



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Monterrey

*Estudio del efecto de las interacciones no específicas en la
división de la Escherichia coli*

Tesis que presenta:

Samuel Salinas Almaguer

para obtener el grado de Doctor en Ciencias

en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León

Septiembre, 2017

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres por el apoyo incondicional que me han brindado, a mis hermanas por estar siempre conmigo, a mi abuela Felicitas González Álvarez (q.e.p.d) y a mi amigo Elias Espinoza Manzanares, gracias a todos por apoyarme y estar conmigo en todas mis decisiones profesionales y personales.

Quisiera agradecer al Dr. Carlos Ruiz por darme la oportunidad de formar parte de su grupo, así como también por las constantes discusiones y tutorías brindadas durante el desarrollo de este trabajo. También quiero agradecer a mis amigos del Cinvestav Monterrey por su ayuda y buenos consejos durante la primera etapa de experimentos: Rosendo Isidoro, Jorge González, Ángel Reyes, Eric Oropeza, Victor Tamez, Martín Ramos, Francisco Sierra Valdez y Maricarmen Ríos.

Durante la segunda etapa de este proyecto fue necesario realizar una estancia de investigación, por lo que quisiera agradecer al Dr. Francisco Monroy de la Facultad de Química de la Universidad Complutense de Madrid por permitirme trabajar en su laboratorio y por su constante tutoría junto con la Dr. Aurora Hernández Machado. Durante la estancia tuve la suerte de contar con buenos amigos en el laboratorio, por lo que quisiera agradecer a: Sergio Ángel Ortega, Aymara Blanco Romero, Zasskia González, Mikheil Kharbedia, Claudia Sosa Fernandez, Lourdes Álvarez, Antonio González Perez, Berta Tinao Nieto, Víctor Galileo, Paolo Natale y Andrés Tolosa. Sin duda sus buenos consejos y amistad ayudaron en gran medida durante estos dos años en Madrid, ¡gracias chicos!

También quisiera agradecer al resto de mis amigos de Madrid, a Jose De Castro Kustner, Martín Urrutia Bahon, Izaskun Urrutia, Nadja Urrutia, Arlés Velásquez de Urrutia, Xiao Kun Rey (Alejandro) y Kang Li (Alicia), quiero agradecer por la amistad y todos esos momentos que sin duda hicieron mi estancia más placentera y llevadera.

Quiero agradecer muy especialmente a mi novia Meltem Kutluer, por el gran apoyo que siempre me ha brindado, sin duda contar con ella en los momentos más difíciles del desarrollo de este trabajo marcó una gran diferencia y me hizo continuar esforzándome, teşekkürler Lokumum!.

Por último, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

Índice

1. Introducción	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1. Estructura	2
1.1.2. División celular	5
1.1.3. El papel de la proteína FtsZ	6
1.1.4. El papel de los lípidos en la división celular	8
1.1.5. Cambios en la composición lipídicas e inhibición en el crecimiento	9
1.2. Física de bicapas lipídicas	10
1.2.1. Parametrización de Monge	12
1.2.2. Hamiltoniano de Canham-Helfrich	12
1.2.3. Modelo físico de la formación de un septo en un liposoma	13
2. Hipótesis	16
2.1. Objetivos	16
3. Métodos experimentales	17
3.1. Crecimiento de cultivos	17
3.1.1. Descripción de una curva de crecimiento	17

3.1.2.	Preparación de los cultivos	19
3.2.	La balanza de Langmuir	20
3.2.1.	Preparación de monocapas de lípidos polares de <i>Escherichia coli</i>	22
3.2.2.	Isotermas	23
3.2.3.	Análisis del módulo de compresibilidad lateral	24
3.3.	Formación de liposomas	24
3.3.1.	Electroformación	25
3.3.2.	Estudio de fluctuaciones mediante microscopia	25
3.3.3.	Análisis del módulo de flexión	27
3.3.4.	Ajuste al espectro de fluctuaciones	29
3.4.	Fluctuaciones en la membrana de la <i>Escherichia coli</i>	30
3.4.1.	Estandarización de cultivos	30
3.5.	Herramientas matemáticas para el análisis de fluctuaciones	31
3.5.1.	Desviación estándar	31
3.5.2.	Skewness	32
3.5.3.	Kurtosis	33
3.5.4.	Desplazamiento cuadrático medio	33

4. Resultados	35
4.1. Crecimiento de bacterias	35
4.2. Módulo de compresibilidad lateral en monocapas de Langmuir	38
4.3. Módulo de flexión en liposomas de extracto de lípido polar de <i>Escherichia coli</i>	43
4.4. Efecto del módulo de flexión en la tasa de crecimiento efectiva	44
4.5. Mapas mecánicos de las fluctuaciones de la membrana exterior de la <i>Escherichia coli</i>	47
4.6. Efecto de la cardiolipina en los liposomas	52
5. Discusión	54
6. Conclusiones	58
7. Apéndice	59
7.1. Aproximación al módulo de flexión	59
7.2. Dinámica de crecimiento de un cultivo	61
7.3. Material suplementario	64
7.4. Análisis de una bacteria artificial	65
7.5. Esterilización por congelamiento bajo condiciones isocóricas: El caso de la <i>Escherichia coli</i>	67

Abreviaturas

Å Ångstrom

nm nanómetro

DOPC 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

PE Fosfatidiletanolamina

PG Fosfatidilglicerol

PC Fosfatidilcolina

CL Cardiolipina

Resumen

En este trabajo se estudió el papel de las propiedades elásticas de la membrana de la *Escherichia coli* durante el proceso de la división celular. Utilizando compuestos hidrocarbonados que se anclan en membrana, se evaluó el efecto que estos compuestos crean sobre el módulo de flexión de monocapas y liposomas de un extracto de lípidos polares de *Escherichia coli*. Posteriormente se estudiaron los efectos que estos cambios elásticos producen sobre el crecimiento de cultivos de *E. coli*, lo cual llevo a la creación de un modelo físico que describe la dependencia de esta bacteria en las propiedades elásticas de su membrana durante la división, lo cual podría ayudar en la búsqueda de nuevos objetivos terapéuticos que detengan la proliferación de esta bacteria.

Abstract

In this work it has been studied the role of the elastic properties of the *Escherichia coli*'s membrane during cell division. Using hydrocarbon compounds which preferably attach to the membrane, we evaluate the effect of these compounds on the bending modulus of monolayers and liposomes made of a polar lipid extract of *Escherichia coli*. Subsequently, we investigate the effect that these elastic changes exerts on the growth of *E. coli*, thus allowing the creation of a physical model which describes the dependency of this bacteria on the elastic properties of his membrane during division, which could help on the search for new therapeutical targets to stop proliferation of this bacteria.

1. Introducción

1.1. *Escherichia coli*

La *E. coli* es un organismo procariota con una longitud de cerca de 2 μm de largo y menos de 1 μm de grosor. Esta bacteria encontrada con facilidad en aguas de charca, está presente además en el intestino delgado de prácticamente todos los animales de sangre caliente.

El material genético de la *E. coli*, se encuentra contenido en un cromosoma con forma circular que se encuentra en el citoplasma de la célula. Su genoma consta de 4, 639 221 pares de bases que conforman 4288 genes que codifican proteínas [1]. Aparte de su propia información genética, la bacteria contiene pequeñas secuencias de material genético extracromosomal en forma circular llamados plásmidos. Algunos plásmidos le confieren a la bacteria resistencia a algunos tipos de antibióticos y son intercambiados con otras bacterias. Si bien la mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas al ser humano, existen algunas variantes como la *E. coli* O157:H7, que es conocida por producir gastroenteritis y en algunos casos también por producir el síndrome urémico hemolítico en niños y ancianos [2][3].

Recientemente, esta bacteria ha adquirido notoriedad en los medios por la aparición de nuevas cepas como la O104:H4-ST678, que produjo en 2014 un brote infeccioso con consecuencias mortales en Alemania por el consumo de vegetales contaminados [4] y la reciente aparición de superbacterias resistentes a los antibióticos más potentes conocidos [5].

El uso de los antibióticos tanto en la ganadería como en la agricultura parece ir de la mano con la resistencia a los mismos, esto como resultado de la selección natural impuesta a los microorganismos[6]. Recientemente la *E. coli* ha generado un gran interés por ser el patógeno bacteriano más común al ser humano [7].

En la siguiente sección se comenzará por definir algunos conceptos necesarios para el desarrollo de este trabajo, por lo que se iniciará describiendo la estructura interna de la bacteria y algunas propiedades de la misma durante el ciclo de división celular.

1.1.1. Estructura

La *E. coli* es una bacteria clasificada como Gram-negativa. Su forma semejante a un bastón, se debe a una de las proteínas presentes en el citoesqueleto, la proteína MreB. Esta proteína estructural (homólogo de la actina), se encuentra presente con una formación de hélice en la dirección longitudinal de la bacteria [8]. Está reportado que la despolimerización de esta proteína hace a la bacteria adquirir una configuración esférica [9][10]. Se ha demostrado mediante simulaciones computacionales que la ausencia de la proteína MreB permite la propagación de inestabilidades que hacen a la bacteria adquirir esta configuración de balón [11].

La pared celular de la *E. coli* está constituida principalmente de fosfolípidos y proteínas. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, es decir cuentan con un extremo en su estructura química que debido a las propiedades de sus grupos funcionales (que son cargados o polares) tienden a formar interacciones electrostáticas o puentes de hidrógeno con las moléculas de agua a su alrededor, volviendo a este extremo en soluble. Mientras que en el extremo opuesto, las moléculas anfipáticas cuentan con una parte que debido a la naturaleza de sus grupos funcionales (con carga neutra y no polarizables) no forman interacciones energéticamente favorables con el agua, volviendo a este extremo de la estructura química en insoluble. Es debido a esta doble naturaleza hidrofílica e hidrofóbica en los fosfolípidos, lo que les confiere la capacidad de organizarse y de formar bicapas lipídicas, las cuales constituyen la base de las membranas celulares.

Internamente la pared celular de la *E. coli* (ver figura 1, [12]) está formada de dos membranas separadas entre sí por el periplasma donde se encuentra una capa de peptidoglicano, una membrana externa anclada sobre esta región y una membrana

interna posicionada sobre el andamiaje del citoesqueleto.

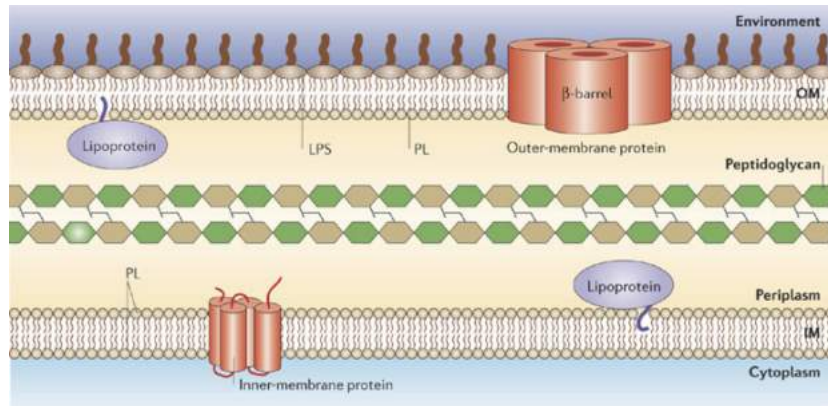


Figura 1: Estructura de la pared celular de la *E. coli* [12]. La membrana externa (OM) está constituida de proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS) y fosfolípidos (PL). La membrana interna (IM), es la membrana cercana al citoplasma y está constituida por proteínas, lipoproteínas y fosfolípidos. En el área entre ambas membranas se encuentra la región del periplasma, el cual contiene una capa de peptidoglicano.

La composición de la pared celular (membrana interna y externa) consta principalmente de tres tipos de lípidos: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL). La figura 2, resume la vía metabólica de la síntesis de estos tres tipos de lípidos en la *E. coli*. A partir del ácido fosfatídico (PA), la enzima CDP-diacilglicerol sintasa (*cdsA*) junto con una molécula de citidina trifosfato (CTP) producen el CDP-diacilglicerol. Esta molécula junto con la L-serina produce la fosfatidilserina por la acción de la fosfatidilserina sintasa (*pssA*), finalmente esta molécula es procesada por la fosfatidilserina decarboxilasa para producir la fosfatidiletanolamina (PE) y liberar CO_2 . A partir del CDP-diacilglicerol, la enzima fosfatidilglicerol-3-P sintasa junto con una molécula de Glicerol-3-P produce fosfatidilglicerol-3P que con la acción de la enzima fosfatidilglicerol-P sintasa y una molécula de fosfato inorgánico dan lugar a la formación del fosfatidilglicerol (PG). Finalmente la unión de dos fosfatidilglicerol mediante la acción de la enzima cardiolipina sintasa da lugar a la formación de la cardiolipina (CL) y glicerol.

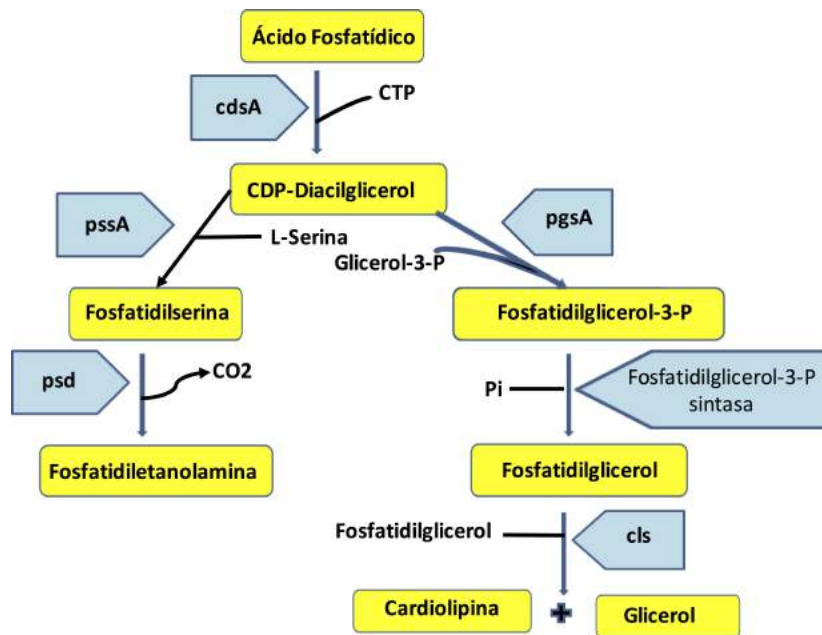


Figura 2: Rutas metabólicas para la síntesis de lípidos en la *E. coli* [13].

La membrana interior está compuesta de un 70-80 % de PE, 20-25 % de PG y de un 5-10 % de CL [14][15][16]. Esta membrana presenta además dos tipos de proteínas, las proteínas integrales de la membrana interna y las lipoproteínas.

La membrana exterior esta caracterizada por poseer un mayor porcentaje de PE, junto con una mayor cantidad de saturaciones en este lípido [17], además de poseer lipopolisacáridos (LPS) [18], lo cual le confiere a la membrana una mayor rigidez. Algunos autores sugieren que los lipopolisacáridos confieren a la membrana externa una baja permeabilidad a compuestos hidrofóbicos [19][20].

El periplasma es el área entre la membrana externa e interna donde se encuentra una capa de mureína o peptidoglicano, que consiste en un arreglo cristalino de segmentos de N-acetil-glucosamina (NAG) y el Ácido N-acetilmurámico (NAM) unidos mediante enlaces β -1,4. Estos segmentos están unidos por enlaces peptídicos formando un arreglo periódico que corre de forma transversal [21]. El peptidoglicano confiere a la bacteria una resistencia a su propia presión de turgencia de 0.3 ~ 3 atm [11]. Además de proteger

a la bacteria ante choques osmóticos.

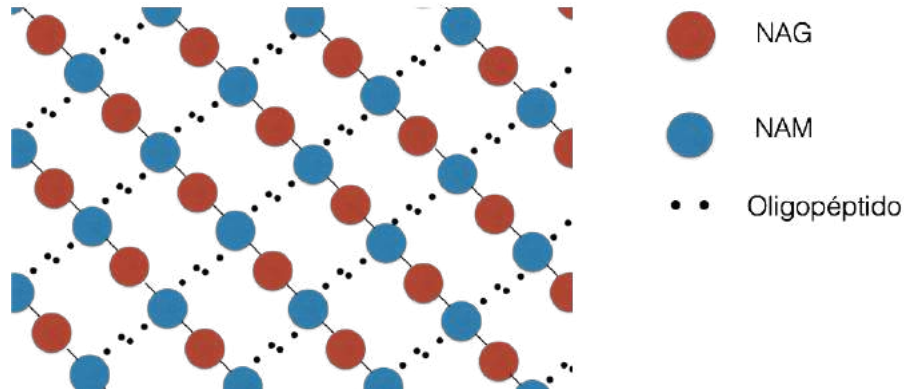


Figura 3: Capa de peptidoglicano. Estructura del arreglo periódico. Abreviaturas: NAG: N-acetilglucosamina, NAM: Ácido N-acetilmurámico.

1.1.2. División celular

La fisión binaria es el proceso mediante el cual microorganismos como la *Escherichia coli* se reproducen dando lugar a la formación de dos células hijas. Este proceso puede resumirse en 3 etapas principales. Como primer paso la célula replica su ADN, de esta forma cada célula podrá poseer un juego completo del código genético. Durante la segunda etapa ocurre un crecimiento de la célula, de tal manera que la bacteria crea la maquinaria necesaria para la supervivencia de su progenie y finalmente, ocurre la formación de un septo en la región central de la bacteria, proceso que culmina con la ruptura de la membrana celular para dar lugar a la formación de dos células hijas.

La división de las bacterias es llevada a cabo por un complejo protéico llamado divisoma [22][23]. Este complejo formado por al menos 15 proteínas, de las cuales 10 se han reportado como esenciales: FtsZ, FtsA/ZipA, FtsK, FtsQ, FtsL/B, FtsW, FtsI, FtsN [23]. Estas proteínas tienen el prefijo Fts que proviene de *filamentous temperature sensitive* al ser descubierto que su funcionamiento es modulado por la temperatura.

La primera proteína en integrarse durante la formación del divisoma es la llamada FtsZ¹, la cuál recluta a otras proteínas como la FtsA y ZipA que la anclan a la membrana interna en la región central de la bacteria [24][22][23].

Se ha demostrado que la *E. coli* no posee ningún mecanismo de control para detener la división tanto si se bloquea la expresión de la FtsZ o la proteína FtsI, una de las últimas proteínas en incorporarse al anillo [24]. Durante la división celular no ocurren cambios en la concentración de las proteínas FtsZ, FtsA, ZipA, por lo que se descarta que la división inicie por una sobreexpresión de alguna proteína estructural del complejo FtsZ [25].

Durante la división, se crea un anillo de proteína MreB alrededor del septo, que finalmente se divide en dos anillos (uno para cada célula hija) rodeando a la banda de la FtsZ [8]. Algunos autores consideran que para que ocurra la división, es necesario que ocurra una despolimerización de la proteína MreB en la región cercana a la formación de la banda [11], de tal manera que una fuerza del orden de los picoNewton es capaz de conseguir la división de la bacteria [26].

1.1.3. El papel de la proteína FtsZ

Es conocida la capacidad de la proteína FtsZ de formar anillos y generar una fuerza constrictora bajo condiciones in-vitro [27]. En un experimento clásico de Osawa [28], fue modificada la bacteria *E. coli* para producir proteínas FtsZ que pudieran anclarse a la membrana por sí mismas, cambiando el péptido que une a la proteína FtsZ a la proteína FtsA por una hélice anfipática. Una vez extraída y purificada, la proteína fue reconstituida en liposomas de una mezcla de DOPG y PC de huevo. Inicialmente los liposomas adquirieron una configuración esférica, pero al entrar en contacto con GTP comenzaron a formarse liposomas tubulares. En base a los resultados de estos experimentos fue posible observar la difusión y condensación de bandas de la proteína FtsZ

¹Proteína que se ancla sobre la membrana interna.

y la aparición de las regiones en constricción en lugares densamente poblados por las bandas proteicas. Debido a la imposibilidad del autor de formar liposomas unilaminares, la aparición de regiones en constricción fue limitada a lugares muy específicos donde se cree que el grosor de la membrana era mucho menor y donde además había una abundancia de la proteína FtsZ. Si bien el autor no pudo encontrar la división de los liposomas, sus resultados pudieron demostrar que por sí sola la proteína FtsZ es capaz de generar una constricción.

En otros organismos como el *Bacillus subtilis*, al remover de su genoma la información necesaria para la expresión de la proteína FtsZ (L-Forms), se encontró que las células eran capaces de dividirse mediante un mecanismo de crecimiento de área de la membrana, lo que podría representar un mecanismo primitivo de división celular [29][30][31]. Adicionalmente, mediante un estudio de la polarización de la luz proveniente de una proteína GFP-FtsZ dentro de la *E. coli*, se mostró que los filamentos que crea esta proteína se encuentran desorganizados dentro del complejo FtsZ, por lo que se cree que el anillo podría no generar una fuerza contráctil o al menos no de la misma magnitud que si estuviera bajo condiciones in-vitro [32].

El enfoque reduccionista del complejo FtsZ como eje central en la fisión binaria parece ser un punto muy cuestionable, pasando a ser solo un componente más de la compleja maquinaria de la división celular, por lo que para poder tener una imagen completa de este fenómeno es necesario tomar en cuenta también el medio en el que se anclan estas proteínas, es decir los lípidos de la pared celular.

1.1.4. El papel de los lípidos en la división celular

Existe evidencia experimental de que la *E. coli* cambia su composición lipídica durante el ciclo celular, incrementando la concentración de PG durante la etapa de elongación de la bacteria, manteniendo un porcentaje casi invariable de PE. La cardiolipina se mantiene constante durante el periodo de elongación pero aumenta durante la formación del septo [33].

La distribución heterogénea de los lípidos en la membrana celular da lugar a la formación de regiones pobladas de dominios de lípidos en puntos muy definidos de la bacteria. Lípidos como la cardiolipina se encuentran en las regiones de los polos y la región del septo. Se cree que la formación de estos dominios ricos en cardiolipina se debe a su capacidad para formar puentes de hidrógeno debido a su naturaleza dimérica (ver figura 4) [34], o a la separación de fases inducida por el calcio [35].

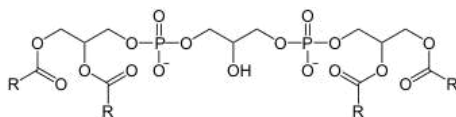


Figura 4: Estructura química de la cardiolipina

Es los dominios ricos en cardiolipina, donde debido a la naturaleza electronegativa de los grupos fosfato de su estructura, se forman interacciones débiles con algunas proteínas modulando así su funcionamiento. Se ha encontrado que tanto el inicio de la replicación del ADN [36][37][38], como el funcionamiento del sistema Min (que regula el correcto posicionamiento de la proteína FtsZ) [39], son dependientes de este tipo de interacciones con la membrana.

1.1.5. Cambios en la composición lipídicas e inhibición en el crecimiento

En estudios realizados con mutantes de *E. coli* carentes de los lípidos aniónicos CL y PG, se ha demostrado que las bacterias resultantes son inviables [38]. Mientras que mutantes carentes de CL son viables y tienden a compensar esta deficiencia aumentando el porcentaje de PG [40]. En cultivos de mutantes incapaces de expresar el lípido zwitteriónico PE, se encontró que los cultivos son viables solo en presencia de CL y cationes divalentes en el medio[41] o el lípido monoglucosildiglicerido (lípido ajeno a la *E. coli* que tiende a producir curvaturas negativas en membranas lipídicas) [42]. Por lo que se sugiere que la división celular es dependiente de la correcta composición química y las propiedades físicas de la membrana [33].

Es conocida la capacidad de la *E. coli* de cambiar su composición lipídica durante el crecimiento [33], lo cual le permite además generar una respuesta de adaptación ante el efecto de condiciones externas. Un ejemplo de esta adaptación es que la *E. coli* cambia su composición lipídica de acuerdo a la temperatura de incubación, de tal forma que al incrementarse la temperatura se incrementa la relación *ácidos grasos saturados / ácidos grasos insaturados*, aumentando la cantidad de saturaciones en la membrana celular [43]. De manera similar, el crecimiento de la *E. coli* en presencia de alcoholes como la serie del n-butanol al n-octanol tienden a incrementar la cantidad de saturaciones en la membrana celular de la bacteria tanto a 27 °C como a 37 °C, mientras que para el n-nonanol y n-decanol la tasa de saturados a insaturados no cambia [44]. Por lo que se cree que estos compuestos hidrocarbonados ejercen un efecto perturbando el orden de los lípidos en la membrana y por ende su fluidez [44]. Existen reportes de algunos compuestos hidrocarbonados que tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de la *E. coli*, algunos autores [45], reportan un efecto inhibitorio para compuestos aminados de longitudes de cadena de 8 a 13 carbonos.

En algunos trabajos se ha estudiado el efecto de modificar la síntesis de los ácidos grasos en la *E. coli*, puesto que esto potencia la actividad antibacterial a otros compuestos [46]. También existen reportes donde se ha estudiado cómo se puede inhibir el

crecimiento de la *E. coli* al estar en contacto con cadenas hidrocarbonadas largas de ácidos grasos [20].

1.2. Física de bicapas lipídicas

Las propiedades elásticas de una bicapa lipídica fueron formuladas por primera vez por W. Helfrich en 1973 [47], como una aproximación para poder estudiar las membranas biológicas. La figura 5, muestra los tres tipos de deformaciones estudiadas por Helfrich y que servirán para definir los conceptos necesarios a lo largo de este trabajo, éstos son: deformación por curvatura, deformación por compresión, expansión y deformación por estrés de corte (shear stress).

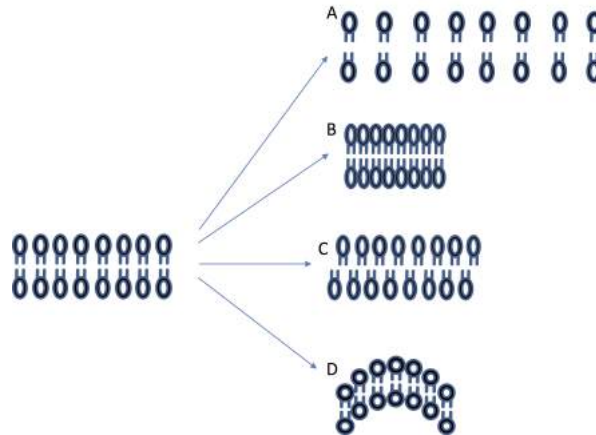


Figura 5: Tipos de deformaciones en una membrana lipídica. Izquierda. Membrana en estado relajado. Derecha. Tipos de deformaciones: A) Expansión. B) Compresión. C) Deformación por estrés de corte. D) Deformación por curvatura.

La energía elástica para una bicapa sujeta a pequeñas deformaciones debido a una compresión o expansión por unidad de área (A), puede ser escrita en términos de un módulo de elástico (ϵ) como [47]:

$$E_s = \frac{1}{2}\epsilon(\Delta A/A)^2. \quad (1)$$

Para una bicapa bajo un esfuerzo de corte podemos expresar su energía elástica por unidad de área como [47]:

$$E_t = \frac{1}{2} K_t \left\| \vec{n} \times \vec{d} \right\|^2, \quad (2)$$

donde \vec{n} es el vector normal de la bicapa, \vec{d} es el vector de la dirección promedio de los lípidos y K_t representa su respectivo módulo elástico².

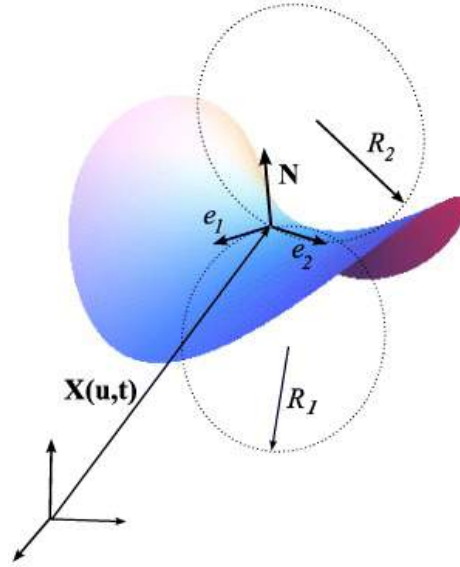


Figura 6: Descripción de una superficie por medio de sus curvaturas principales [48]

En una bicapa bajo la deformación producida debido al efecto de curvatura, podemos expresar su energía potencial elástica por unidad de área en términos de las curvaturas principales ($c_1 = 1/R_1$ y $c_2 = 1/R_2$, ver figura 6) y considerando además que no existe un efecto de cizalla por la acción de la curvatura, como [47]:

$$E_b = \frac{1}{2} \kappa (K - c_0)^2 + \bar{\kappa} K_G, \quad (3)$$

² K_t representa un módulo elástico por unidad de área para una compresión por estrés de corte.

se define como c_0 a la curvatura espontánea de la bicapa, $K = c_1 + c_2$ como la curvatura extrínseca, $K_G = c_1 c_2$ como la curvatura gaussiana y los módulos κ y $\bar{\kappa}$ se conocen como módulo de flexión (bending modulus) y el módulo elástico de la curvatura gaussiana o *saddle-splay modulus*.

1.2.1. Parametrización de Monge

La ecuación 3, define la energía potencial elástica de una bicapa lipídica en términos de las curvaturas principales. En la práctica, debido a la dificultad que implica definir la superficie descrita por dichas curvaturas (o medirlas), es más común encontrar aproximaciones a una superficie modelo. Quizás la más popular de estas aproximaciones es la parametrización de Monge [49], la cuál permite definir la curvatura extrínseca (K) en términos de un vector (\vec{r}) que describe una superficie bidimensional con una altura $h(\vec{r})$ como:

$$K = \nabla \cdot \left(\frac{\nabla h(r)}{\sqrt{1 + (\nabla h(r))^2}} \right) \approx \Delta h(r) \quad \text{Para } |\nabla h| \ll 1, \quad (4)$$

donde Δ representa el operador de Laplace. Esta aproximación es también conocida como la aproximación para gradientes pequeños porque es solo valida para casos donde la magnitud de ∇h es mucho menor a 1, es decir para casos donde las fluctuaciones son pequeñas, como las que podríamos encontrar en liposomas que fluctúan sin perder su esfericidad.

1.2.2. Hamiltoniano de Canham-Helfrich

A partir de la ecuación (3) se define el Hamiltoniano de Canham-Helfrich como [50]:

$$E_{CH} = \int \left\{ \frac{1}{2} \kappa (K - c_0)^2 + \bar{\kappa} K_G \right\} dA. \quad (5)$$

Considerando que no hay cambios en la topología del sistema, es decir, durante las fluctuaciones de la bicapa no hay formaciones de asas, la contribución por parte de K_G al evaluar la integral es cero, relación conocida como teorema de Gauss-Bonnet. Debido a las fluctuaciones de la bicapa, para garantizar que hay un área constante es introducida una restricción de área por medio de un multiplicador de lagrange (Γ), se define la energía de tensión superficial³:

$$E_{tens} = \Gamma \int dA. \quad (6)$$

Al introducir la aproximación de Monge en el hamiltoniano de Canham-Helfrich este puede expresarse como:

$$E_{CH} = \frac{1}{2} \int [\kappa(\Delta h)^2 + \sigma(\nabla h)^2] dx dy, \quad (7)$$

donde $\sigma = 1/2\Gamma$, este término físicamente representa la contribución que impone la tensión superficial³ (σ) sobre la membrana.

1.2.3. Modelo físico de la formación de un septo en un liposoma

En 2015 fue publicado un modelo de campo de fases que describe la física de la formación de septos en liposomas [51]. A partir de un sistema de ecuaciones diferenciales modeladas como un sistema tipo Cahn-Hilliard (modelo B [52]), se simuló la evolución temporal de los componentes de una membrana (ϕ) y la concentración de una proteína (p) o complejo capaz de crear una constricción a partir de un sistema de ecuaciones diferenciales acopladas:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D_\phi \nabla^2 \left(\frac{\delta F}{\delta \phi} \right), \quad (8)$$

³Energía necesaria para aumentar la superficie de la bicapa por unidad de área.

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D_p \nabla^2 \left(\frac{\delta F}{\delta p} \right), \quad (9)$$

donde D_ϕ y D_p , representan el coeficiente de difusión de los componentes de la membrana y la proteína inmersa en la membrana respectivamente. Mientras que F es el funcional⁴ de la energía libre, el cual está definido como:

$$F = \int_V (A_b \Phi_b^2 + A_s V_s + A_f V_f + \sigma |\nabla \phi|^2) dV, \quad (10)$$

donde los términos con subíndice b representan la contribución del módulo de flexión (A_b es el módulo de flexión y ϕ_b es una función que describe el efecto sobre el módulo de flexión por la acción de la proteína (p) y los componentes de una membrana (ϕ)). Los términos con subíndice s representan la asociación de la proteína a la membrana (V_s es la función que describe la asociación de la proteína con la membrana y A_s el coeficiente de dicha contribución). Por último, los términos con el subíndice f representan la contribución energética de la proteína lejos de la membrana (V_f : función que define la contribución energética de la proteína lejos de la membrana y A_f es el coeficiente correspondiente a esta interacción). Para mayor información consultar [51].

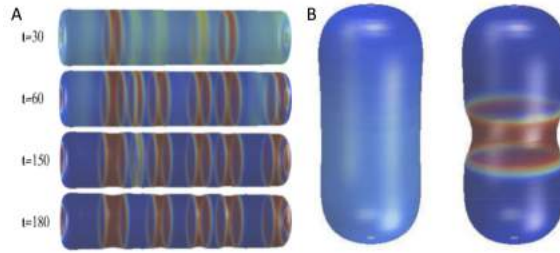


Figura 7: Simulación de la formación de un septo. **A.** Aparición de bandas y difusión las mismas a través del liposoma. **B.** Izquierda: Liposoma en estado inicial con la proteína. Derecha: Condensación de bandas para la formación del septo (banda roja) y constricción del liposoma por la proteína[51].

⁴Una función que como argumento de entrada toma a otras funciones.

Los resultados de este modelo lograron reproducir los resultados experimentales reportados por Osawa sobre la difusión (figura 7-A), condensación y constricción de bandas de un complejo constrictor (figura 7-B) en liposomas[28].

Debido a que el modelo fue definido para casos donde no hay cambios topológicos en el sistema, es decir no hay una contribución energética por parte de la curvatura gaussiana, no fue posible simular una división debido al complejo proteico, sin embargo una de las principales contribuciones del modelo fue poner de manifiesto la importancia del módulo de flexión en la formación del septo, proceso que antecede a la ruptura de la membrana bacteriana y la posterior división celular.

2. Hipótesis

En base a la evidencia experimental discutida en la sección 1.1.5, a la dependencia de la división celular en la composición lipídica (ver sección 1.1.4) y al modelo físico descrito en la sección 1.2.4, surge la siguiente pregunta: ¿hasta qué punto la división de la *Escherichia coli* depende de las propiedades elásticas de su membrana?

A partir de esta pregunta es que surge la hipótesis de este trabajo:

“Es posible alterar la división de la *Escherichia coli* al cambiar las propiedades elásticas de su membrana, alterando su módulo de flexión”.

Debido a que el complejo constrictor de la *E. coli* se ancla en la membrana interna, se decidió trabajar con un extracto comercial que contiene la misma composición lipídica; Estos detalles serán descritos en el siguiente capítulo.

2.1. Objetivos

- Estudiar las propiedades elásticas de los lípidos que componen la membrana interna de la *E. coli*.
- Rigidizar y fluidizar liposomas de lípidos de membrana interna de *E. coli*.
- Estudiar el efecto de estos agentes fluidizantes y rigidizantes sobre cultivos de *E. coli*.

3. Métodos experimentales

Debido a los efectos producidos en la *Escherichia coli* al entrar en contacto con alcoholes y compuestos aminados (ver sección 1.1.5), se propone modificar las propiedades elásticas de la membrana interna con el uso de cadenas hidrocarbonadas de 5 y 12 carbonos (pentanol y clorhidrato de dodecilamina). En esta sección se describirán los protocolos utilizados durante los experimentos, además de la terminología necesaria para describir los resultados, que serán discutidos en detalle en el siguiente capítulo.

3.1. Crecimiento de cultivos

Para estudiar los efectos de las cadenas hidrocarbonadas sobre la replicación de la *E. coli* fueron realizados cultivos de la cepa MG-1655 (w.t.) en presencia de distintas concentraciones de 1-pentanol (Sigma-Aldrich) y para poder emplear una cadena más grande y soluble el clorhidrato de dodecilamina (TCI America).

Como primer paso se procedió a estudiar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento de cultivos de *E. coli* con distintas concentraciones de las cadenas disueltas en el medio de cultivo. Para poder entender los resultados, es necesario antes familiarizarse con los términos esenciales para describir los cambios en el crecimiento de los cultivos, por lo que en la siguiente sección se describirá las fases de la curva de crecimiento.

3.1.1. Descripción de una curva de crecimiento

La primera fase de una curva de crecimiento bacteriano es la conocida como fase lag, donde el crecimiento de las bacterias es prácticamente nulo ya sea porque las bacterias comienzan a adaptarse a las condiciones del medio o bien la cantidad de bacterias presentes no es suficiente para ser registrada (aunque éstas se encuentren dividiéndose).

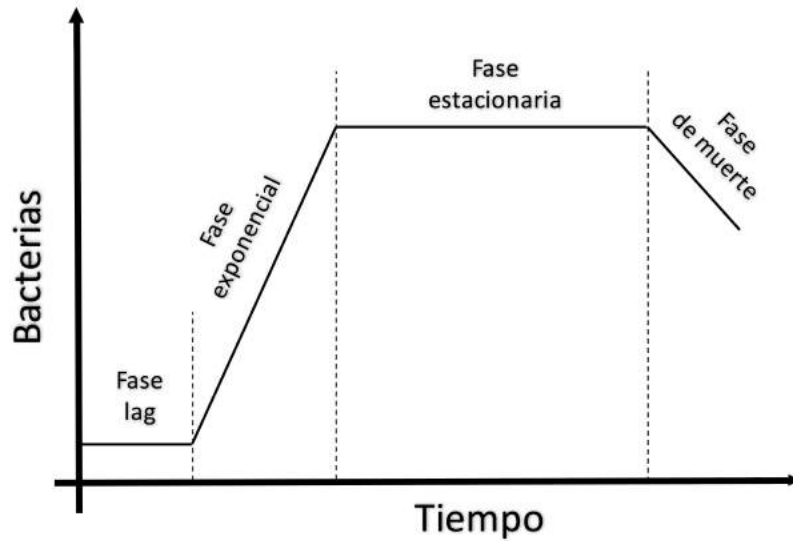


Figura 8: Curva de crecimiento.

Después de la fase lag ocurre la fase de crecimiento exponencial, que representa la fase de mayor crecimiento de las bacterias. En esta etapa el crecimiento del cultivo es proporcional a la cantidad de bacterias presentes en el medio, de tal manera que por cada célula se generan dos más, lo cual puede expresarse con la siguiente relación [53]:

$$X = 2^n X_0, \quad (11)$$

donde X_0 representa la concentración inicial de bacterias, X representa la concentración de bacterias en el tiempo (t) y n corresponde al número de generaciones o divisiones de las células.

Posteriormente ocurre la fase estacionaria, donde el número de divisiones en el cultivo se encuentra en balance con el número de bacterias que mueren, por lo que el crecimiento del cultivo se mantiene en cero. Existen diversos motivos por los que un cultivo podría entrar en la fase estacionaria, una razón es que se hayan agotado las fuentes de carbono, de tal manera que las células requieran obtener los nutrientes de

otras células muertas para su crecimiento. Otra razón podría deberse al aumento de los productos de deshecho en cultivos con un alto número de células [53].

Finalmente la última fase es la muerte celular, donde el número de muertes en el cultivo sobrepasa al número de células en división.

3.1.2. Preparación de los cultivos

A partir de alicuotas de *E. coli* MG1655 *w.t.* previamente almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 % glicerol en medio de cultivo Luria Bertani, L.B.) fueron tomados 200 mL y depositados en 20 μL de medio (L.B.) a manera de inóculo. La solución final fue incubada por 4 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ tal como es descrito en [54]. Una vez transcurrido el periodo de incubación fueron tomados 200 μL para ser depositados en disoluciones de 1-pentanol (30, 50, 70 y 90 mM, concentraciones representativas de un barrido mucho mayor, 5-120 mM obtenido experimentalmente) y clorhidrato de dodecilamina (donde debido a la baja solubilidad del compuesto y a los efectos reportados en la literatura [45], se decidió probar las siguientes concentraciones: 0.05, 0.11, 0.14, 0.22 mM). De cada solución con bacterias fueron tomados 200 μL y depositados en placas de 96 pozos para ser leídos utilizando un espectofotómetro (Multiskan Go, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 600 nm. Para evitar la evaporación, cada pocillo fue sellado con 20 μL de aceite mineral. Las lecturas fueron tomadas cada 30 minutos a una temperatura constante de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ manteniendo una agitación constante entre mediciones. Cada cultivo fue repetido cinco veces en la misma placa y cada experimento fue repetido bajo las mismas condiciones 5 veces de manera independiente.

3.2. La balanza de Langmuir

En la siguiente etapa de este trabajo se estudiaron las propiedades elásticas de una monocapa formada de los lípidos de la membrana interna de la *E. coli*, para esto se decidió emplear la balanza de Langmuir por la rapidez y reproducibilidad de sus mediciones.

Una balanza de Langmuir (figura 9) consiste en un sistema compuesto de una tina hecha de un material hidrófobo donde se deposita una solución (usualmente agua). Sobre esta solución es que será depositado un film de moléculas anfipáticas como los lípidos.



Figura 9: Balanza de Langmuir.

Por medio de dos motores que mueven dos barreras hechas de material hidrófobo (teflón) es controlada el área de la película hecha de los lípidos que fue depositada sobre la solución en la tina. Al cerrarse las dos barreras de teflón en la balanza, los lípidos dispersos sobre la superficie de la tina comienzan a juntarse, mientras un sensor colocado en la parte superior central de la tina, comienza a registrar los incrementos en la tensión superficial de la monocapa sobre una pequeña tira de papel de filtro conectado al sensor a manera de balanza de Wilhelmy (figura 10).

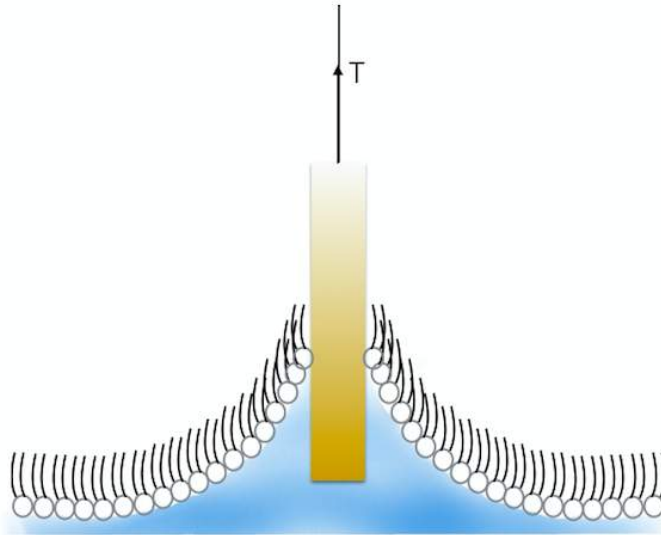


Figura 10: Esquema de la balanza de Wilhelmy. Debido al efecto de la tensión superficial de la monocapa se crea un menisco sobre el papel filtro, generando una tensión que es registrada por un sensor.

Las señales registradas por el sensor son almacenadas por una computadora que calcula la presión superficial durante el proceso de compresión (Π), como:

$$\Pi = \gamma - \gamma_0, \quad (12)$$

donde γ representa la tensión superficial de la monocapa y γ_0 la tensión superficial de la solución donde se depositan los lípidos.

3.2.1. Preparación de monocapas de lípidos polares de *Escherichia coli*

Dado que el complejo divisorio FtsZ se ancla sobre la membrana interna de la bacteria, se decidió utilizar un extracto comercial de lípidos polares, pues contiene una composición similar a la de la membrana interna [14][15][16] (ver tabla 1).

Compuesto	(Peso/ $Peso_{Total}$) %
Fosfatidiletanolamina (PE)	67.0
Fosfatidilglicerol (PG)	23.2
Cardiolipina (CA)	9.8

Cuadro 1: Extracto polar de lípidos de *E. coli* (Avanti Lipids)

Para la formación de la monocapa lipídica, fue esparcida una solución de lípidos disueltos en cloroformo (0.5 mg/mL) sobre una solución de agua junto con los compuestos hidrocarbonados (pentanol: 10 - 120 mM; clorhidrato de dodecilamina: 0.05 - 0.44 mM) dentro de la tina de la balanza de Langmuir (702BAM, NIMA).

Una vez evaporado el cloroformo, debido a la naturaleza anfipática de los lípidos estos tienden a orientar la parte hidrófila de su estructura en contacto con el agua y su parte hidrofóbica fuera de ella, formando una interfase agua-aire.

3.2.2. Isotermas

Las fases encontradas durante la compresión de una monocapa a temperatura constante o curva de presión-área (isoterma) se ilustran en la figura 11, el primer estado consiste en una etapa donde las moléculas se encuentran en un estado parecido a un gas a baja presión (G). Esta etapa está caracterizada por ser el área/molécula mucho más grande que la sección transversal al eje de compresión de la monocapa.

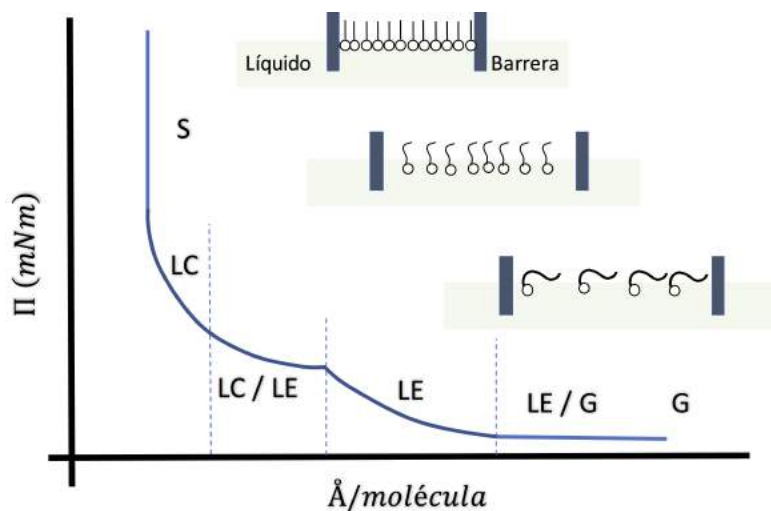


Figura 11: Fases en una isoterma.

Conforme aumenta la presión del film en estado gaseoso⁵, este condensa a una fase líquida llamada líquido en expansión (LE), posteriormente ocurre una etapa donde la monocapa en estado líquido se encuentra en un estado más denso, conocida como fase de líquido condensado (LC) y finalmente una etapa de fase sólida (S), que existe en condiciones de alta presión para las moléculas de la monocapa. Adicionalmente si la monocapa continúa comprimiéndose hasta sobrepasar un punto crítico de presión ocurre el colapso de la monocapa, dando lugar a la formación de sólidos en tres dimensiones.

⁵Estado en el que las moléculas anfipáticas se encuentran tan separadas entre sí como lo están las moléculas en un gas.

3.2.3. Análisis del módulo de compresibilidad lateral

A partir de la información de las isotermas es posible calcular el módulo de compresibilidad lateral [55], como la relación:

$$\epsilon = A \left(\frac{\partial \Pi}{\partial A} \right). \quad (13)$$

Una vez calculado el módulo de compresibilidad es posible hacer una aproximación al módulo de flexión ó bending modulus (ver apéndice, sección 7.1) para una bicapa como :

$$\kappa = \frac{1}{48} \epsilon h^2, \quad (14)$$

donde h representa el grosor por monocapa.

3.3. Formación de liposomas

Debido a las diferencias estructurales entre una monocapa y una membrana celular y a los posibles efectos de los compuestos hidrocarbonados dentro de la región de las colas de una bicapa, se decidió estudiar el efecto de estos compuestos en una estructura tridimensional. Para esto fueron formados liposomas unilamelares a partir de los lípidos de membrana interna de *E. coli*.

3.3.1. Electroformación

Para la formación de los liposomas fue empleada la técnica de electroformación, donde partiendo de una solución de lípidos disueltos en cloroformo (5.5 mg/mL) es tomado un pequeño volumen (5 μL) para ser depositado sobre la superficie de una placa conductora de óxido de indio y estaño (ITO). Una vez evaporado el cloroformo es colocada otra placa de Ito a una distancia fija (5 mm) utilizando una cera no conductora para crear un espacio a manera de contenedor. Finalmente, el espacio entre las placas es llenado con una solución de sacarosa (220 mM) y las placas son puestas a una diferencia de potencial alterna (1.7 Volts y 500 Hz) por un periodo de 16 horas (Figura 12).

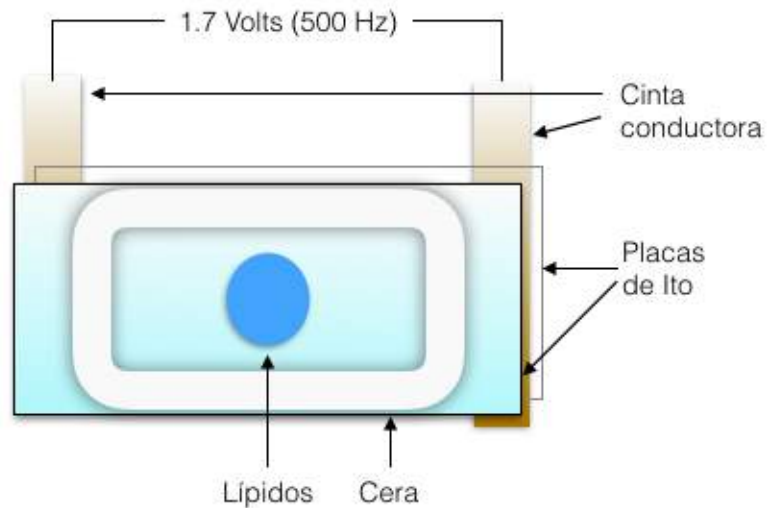


Figura 12: Arreglo experimental para la electroformación.

3.3.2. Estudio de fluctuaciones mediante microscopia

Las membranas lipídicas son descritas físicamente como hojas bidimensionales fluctuantes. La naturaleza de estas fluctuaciones puede ser muy variada, desde el efecto de la energía térmica hasta la acción de la presión osmótica. La energía potencial elástica de una membrana puede ser descrita en términos del módulo de flexión y la tensión,

que experimentalmente pueden ser obtenidos a partir del análisis de las fluctuaciones de la membrana.

A partir de una solución con liposomas fueron estudiadas las fluctuaciones de la membrana de liposomas unilamelares mediante un microscopio óptico invertido con una cámara ultrarrápida (figura 13). Sobre la montura del microscopio es colocado un portamuestras con un O-ring dentro del cuál es depositada una pequeña gota (85 μL) de una solución de glucosa de (200 mM), dentro de esta gota es inyectado un pequeño volumen (15 μL) de la solución con los liposomas. Finalmente es colocado un cubremuestras sobre el O-ring y la muestra. La diferencia de densidades entre la glucosa y la sacarosa permite que los liposomas sedimenten sobre la superficie del portamuestras además de brindar un mejor contraste debido a la diferencia en los índices de refracción entre ambas soluciones.



Figura 13: Arreglo experimental: Microscopio Nikon Eclipse Ti y objetivo de contraste de fase 100x. Cámara: Photron, FastCAM SA3

Una vez enfocado el sistema en un liposoma fueron registradas sus fluctuaciones de su membrana lipídica por medio de una cámara ultrarrápida, fijando una velocidad de captura de 500 cuadros por segundo. Las imágenes fueron almacenadas en una computadora para su posterior análisis mediante un programa de computadora.

3.3.3. Análisis del módulo de flexión

Para calcular el módulo de flexión es necesario obtener el contorno de los liposomas. Para esto es analizado el halo blanco formado alrededor de los liposomas, definiendo el contorno como el intercepto entre la intensidad promedio del medio (fuera del liposoma) y la recta del máximo y mínimo de intensidad del halo blanco [56] (Figura 14).

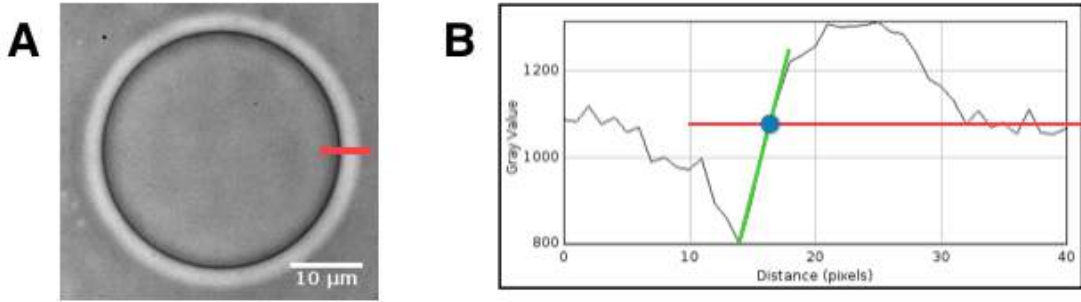


Figura 14: Definición del contorno de un liposoma.

Una vez obtenido el contorno en coordenadas cartesianas (x_i, y_i) es mapeado a coordenadas polares (r_i, θ_i) . Posteriormente los contornos en coordenadas polares son proyectados a una serie de Fourier, de tal manera que el contorno pueda ser expresado en términos de los modos de Fourier [50]:

$$r(\theta) = R \left(1 + \sum_{n=1}^{\infty} [a_n \cos(n\theta) + b_n \sin(n\theta)] \right), \quad (15)$$

$$R = \frac{1}{a\pi} \sum_{i=1}^N (r_i + r_{i+1})(\theta_{i+1} - \theta_i), \quad (16)$$

donde a_n y b_n son los coeficientes de la serie de Fourier.

Finalmente son analizadas las fluctuaciones de la membrana de la vesícula con respecto a su posición promedio como:

$$\langle |u(q_x)|^2 \rangle = \frac{\pi \langle R \rangle^3}{2} (\langle |C_n|^2 \rangle - \langle |C_n| \rangle^2), \quad (17)$$

donde q representa el vector de onda, $u(q)$ representa el desplazamiento con respecto a la posición promedio en la dirección normal de la membrana en un espacio de Fourier y C_n representa la transformada de Fourier compleja de la serie temporal de radios promedio. Debido a que al enfocar el microscopio en el liposoma nos enfocamos solo en la región ecuatorial del mismo, el espectro es ajustado de acuerdo a la teoría de Helfrich[57], para de esta forma poder calcular el módulo de flexión (κ) y la tensión(σ):

$$\langle |u(q_x, y = 0)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\sigma} \left[\frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{\frac{\sigma}{\kappa} + q_x^2}} \right]. \quad (18)$$

Para la realización de las mediciones fueron tomadas 10000 imágenes de liposomas unilamelares (20 liposomas por grupo experimental), a una velocidad de 500 cuadros por segundo, bajo las condiciones de preparación descritas en la sección 3.3.1.

3.3.4. Ajuste al espectro de fluctuaciones

Una vez calculado el espectro de fluctuaciones (ec. 17), es posible calcular el módulo de flexión y la tensión mediante la ec. 18. Sin embargo, debido a la presencia de ruido por la discretización de la bicapa de los liposomas a pixeles, aparece en el espectro una región de ruido con una forma característica de función sinc, por lo que es necesario ajustar el espectro manualmente a las regiones anterior y posteriores a la región con ruido, descartando además los primeros modos (usualmente los primeros 2) debido a que son afectados por la curvatura de los liposomas y a los errores por la topología cerrada de la membrana [50].

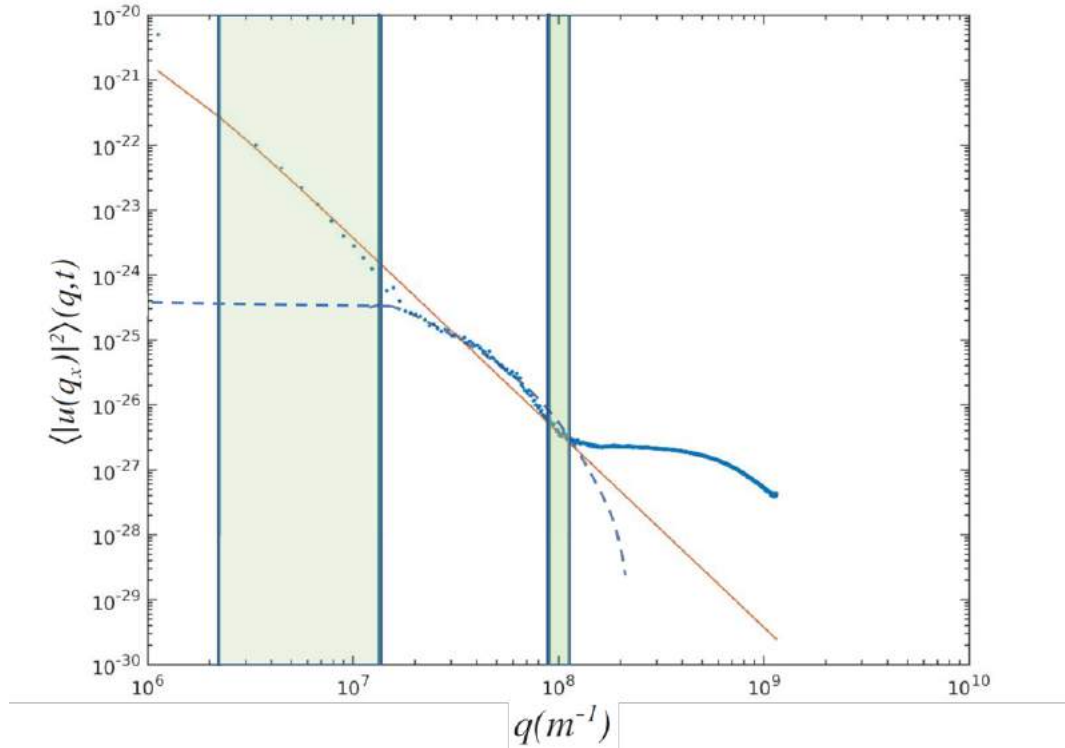


Figura 15: Espectro de fluctuaciones. Las bandas en verde corresponden a regiones antes y después del ruido. La línea a trozos representa el ruido con la forma característica de función sinc. La curva en rojo muestra el ajuste realizado al espectro.

3.4. Fluctuaciones en la membrana de la *Escherichia coli*

Durante el ciclo de división celular, la *Escherichia coli* cambia su composición lipídica, por lo que el estudiar las fluctuaciones de su membrana nos ayudaría a entender cómo cambia sus propiedades elásticas y nos permitiría encontrar además las áreas de mayor actividad durante la división. Para esto se decidió estudiar las fluctuaciones de la membrana a partir de la técnica anteriormente descrita ya que permite obtener fluctuaciones a resoluciones subpixel del orden de nanómetros.

Debido a la imposibilidad de estudiar únicamente la membrana interior bajo condiciones in vivo (sin alterar la estructura de la bacteria), se estudió la membrana exterior como una medida indirecta de la membrana interna, ya que ambas están compuestas de los mismos lípidos y a que ambas tienen contacto a través de la capa de peptidoglicano.

3.4.1. Estandarización de cultivos

Para analizar las fluctuaciones de la membrana externa de una bacteria es necesario estandarizar la fase de crecimiento del cultivo, de tal manera que al elegir una bacteria ésta se encuentre en una etapa de crecimiento óptimo y además sea representativa del estado en que se encuentra la población. Para esto, partiendo de un cultivo de 12 horas son realizadas una serie de diluciones con el fin de que cada nuevo cultivo se encuentre en la misma etapa de crecimiento exponencial. El primer paso, consiste en diluir el cultivo de la noche anterior a una relación 1:100 en medio de cultivo (L.B.), la solución final es puesta a incubar a 37 °C con una agitación constante por aproximadamente 1 hora 40 minutos hasta alcanzar una absorbancia de 0.3⁶ a una longitud de onda de 600 nm. Una vez alcanzada dicha absorbancia, el siguiente paso consiste en realizar 3 diluciones consecutivas a una relación 2:1, cuando los cultivos tengan una absorbancia de 0.3, es necesario hacer la siguiente dilución, y así sucesivamente (aproximadamente 20-25 minutos entre diluciones hasta alcanzar la absorbancia necesaria).

⁶Absorbancia típica de un cultivo en fase de crecimiento exponencial.

Una vez estandarizado el cultivo, el siguiente paso consiste en fijar las bacterias a un porta muestras. Para esto es depositada una ligera capa de medio de cultivo con agar dentro un O-ring colocado en un porta muestras. Sobre esta fina capa de agar será depositada una pequeña gota del cultivo con las bacterias. Una vez fijado el cultivo al agar es sellado con una fina capa de aceite mineral, con el fin de evitar la evaporación del medio. Finalmente es colocada una placa cubre muestra sobre el O-Ring.

Un vez enfocado el sistema sobre una bacteria, el siguiente paso consiste en capturar un promedio de 10000 fotografías a alta velocidad (500 fps). Debido al tamaño de la memoria interna de la cámara ultrarrápida el tiempo mínimo posible entre mediciones es de 10 minutos.

3.5. Herramientas matemáticas para el análisis de fluctuaciones

3.5.1. Desviación estándar

La desviación estándar (STD), es una medida estadística de la dispersión en una distribución (X) con respecto a su media (μ),

$$STD = \sqrt{E [(X - \mu)^2]}, \quad (19)$$

donde E representa el valor esperado de la distribución X.

Por medio de esta variable son creados mapas mecánicos que representarán que tanto se desplaza un punto en la membrana de una célula o liposoma.

3.5.2. Skewness

El Skewness es una medida estadística de la simetría (o asimetría) de una distribución. La Skewness está definida como:

$$Skewness = E \left[\left(\frac{X - \mu}{STD(X)} \right)^3 \right]. \quad (20)$$

La forma empleada para representar esta variable en los mapas mecánicos es la siguiente: una Skewness negativa corresponde a una distribución dirigida hacia afuera de la célula o liposoma y positiva hacia dentro, de tal forma que la representación es contraria al signo, es decir:

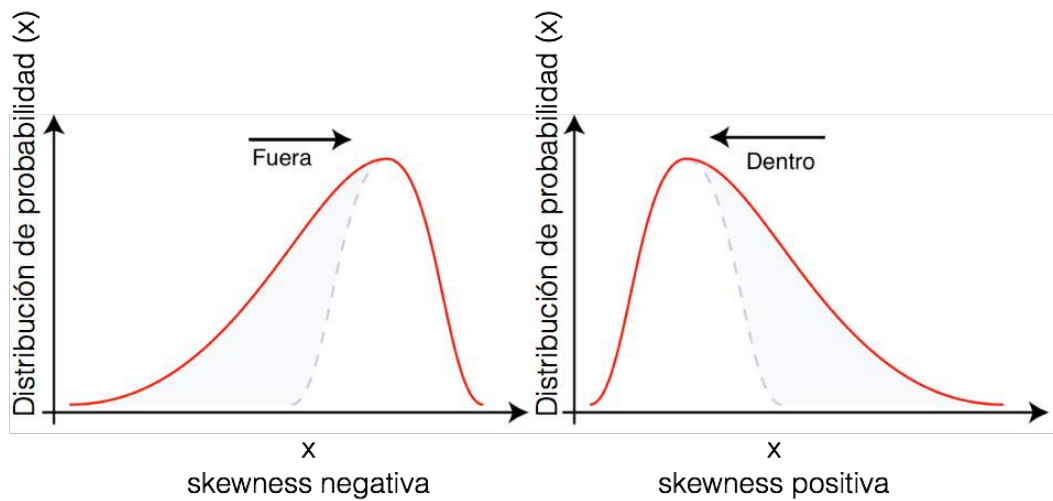


Figura 16: Representación de la skewness. La curva en color rojo representa una función de probabilidad, el área en color gris representa el área de la cola de la distribución.

3.5.3. Kurtosis

La Kurtosis es una medida estadística que nos permite saber cuan alto es el pico de una distribución de probabilidad y está definida como:

$$Kurtosis = E \left[\left(\frac{X - \mu}{STD(X)} \right)^4 \right]. \quad (21)$$

De tal forma que una función con una Kurtosis de 3 (y Skewness = 0), representa una distribución normal, mientras que una distribución con un pico mucho más alto tendría valores mayores y distribuciones aplanadas corresponden a valores inferiores a 3.

3.5.4. Desplazamiento cuadrático medio

El desplazamiento cuadrático medio es empleado para describir el tipo de difusión a lo largo del tiempo para una partícula,

$$MSD = \langle (x - x_0)^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (x_n(t) - x_n(0))^2, \quad (22)$$

donde N representa el número de pasos de la partícula. A partir de la curva del desplazamiento cuadrático medio es posible definir un modelo de difusión, en base al valor del exponente del tiempo (ver figura 17). Donde para un valor del exponente $\rho = 1$, corresponde a un régimen puramente difusivo, valores del exponente menores a 1 son considerados como subdifusivos y para coeficientes de difusión mayores a 1 son considerados super difusivos, es decir aparte de la contribución de la difusión se considera que existe un flujo (ver figura 17 y ecuaciones 23-25).

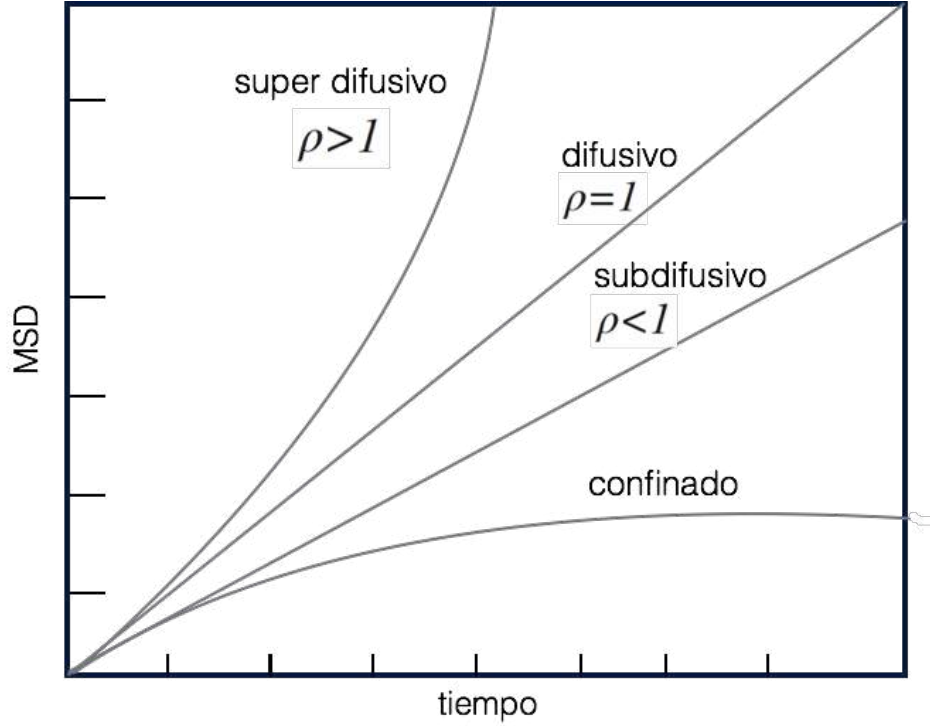


Figura 17: Forma del desplazamiento cuadrático medio para los distintos tipos de difusión [58]

También es posible clasificar el tipo de difusión en base al modelo que mejor describa la física del movimiento y que mejor ajuste al desplazamiento cuadrático medio. Estos son algunos modelos de difusión:

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt^{\rho=1} \quad \text{Difusión normal} \quad (23)$$

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt^\rho \quad \text{Difusión anómala } (\rho \neq 1) \quad (24)$$

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt + (Vt)^2 \quad \text{Movimiento dirigido con difusión} \quad (25)$$

Dado que las fluctuaciones de la membrana de la bacteria son rápidas y muy confinadas⁷, estas se ajustan desde luego antes de llegar a la meseta a una difusión normal de acuerdo a la ecuación 23.

⁷Debido a que la bicapa de los liposomas y la membrana de las bacterias no están rotas.

4. Resultados

4.1. Crecimiento de bacterias

Como un primer acercamiento para entender los efectos de las cadenas hidrocarbonadas (1-pentanol y dodecilamina) sobre la *E. coli*, se observaron los efectos de estos compuestos en el crecimiento de cultivos por medio de un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ti). La figura 18-A, muestra la forma de las bacterias al crecer en un medio rico en 1-pentanol (50 mM) y dodecilamina (0.14 mM) a las 2 y 8 horas a una temperatura de 37°. Observamos una morfología normal en las bacterias comparado con respecto al grupo control, las bacterias presentan la misma forma cilíndrica característica.

Para estudiar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento de los cultivos fue utilizado un espectrofotómetro tal como ha sido descrito anteriormente en la sección 2. La figura 18-B superior muestra las curvas de crecimiento de cultivos de *Escherichia coli*, se observa cómo existe un periodo de adaptación de las bacterias que cambia conforme aumenta la concentración de 1-pentanol, además de un posterior aumento en la pendiente de la fase exponencial de crecimiento, con un máximo de crecimiento a 70 mM y un efecto inhibitorio en el crecimiento de los cultivos a 90 mM. Para los cultivos en presencia de la dodecilamina ocurre una disminución tanto en el crecimiento máximo de los cultivos como en la pendiente de crecimiento de la fase exponencial al incrementarse la concentración de dodecilamina presente en el medio hasta llegar a una completa ausencia de crecimiento a una concentración de 0.22 mM [45].

Para un análisis cuantitativo de estos resultados se propuso ajustar las curvas de crecimiento a la siguiente ecuación logística:

$$Q(t) = \frac{Q_{\infty}}{1 + e^{-\alpha(t-t_0)}}, \quad (26)$$

donde Q representa la absorbancia registrada en el tiempo, Q_{∞} corresponde a la absor-

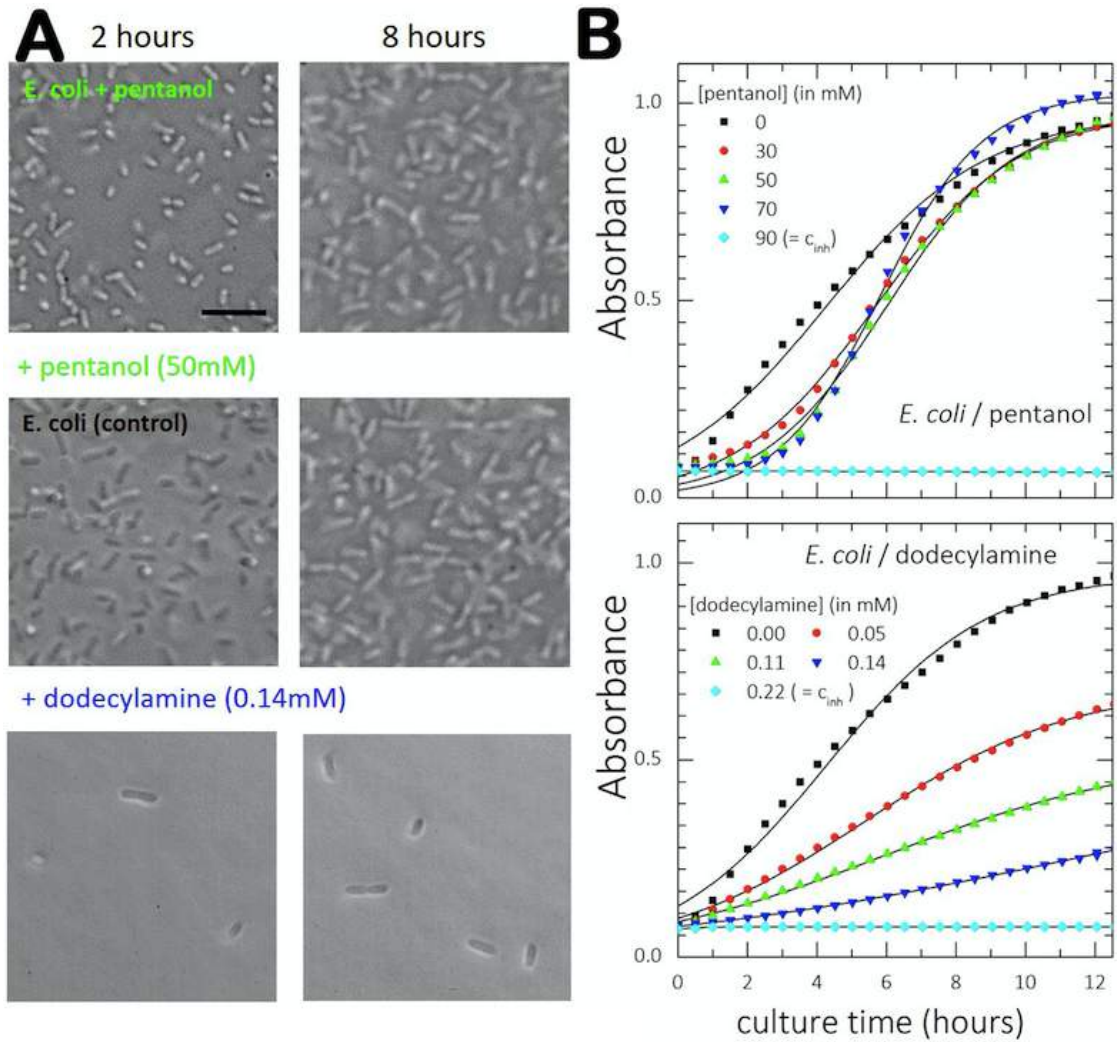


Figura 18: A. Forma de las bacterias *Escherichia coli* en presencia de 1-pentanol y dodecilamina a las 2 y 8 horas de crecimiento. B. Curvas de crecimiento de los cultivos.

bancia máxima alcanzada por los cultivos, α es la pendiente en la fase exponencial y t_0 es el tiempo de adaptación de los cultivos. A partir de este ajuste fue construido un nuevo indicador, la tasa de crecimiento efectiva (EGR) como:

$$EGR = \alpha \cdot t_0 \cdot 100. \quad (27)$$

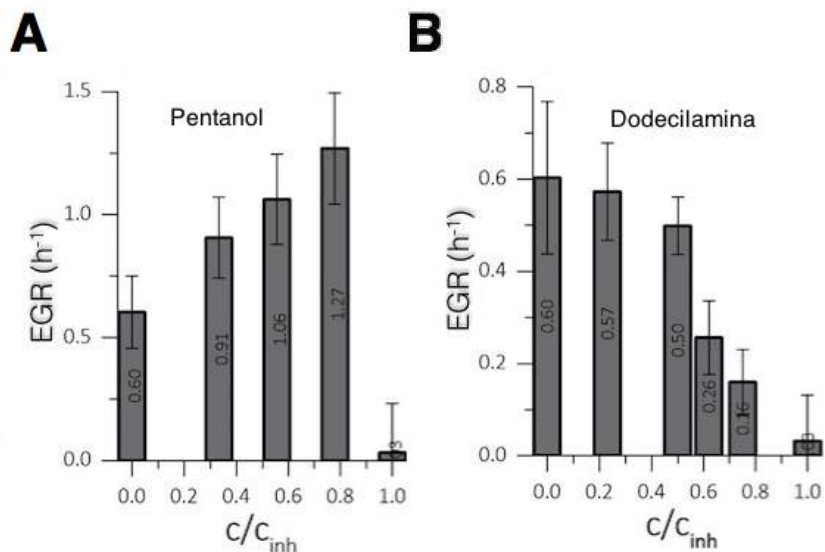


Figura 19: Tasa de crecimiento efectiva de cultivos de *Escherichia coli* en presencia de A.1-pentanol y B. dodecilamina.

La figura 19 muestra la tasa de crecimiento efectiva (G) de los cultivos en función de las concentraciones de 1-pentanol y la dodecilamina normalizados con respecto a la concentración inhibitoria de cada compuesto obtenida de las curvas de crecimiento. La figura 19-A muestra un incremento en la tasa de crecimiento efectiva (G) al aumentar la concentración de 1-pentanol en los medios de cultivo, mientras que los cultivos en presencia de la dodecilamina (19-B) muestran una disminución al aumentar la concentración. Ambas figuras muestran un mínimo en este indicador a sus respectivas concentraciones inhibitorias.

4.2. Módulo de compresibilidad lateral en monocapas de Langmuir

Para las monocapas de lípido polar de *E. coli* (ver cuadro 1) en presencia de 1-pentanol (figura 20-A), se observa un incremento gradual en la presión superficial durante la fase LE comparado con el grupo control. Mostrando el mayor aumento a una concentración de 70 mM, mientras que a concentraciones mayores de 80 a 120 mM ocurre un desplazamiento a la derecha del control para esta fase.

En las isothermas de lípido polar de *E. coli* en presencia de dodecilamina (figura 20-B), se observa cómo comienza a incrementarse rápidamente la presión superficial desde las primeras etapas de compresión, lo que demuestra el rápido efecto que este compuesto ejerce en las monocapas.

A partir de los datos de las isothermas se calcula el módulo de compresibilidad lateral (ϵ) por medio de la ecuación 13. La figura 20-C muestra cómo en presencia del 1-pentanol las monocapas muestran rápidamente picos de aumento en el módulo de compresibilidad, mostrando el primer pico (de derecha a izquierda) a la concentración de 70 mM, mientras que a concentraciones mayores no existe un aumento sino hasta los $90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, área que disminuye a concentraciones mayores.

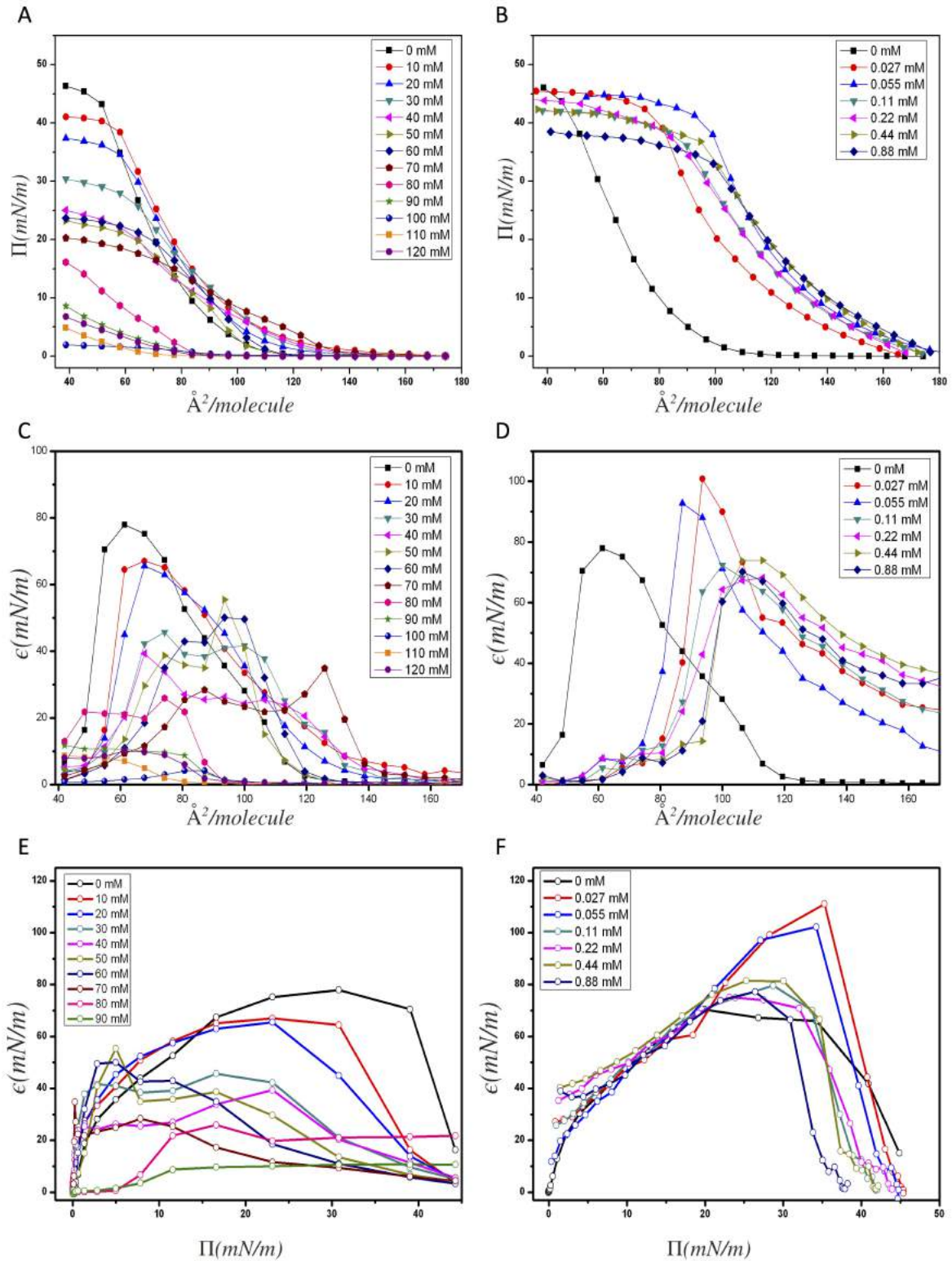


Figura 20: Resultados de la balanza de Langmuir. Curvas del módulo de compresibilidad de monocapas de lípido polar de *Escherichia coli* con: A. 1-pentanol, B. dodecilamina. Curvas del módulo de compresibilidad lateral *vs* \dot{A}^2 /molécula para: C. 1-pentanol, D. dodecilamina. Curvas del módulo de compresibilidad lateral *vs* Presión superficial para: E. 1-pentanol, F. dodecilamina

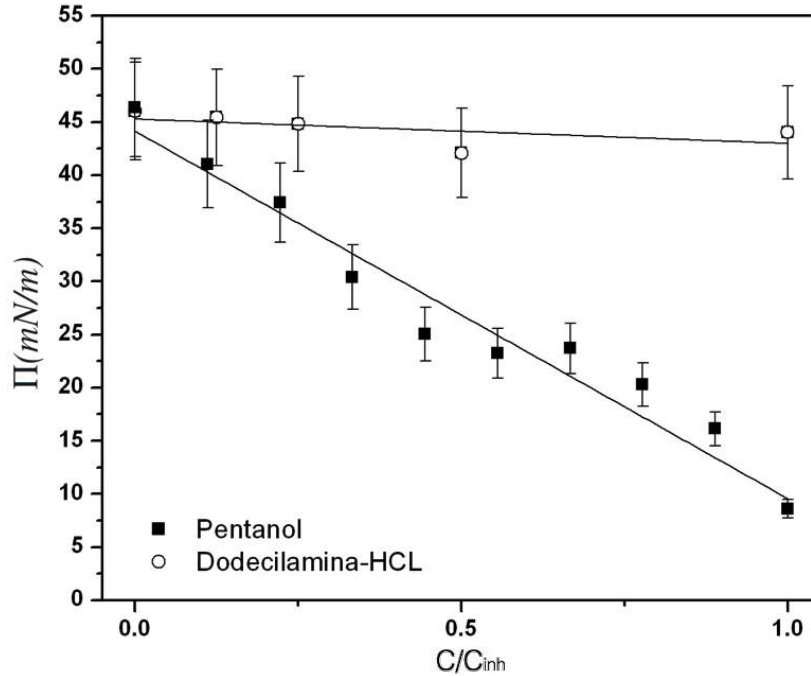


Figura 21: Presión superficial máxima. Curvas formadas a partir de condensar las presiones superficiales máximas para las monocapas en presencia del 1-pentanol y clorhidrato de dodecilamina. En esta gráfica se observa como tiende a colapsar una monocapa al incrementarse la concentración de cada compuesto.

Para las monocapas en presencia de dodecilamina (figura 20-D) se observa un aumento gradual en la compresibilidad lateral a regiones de $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ mayores (anteriores al aumento del grupo control, derecha-izq.) y un módulo de compresibilidad mayor al alcanzado por el control a las concentraciones de 0.027 y 0.055 mM.

La figura 20-E muestra cómo en presencia de 1-pentanol las monocapas de lípido polar de *E. coli* aumentan su módulo de compresibilidad a concentraciones menores a 70 mM y presiones menores de 10 mN/m. Posteriormente a presiones mayores comienza a disminuir el módulo de compresibilidad, mientras que en presencia de la dodecilamina (fig. 20-F) comienza a incrementarse el módulo de compresibilidad desde rangos de presiones entre 0 y 10 mN/m, repentinamente comienzan a converger cada curva al grupo control para presiones entre 10 y 20 mN/m. Finalmente el módulo de compresibilidad comienza a incrementarse de 20 a 30 mN/m.

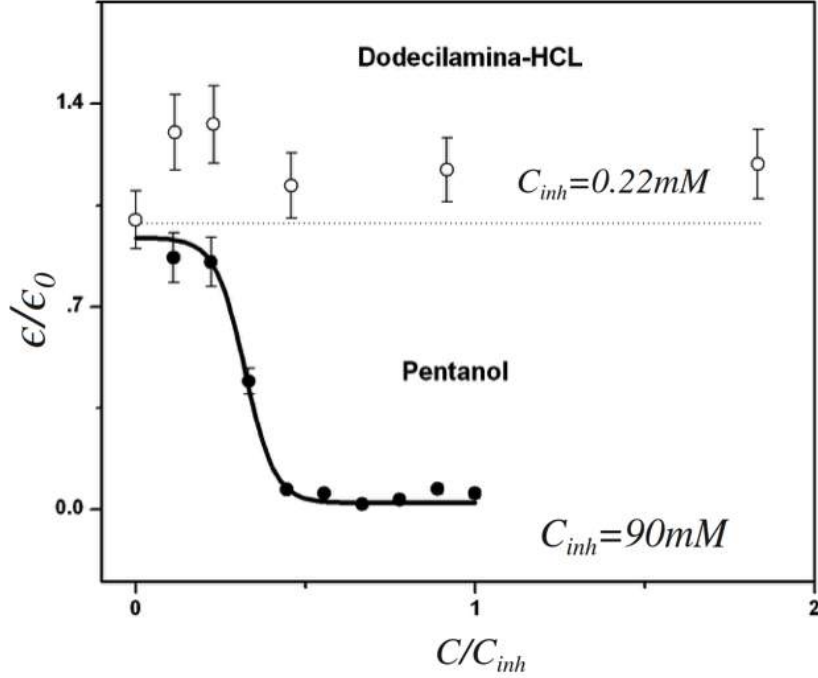


Figura 22: Módulos de compresibilidad lateral normalizada. Curva obtenida a partir de las isothermas de monocapas de lípidos polares de *E. coli* a distintas concentraciones de 1-pentanol y clorhidrato de dodecilamina. Las curvas están normalizadas con respecto al módulo de compresibilidad lateral para una monocapa control ($\epsilon_0 \approx 80$ mN/m)

Si bien los resultados del módulo de compresibilidad lateral muestran los efectos que el 1-pentanol y la dodecilamina producen para un amplio rango de presiones (desde áreas donde las moléculas están tan separadas como un gas hasta regiones de $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ donde la monocapa se encuentra tan compacta que se consideran un sólido, pasando además por una etapa intermedia de líquido), para poder observar el efecto que se produce en la membrana de una bacteria es necesario enfocarse a presiones cercanas a las que podrían encontrarse en estructuras 3D compuestas de la misma monocapa de lípidos. Para esto son estudiados los efectos en el módulo de compresibilidad a una presión de 25 mN/m, una presión típica encontrada en liposomas.

Durante las últimas etapas de compresión se observa cómo la presión superficial máxima se reduce en función de la concentración del 1-pentanol, mientras que las monocapas en presencia de la dodecilamina se registra una presión superficial casi constante, disminuyendo ligeramente con respecto al grupo control, lo que demuestra la tendencia

de cada compuesto a precipitar los lípidos al fondo de la tina de la balanza en función de su concentración (ver figuras 20-A y B). La figura 21 condensa estos resultados junto con la tendencia de cada compuesto durante la etapa final de compresión de las monocapas, mostrando una disminución lineal en la presión superficial máxima de las monocapas en presencia del 1-pentanol.

La figura 22 muestra el módulo de compresibilidad lateral normalizado con respecto a una monocapa control a presiones de 25 mN/m. Para el 1-pentanol se observa inicialmente una ligera disminución de la compresibilidad normalizada hasta llegar a un valor mínimo a concentraciones de 40 a 90 mM, mostrando una forma de tipo sigmoidal. Mientras que la dodecilamina tiende a incrementar ligeramente la compresibilidad en los primeros dos puntos y posteriormente disminuye hasta llegar a tener valores muy similares al grupo control.

A partir del módulo de compresibilidad es posible hacer una aproximación al módulo de flexión para una bicapa tal como fue descrito en sección 2 (demostración en el apéndice 6.1).

Se ha estimado que el grosor de una monocapa artificial es del orden de 15 \AA [59], por lo que al sustituir los valores del módulo de compresibilidad en la aproximación al módulo de flexión, se encontró que para una bicapa el módulo de flexión muestra un comportamiento similar al de la figura 22 con una disminución en presencia del 1-pentanol, un ligero aumento con la dodecilamina y un valor del módulo de flexión (κ) para el grupo control $\approx 11.39 \text{ kT}$.

4.3. Módulo de flexión en liposomas de extracto de lípido polar de *Escherichia coli*

Para poder estudiar los efectos del 1-pentanol y la dodecilamina sobre una configuración similar a una membrana celular se midió el módulo de flexión de liposomas en presencia de estos compuestos.

Una vez creados los liposomas con la técnica anteriormente descrita en la sección 2, se estudiaron las fluctuaciones de la membrana de los liposomas en la zona ecuatorial. La figura 23 muestra el módulo de flexión (o módulo de bending) para liposomas de extracto de lípidos polares de membrana de la *E. coli* (ver cuadro 1) normalizado con respecto al módulo de flexión de un grupo control ($\approx 12K_B T$). La curva inferior representa los valores de los grupos experimentales en presencia del 1-pentanol, donde se observa una disminución exponencial del módulo de flexión. En la parte posterior se representan las mediciones de los grupos experimentales en presencia de la dodecilamina. Contrario a los resultados del módulo de compresibilidad lateral en las monocapas, existe un incremento exponencial para los liposomas en presencia de la dodecilamina, lo que nos muestra el efecto de esta en una bicapa, lo que podría sugerir una interacción en el área intermedia de una membrana por la hidrofobicidad de la dodecilamina.

El 1-pentanol reduce el módulo de flexión (bending modulus) en función de la concentración, mientras que la dodecilamina lo incrementa. Es interesante resaltar cómo la concentración inhibitoria para la dodecilamina (0.22 mM) incrementa casi tres veces el módulo de bending comparado con el grupo control (figura 23).

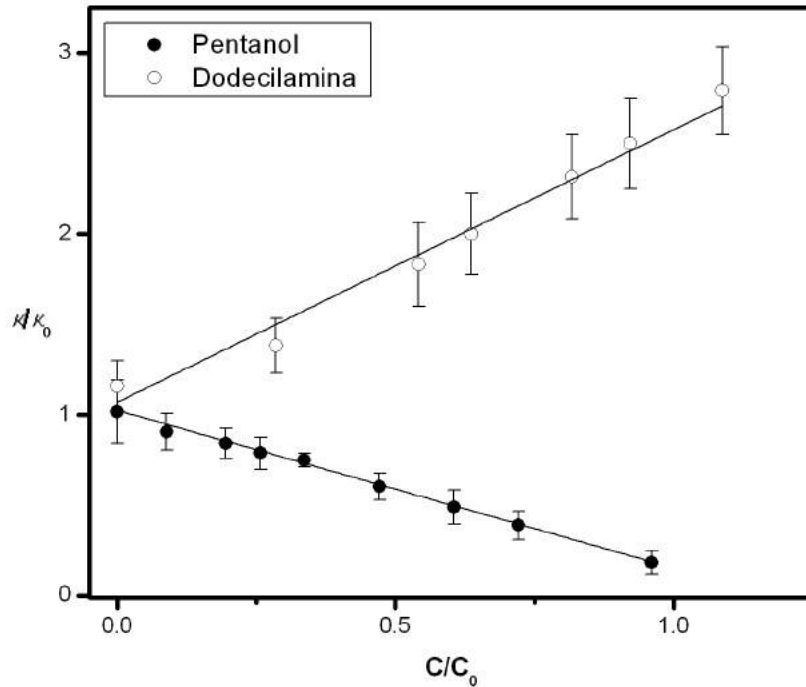


Figura 23: Mediciones del módulo de flexión en liposomas. La figura muestra los valores promedio de las mediciones del módulo de flexión de liposomas ante distintas concentraciones de 1-pentanol y dodecilamina. Cada grupo experimental representa los valores obtenidos de 20 liposomas.

4.4. Efecto del módulo de flexión en la tasa de crecimiento efectiva

Es posible agrupar los resultados obtenidos del módulo de flexión de los liposomas con los resultados sobre el efecto del 1-pentanol y la dodecilamina en la tasa de crecimiento efectiva de los cultivos.

A partir de estos resultados fue construido un modelo matemático para describir la dinámica de crecimiento de un cultivo de bacterias. Este modelo está basado en ideas propuestas anteriormente [51], donde se incorpora un complejo protéico de concentración u que genera una constricción dependiente del módulo de flexión. Para una derivación del modelo consultar el apéndice en la sección 6.2.

Una vez formulada la ecuación diferencial que describe la dinámica del crecimiento de las bacterias, se obtiene una ecuación que nos da la cantidad de bacterias presentes en el medio (ec. 34). La derivada de esta ecuación (ec. 35) nos proporciona una tasa de crecimiento (α) multiplicada por la cantidad total que puede haber de bacterias. Esta tasa de crecimiento es representada en términos de un factor de escala en función de la diferencia de un módulo de flexión máximo y las mediciones experimentales del módulo de flexión, elevado todo a un exponente (ec. 36). Este ajuste es representado por la banda roja en la figura 24-A. Al ajustar los valores experimentales de la figura 24-A se obtuvo el valor del exponente $\beta \approx 2$ (figura 24-B).

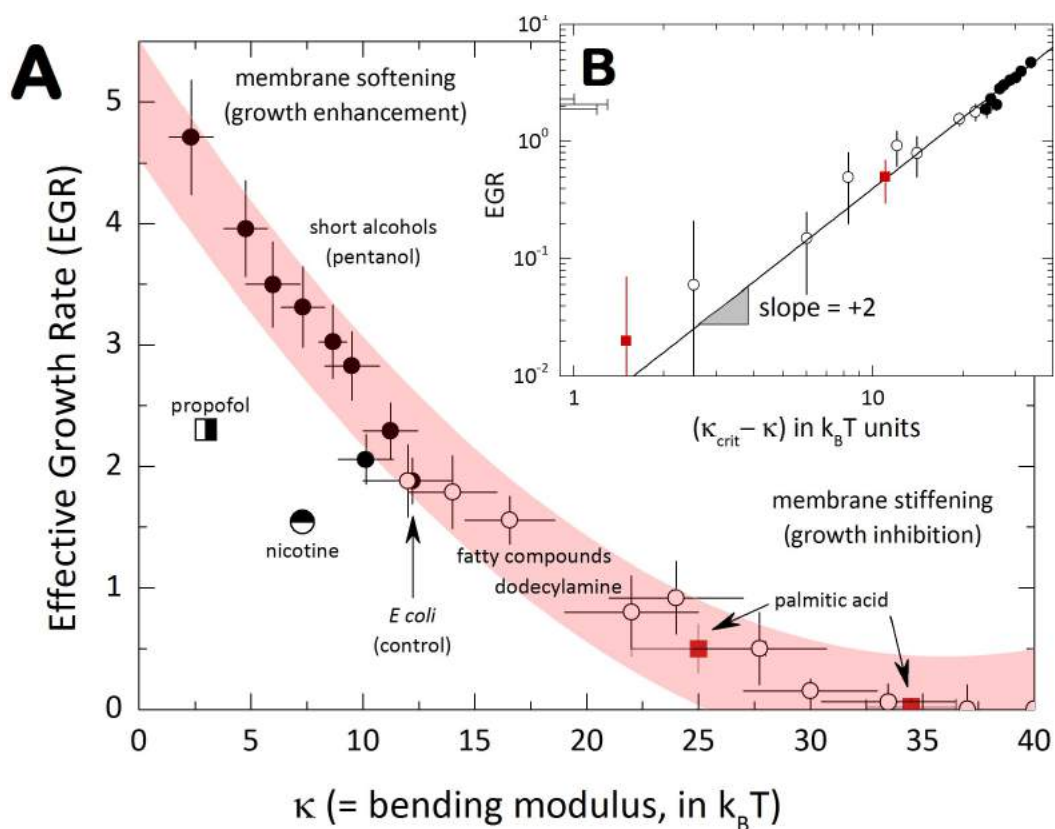


Figura 24: Efecto del módulo de flexión sobre la tasa de crecimiento efectiva de la *E. coli*. **A.** Esta figura condensa los resultados de las mediciones de la tasa de crecimiento efectiva (EGR) y las mediciones del módulo de flexión con los liposomas en presencia los compuestos hidrocarbonados de cadena corta (Negro:1-pentanol) y los compuestos de cadena larga (blanco: dodecilamina, rojo: ácido palmítico). **B.** Representación logarítmica de la curva en A.

La banda roja en la figura 24-A muestra la región donde los cambios en la tasa de crecimiento de los cultivos es debida a efectos puramente físicos, es decir en función del módulo de flexión. Para completar esta idea fueron añadidos además los efectos del propofol, nicotina y ácido palmítico. Debido a que el propofol[60][61] y la nicotina[62] tienen efectos sobre el metabolismo de la *E. coli* y no sobre las propiedades de su membrana (ver apéndice, sección 7.3) estos puntos se encuentran fuera de la banda roja, mientras que el ácido palmítico (otro compuesto hidrocarbonado e hidrofóbico similar a la dodecilamina) se encuentra dentro de esta banda.

4.5. Mapas mecánicos de las fluctuaciones de la membrana exterior de la *Escherichia coli*

Las figuras [25-27], muestran los mapas mecánicos de la membrana externa de una bacteria. Las figuras muestran la evolución temporal del movimiento o actividad de la membrana de una bacteria de *E. coli* MG1655 de tipo silvestre durante el proceso de división celular. Debido al proceso de estandarización en el crecimiento de los cultivos, se considera que estos resultados son muestras representativas de un cultivo bajo las mismas condiciones. La temperatura del cuarto donde se desarrollaron las mediciones fue de alrededor de 24 °C, por lo que la división de las bacterias ocurre en un periodo aproximado de 60 minutos.

Los recuadros en la figura 25 muestran los mapas mecánicos de la desviación estándar para fluctuaciones de la membrana. Todas las figuras muestran una actividad máxima de entre 110 a 170 nm y mínimos de actividad de 50 nm. Sin embargo, debido al efecto del ruido electrónico proveniente de las imágenes (ver sección 7.4), se decidió realizar un análisis más refinado a partir de las fluctuaciones de la membrana fue calculado el desplazamiento cuadrático medio y ajustado a un modelo de difusión para la región difusiva (ver sección 2).

La figura 26 muestra los mapas del coeficiente de difusión a lo largo de la membrana de la *E. coli*. Estos resultados indican que las fluctuaciones están heterogéneamente distribuidas a lo largo de la membrana y que se repiten periódicamente a lo largo del ciclo celular. En la figura 26 se encuentra un patrón similar en las fluctuaciones a 0, 10 y 30 minutos, donde se encuentran puntos de altos coeficientes de difusión en las regiones de los polos, mientras que para los tiempos 20 y 40 hay una máxima actividad en las regiones cercanas a estos y una actividad ligeramente menor en los polos. En el minuto 50 vemos actividad en la membrana en las regiones cercanas a los polos, además de un aumento comparado al minuto 40. Esta figura nos muestra además que la región central de la bacteria es muy poco fluctuante desde las primeras etapas del

crecimiento. A partir del trabajo de Granek [63], es posible establecer una relación entre el coeficiente de difusión y el módulo de flexión (ver ecuación 64 en [63]): $D \propto \kappa^{-3}$. Notamos así que la región central de la bacteria tiene valores más altos en el módulo de flexión.

En un trabajo anterior realizado con microcopia de fuerza atómica (AFM), estudiamos la bacteria *E. coli* (MG1655) congelada bajo condiciones isocóricas (ver sección 7.5). Encontramos que la región central es la menos deformable ante el efecto de una compresión hidrostática (esto se discutirá en la sección 7.5).

La figura 27 representa el apuntamiento de las distribuciones por las fluctuaciones de la membrana, de tal manera que para una kurtosis de 3 tenemos una forma gaussiana, para números menores tenemos distribuciones más achatadas y para números mayores a 3 tenemos distribuciones con una media más alta. Estos resultados nos muestran cómo la bacteria rompe la simetría con respecto a un caso artificial (ver sección 7.4) y cómo estas características de no gaussianidad son dependientes de la amplitud de las fluctuaciones locales, las cuales evolucionan a través del ciclo celular.

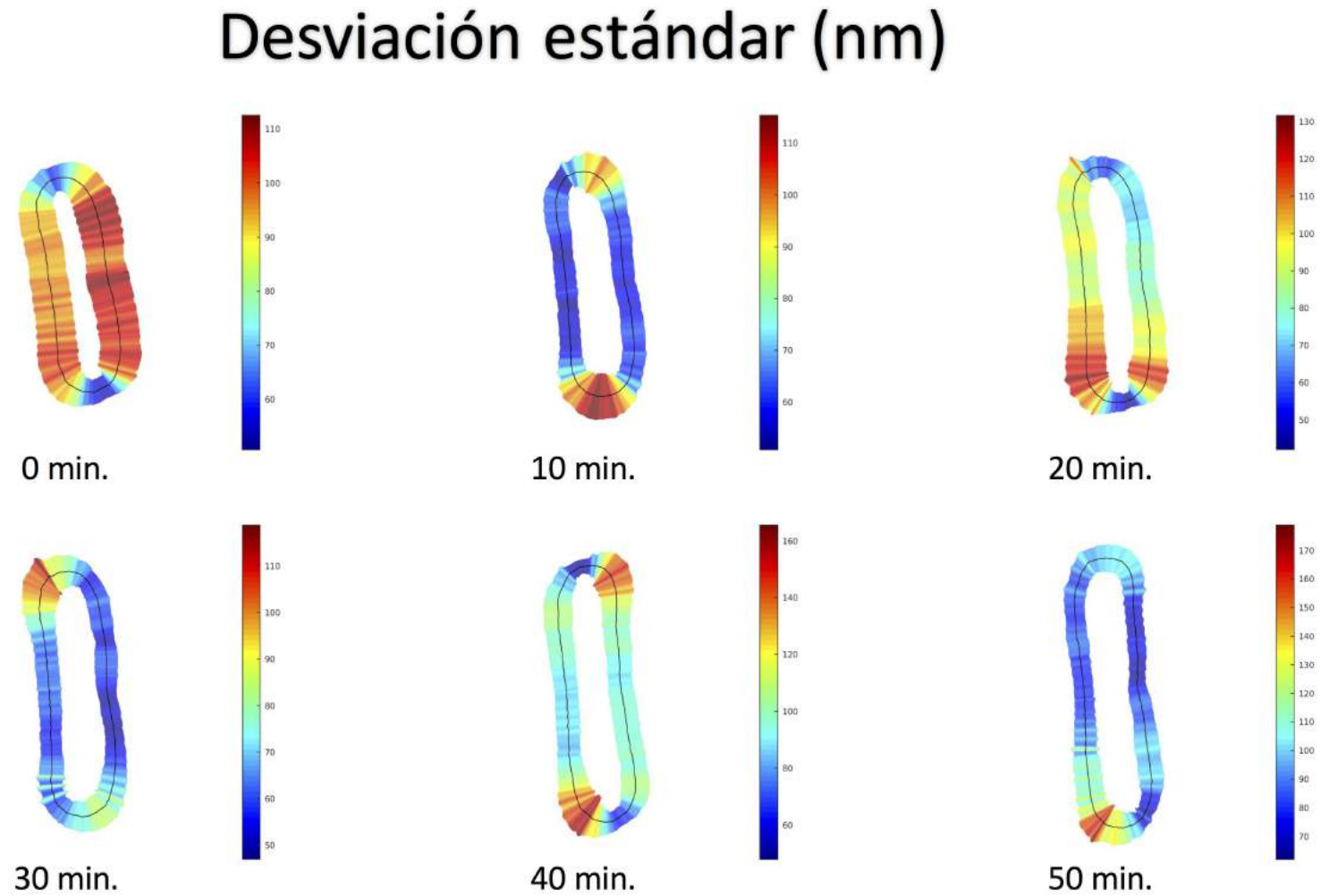


Figura 25: Mapas de la desviación estándar de la membrana de la *E. coli* durante la división celular. Mapas generados a partir de la actividad de la membrana registrada en conjuntos de 10000 imágenes tomadas a una velocidad de 500 cuadros por segundo.

Coeficiente de difusión (nm^2/s)

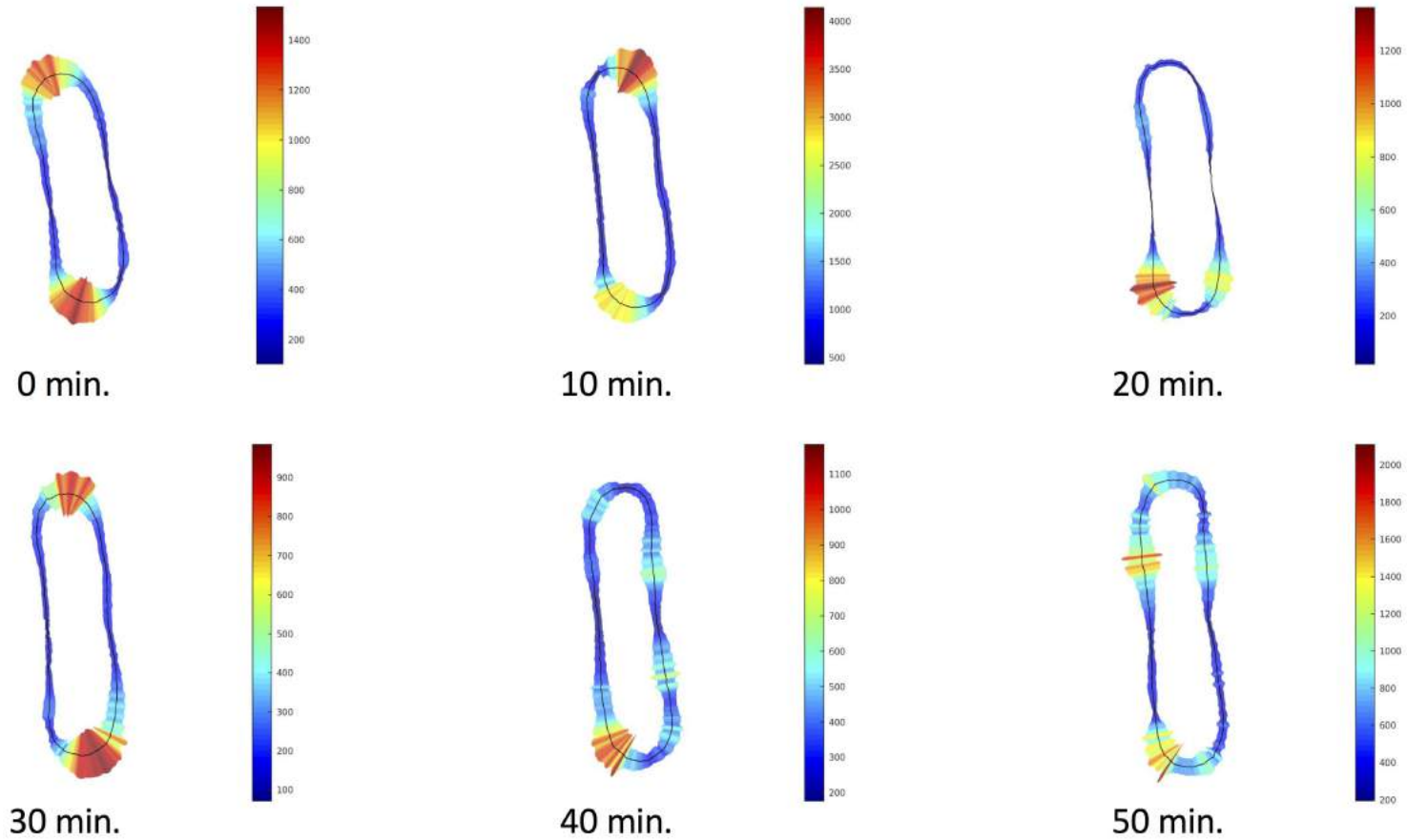


Figura 26: Mapas del coeficiente de difusión de la membrana de la *E. coli* durante la división celular. Mapas generados a partir de la actividad de la membrana registrada en conjuntos de 10000 imágenes tomadas a 500 cuadros por segundo. El valor del coeficiente de difusión corresponde a un ajuste en la región difusiva a partir del desplazamiento cuadrático medio.

Kurtosis

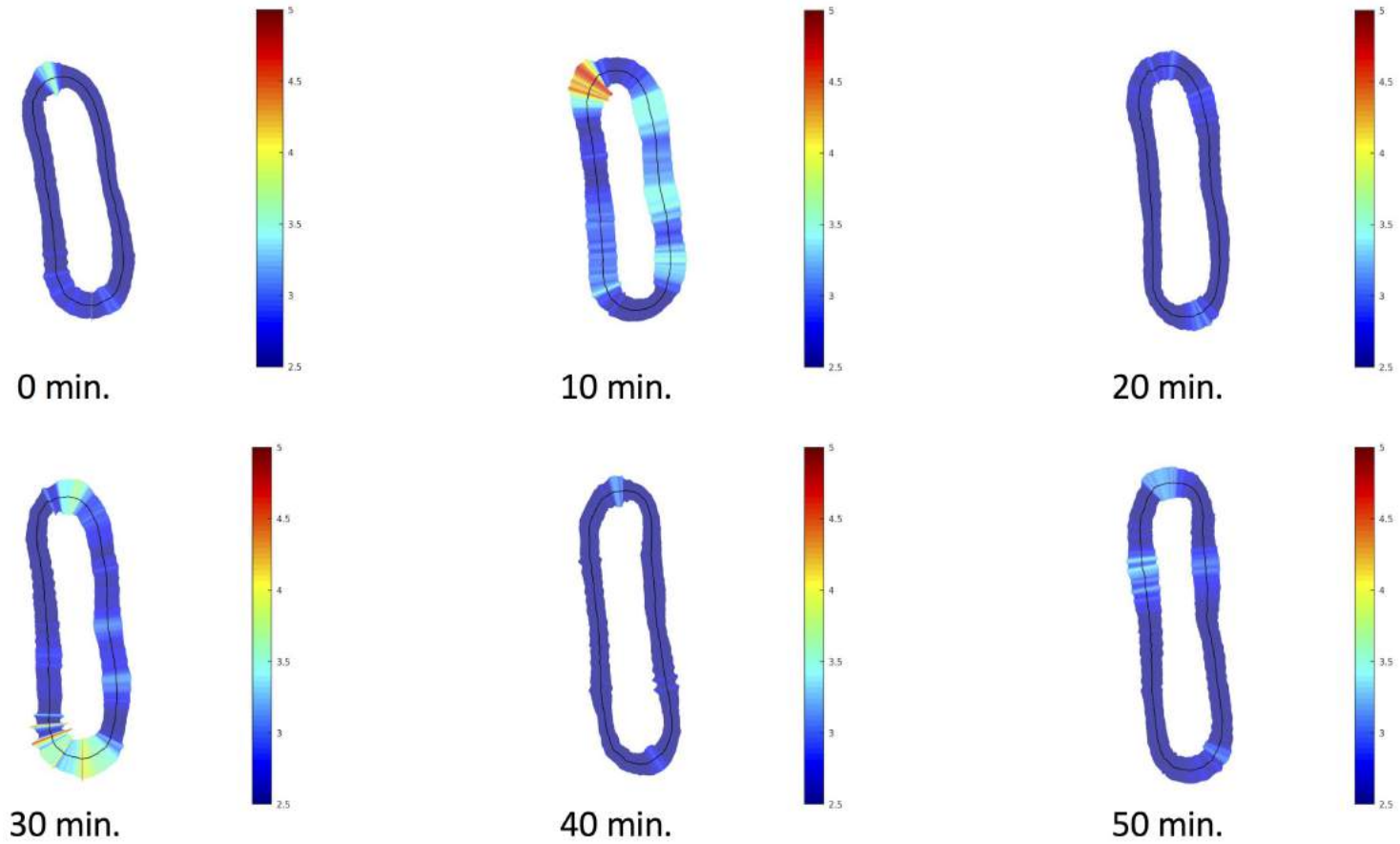


Figura 27: Mapas de la Kurtosis de la membrana de la *E. coli* durante la división celular. Mapas generados a partir de la actividad de la membrana registrada en conjuntos de 10000 imágenes tomadas a 500 cuadros por segundo.

4.6. Efecto de la cardiolipina en los liposomas

Debido a la reducida actividad en la región central de las bacterias y que es en esta región donde se concentra la cardiolipina (CL) durante la división celular, el siguiente paso consistió en estudiar el efecto que este lípido produce sobre el módulo de flexión. Para esto fueron formados liposomas de distintos porcentajes de CL y DOPC mediante la técnica de electroformación anteriormente descrita en la sección 2. La elección del DOPC fue principalmente por su temperatura de transición, por ser un lípido neutro y porque no forma curvaturas espontáneas en los liposomas.

La figura 28 condensa las mediciones de cada grupo experimental con 0, 5, 10,15, 20, 40 y 100 % de CL con un número de repeticiones de 20 liposomas por grupo experimental. Es importante señalar que debido a la forma en que son formados los liposomas a partir de una gota de lípidos evaporada en una de las placas de ITO, no es posible garantizar que todos los liposomas creados tienen el mismo porcentaje de CL. Por tal motivo las mediciones en el módulo de flexión en mezclas entre estos dos lípidos muestran una gran variabilidad, aunque representan la tendencia anteriormente reportada en monocapas (por medio de la balanza de Langmuir) de que la CL tiende a incrementar la compresibilidad lateral (en mezclas de DOPC y CL) y por ende el módulo de flexión hasta un porcentaje de aproximadamente un 10 a un 15 %. Posteriormente, el exceso de CL tiende a crear inestabilidades que reducen el módulo de compresibilidad lateral ([64]).

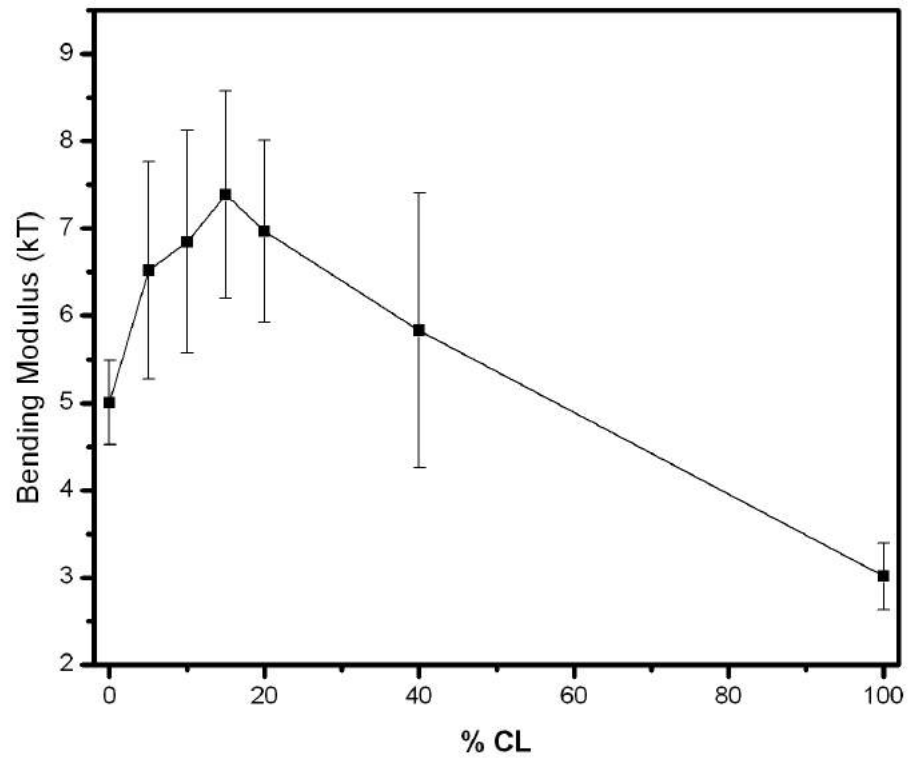


Figura 28: Módulo de flexión en función del porcentaje de cardiolipina. La figura muestra el módulo de flexión ante incrementos en el porcentaje de CL en liposomas (CL/DOPC). Cada grupo experimental representa los valores obtenido de 20 liposomas.

5. Discusión

La curva mostrada en la figura 24 provee una estrategia mecánica para modificar la replicación de la bacteria: La rigidez de la membrana de la *E. coli* puede ser ajustada al usar sustancias mecano-activas de cadena corta o larga. Es posible ir de un escenario donde la bacteria se divide ($\kappa < \kappa_{crit}$) a otro donde la bacteria no puede dividirse ($\kappa > \kappa_{crit}$). Sin embargo, una pregunta importante permanece: ¿Cómo estos surfactantes mecano-activos producen tanto un efecto como el otro? Debido a que se encontró una correlación con forma de ley de potencias entre el crecimiento de la bacteria in vivo y el módulo de flexión de una membrana artificial formada con los lípidos de la *E. coli* in vitro, surge una pista: los alcoholes de cadena corta y surfactantes grasos parecen actuar como drogas no específicas dentro de los lípidos de la membrana bacteriana. Aunque se encuentre fuera del alcance de este trabajo medir la energía libre de Gibbs que caracteriza a estas interacciones, es necesario especular al respecto. El cambio en la energía libre de Gibbs para una mezcla entre lípidos y sustancias hidrofóbicas es negativo [65], sin embargo no sabemos si la interacción de alcoholes de cadena corta y sustancias grasas in vivo en la membrana de la *E. coli* se lleva a cabo por la entropía o la entalpía. Aunque una compensación entropía-entalpía es rara vez mencionada en sistemas biológicos, nos inclinamos a pensar de la siguiente manera: es el cambio en el orden de la membrana producido por estas sustancias lo que produce el efecto observado en los experimentos. El cambio en la longitud de las cadenas hidrocarbonadas provee una variación en la interacción: menores fuerzas de van der Waals en los enlaces pentanol-lípido hace aumentar la entropía, mientras que mayores fuerzas de interacción (dodecilamina-lípidos) la reducen. Esto estaría relacionado con las modificaciones estructurales de la membrana, lo que explicaría los cambios en el módulo elástico.

Contrario a este simple argumento a favor de un mecanismo de reblandecimiento dirigido por la entropía de disruptores de bicapas (alcoholes de cadena corta) y una rigidificación por organizadores de bicapas (surfactantes grasos saturados), una discusión más detallada es posible en términos moleculares más simples. Por un lado, los alcoholes

son conocidos moduladores de las propiedades de bicapas lipídicas [66]. Es particularmente conocido el efecto disruptor de los alcoholes en la ajustada organización lateral de bicapas de fosfolípidos [67]. Este efecto desordenante es dominante para alcoholes de cadena pequeña como el 1-pentanol, alcohol utilizado en este trabajo. Sin embargo, los alcoholes pueden alterar la función de proteínas a través de interacciones directas con las proteínas mismas. Por supuesto, los alcoholes pueden enlazarse, específica o inespecíficamente con las proteínas [68]. Hoy en día, existe un consenso ampliamente aceptado para designar las interacciones biológicas de alcoholes de cadena corta con una combinación de interacciones proteína-alcohol, así como también de las interacciones inducidas por los cambios estructurales producidos por el alcohol en la membrana [66]. El efecto estructural de este último se vuelve progresivamente dominante conforme se incrementa la hidrofobicidad del alcohol dado que los agentes mecano-activos penetran más eficientemente en el núcleo de la membrana, que se vuelve ligeramente más compacta [67]. Por lo tanto, el reblandecimiento de la membrana inducido por el pentanol observado en los experimentos, es posiblemente por una ganancia de entropía estructural debido a la pequeña cantidad de aditivo hidrofóbico embebido en el ensamble lipídico. Por otra parte, el efecto de condensación de compuestos con cadenas largas y saturadas en bicapas modelo de fosfolípidos es bien conocida [65], particularmente de aminas grasas [69][70] y ácidos grasos [71][72]. Dicha condensación estructural induce un significativo incremento en la temperatura de transición de la bicapa y aún también la supresión de la fase fluida en algunos casos [73].

Estudios calorimétricos de mezclas de fosfolípidos en membranas con aditivos de ácidos grasos saturados han demostrado la formación de complejos estequiométricos (1:1 o 1:2) y una partición preferencial a dominios tipo sólido [73].

Adicionalmente, al incrementar el ordenamiento lateral en bicapas lipídicas se espera que incremente la rigidez por el acoplamiento intermonocapa a través de interacciones cola a cola [74].

La rigidez de la membrana observada e inducida por la amina/ácido graso resulta

plausible a partir de una reducción en la entropía estructural debido a estos aditivos ordenadores de membrana. Volviendo ahora al lado biológico, dada la extremadamente baja solubilidad de sustancias de cadena larga grasas en agua, estos aditivos hidrofóbicos se acumularían predominantemente en una membrana lipídica, para posteriormente ser translocados con la ayuda de proteínas que componen la maquinaria de transporte de la bacteria [75].

El dopar cultivos de bacterias con pequeñas cantidades de surfactantes grasos saturados que se anclan en la membrana celular, puede hacer a la membrana volverse mecánicamente más rígida bajo una combinación de los efectos de compactación descritos arriba.

Además de dicho efecto de rigidez del surfactante graso, a altas dosis, puede ser transportado al citoplasma, donde eventualmente contribuye a alimentar a la célula a través de diferentes vías metabólicas [75].

Nuestro análisis matemático sugiere que la respuesta mecánica de la membrana de la bacteria y sus efectos asociados en la división, exhiben un cierto grado de universalidad más bien relacionado con la rigidez⁸ de la membrana que con la fuerza del complejo de constricción basado en la FtsZ.

En base a los resultados de los mapas mecánicos, se sugiere un posible mecanismo de crecimiento de la membrana observado a partir de los cambios en el coeficiente de difusión, este crecimiento consiste en: Una mínima actividad en la región media de la bacteria (donde se ancla el complejo divisorio FtsZ). Conforme se avanza en dirección hacia los polos hay una creciente actividad o aumento de la membrana, con momentos donde hay ausencia o poca actividad en el polo hasta que finalmente estos movimientos tienden a desplazarse y concentrarse en los polos, proceso que parece ocurrir de manera periódica durante el crecimiento de las bacterias.

⁸Debido a la adición de un agente mecanoactivo o de manera natural por la redistribución de los lípidos en la bacteria.

A partir de los resultados encontrados en los mapas del coeficiente de difusión de la membrana de la *E. coli*, durante las últimas etapas de división se evidencia poca actividad en la región central de la bacteria. Debido a que esta es un área rica en cardiolipina las mediciones del módulo de flexión en los liposomas nos hablan de la importancia de este lípido y el por que podría ser necesario en la región del septo. Pensamos que esto podría servir para brindar una estabilidad estructural durante el ensamblaje del divisoma (al incrementar el módulo de flexión) y posteriormente al incrementarse la concentración de cardiolipina, el exceso de este lípido produce una disminución del módulo de flexión de la membrana lo cual reduciría la energía necesaria para que la bacteria se divida.

6. Conclusiones

En este trabajo se ha abordado la división celular de la *E. coli* estudiando su membrana como si se tratase de un sólido deformable con un módulo elástico. Por lo que, basado en las regulaciones de las propiedades mecánicas de la membrana de la bacteria, este trabajo propone una nueva estrategia para implementar tratamientos que inhiban el crecimiento de bacterias. Al exponer bacterias a cadenas hidrocarbonadas saturadas como las aminas grasas y ácidos grasos, estamos modificando el módulo de flexión de la membrana interna y obstaculizando la proliferación de las mismas. Dado que la interacción de estas sustancias con las células es con la parte hidrofóbica de la membrana interna, descartamos un efecto metabólico. Creemos que el efecto producido por muchos otros aditivos en la replicación de la bacteria podrían seguir un comportamiento universal como el encontrado en este estudio.

7. Apéndice

7.1. Aproximación al módulo de flexión

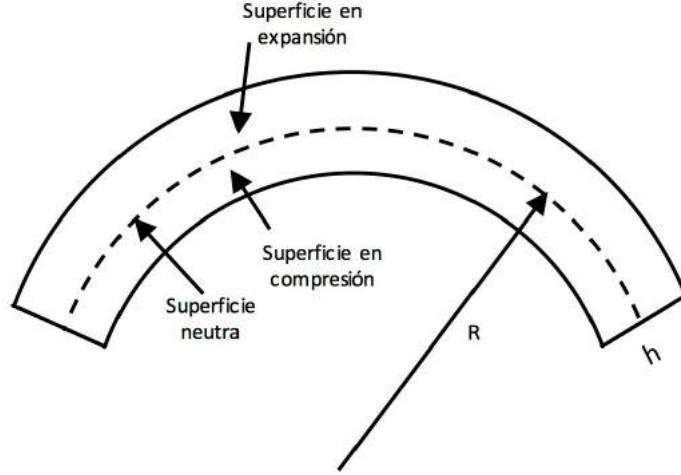


Figura 29: Monocapa flexionada en dirección radial.

Definimos la energía de expansión para un sólido como la diferencia energética entre la deformación con respecto a un volumen inicial, en términos de un módulo de compresibilidad en R^3 o módulo de Young (Y) como:

$$E_{exp} = \frac{1}{2} Y \frac{(V - V_0)^2}{V_0}. \quad (28)$$

De forma similar para una monocapa de área L^2 y flexionada un radio R con respecto al eje Z (figura 29), podemos definir la energía de flexión por área de la siguiente manera:

$$e_{flex} = \frac{1}{L^2} \int_0^L \int_0^L \int_{-h/2}^{h/2} \frac{1}{2} Y \frac{[(1 + z/R)dxdydz - dxdydz]^2}{dxdydz}, \quad (29)$$

$$= \frac{1}{L^2} \int_0^L \int_0^L \int_{-h/2}^{h/2} \frac{1}{2} Y ((1 + z/R)^2 - 2(1 + z/R) + 1) dxdydz,$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{1}{L^2} \int_0^L \int_0^L \int_{-h/2}^{h/2} \frac{1}{2} Y \left[\frac{z}{R} \right]^2 dx dy dz, \\
&= \int_{-h/2}^{h/2} \frac{1}{2} Y \left[\frac{z}{R} \right]^2 dz, \\
e_{flex} &= \frac{1}{24} Y \frac{h^3}{R^2}. \tag{30}
\end{aligned}$$

Definimos el módulo de compresibilidad lateral, $\epsilon = Yh$, esto es:

$$e_{flex} = \frac{1}{24} \epsilon \left(\frac{h}{R} \right)^2. \tag{31}$$

A partir de (31) es posible definir el módulo de flexión para una monocapa como:

$$\kappa = \frac{1}{12} \epsilon h^2, \tag{32}$$

y la energía de flexión como:

$$e_{flex} = \frac{1}{2} \kappa \frac{1}{R^2}. \tag{33}$$

De forma similar, es posible calcular la energía de flexión para dos monocapas, suponiendo que no existe ningún efecto por el rozamiento y cizalla entre ellas, podemos expresar esta energía a partir de (29) para una bicapa de grosor h como:

$$e_{flex} = e_{flex_{mono1}} + e_{flex_{mono2}}, \tag{34}$$

$$= Y \int_{-h/4}^{h/4} \left[\frac{z}{R} \right]^2 dz,$$

$$e_{flex} = \frac{1}{96 R^2} Y h^3, \tag{35}$$

y el módulo de flexión para la bicapa:

$$\kappa = \frac{1}{48}\epsilon h^2. \quad (36)$$

7.2. Dinámica de crecimiento de un cultivo

Sea $n(t,u)$, la cantidad de bacterias presentes en el tiempo (t) y con la concentración del complejo protéico que genera la constricción u , es posible expresar la dinámica de crecimiento como:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \frac{du}{dt} \frac{\partial n}{\partial u} = - [b(u) + \mu] n(t, u). \quad (37)$$

con la condición:

$$n\left(t, \frac{u}{2}\right) = 2b(u)n(t, u), \quad (38)$$

tal que:

$$b(u) = \tau_p^{-1} H(u - U_{cr}), \quad (39)$$

donde H es una función Heavside y $u(t)$ representa la concentración del complejo que genera la constricción en la E. coli alrededor de la inestabilidad en ω :

$$u(t) = U_h e^{\omega t}, \quad (40)$$

$$\frac{du}{dt} = U_h \omega e^{\omega t} = \omega u(t). \quad (41)$$

Para $\omega = \omega_{k_{max}}(\kappa)$, en términos del módo $\omega_{k_{max}}$, que a su vez está en función del módulo de flexión (κ) , suponemos que:

$$n(t, y) = T(t)F(u). \quad (42)$$

Sustituyendo (42) en (37) para aplicar separación de variables y resolviendo para la región $u > U_{cr}$ de la función Heavside, es decir una concentración por encima de la concentración mínima necesaria (U_{cr}) del complejo que genera la constricción:

$$T'F + \omega uTF' = - [\tau_p^{-1} + \mu] TF, \quad (43)$$

dividiendo (43) entre TF :

$$\frac{T'}{T} + \omega u \frac{F'}{F} = - [\tau_p^{-1} + \mu], \quad (44)$$

esto es:

$$\frac{T'}{T} + \mu = \sigma, \quad (45)$$

$$-\omega u \frac{F'}{F} - \tau_p^{-1} = \sigma. \quad (46)$$

A partir de (45):

$$T' - (\sigma - \mu)T = 0. \quad (47)$$

Multiplicando (47) por el factor integrante $e^{-(\sigma-\mu)t}$ y agrupando:

$$\frac{d}{dt} [Te^{-(\sigma-\mu)t}] = 0, \quad (48)$$

donde integrando (48) en el intervalo de 0 a t, obtenemos:

$$T(t) = C_1 e^{(\sigma-\mu)t}. \quad (49)$$

De forma similar a partir de (46) multiplicando por el factor integrante $e^{\left[\frac{\sigma+\tau_p^{-1}}{\omega}\right]Ln(u)}$ y desarrollando obtenemos:

$$\frac{d}{dt} \left\{ e^{\left[\frac{\sigma+\tau_p^{-1}}{\omega}\right]Ln(u)} F \right\} = 0,$$

lo que integrando para una concentración de u_0 a u resulta:

$$F(u) = c_2 e^{-\left[\frac{\sigma + \tau_p^{-1}}{\omega}\right] \text{Ln} \frac{u}{u_0}}. \quad (50)$$

Sustituyendo (49) y (50) en (42):

$$n(t, u) = C e^{(\sigma - \mu)t} e^{-\left[\frac{\sigma + \tau_p^{-1}}{\omega}\right] \text{Ln} \frac{u}{u_0}}. \quad (51)$$

Aplicando la condición (38) y desarrollando obtenemos los valores de μ y el eigenvalor σ :

$$\mu = 0,$$

$$\sigma = -\tau_p^{-1} + \frac{\omega \text{Ln}(2\tau_p - 1)}{\text{Ln}(2)}.$$

De esta forma podemos expresar (42) como:

$$n(t, u) = u_0 e^{\sigma t} e^{-\left[\frac{\sigma + \tau_p^{-1}}{\omega}\right] \text{Ln} \frac{u}{u_0}}. \quad (52)$$

Esta solución separable nos permite derivar la dinámica de la población total de bacterias, $N(t) = \int_0^\infty n(t, u) du$ y una tasa de crecimiento:

$$\frac{dN}{dt} = \alpha N, \quad (53)$$

donde $\alpha = \sigma$ y para $\alpha > 0$ la tasa de crecimiento satisface el factor de escala:

$$\alpha \sim (\kappa_{cr} - \kappa)^\beta. \quad (54)$$

La variable κ_{cr} representa el valor crítico del módulo de flexión por encima del cual la inestabilidad que inicia la constricción no ocurre. Analizando el comportamiento de $\omega_{k_{max}}$ cerca del valor crítico, encontramos que $\beta \simeq 2$.

7.3. Material suplementario

La figura 30, muestra las curvas de crecimiento para la *E. coli* en presencia de diferentes aditivos mecano activos causando la proliferación (propofol) y descenso (nicotina, ácido palmítico) de los cultivos. El propofol y la nicotina son solubles en agua, así que fueron disueltos en el medio de cultivo, mientras que el ácido palmítico fue disuelto en metanol ($\approx 1\%$ del volumen del medio, concentración encontrada inocua para las bacterias) antes de ser agregado al medio.

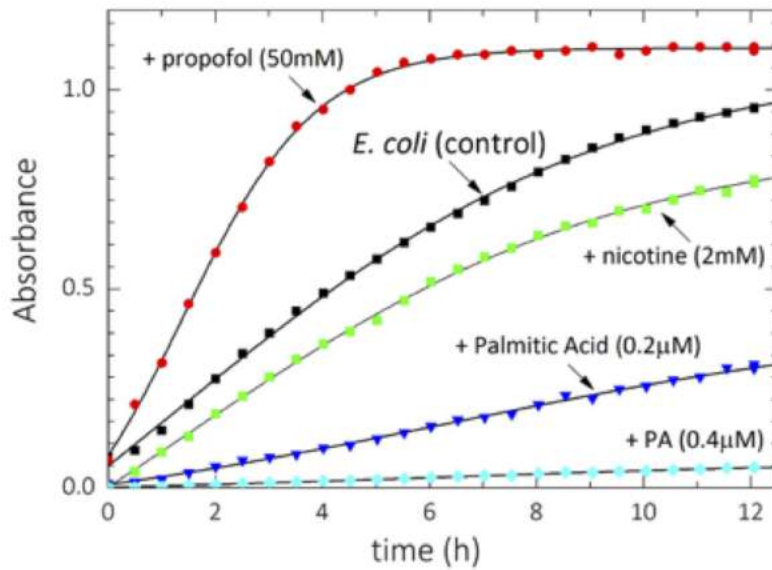


Figura 30: Curvas de crecimiento de *E. coli*.

La siguiente tabla contiene las mediciones de los módulos de flexión y la tasa de crecimiento efectiva para liposomas y cultivos en presencia de Nicotina, Propofol y Ácido Palmítico:

	Propofol		Nicotina		Acido palmítico	
	5 mM	50 mM	1 mM	2 mM	0.2 μ M	0.4 μ M
EGR (h^{-1})	–	0.85 ± 0.15	–	1.0 ± 0.5	0.15 ± 0.07	0.02 ± 0.01
$\kappa(K_b T)$	3.0 ± 0.5	3.1 ± 0.5	5.2 ± 0.8	7.3 ± 1.0	$25 (\pm 10\%)$	$35 (\pm 10\%)$

7.4. Análisis de una bacteria artificial

Para estimar el nivel del ruido electrónico proveniente de la cámara ultrarrápida, fue creada una imagen de una figura similar a una *E. coli* con el centro de color negro y el característico halo blanco. Posteriormente esta imagen fue superpuesta con 10,000 imágenes provenientes de un porta muestras, de esta manera el halo blanco ahora contiene una señal de ruido electrónico. A partir de este análisis se fijó un mínimo para las fluctuaciones de la bacteria de 60 nm. Es importante señalar que solo las mediciones de la desviación estándar son sensibles a esta señal de ruido (ver figura 25), mientras que el coeficiente de difusión y skewness muestran respuestas pequeñas y la kurtosis valores uniformes (ver figura 31).

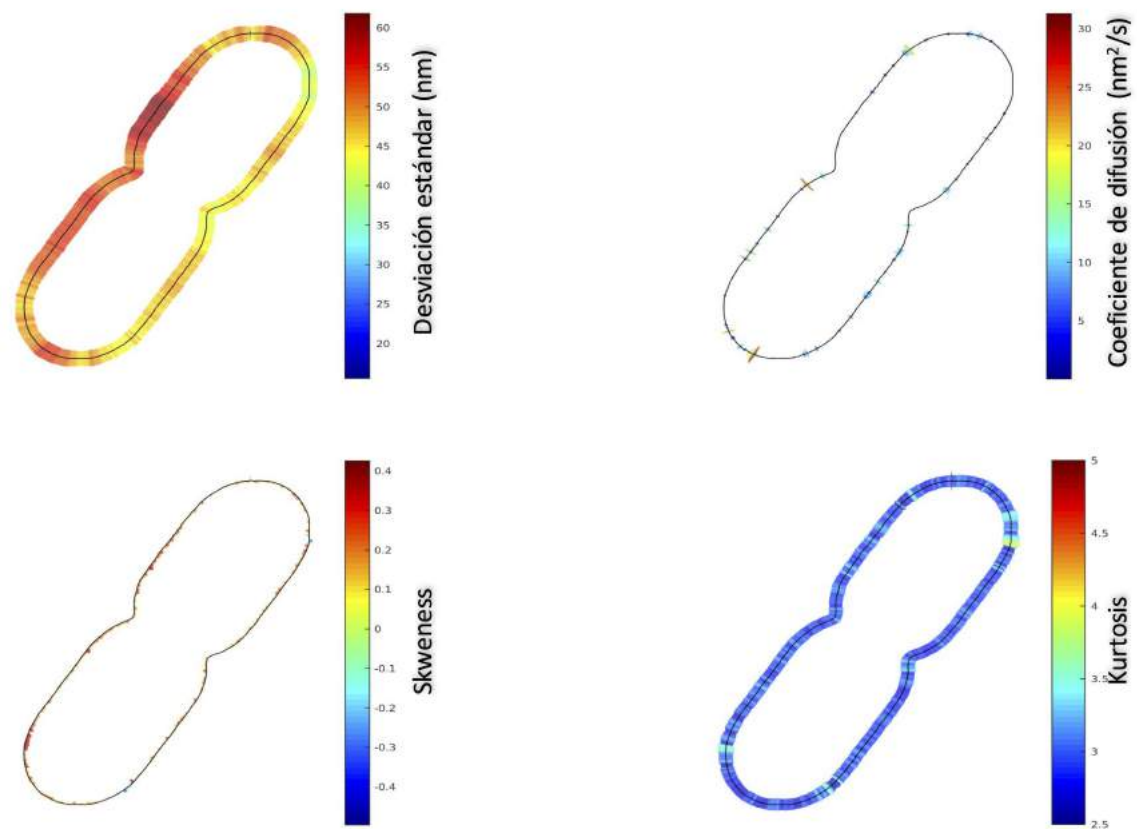


Figura 31: Estimación del nivel de ruido.

7.5. Esterilización por congelamiento bajo condiciones isocóricas: El caso de la *Escherichia coli*

La inactivación microbiana es objeto de estudio debido al hecho de que los microorganismos son la principal causa de contaminación en alimentos y la transmisión de enfermedades. Los métodos de inactivación microbiana más utilizados son: radiación ionizante, pulsos de grandes campos eléctricos, formación de plasmas y alta presión hidráulica (HHP).

La irradiación involucra la aplicación de ondas electromagnéticas (generalmente rayos γ) en una muestra. La ionización esencialmente causa daño oxidativo y cromosomal, así como la pérdida de mecanismos de reparación. Se ha sugerido que estos mecanismos son el origen de la muerte celular, pero no está claro cuán decisivos son aún [76][77][78]. Algunos estudios han reportado la inactivación en líquidos por plasma creada por descargas generadas por corrientes de alto voltaje, ambas técnicas han mostrado relación entre el daño observado y la inactivación microbiana [76][78][79][80].

El procesamiento por altas presiones hidráulicas es considerada una de las técnicas más prometedoras, aunque puede llegar a afectar la calidad de los nutrientes y las características visuales de los alimentos (tal como decoloración, inhibición en la actividad enzimática y desnaturalización de proteínas), aunque estos efectos son pocos. La HHP se ha convertido en una alternativa atractiva para la comida, tejidos y preservación de órganos [81][82].

En este estudio se explora el efecto del congelamiento bajo condiciones isocóricas en cultivos de *E. coli*. Contrario a los métodos de inactivación microbiana por alta presión hidrostática, donde existe un mecanismo externo para producir un aumento de presión, nuestra técnica solo requiere de congelamiento. Al no cambiar el volumen al congelar las muestras por debajo de 0 °C, la presión dentro de un contenedor se incrementa substancialmente tal como indica el diagrama de fase del agua (ver figura 32).

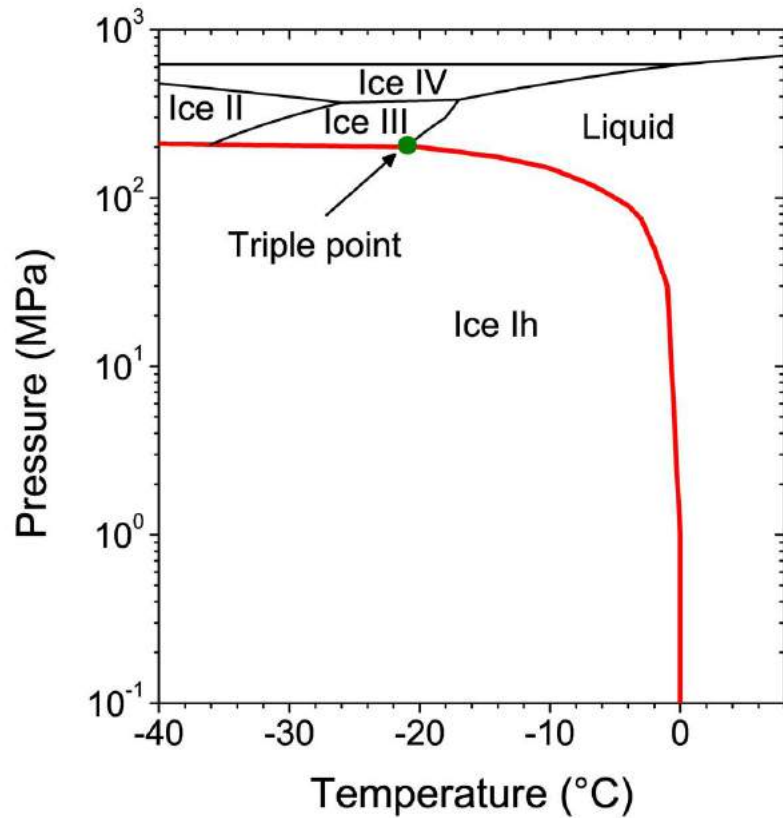


Figura 32: Sección del diagrama de fases del agua. Esta figura muestra los estados líquido, estados cristalinos y fronteras metaestables. La línea roja representa el camino seguido al congelar una muestra bajo condiciones isocóricas.

Crecimiento de cultivos

En este trabajo fue utilizada la bacteria *E. coli* (MG-1655 wt.) previamente almacenada en alícuotas (tal como fue descrito en la sección 3.1.2). A partir de estas alícuotas fue preparado un cultivo puesto 24 horas, bajo una temperatura constante de 37°C bajo agitación. Una vez transcurrido este periodo, el inóculo fue depositado en dos contenedores de acero antes de ser congelado.

Proceso de congelado

El medio con las bacterias fue distribuido en dos contenedores. Los contenedores fueron construidos en acero inoxidable, con una forma cilíndrica de 3.2 cm de largo y 4.7 cm de diámetro. Cada cilindro contiene una cavidad central de 1.1 cm de diámetro y 2.44 cm de profundidad. Para cerrar los contenedores fue utilizada una tapa de acero inoxidable de 0.95 cm de ancho, con un pequeño pomo de 0.2 cm de grosor rodeada por un O-ring que permitirá cerrar herméticamente los contenedores. Los discos fueron ajustados al contenedor por medio de seis tornillos (ver figura 33).

El primero de los contenedores fue llenado al 90 % de su volumen y el segundo fue llenado en su totalidad (2.13 mL). Finalmente, ambos contenedores fueron puestos en un baño térmico por 20 horas a una temperatura fija. Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando las siguientes temperaturas: -15, -20 y -30 °C. Las condiciones isocóricas fueron conseguidas en el contenedor lleno al 100 %, mientras que en el contenedor lleno al 90 % fue posible obtener la formación del hielo I_h debido a que este pudo expandirse. Cada experimento fue repetido cuatro veces.

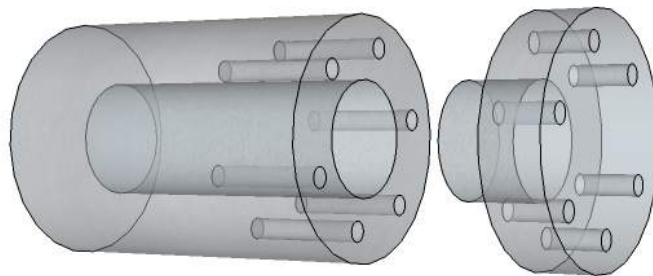


Figura 33: Contenedor de muestra. Esta figura muestra el diseño de los contenedores empleados para congelar las muestras. Durante el experimento los contenedores son llenados al 90 y 100 % de su capacidad.

Medición de las curvas de crecimiento

Después de un periodo de congelación de 20 horas, los contenedores fueron puestos en un baño térmico a una temperatura de 37 °C por 1.5 horas. Posteriormente de cada contenedor fueron tomados 200 μL y depositados en 20 mL de medio L.B para ser medidos en un espectrofotómetro (Multiskan GO Thermo Scientific), tal como fue descrito en la sección 3.1.2. Las curvas de crecimiento de los cultivos fueron promediadas para cada grupo experimental y temperatura respectivamente.

Preparación de las muestras para el microscopio de fuerza atómica

Para evaluar el efecto del congelamiento bajo condiciones isocóricas en la *E. coli*, las muestras fueron analizadas por microscopía de fuerza atómica (AFM). Una vez descongelados los contenedores, las soluciones fueron lavadas tres veces utilizando agua ultra pura (1000 mL por 5 minutos). Antes de poder obtener una imagen a partir de las soluciones, las bacterias fueron pegadas a la superficie de un portamuestras. Para esto fue utilizada la polietilenimina (PEI) con el fin de crear una superficie cargada positivamente en el vidrio y poder promover la adhesión irreversible de la bacteria. Para preparar los portamuestras con el PEI (0.2% en 1 mL), la solución fue depositada por 3-5 horas antes de ser lavada con agua MiliQ. Posteriormente, la inóculos provenientes de los contenedores (1 mL), fueron depositados sobre portamuestras preparados con el PEI, después de 30 minutos las muestras fueron lavadas vigorosamente con un chorro de agua desionizada y secadas con nitrógeno para ser analizadas en aire.

Microscopía de fuerza atómica

Las imágenes por AFM fueron creadas utilizando un microscopio de fuerza atómica (Innova Bruker, Santa Barbara, CA) equipado con un escáner de área de 5 μm x 5 μm . Las imágenes fueron obtenidas en modo tapping usando un cantilever dopado de silicio (Bruker, Santa Barbara, CA), con una punta de un radio nominal de 2 nm y una constante elástica nominal de 40 N/m a una frecuencia de 300 Hz. Las mediciones fueron realizadas en aire a temperatura ambiente (25 °C) con una resolución de 512

pixeles/línea, a una tasa de escaneo de 0.5 Hz y un ángulo de 90° con la mínima fuerza posible. Los datos crudos fueron suavizados y ajustados usando el software Gwydion 2.38. Tres bacterias fueron analizadas por cada experimento.

Resultado de la replicación de la E. coli

La figura 34 muestra la absorbancia en función del tiempo e ilustra las curvas de crecimiento de los cultivos de E. coli tras ser congelados (y posteriormente descongelados) a -15, -20 y -30 ° C. Observamos un notable contraste de los resultados del grupo a -15 °C comparado con los otros dos grupos experimentales. Mientras las bacterias a -20 y -30 °C fueron capaces de replicarse, las bacterias del grupo a -15 °C no lo fueron. En los experimentos donde el contenedor fue llenado al 90% (línea roja), se observa que si existe un crecimiento.

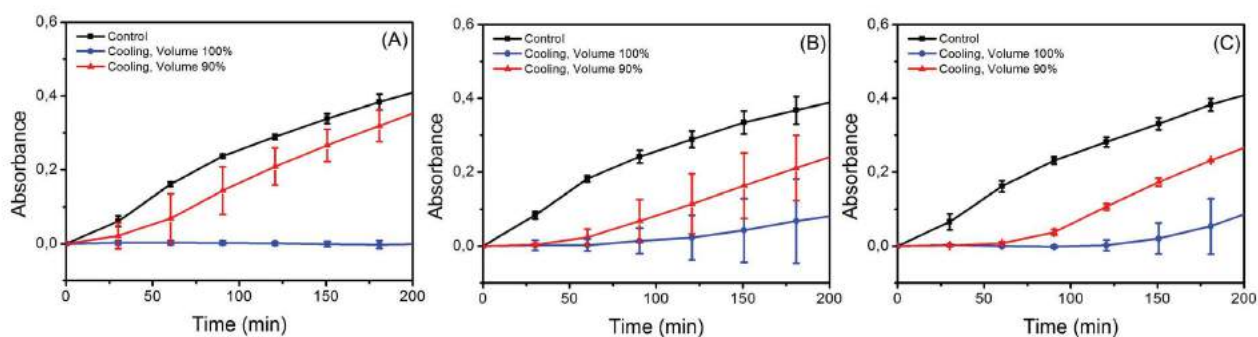


Figura 34: Curvas de crecimiento promedio para cultivos de E. coli. Resultados obtenidas a partir de cultivos que fueron congelados a: (A)-15 °C, (B)-20 °C y (C) -30 °C. Azul: Cultivos que fueron congelados bajo condiciones isocóricas. Rojo: Cultivos bajo condiciones de cristalización por congelamiento del medio. Negro: Grupo control.

Análisis de los resultados de microscopía de fuerza atómica

La figura 35, muestra los perfiles representativos de tres bacterias diferentes que fueron congeladas en el contenedor al 100 %. A partir de cada imagen representativa de las bacterias a -15, -20 y -30 °C, observamos que las condiciones isocóricas producen alteraciones en la integridad física de la bacteria. Las más evidentes alteraciones son el daño en la membrana y la pérdida de la forma y tamaño de la célula, formación de protrusiones en forma de ampollas, la ruptura de la membrana y la expulsión del material intracelular (mostrado en mayor medida a -15 °C, además de una inesperada variabilidad en el tamaño de las células). Estos resultados concuerdan con estudios previos en células sometidas a altas presiones hidrostáticas por medio de compresión [83][84]. Aunque no es posible observar los cambios moleculares por medio de AFM, es posible que los ribosomas se hayan disociado, con la posterior inhibición en la síntesis de y la desnaturalización del ADN, procesos reportados alrededor de 60 MPa en cultivos de *E. coli* [85][86][87]. La figura 36 muestra los efectos del congelamiento a -15 °C de las muestras de *E. coli* que fueron depositadas en los contenedores llenos al 90 %. Se observa una morfología y perfil similar al grupo control, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento.

Discusión

Un estudio de las propiedades dieléctricas del agua pura a temperaturas de 6 a -23 °C, demuestra que bajo condiciones isocóricas el agua no puede cristalizar [88]. A partir del diagrama de fases del agua (figura 32), conforme el líquido dentro del contenedor es congelado a temperaturas inferiores a 0 °C, al seguir el camino termodinámico que describe la línea de coexistencia (línea en color rojo de la figura 32) aumenta la presión, tal como es predicho por la ecuación de Clausius-Clapeyron [89]. Esta ecuación nos dice que: $\frac{dP}{dT} = \frac{\Delta H}{T\Delta V}$, donde P, T, H corresponden a la presión, temperatura y entalpía respectivamente. Debido a que $dV = 0$, la presión tiende a incrementarse considerablemente.

El diagrama de fase (figura 32) indica que el agua se encuentra en estado líquido hasta aproximadamente 210 MPa ($-24\text{ }^{\circ}\text{C}$), cuando el punto triple del agua es alcanzado. Como el volumen y masa son constantes, la densidad no puede cambiar. En el punto triple, una pequeña capa de hielo III comienza a nuclear en la superficie del contenedor debido a la alta presión. Debido a que el hielo III es más denso que el agua [90], esto produce una liberación de espacio para crear una pequeña capa de hielo Ih que comienza a nuclear. El efecto producido por congelar muestras de *E. coli* a -15 , -20 y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un contenedor lleno al 90 % de su capacidad es una simple cristalización. De acuerdo al principio de Le Chatelier, si las condiciones de equilibrio (concentración, temperatura, volumen o presión) son perturbadas, el sistema (bacteria-medio) se reajusta a sí mismo para contrarrestar este efecto. Es debido a este reajuste osmótico que ocurre la muerte celular. Sin embargo, los resultados indican que no existe una total exterminación de las bacterias (figura 34). Más interesante aún son las condiciones isocóricas. Las curvas de replicación (líneas azules) indican que el efecto por congelamiento a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ es completamente inesperado. La explicación de este fenómeno está basada en el diagrama de fases del agua: a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ la bacteria permanece en un entorno metaestable (descrito por la línea de coexistencia en la figura 32) donde no se forma hielo y el líquido ejerce una presión capaz de causar la completa exterminación de las bacterias, lo cual es confirmado al ver las imágenes de AFM (figura 35). En contraste, al congelar a bajas temperaturas (-20 y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) lleva solo a la parcial destrucción de la población de bacterias (líneas rojas en figura 34). La razón es que a dichas temperaturas se comienza a formar el hielo III, y posteriormente el hielo Ih. A estas temperaturas sólo algunas bacterias mueren, mientras que otras son protegidas dentro de los cristales (debido a que el hielo no extermina por completo a las bacterias tal como se observa en la línea roja de la figura 32), por lo que después del proceso de congelación las bacterias sobrevivientes comienzan a replicarse.

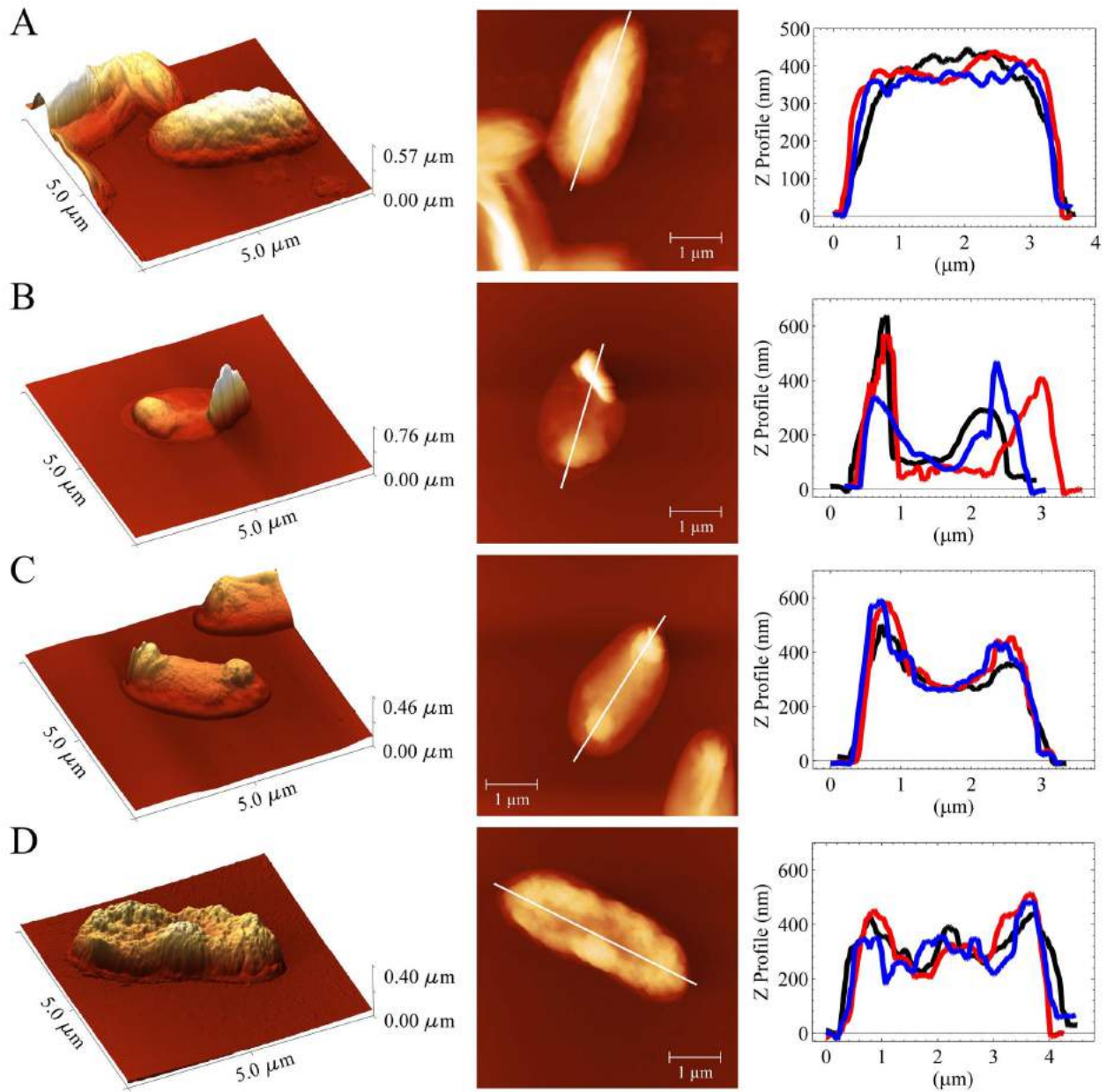


Figura 35: Imágenes representativas de AFM para cultivos control y cultivos congelados bajo condiciones isocóricas. (A) Célula control. (B), (C), (D) células congeladas bajo a: -15 , -20 y -30 °C, respectivamente. La primera y segunda columna representan las imágenes en 3D y 2D de una bacteria representativa. La tercera columna representa un perfil de 3 bacterias diferentes. Las intensidades de luz indican las diferencia entre alturas.

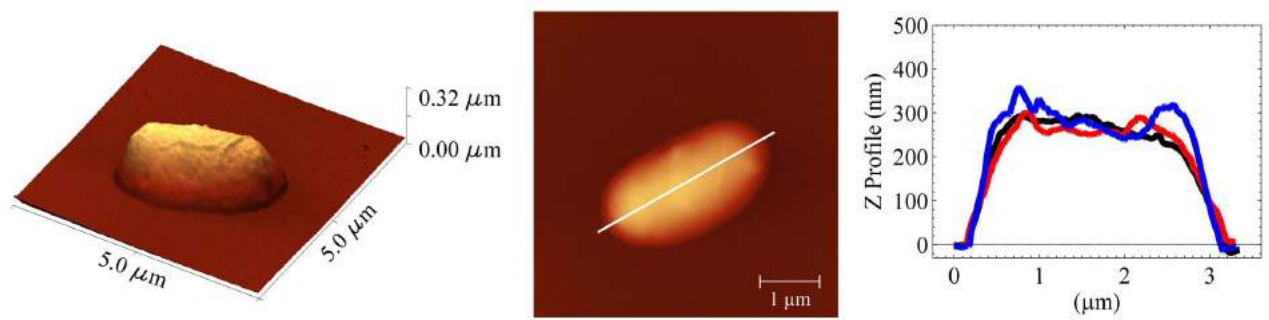


Figura 36: Imágenes representativas de AFM para cultivos congelados en un contenedor al 90 % de su volumen. La primera y segunda columna representan las imágenes en 3D y 2D de una bacteria representativa. La tercera columna representa un perfil de 3 bacterias diferentes.

Referencias

- [1] F. R. Blattner, *et al.*, *Science* **277**, 1453 (1997).
- [2] H. Pennington, *The Lancet* **376**, 1428 (2010).
- [3] H. Karch, P. I. Tarr, M. Bielaszewska, *International Journal of Medical Microbiology* **295**, 405 (2005).
- [4] J. Blanco, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **30**, 84 (2012).
- [5] A. S. Morales, *et al.*, *The Scientific World Journal* **2012**, 1 (2012).
- [6] R. I. Aminov, R. I. Mackie, *FEMS Microbiology Letters* **271**, 147 (2007).
- [7] M. U. Rasheed, N. Thajuddin, P. Ahamed, Z. Teklemariam, K. Jamil, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **56**, 341 (2014).
- [8] P. Vats, L. Rothfield, *PNAS* **104**, 17795 (2007).
- [9] N. I. Wai, K. N. Agai, M. W. Achi, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **66**, 2658 (2002).
- [10] A. Karczmarek, *et al.*, *Molecular Microbiology* **65**, 51 (2007).
- [11] H. Jiang, F. Si, W. Margolin, S. X. Sun, *Biophysical Journal* **101**, 327 (2011).
- [12] N. Ruiz, D. Kahne, T. J. Silhavy, *Nature Reviews Microbiology* **4** (2006).
- [13] E. Mileykovskaya, W. Dowhan, *Current Opinion in Microbiology* **8**, 135 (2005).
- [14] M. P. Assembly, *The Journal of biological chemistry* **284**, 9637 (2009).
- [15] S. N. Y. Kanemasa, Y. Akamatsu, *Biochimica et biophysica acta* **144**, 382 (1967).
- [16] Y. K. A. Yamagami, T. Yoshioka, *Japan Journal of Microbiology* **14**, 174 (1970).
- [17] E. Scientific, P. Company, R. Peters, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **441**, 38 (1976).

- [18] H. N. Y. Kamio, *Biochemistry* **15**, 2561 (1976).
- [19] H. Nikaido, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 593 (2003).
- [20] E. F. C. W. Shew, *Journal of Bacteriology* **115**, 869 (1973).
- [21] W. Vollmer, D. Blanot, M. A. D. Pedro, *FEMS Microbiology Review* **32**, 149 (2008).
- [22] M. Vicente, A. I. Rico, *Journal of Bacteriology* **188**, 19 (2006).
- [23] N. W. Goehring, M. D. Gonzalez, J. Beckwith, *Molecular Microbiology* **61**, 33 (2006).
- [24] S. J. R. Arends, D. S. Weiss, *J Bacteriol* **186**, 880 (2004).
- [25] S. Rueda, M. Vicente, J. Mingorance, *Journal of Bacteriology* **185**, 3344 (2003).
- [26] A. B. Kolomeisky, M. E. Fisher, *Annu Rev Phys Chem* **58**, 675 (2007).
- [27] Y. Chen, H. P. Erickson, *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 22549 (2005).
- [28] M. Osawa, D. E. Anderson, H. P. Erickson, *Cell* **320**, 792 (2009).
- [29] M. Leaver, P. Domínguez-Cuevas, J. M. Coxhead, R. A. Daniel, J. Errington, *Nature* **460**, 538 (2009).
- [30] E. V. Koonin, A. Y. Mulkidjanian, *Cell* **152**, 942 (2013).
- [31] R. Mercier, Y. Kawai, J. Errington, *Cell* **152**, 997 (2013).
- [32] F. Si, K. Busiek, W. Margolin, S. X. Sun, *Biophysical Journal* **105**, 1976 (2013).
- [33] S. Furse, H. Wienk, R. Boelens, A. I. P. M. De Kroon, J. A. Killian, *FEBS Letters* **589**, 2726 (2015).
- [34] E. Mileykovskaya, *et al.*, *FEBS Letters* **507**, 187 (2001).
- [35] P. Gangola, B. P. Rosen, *Progress in clinical and biological research* **252**, 215 (1988).

- [36] T. Mizushima, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 3633 (1996).
- [37] K. Boeneman, E. Crooke, *Current Opinion in Microbiology* **8**, 143 (2005).
- [38] W. Dowhan, E. Mileykovskaya, M. Bogdanov, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1666**, 19 (2004).
- [39] E. Mileykovskaya, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 22193 (2003).
- [40] I. Shibuya, C. Miyazaki, A. Ohta, *Journal of Bacteriology* **161**, 1086 (1985).
- [41] J. Antoinette Killian, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1189**, 225 (1994).
- [42] M. Wikström, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 10484 (2004).
- [43] A. Marr, J. Ingraham, *Journal of bacteriology* **84**, 1260 (1962).
- [44] K. H. Sullivan, G. D. Hegeman, E. H. Cordes, *Journal of Bacteriology* **138**, 133 (1979).
- [45] J. J. Kabara, D. M. Swieczkowski, a. J. Conley, J. P. Truant, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2**, 23 (1972).
- [46] C. J. Zheng, *et al.*, *FEBS Letters* **579**, 5157 (2005).
- [47] W. Helfrich, *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **28**, 693 (1973).
- [48] M. B. Amar, M. M. Müller, M. Trejol, *New Journal of Physics* **14** (2012).
- [49] M. Deserno(Max-Planck-Institut), Fluid lipid membranes - a primer (2009).
- [50] J. Pécréaux, H. G. Döbereiner, J. Prost, J. F. Joanny, P. Bassereau, *European Physical Journal E* **13**, 277 (2004).
- [51] C. B. Picallo, R. a. Barrio, C. Varea, T. Alarcón, a. Hernandez-Machado, *The European Physical Journal E* **38**, 61 (2015).

- [52] N. Provatas, K. Elder, *Nonequilibrium Dynamics* (Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2010), pp. 33–56.
- [53] R. M. Maier, *Environmental Microbiology* (2015), pp. 37–56.
- [54] S. Salinas-Almaguer, A. Angulo-Sherman, F. J. Sierra-Valdez, H. Mercado-Uribe, *PLoS ONE* **10**, 1 (2015).
- [55] I. López-Montero, *et al.*, *Langmuir* **24**, 4065 (2008).
- [56] H. G. Döbereiner, E. Evans, M. Kraus, U. Seifert, M. Wortis, *Physical Review E* **55**, 4458 (1997).
- [57] W. Helfrich, R. M. Servuss, *Il Nuovo Cimento D* **3**, 137 (1984).
- [58] M. J. Saxton, K. Jacobson, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **26**, 373 (1997).
- [59] M. Wiener, S. White, *Biophysical Journal* **61**, 434 (1992).
- [60] T. Sakuragi, K. Yanagisawa, Y. Shirai, K. Dan, *Acta anaesthesiologica Scandinavica* **43**, 476 (1999).
- [61] I. Wachowski, *et al.*, *Anesthesia and analgesia* **88**, 209 (1999).
- [62] L. Ding, J. Chen, J. Zou, L. Zhang, Y. Ye, *Canadian Journal of Microbiology* **60**, 547 (2014).
- [63] R. Granek, *Journal de Physique II* **7**, 1761 (1997).
- [64] M. D. Phan, K. Shin, *Biophysical Journal* **108**, 1977 (2015).
- [65] S. Denzinger, *Advanced Materials* **8**, 367 (1996).
- [66] H. I. Ingólfsson, O. S. Andersen, *Biophysical Journal* **101**, 847 (2011).
- [67] T. H. Aagaard, M. N. Kristensen, P. Westh, *Biophysical Chemistry* **119**, 61 (2006).

- [68] Y. Chong, A. Kleinhammes, P. Tang, Y. Xu, Y. Wu, *The Journal of Physical Chemistry B* **119**, 5367 (2015). PMID: 25856773.
- [69] J. M. Boggs, *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **64**, 50 (1986).
- [70] A. D. Petelska, Z. A. Figaszewski, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **82**, 340 (2011).
- [71] S. E. Schullery, T. A. Seder, D. A. Weinstein, D. A. Bryant, *Biochemistry* **20**, 6818 (1981).
- [72] T. Inoue, S.-i. Yanagihara, Y. Misono, M. Suzuki, *Chemistry and Physics of Lipids* **109**, 117 (2001).
- [73] J. M. Seddon, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1327**, 131 (1997).
- [74] P. L. Hansen, L. Miao, J. H. Ipsen, *Physical Review E* **58**, 2311 (1998).
- [75] P. N. Black, C. C. DiRusso, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **67**, 454 (2003).
- [76] P. Mañas, R. Pagán, *Journal of Applied Microbiology* **98**, 1387 (2005).
- [77] A. Krisko, M. Radman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14373 (2010).
- [78] R. T. Byrne, S. H. Chen, E. A. Wood, E. L. Cabot, M. M. Cox, *Journal of Bacteriology* **196**, 3534 (2014).
- [79] Y. C. Hong, H. J. Park, B. J. Lee, W.-S. Kang, H. S. Uhm, *Physics of Plasmas* **17**, 053502 (2010).
- [80] R. Peña-Eguiluz, *et al.*, *The European Physical Journal Applied Physics* **49**, 13109 (2009).

- [81] M. T. Kalichevsky, D. Knorr, P. J. Lillford, *Trends in Food Science and Technology* **6**, 253 (1995).
- [82] T. Takahashi, *et al.*, *Transplantation Proceedings* **32**, 1634 (2000).
- [83] M. Prieto-Calvo, M. Prieto, M. López, A. Alvarez-Ordóñez, *Molecules* **19**, 21310 (2014).
- [84] G. Kaletunç, J. Lee, *Applied and environmental ...* **70**, 1116 (2004).
- [85] G. W. Niven, C. A. Miles, B. M. Mackey pp. 419–425 (2015).
- [86] M. Gross, K. Lehle, *European Journal of ...* **468**, 463 (1993).
- [87] T. J. Welch, A. Farewell, F. C. Neidhardt, D. H. Bartlett, *Journal of bacteriology* **175**, 7170 (1993).
- [88] A. Angulo-Sherman, H. Mercado-Uribe, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **89**, 1 (2014).
- [89] C. M., *Water structure and science* (2000).
- [90] P. Ball, *Chemical Reviews* **108**, 74 (2008).