aunque estas diferencias no fueron significativas, lo cual indicó que las células en este punto de crecimiento ya poseían flagelos y que estos no se desprendieron. Con lo anterior se demuestra que el carvacrol a concentraciones subinhibitorias, altera la movilidad de *E. coli*, provocando variación en el número de flagelos y la síntesis de la flagelina en la bacteria.

También se ha utilizado a *E. coli* como organismo modelo para estudiar la fluidez de membrana. Existen sondas fluorescentes que nos permiten evaluar la fluidez de la membrana como DPH y TMA-DPH y sondas de superficie de membranas como ANS y laurdan (Johnson, 2010). Estas sondas, se caracterizan por tener gran afinidad por estructuras hidrofóbicas y particionan preferentemente en membranas. De las antes mencionadas, el laurdan es un tinte sintético que se ha utilizado como indicador para evaluar la fluidez de membrana en organismos como *E. coli* (Bessa *et al.*, 2018). En este tinte, cuando se incorpora a una bicapa lipídica, el grupo funcional de laurdan se localiza en la región carbonilo de la bicapa (Jurkiewicz *et al.*, 2005); sin embargo, el laurdan es anfifílico y puede insertarse en bicapas lipídicas a diferentes profundidades y orientaciones (Demchenko *et al.*, 1985, 2009). Esto permite evaluar el entorno mediante espectros de emisión de fluorescencia (400 a 550 nm).

Para el análisis espectral de lauridan, la fluorescencia generalmente se recolecta en el canal "azul" y "verde", y la diferencia normalizada entre los dos canales espectrales se conoce como polarización general ( $GP_{exc}$ , Parasassi *et al.*, 1990, 1995). Normalmente, cuando más altos sean los valores de  $GP_{exc}$ , más cerca estarán las membranas de un estado ordenado; mientras que valores más bajos indicarán membranas en un estado fluido (Bessa *et al.*, 2018). Por lo tanto, el valor de  $GP$  indica el grado de fluidez de membrana y como se sabe, la fluidez es vital para la función celular, puesto que participa en procesos de morfogénesis y el mantenimiento del potencial de membrana (Gohrbandt *et al.*, 2022). Por su parte, se ha demostrado que el carvacrol a concentraciones subletales aumenta la fluidez de la membrana (García-García & Palou-García, 2008; Ochoa *et al.*, 2019), lo cual concuerda con nuestros resultados; en donde para la cepa mutante en *mreB*, se observó aumento de la fluidez de membrana a los 30 min y a las 4 h en presencia de carvacrol; en tanto que en la cepa silvestre detectamos el aumento solo a las 4 h. Se ha demostrado que la alta fluidez de membrana permite la difusión de proteínas de membrana (Gohrbandt *et al.*, 2022); y esta difusión puede estar estrechamente relacionada con la proteína *mreB*, (la cual también es afectada por la fluidez de membrana) y afecta a su vez la localización de otras proteínas de membrana (Kurita *et al.*, 2020), asociándolo al complejo multiproteico presente en la membrana que sostiene al flagelo, y que participa en la motilidad tipo *swarming*. Dicho esto, posiblemente la alteración de este complejo puede traer consigo el incremento de la motilidad observado en nuestros resultados. Además, existe la evidencia que no se alteró el crecimiento de la bacteria al utilizar las distintas concentraciones subinhibitorias de carvacrol, ya que se ha mencionado que cuando existe una fluidez de membrana demasiado baja se puede llegar a producir la detención en el crecimiento de la bacteria (Gohrbandt *et al.*, 2022).

Por otro lado, en la cepa silvestre observamos el descenso en la fluidez de la membrana cuando la bacteria se expuso por 30 min a concentraciones subinhibitorias de carvacrol; este resultado puede estar asociado al estado de crecimiento de la bacteria, ya que la fase de crecimiento afecta la fluidez de la membrana (Wenzel *et al.*, 2018). Durante ese corto lapso de tiempo el carvacrol puede disminuir el crecimiento de *E. coli* (Khan *et al.*, 2017), sin embargo, aparentemente la cepa puede modular estos cambios a nivel de membrana, ya que, a las 4 h, se observó aumento de la fluidez. Además, se ha mencionado

que la adición de compuestos antimicrobianos como el carvacrol, afectan la capacidad de adaptación de la bacteria al medio, el cual podría estar alterando a la membrana ya sea inhibiendo la absorción de los nutrientes o afectando algunas enzimas o proteínas de membrana indispensables para su multiplicación celular o mediante mecanismos de difusión al interior de la célula (Ortega-Ramírez, 2013).

## 9. CONCLUSIONES

- La concentración mínima bactericida de carvacrol sobre *E. coli* fue de 0.47 mg/ml para la cepa silvestre y 0.41 mg/ml para la cepa mutada.
- Las concentraciones subinhibitorias de carvacrol 0.025, 0.05 y 0.1 mg/ml inducen la movilidad de la cepa silvestre y mutada *E. coli* de manera dosis dependiente.
- Se observó que el fenotipo de desplazamiento colectivo se afectó en ambas cepas por exposición a concentraciones subinhibitorias de carvacrol.
- La exposición de la cepa silvestre de *E. coli* a concentraciones subinhibitorias de carvacrol (0.025, 0.05 y 0.1 mg/ml por 4 h) disminuyó el grado de polarización y por consiguiente provocó aumento en la fluidez de la membrana; en contraste la exposición por 30 min mostró disminución de esta fluidez.
- La exposición de la cepa mutante de *E. coli* a concentraciones subinhibitorias de carvacrol (0.025, 0.05 y 0.1 mg/ml por 30 min y 4 h) disminuyó el grado de polarización y por consiguiente provocó un aumento en la fluidez de la membrana.

## 10.PERSPECTIVAS

Los ensayos de motilidad demostraron que el carvacrol a concentraciones subinhibitorias es capaz de inducir el *swarming* en *E. coli*, el cual, puede estar asociado directamente a MreB y a la posterior difusión de otras proteínas de membrana como la del flagelo. Sin embargo, es necesario detectar que otras proteínas de membrana pueden ser afectadas y puedan participar en este mecanismo.

Con los ensayos de espectroscopia utilizando el colorante de membrana laurdan, se deduce que el carvacrol efectivamente aumenta la fluidez de membrana, pero sería interesante complementar este tipo de estudios al considerar aumento en la cantidad de variables, como temperatura, tiempo de exposición a carvacrol y añadir otros tintes como el DilC12 (alta fluidez) y DilC18 (baja fluidez), lo que permitiría ver cambios puntuales a nivel de membrana y determinar que tanto afecta el carvacrol en esas condiciones. Además, sería interesante complementar este tipo de estudios con algunos otros como el de anisotropía y otros que nos permitan evaluar el perfil de ácidos grasos que modulan la fluidez de membrana.



## 10. REFERENCIAS

- Ai, H., Shaner, N. C., Cheng, Z., Tsien, R. Y. and Campbell, R. E. (2007). Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry* 46, 5904-5910
- Allen, P. E., & Martinez, J. J. (2020). Modulation of host lipid pathways by pathogenic intracellular bacteria. *Pathogens*, 9(8), 1–22. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080614>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Al-Mnaser, A. A., & Woodward, M. J. (2020). Sub-lethal concentrations of phytochemicals (Carvacrol and Oregano) select for reduced susceptibility mutants of Escherichia coli O23:H52. *Polish Journal of Microbiology*, 69(1), 121–125. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-003>
- Avelino, F. (2014). Factores ambientales que afectan la expresión del flagelo de *Escherichia coli* enteropatógena y su implicación en la formación de biopelículas en materiales inertes. (*Tesis doctoral*). Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Awuni, Y., Jiang, S., Robinson, R. C., & Mu, Y. (2016). Exploring the A22-Bacterial Actin MreB Interaction through Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(37), 9867–9874. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05199>
- Awuni, E. (2020). Status of Targeting MreB for the Development of Antibiotics. *Frontiers in Chemistry*, 7(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00884>
- Ayres Cacciatore, F., Dalmás, M., Maders, C., Ataíde Isaíá, H., Brandelli, A., & da Silva Malheiros, P. (2020). Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 133, 109143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109143>.
- Barák, I., & Muchová, K. (2013). The role of lipid domains in bacterial cell processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 4050–4065. <https://doi.org/10.3390/ijms14024050>
- Barettino Luengo, Elena. (2016). Uso de antagonistas de TLRs para mejorar la respuesta inmune en vacunas. (*Tesis de licenciatura*). Universidad Complutense Madrid, Madrid.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>
- Bessa, L. J., Ferreira, M., & Gameiro, P. (2018). Data on Laurdan spectroscopic analyses to compare membrane fluidity between susceptible and multidrug-resistant bacteria. *Data in Brief*, 21(October), 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.09.106>
- Billaudeau, C., Yao, Z., & Chastanet, A. (2019). MreB Forms Subdiffraccion Nanofilaments during Active Growth in *Bacillus subtilis*. *mBio*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.01879-18>.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Burt, S. A., Van Der Zee, R., Koets, A. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4484–4490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00340-07>
- Castro, A. M. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas*. México: El Manual Moderno.
- Calvo, J. C. B., Castillo, A. M., Serrano, R. M., & Cuan, A. G. (2012). *E. coli* 157:H7 en Las canales de bovinos en plantas de beneficio: un peligro biológico con gran impacto para la salud pública. *Biociencias*, 6(2), 53–61. <http://ezproxy.unilibrebaq.edu.co/unilibrebaq/revistas2/index.php/biociencias/article/view/230>
- Cazzola, H., Lemaire, L., Acket, S., Prost, E., Duma, L., Erhardt, M., Čechová, P., Trouillas, P., Mohareb, F., Rossi, C., & Rossez, Y. (2020). The impact of plasma membrane lipid composition on flagellum-mediated adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *mSphere*, 5(5), e00702-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00702-20>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2745–2749.

<https://doi.org/10.1021/jf0527221>

- Espinosa-Carranza, Nancy. (2011). Valoración biofísica del carvacrol nanoencapsulado para su uso como demoprotector. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León
- Fabiola, A. F., Universitaria, C., & Manuel, S. (2013). Agentes desinfectantes a base de cobalto son ineficaces para *E. coli* enteropatógena. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 4(7), 23–31.
- Faleiro, N. (2009). Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Fu, G., Bandaria, J. N., Le Gall, A. V., Fan, X., Yildiz, A., Mignot, T., Zusman, D. R., & Nan, B. (2018). MotAB-like machinery drives the movement of MreB filaments during bacterial gliding motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), 2484–2489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716441115>
- Gabel, C. V., & Berg, H. C. (2003). The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with protonmotive force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8748–8751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533395100>
- García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.001>
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.046>
- García-García, R., & Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés alimenticio. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 2 (2), 41-51.
- Gohrbandt, M., Lipski, A., Grimshaw, J. W., Buttress, J. A., Baig, Z., Herkenhoff, B., Walter, S., Kurre, R., Deckers-Hebestreit, G., & Strahl, H. (2022). Low membrane fluidity triggers lipid phase separation and protein segregation in living bacteria. *The EMBO Journal*, 41(5), 1–21. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109800>

- González Tinoco, Y., & Georges Dreyfus, G. (2017). Motilidad de las bacterias marinas del género *Vibrio*. *Revista de Educación Bioquímica*, 34(4), 98–108.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gracia-Valenzuela, M. H., Orozco-Medina, C., & Molina-Maldonado, C. (2012). Antibacterial effect of essential oregano oil (*Lippia berlandieri*) on pathogenic bacteria of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiológica*, 22(3), 201–206.
- Gray, A. N., Egan, A. J. F., Van't Veer, I. L., Verheul, J., Colavin, A., Koumoutsi, A., Biboy, J., Altelaar, M. A. F., Damen, M. J., Huang, K. C., Simorre, J. P., Breukink, E., den Blaauwen, T., Typas, A., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2015). Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division. *ELife*, 4(MAY), 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.07118>
- Haimes, J., & Kelley, M. (2010). Demonstration of a  $\Delta\Delta C q$  calculation method to compute relative gene expression from qPCR data. Group: Horizon Discovery, 3, 6-18. <https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Technicalmanuals/delta cq-solaristechnote.pdf>
- Huamán, N., Allecca, E., Arroyo, G., & Quintana, J. (2016). Solid phase microextraction (SPME) volatile compounds of genus *Origanum*. *Rev. Soc. Quim Perú*, 82(2), 105–113.
- Hussain, S., Wivagg, C. N., Szwedziak, P., Wong, F., Schaefer, K., Izoré, T., Renner, L. D., Holmes, M. J., Sun, Y., Bisson-Filho, A. W., Walker, S., Amir, A., Löwe, J., & Garner, E. C. (2018). MreB filaments align along greatest principal membrane curvature to orient cell wall synthesis. *ELife*, 7, 1–45. <https://doi.org/10.7554/eLife.32471>
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 3:12–15. <https://doi:10.3389/fmicb.2012.00012>
- Khan, I., Bahuguna, A., Shukla, S., Aziz, F., Kumar, A., Ansari, M. B., Bajpai, V., Suk Huh, Y., Kang, S. (2020), Antimicrobial potential of the food-grade additive carvacrol against uropathogenic *E. coli* based on membrane depolarization, reactive oxygen species generation, and molecular docking analysis. *Microbial Pathogenesis*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104046>.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a

- review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jones, L. J. F., Carballido-López, R., & Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 104(6), 913–922.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00287-2)
- Johnson ID, Spence M. (Eds.), Probes for Lipids and Membranes, Chapter 13, en *The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* 11th Ed, Life Technologies, 2010.  
<https://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-lipids-and-membranes.html>
- Kastenhofer, J., Rajamanickam, V., Libiseller-Egger, J., & Spadiut, O. (2021). *Monitoring and control of E. coli cell integrity*. *Journal of Biotechnology*, 329, 1–12. doi:10.1016/j.jbiotec.2021.01.009
- Kim, K. S. (2016). Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0015-2015>
- Kurita, K., Shin, R., Tabei, T., & Shiomi, D. (2019). Relation between rotation of MreB actin and cell width of *Escherichia coli*. *Genes to Cells*, 24(3), 259–265.  
<https://doi.org/10.1111/gtc.12667>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (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.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 655–683.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>
- Lucana, M., & Huanca, R. (2014). Estructura Bacteriana: Bacterias Gram Negativas. *Rev Actualización Clínica*, 49(7), 2609–2613.  
[http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49\\_a01.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a01.pdf)
- Meza, U., Romero-Méndez, A.C., Sánchez-Armáas, S. (2010). La membrana plásmatica: modelos, balsas y señalización. *Redalyc*, 29(4), 125-134.
- Molero, A. (2014). Implicación de la glicosilación en el ensamble del flagelo y las fimbrias de *Aeromonas hydrophilia* AH-1. (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Mondino, S., San Martin, F., & Buschiazzo, A. (2022). 3D cryo-EM imaging of bacterial flagella: Novel structural and mechanistic insights into cell motility. *The Journal*

- Morgenstein, R. M., Bratton, B. P., Nguyen, J. P., Ouzounov, N., Shaevitz, J. W., & Gitai, Z. (2015). RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(40), 12510–12515. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509610112>
- Moura, C., Tiba, M. R., da Silva, M. J., & da Silva Leite, D. (2013). Identification of new flagellin-encoding fliC genes in *Escherichia coli* isolated from domestic animals using RFLP-PCR and sequencing methods. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33(4), 417–422. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400001>
- Ortiz, R. Y. (2020). Factores de virulencia de *E. coli* O104: H4: acción de antimicrobianos naturales. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza.
- Ortiz, Y., García-Heredia, A., Merino-Mascorro, A., García, S., Solís-Soto, L., & Heredia, N. (2021). Natural and synthetic antimicrobials reduce adherence of enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *PLoS ONE*, 16(5 May), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251096>
- Ortega-Ramírez, L. (2013). Sinergismo antibacteriano entre compuestos terpenicos de *Cymbopogon citratus* y Azufrados de *Allium cepa*. (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora.
- Oswald, F., Varadarajan, A., Lill, H., Peterman, E. J. G., & Bollen, Y. J. M. (2016). MreB dependent organization of the *E. coli* cytoplasmic membrane controls membrane protein diffusion. *Biophysical Journal*, 110(5), 1139–1149. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.01.010>
- Otero, G & Vivanco, V. (2022). Sinergia entre el aceite esencial del Óregano mediterráneo y el metasilicato de sodio en la prevención de la proliferación bacteriana usando *Escherichia coli* como organism modelo. (Tesis de licenciatura). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú.
- Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. and Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79-88
- Pírez, M. y Mota, M. Temas de Bacteriología y virología médica: morfología y estructura bacteriana. 2 ed. Montevideo (Uruguay): Universidad de la República, Departamento de Bacteriología y Virología, Oficina del libro FEFMUR, 2006, p. 26-27
- Ranjit, D. K., Liechti, G. W., & Maurelli, A. T. (2020). Chlamydial mreB directs cell

- division and peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli* in the absence of ftsZ activity. *MBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.03222-19>
- Reid, S. D., Selander, R. K., & Whittam, T. S. (1999). Sequence diversity of flagellin (fliC) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(1), 153–160. <https://doi.org/10.1128/jb.181.1.153-160.1999>
- Reshes, G., Vanounou, S., Fishov, I., & Feingold, M. (2008). Cell shape dynamics in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 94(1), 251–264. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104398>
- Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
- Rohs, P. D. A., Buss, J., Sim, S. I., Squyres, G. R., Srisuknimit, V., Smith, M., Cho, H., Sjodt, M., Kruse, A. C., Garner, E. C., Walker, S., Kahne, D. E., & Bernhardt, T. G. (2018). A central role for PBP2 in the activation of peptidoglycan polymerization by the bacterial cell elongation machinery. *PLoS Genetics*, 14(10), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007726>
- Saeloh, D., Tipmanee, V., Jim, K. K., Dekker, M. P., Bitter, W., Voravuthikunchai, S. P., Wenzel, M., & Hamoen, L. W. (2018). The novel antibiotic rhodomyrone traps membrane proteins in vesicles with increased fluidity. In *PLoS Pathogens*(Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006876>
- Saikia, K., Sravani, Y. D., Ramakrishnan, V., & Chaudhary, N. (2017). Highly potent antimicrobial peptides from N-terminal membrane-binding region of *E. coli* MreB. *Scientific Reports*, 7(January), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep42994>
- Salceda Sacanelles, R., & Albert Garay, J. S. (2017). El citoesqueleto: un componente fundamental en la arquitectura y en la fisiología celular. *Revista de Educación Bioquímica*, 35(4), 102–114.
- Scheinpflug, K., Krylova, O., & Strahl, H. (2017). Measurement of cell membrane fluidity by Laurdan GP: Fluorescence spectroscopy and microscopy. *Methods in Molecular Biology*, 1520, 159–174. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_10)
- Scherber, C. M., Schottel, J. L., & Aksan, A. (2009). Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(11), 2427–2435. [doi:10.1016/j.bbamem.2009.08.011](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.011)
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>

- Shaner, N. C., Patterson, G. H., & Davidson, M. W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *Journal of Cell Science*, 120(24), 4247–4260. <https://doi.org/10.1242/jcs.005801>
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675–1687. <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>
- Shi, H., Bratton, B. P., Gitai, Z., & Huang, K. C. (2018). How to build a bacterial cell: MreB as the foreman of *E. coli* construction. *Cell*, 172(6), 1294–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.050>
- Shi, H., Quint, D. A., Grason, G. M., Gopinathan, A., & Huang, K. C. (2020). Chiral twisting in a bacterial cytoskeletal polymer affects filament size and orientation. *Nature Communications*, 11(1). [doi:10.1038/s41467-020-14752-9](https://doi.org/10.1038/s41467-020-14752-9)
- Sjodt, M., Brock, K., Dobihal, G., Rohs, P. D. A., Green, A. G., Hopf, T. A., Meeske, A. J., Srisuknimit, V., Kahne, D., Walker, S., Marks, D. S., Bernhardt, T. G., Rudner, D. Z., & Kruse, A. C. (2018). Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis. *Nature*, 556(7699), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature25985>
- Strahl, H., Bürmann, F., & Hamoen, L. W. (2014). The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4442>
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304–318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Susan, M., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>.
- Tapia Rodríguez, M. (2018). Carvacrol como inhibidor de comunicación intracelular responsable de la formación de biopelículas de *Pseudomonas aureginosa*. (Tesis de doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora.
- Tamez-Hernandez, Alondra. (2020). Análisis de la localización de los filamentos MreB y la formación de flagelos en *Escherichia coli*, en presencia de carvacrol. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.



- Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
- Van den Ent, F., Amos, L. A & Lowe J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413(6851), 39–44.
- Vila Estapé, J., & Zboromyrska, Y. (2012). Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarregénicas. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(2), 89–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2011.10.007>
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Banõ, J., Baquero, F., & Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437–463.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.006>
- Liu, X., Biboy, J., Consoli, E., Vollmer, W., & den Blaauwen, T. (2020). MreC and MreD balance the interaction between the elongasome proteins PBP2 and RodA. *PLoS Genetics*, 16(12 December), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009276>
- Wei, S. P., Qian, Z. G., Hu, C. F., Pan, F., Chen, M. T., Lee, S. Y., & Xia, X. X. (2020). Formation and functionalization of membraneless compartments in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 16(10), 1143–1148.  
<https://doi.org/10.1038/s41589-020-0579-9>
- Wenzel, M., Vischer, N., Strahl, H., Hamoen, L. (2018). Assessing Membrane Fluidity and Visualizing Fluid Membrane Domains in Bacteria Using Fluorescent Membrane Dyes. *Bio-protocol*, 8(20), 1-26. [DOI:10.21769/BioProtoc.3063](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3063).
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424(6949), 643–650. <https://doi.org/10.1038/nature01830>
- Zhang D., Gan R., Ge Y., Yang Q., Ge J., Li H., Corke H. (2018). Research Progress on the Antibacterial Mechanisms of Carvacrol: A Mini Review. *Bioactive Compounds. Health and Disease*. 1(6): 71-81.
- Zielińska, A., Savietto, A., Borges, A. de S., Martinez, D., Berbon, M., Roelofsen, J. R., Hartman, A. M., de Boer, R., Van der Klei, I. J., Hirsch, A. K. H., Habenstein, B., Bramkamp, M., & Scheffers, D. J. (2020). Flotillin-mediated membrane fluidity controls peptidoglycan synthesis and mreB movement. *ELife*, 9, 1–21.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.57179>