



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE TRES ANTIBIÓTICOS USANDO  
TINTAS FLUORESCENTES EN MICROCHIPS DE MICROFLUÍDICA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA

PRESENTA:

KARLA ITZEL GARFIAS GONZÁLEZ



CIUDAD DE MÉXICO

NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO**

**PRESIDENTE: Dr. Luis Fernando Olguín Contreras**

**VOCAL: Norma Angélica Castellanos Chávez**

**SECRETARIO: María Elena Rodríguez Alegría**

**1er. Suplente: Genaro Jiménez Reyes**

**2do. Suplente: Edgar Axel Donjuan Guerrero**

## **LUGAR DÓNDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO**

**LABORATORIO 309 DE BIOFISICOQUÍMICA, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA,  
UNAM**

## **SUSTENTANTE**

**KARLA ITZEL GARFIAS GONZÁLEZ**

## **ASESOR**

**DR. LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS**

## AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Química por el financiamiento otorgado mediante el “Subprograma 121: Formación Básica en Investigación”. A través del cual recibí apoyo como Ayudante de Investigador Nivel A

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el financiamiento del proyecto titulado: “**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS UTILIZANDO ENSAYOS EN MICROCHIPS**” Clave: 153208, por medio del cual se compraron equipos e insumos para la realización de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres; por enseñarme que el trabajo y la disciplina pueden romper cualquier barrera; por darme todas las herramientas necesarias para crecer y formarme, no sólo de manera profesional, sino cómo ser humano; por creer cada día en mí y darme la oportunidad de perseguir mis sueños; por ésos abrazos y palabras de aliento que esperaba cada fin de semana y que me ayudaron a continuar en los momentos más difíciles, sin su apoyo y amor jamás habría llegado a éste momento.

A mi hermana; no tengo palabras para agradecer todo tu cariño y apoyo, eres el mejor regalo que mis papás pudieron darme; gracias por las pláticas y algunos cuántos regaños, me asombra cada día todo lo que tengo que aprender de ti.

Al Dr. Luis; por permitirme integrarme a su equipo de trabajo y brindarme toda la confianza. Muchas gracias por sus consejos y su paciencia. Tiene mi admiración, no sólo por ser un excelente maestro e investigador, sino por ser una excelente persona.

A Leo; por enseñarme no sólo box, sino también a ver la vida con otros ojos (a través de los tuyos); por recordarme que no todo es blanco o negro y que todo por lo que vale la pena luchar siempre cuesta trabajo; por contagiarme tu positividad y energía. Gracias por llegar a mi vida.

A Lucero; porque sólo tú sabes cuánto llenaste de luz muchos de mis días, gracias por escuchar sin importar la hora y el lugar. Siempre tendrás un lugar en mi corazón.

A mis amigos Betty, Jonathan y May; por las largas pláticas, los largos días de estudio, por hacer las clases más amenas y los seminarios llenos de información. Tengo el orgullo de haber conocido a los mejores químicos de mi generación. Gracias por todo su apoyo.

A mis amigos Artemio, Eddy y Eli; por estar conmigo durante todo éste proceso y nunca dejarme sola. Ahora sé que, a pesar de estar lejos siempre podré contar con ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, que hicieron que mi estadía en el 309 se sintiera cómo un segundo hogar.

---

**1. INTRODUCCIÓN** **9**

<b>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>9</b>
<b>1.2 OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
1.2.1 OBJETIVOS GENERALES	11
1.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	11
<b>1.3 HIPÓTESIS</b>	<b>12</b>

---

**2. ANTECEDENTES** **13**

<b>2.1 VIABILIDAD CELULAR</b>	<b>13</b>
2.1.1 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR POR MÉTODOS CLÁSICOS	14
<b>2.2 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b>	<b>16</b>
2.2.1 PRINCIPIOS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	17
2.2.2 TINCIÓN DIFERENCIAL	19
2.2.2.1 4',6'-DIAMIDINO-2-FENILINDOL (DAPI)	21
2.2.2.2 NARANJA DE ACRIDINA	22
2.2.2.3 BROMURO DE ETIDIO	24
2.2.2.4 SYTOX GREEN®	25
2.2.2.5 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (SYTO 9®-YODURO DE PROPIDIO)	26
<b>2.3 MICROFLUÍDICA. TECNOLOGÍA EN DESARROLLO</b>	<b>28</b>
2.3.1 APLICACIÓN DE LA MICROFLUÍDICA EN ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.	29
2.3.1.2 ENSAYOS EN MICROGOTAS	30

---

**3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL** **33**

<b>3.1 MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO</b>	<b>33</b>
3.1.1 MEDIO LÍQUIDO LB	33
3.1.2 PLACAS DE AGAR CON MEDIO LB	33
3.1.3 SOLUCIÓN SALINA DE NaCl 0.85 % M/V	33
3.1.4 CULTIVO DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> BL21 EN MEDIO LÍQUIDO	33
3.1.5 CULTIVO DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> BL21 EN PLACAS DE AGAR	34
<b>3.2 ARREGLO MICROSCÓPICO</b>	<b>34</b>
<b>3.3 CONTEO DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> CON EL PROGRAMA IMAGE J</b>	<b>35</b>
<b>3.4 EXPERIMENTOS EN PORTAOBJETOS DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21</b>	<b>40</b>
3.4.1 TINCIÓN DEL TOTAL DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 PRESENTES EN LA MUESTRA (DAPI/NARANJA DE ACRIDINA)	40

3.4.2 TINCIÓN DEL TOTAL DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 NO VIABLES EN LA MUESTRA (BROMURO DE ETIDIO/YODURO DE PROPIDIO). TRATAMIENTO CON CALENTAMIENTO	41
3.4.3 EXPERIMENTOS DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 CON TRES PARES DE TINTAS DAPI-BROMURO DE ETIDIO, DAPI-SYTOX GREEN Y SYTO 9-YODURO DE PROPIDIO. TRATAMIENTO CON CALENTAMIENTO.	42
<b>3.5 FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS</b>	<b>43</b>
3.5.1 DISEÑO DE MICROCHIPS SIN FLUJO	43
3.5.2 DISEÑO DE MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO	44
3.5.3 FABRICACIÓN DE MOLDES POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE FOTOLITOGRAFÍA SUAVE	45
3.5.4 FABRICACIÓN DE MICROCHIPS CON PDMS	47
3.5.5 SELLADO DE MICROCHIPS MEDIANTE PLASMA	47
3.5.6 CARACTERIZACIÓN DE RÉPLICAS DE PDMS POR TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	48
<b>3.6 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROCHIPS SIN FLUJO</b>	<b>49</b>
<b>3.7 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE ANTIBIÓTICOS CONOCIDOS EN MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO</b>	<b>50</b>
3.7.1 SISTEMA EXPERIMENTAL	50
3.7.2 TRATAMIENTO DE DATOS	51
3.7.3 VALIDACIÓN DEL MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON EL MÉTODO CLÁSICO DE MICRODILUCIÓN	53
3.7.4 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE TRES ANTIBIÓTICOS CONOCIDOS EN MICROGOTAS	55
3.7.5 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CON CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFOMICINA	58
3.7.6 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CON CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 A 24 HORAS	59

## **4. RESULTADOS Y ANÁLISIS**

**62**

<b>4.1 EXPERIMENTOS EN PORTAOBJETOS</b>	<b>62</b>
4.1.1 CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 TEÑIDAS CON DAPI	62
4.1.2 CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 TEÑIDAS CON NARANJA DE ACRIDINA	63
4.1.3 CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 TEÑIDAS CON BROMURO DE ETIDIO. TRATAMIENTO CON CALENTAMIENTO.	65
4.1.4 CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 TEÑIDAS CON YODURO DE PROPIDIO. TRATAMIENTO CON CALENTAMIENTO.	67

4.1.5 CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 TEÑIDAS CON DAPI Y BROMURO DE ETIDIO. TRATAMIENTO CON CALENTAMIENTO	68
4.1.6 CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®. TRATAMIENTO CON CALENTAMIENTO	72
4.1.7 CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO. TRATAMIENTO CON CALENTAMIENTO	77
<b>4.2 CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS</b>	<b>81</b>
4.2.1 MICROCHIPS SIN FLUJO	81
4.2.2 MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO	84
<b>4.3 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROCHIPS SIN FLUJO</b>	<b>87</b>
<b>4.4 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE ANTIBIÓTICOS CONOCIDOS EN MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO</b>	<b>95</b>
4.4.1 VALIDACIÓN DEL MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA CON EL MÉTODO CLÁSICO DE MICRODILUCIÓN	95
4.4.2 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROGOTAS CON CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 Y CIPROFLOXACINO	104
4.4.2.1 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y BROMURO DE ETIDIO	104
4.4.2.2 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®	110
4.4.2.3 CÉLULAS TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO	115
4.4.2.4 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS DE TINCIÓN	119
4.4.3 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROGOTAS CON CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 Y GENTAMICINA	121
4.4.3.1 CÉLULAS TEÑIDAS DAPI Y BROMURO DE ETIDIO	121
4.4.3.2 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®	126
4.4.3.3 CÉLULAS TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO	130
4.4.3.4 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS DE TINCIÓN	135
4.4.4 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROGOTAS CON CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> BL21 Y FOSFOMICINA	136
4.4.4.1 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y BROMURO DE ETIDIO	137
4.4.4.2 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®	143
4.4.4.3 CÉLULAS TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO	148
4.4.4.4 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS DE TINCIÓN	152
4.4.5 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CON CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFOMICINA	154

4.4.6 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA  
CON CELULAS *E. COLI* BL21 A 24 HORAS 155

**5. CONCLUSIONES** **162**

---

**6. TRABAJO A FUTURO** **163**

---

**7. BIBLIOGRAFÍA** **164**

---

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los agentes microbianos son componentes esenciales del ecosistema, la industria alimenticia, farmacéutica y la investigación biomédica y muchos de éstos agentes no presentan efectos negativos en la salud de los seres vivos. Sin embargo, también existen otros microbios patógenos como algunas bacterias, virus, protozoarios y hongos que amenazan la vida de humanos, animales y plantas.

En los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia de agentes microbianos a los fármacos que los matarían o detendrían su crecimiento. Esto ocasiona que enfermedades infecciosas como; VIH, infección por estafilococos, tuberculosis, influenza, gonorrea, candidiasis y malaria; sean cada vez más difíciles de tratar.

Entre 5 y 10% de los pacientes hospitalarios en Estados Unidos ingresados en 2014 adquirieron alguna enfermedad infecciosa. De ése porcentaje murieron aproximadamente 90,000 pacientes, ésta cifra es preocupante si se compara con las 13,000 muertes al año que se registraban en el año 1992.[1]

El desarrollo de ésta resistencia es causada principalmente por la presión selectiva bajo la cual se encuentran los agentes microbianos, por mutaciones genéticas, adquisición de plásmidos y por el uso inadecuado e irracional de los antibióticos y antivirales.

Hasta el momento, las medidas que se han tomado para lidiar con ésta problemática sanitaria han sido lentas. Una de las estrategias que podría arrojar resultados positivos en un menor lapso de tiempo es la mezcla de antibióticos ya conocidos. El reto se encuentra en desarrollar un método que permita evaluar la mezcla de una enorme cantidad de compuestos en un amplio intervalo de concentraciones para identificar la dosis letal y al mismo tiempo minimizar el efecto de la resistencia.

Por otro lado, uno de los proyectos más ambiciosos es desarrollar y probar nuevos compuestos que tengan propiedades antimicrobianas y contra los cuales se observe nula resistencia.

Para llevar a cabo ensayos de ésta naturaleza se han utilizado técnicas clásicas basadas en el manejo manual de fluidos y reactivos, que si bien han sido validados para su uso en análisis clínicos, también presentan grandes limitaciones por el costo, el uso de grandes cantidades de reactivos y por el restringido espacio químico que permite explorar.[2]

El gran desarrollo de técnicas como la microscopía de fluorescencia, microscopía láser, citometría de flujo, entre otras, ha permitido diseñar ensayos con los que es posible evaluar la susceptibilidad microbiana ante distintos compuestos sin los inconvenientes de las técnicas clásicas.

Aunado a esto, el enorme avance de la microfluídica ha hecho posible conjuntar las técnicas anteriormente descritas facilitando el diseño y desarrollo de nuevos ensayos con los que se pretenden analizar bibliotecas de compuestos que permitan identificar y probar nuevos compuestos con potencial antimicrobiano utilizando nano o picolitros de reactivos en cada ensayo.

El uso de microchips de microfluídica para evaluar nuevos compuestos con potencial bactericida requiere del desarrollo de un método confiable y eficiente que permita determinar de forma concisa y concluyente la viabilidad del agente microbiano en estudio antes y después del tratamiento con algún compuesto bactericida.

En éste afán, se han desarrollado métodos como la tinción diferencial que permite discriminar entre células vivas y muertas a través de tintas fluorescentes que pueden ser analizadas por microscopía de fluorescencia.

En años recientes se ha observado un avance significativo en la rapidez y sensibilidad para detectar agentes microbianos. A su vez, la cantidad de estudios de viabilidad celular que se realizan con el método de tinción diferencial han aumentado debido a dos factores de gran relevancia; un incremento en las posibilidades de análisis por distintas técnicas de fluorescencia y a un mayor abanico de tintas disponibles que permiten evaluar los diferentes requerimientos de viabilidad. Sin embargo, hoy en día la diferenciación entre células vivas y muertas continúa siendo un gran reto.[3]

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVOS GENERALES**

Desarrollar y validar una metodología, basada en microscopía de fluorescencia, que permita monitorear en tiempo real el cambio de células vivas (viables) a muertas (no viables) cuando son expuestas a distintos agentes antimicrobianos, utilizando dispositivos de microfluídica.

### **1.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Estudiar diversos métodos de tinción diferencial para distinguir entre células viables y no viables de *E. coli* BL21 utilizando microscopía de fluorescencia.

Encapsular células de *E. coli* BL21 en microgotas de agua en aceite, dentro de microchips de microfluídica. Estas microgotas de aproximadamente 10 nano litros serán utilizadas como un micro-reactor para realizar los ensayos fluorescentes.

Monitorear el cambio de células viables a no viables de *E. coli* BL21 por microscopía de fluorescencia, cuando están dentro de microgotas en un microchip de microfluídica y en presencia de un antibiótico conocido.

Validar el método de microscopía desarrollado, con el método de microdilución.

### 1.3 HIPÓTESIS

Si los métodos de tinción diferencial permiten distinguir entre células vivas y muertas a través del análisis de criterios de viabilidad como la integridad de la membrana, actividad enzimática, entre otros; entonces será posible utilizar éstos métodos para monitorear el efecto bactericida de determinados compuestos en células de *E. coli* BL21 utilizando microgotas generadas en los canales de un microchip de microfluídica.

Así mismo, las técnicas conjuntas de microscopía de fluorescencia, tinción diferencial y microfluídica, permitirán evaluar el potencial bactericida de determinadas moléculas de forma más rápida, barata y efectiva que los métodos clásicos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 VIABILIDAD CELULAR

Los términos “viable” y “viabilidad celular” han sido utilizados ampliamente, tanto en el campo de la microbiología como en el habla común. Estos conceptos hacen referencia a entidades biológicas que sobreviven después de determinado tiempo.

Para la macrobiología, el término “viable” es mucho más sencillo de definir puesto que se tienen parámetros medibles, como el ritmo cardiaco, que permiten determinar cuándo cierta entidad biológica deja de realizar sus funciones vitales.

En el caso de la microbiología no es posible llevar a cabo ninguna prueba de éste tipo, por lo que la definición de viabilidad no es tan simple y mucho menos clara. Los microbiólogos de décadas pasadas atribuyeron la viabilidad celular a la capacidad de determinada población de bacterias para multiplicarse y formar colonias.[4]

Sin embargo, ésta definición es ambigua debido a dos razones principales:

En primer lugar, sólo una porción de las bacterias conocidas han podido ser cultivadas con los métodos de cultivo comúnmente usados en los laboratorios. Lo que imposibilita determinar su viabilidad celular a partir de ensayos de cultivo.[4]

En segundo lugar, algunos estudios recientes han determinado mediante microscopía la presencia de células bacterianas denominadas “viables pero no cultivables” (VNC)[5] que aún realizan funciones vitales pero que ya no presentan la capacidad para reproducirse.[6]

A pesar de la intensa investigación y la larga controversia después de más de 30 años, aún no existe un consenso entre la comunidad de microbiólogos que permita definir el término “viabilidad” con exactitud.[7] Sin embargo, éste campo de estudio requiere de mayor investigación puesto que determinar la viabilidad de los microorganismos es de vital importancia para la detección y conteo de agentes en la industria alimenticia, la evaluación de tratamientos de inactivación, análisis de calidad, producción de antibióticos, entre muchas otras.

Los requerimientos elementales para la viabilidad de los organismos, además de su capacidad de crecer y multiplicarse, son: (I) Membrana citoplasmática intacta que actúe como barrera entre el citoplasma y el ambiente extracelular. (II) Transcripción de DNA y traducción de RNA. (III) Generación de energía para mantener el metabolismo de la célula, biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros componentes celulares.[8]

Se espera que el desarrollo de nuevas técnicas, como la microscopía de fluorescencia, permitan evaluar los requerimientos básicos de viabilidad ya mencionados y que además puedan ser totalmente validados por el método clásico de cultivo que hasta el momento continúa siendo el más fehaciente para evaluar la viabilidad.

### **2.1.1 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR POR MÉTODOS CLÁSICOS**

La evaluación de viabilidad celular ha cobrado mayor importancia en los últimos años, debido a la necesidad de determinar el nivel citotóxico de nuevas bibliotecas de compuestos, desarrolladas con el fin de descubrir nuevas moléculas con potencial bactericida que permitan tratar las crecientes enfermedades infecciosas que afectan a la población mundial.

La base de los métodos tradicionales para evaluar la viabilidad se sustenta en la capacidad de la célula de reproducirse.

La prueba tradicional para determinar la susceptibilidad bacteriana a determinados antibióticos se ha limitado principalmente al conteo en placas de agar que contienen una concentración definida de antibiótico (Figura 1) o diluciones en medio de cultivo líquido con distintas concentraciones de antibiótico (Figura 2). Estos métodos requieren de incubación a 37° C por más de 16 horas para su posterior análisis.

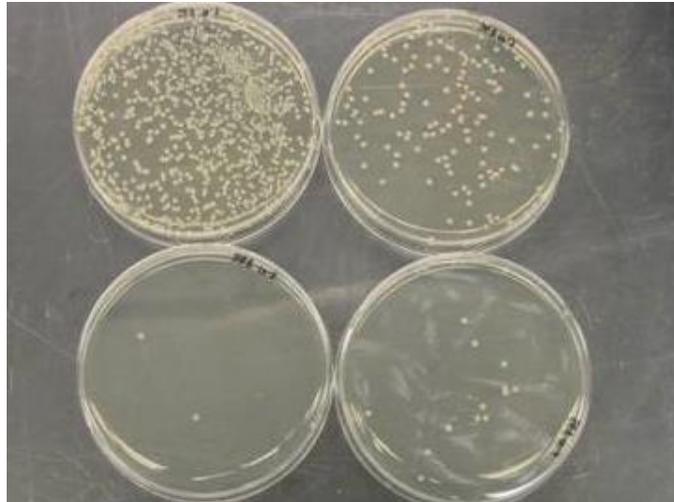


Figura 1. Método de conteo en placas con células de *E. coli*.

<http://bioinvasions.org/mediareources>

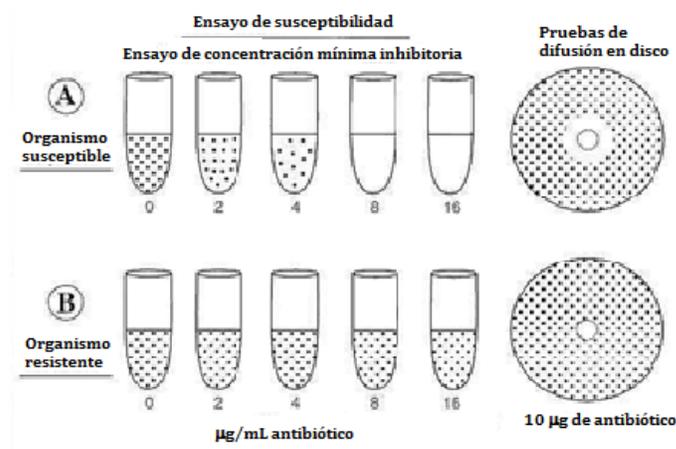


Figura 2. Método de dilución.

<http://intranet.tdmu.edu.ua/data/cd/disk2/ch010.htm>

Otra de las técnicas de uso extendido es el método de difusión en disco (Figura 3), en dónde se colocan discos con determinada concentración de antibiótico, en placas de agar. Para determinar la actividad bactericida de los compuestos evaluados, después de su incubación, se mide el diámetro halo de inhibición que se genera, mientras mayor sea el diámetro se concluye una mayor susceptibilidad al antibiótico.

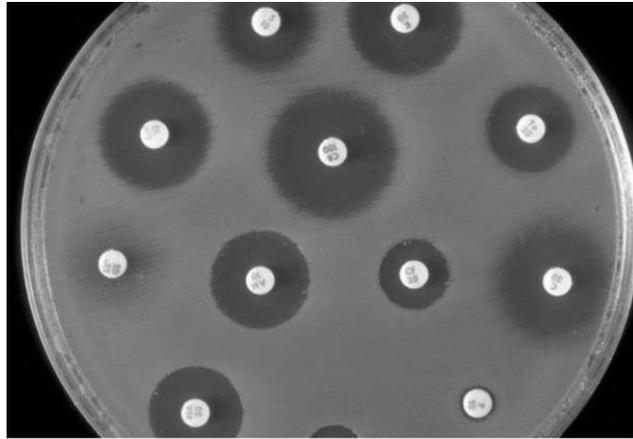


Figura 3. Método de difusión en disco.

<https://www.studyblue.com/notes/n/vmed-7354-study-guide-2013-14-gull/deck/8692296>

Para realizar estudios más profundos sobre la farmacodinámica de la respuesta de células bacterianas a los antibióticos, se realizan ensayos “time-kill” donde la fracción de bacterias sobrevivientes se mide a determinados intervalos de tiempo durante el tratamiento.[9]

Los métodos anteriormente descritos son muy laboriosos, conllevan una gran cantidad de tiempo y requieren del consumo de muchos reactivos, aunado a esto, los resultados falso-positivo suelen ser frecuentes.

## **2.2 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Durante las últimas décadas ha sido patente la necesidad de desarrollar técnicas más confiables, rápidas y eficientes que permitan determinar la viabilidad de los microorganismos en tiempo real principalmente para su uso en análisis clínicos pues permitiría dirigir individualmente el tratamiento de pacientes infectados y monitorear la epidemiología de enfermedades infecciosas.[10]

Investigaciones recientes han desarrollado métodos que permiten diferenciar entre células vivas y muertas usando tintas fluorescentes. El desarrollo de estos métodos

alternativos se debe al avance en la tecnología de las tintas que permiten evaluar diferentes funciones celulares para determinar la viabilidad.[7]

La microscopía de fluorescencia de células teñidas por distintos fluorocromóforos se ha convertido en el método estándar para el conteo de células bacterianas. La mayoría de los microscopios están equipados con una lámpara de mercurio o de xenón-mercurio. La lámpara de Xenón proporciona un espectro continuo mientras que la lámpara de mercurio emite líneas espectrales (365, 405, 435, 546 7 578 nm) con un fondo débil a otras longitudes de onda.[7]

### 2.2.1 PRINCIPIOS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La microscopía de fluorescencia es una forma de luz especial de la microscopía. Hace uso de la fluorescencia para resaltar determinadas estructuras en organismos biológicos. La diferencia principal entre los métodos de contraste basados en “brightfield” (Figura 4) y la microscopía de fluorescencia (Figura 5) es que la fluorescencia emplea un haz de luz incidente en lugar de un haz de luz transmitida.



**Figura 4. Trayectoria del haz de luz transmitida.** La luz es producida por una lámpara simple enfocada a la muestra por el condensador. Posteriormente pasa a través de la muestra, la absorción de luz y otros efectos producen la imagen que se observa.[11]

Cuando una sustancia fluorescente es irradiada con luz de una longitud de onda corta, emite luz a una longitud de onda mayor. Los objetos no fluorescentes, como el fondo, permanecen oscuros. Ésta propiedad que poseen diferentes materiales se conoce como auto-fluorescencia. Sin embargo, la mayoría de los especímenes de interés para la microscopía, no presentan ésta propiedad.

Para lograr el objetivo de hacer visibles ciertas estructuras o resaltar detalles para un análisis específico, los especímenes en cuestión deben ser previamente teñidos o marcados a través de una reacción inmunoquímica con una tinta fluorescente (fluorocromóforo). La luz emitida por una sustancia teñida con un fluorocromóforo se denomina fluorescencia secundaria.[11]



**Figura 5. Trayectoria del haz de luz en microscopía de fluorescencia.** La luz de excitación es dirigida a la muestra a través del objetivo en lugar del condensador. Éste haz de luz es de cierta longitud de onda (azul) que excita al fluoróforo que posteriormente emite a otra longitud de onda (verde). Es ésta luz la que produce la imagen.[11]

En la figura 6 se observa detalladamente la adquisición de la imagen en un microscopio de fluorescencia. La lámpara genera un haz de luz blanca que incide con el filtro de excitación para producir el haz de luz (por ejemplo; azul) a la longitud de onda requerida para excitar el fluorocromóforo. Dentro del cubo de filtración el espejo dichroico dirige éste haz hacia la muestra. El fluoróforo en la muestra comienza a emitir luz (por

ejemplo; verde) a una longitud de onda mayor. Ésta luz emitida es colectada por el objetivo y pasa por el espejo dicróico y posteriormente es filtrada a través del filtro de emisión que sólo permite pasar la luz de una sola longitud de onda. A continuación, la luz emitida incide con un prisma que dirige la luz hacia la interface para detectar la imagen generada.

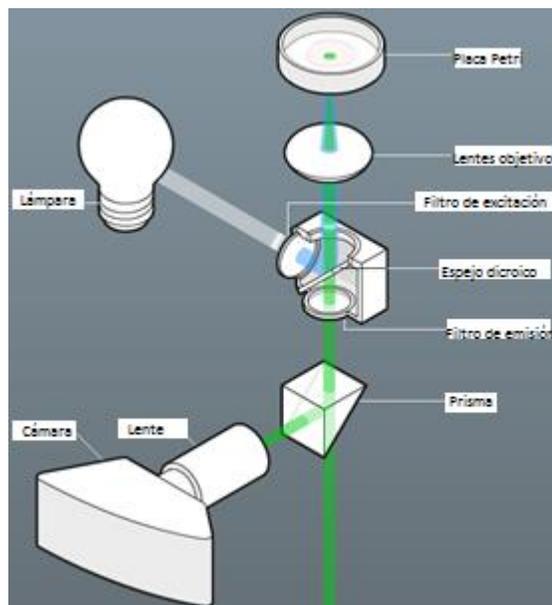


Figura 6. La trayectoria completa del haz de luz en microscopía de fluorescencia. [11]

### 2.2.2 TINCIÓN DIFERENCIAL

Las técnicas de fluorescencia proporcionan la posibilidad de estudiar importantes parámetros fisiológicos con una gran sensibilidad, tiempo de análisis corto y la capacidad de realizar ensayos a nivel de células individuales.[12]

En los primeros años del siglo pasado, un gran número de tintas fluorescentes comenzaron a estar disponibles. Como resultado, compuestos como la fluoresceína y la acriflavina fueron usados en un gran número de aplicaciones microscópicas, poco tiempo después nació el campo de las tintas fluorescentes vitales. La mayoría de éstas primeras aplicaciones se restringieron al estudio de plantas y muestras histológicas.

Actualmente dichos reactivos fluorescentes se usan en una impresionante variedad de aplicaciones biológicas donde la respuesta de células individuales puede observarse

microscópicamente. La implementación de éstos ensayos ha sido una pieza clave en muchos de los extraordinarios desarrollos recientes en biología celular.[13]

En la Tabla 1 se muestran los criterios de viabilidad celular que permiten discriminar entre células vivas y muertas, entre ellos se encuentran algunos criterios que pueden ser evaluados por las tintas fluorescentes existentes hoy en día.

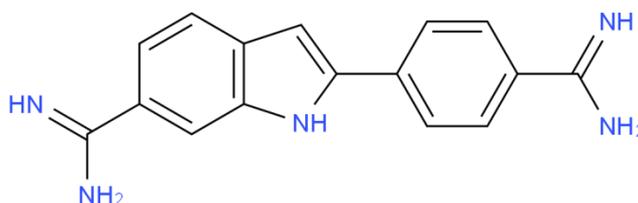
**Tabla 1. Criterios y métodos para evaluar la viabilidad celular [8]**

<b>Criterio</b>	<b>Método de detección</b>	<b>Tiempo de análisis</b>	<b>Comentarios</b>
<b>Reproducción</b>	Conteo en placas	1-5 días	Alta sensibilidad.
<b>Morfología celular (elongación)</b>	Inhibición de la división celular por ácido nalidixico u otros antibióticos	6 horas	Únicamente para células bacterianas susceptibles a antibióticos. Análisis microscópico de la elongación de las células.
<b>Integridad de la membrana</b>	Exclusión de tintas.	30 minutos	Células viables con la membrana citoplasmática intacta no serán teñidas.
<b>Respiración</b>	Reducción de tintas de tetrazolio en células con una cadena de transferencia de electrones activa.	1-4 horas	Acumulación de productos insolubles de formazan.
<b>Actividad enzimática</b>	Actividad de las esterasas sobre el Diacetato de Fluoresceína.	30 minutos	La fluoresceína es acumulada en células intactas.
<b>Potencial de membrana</b>	Distribución de Rhodamina 123, carboxycyamina y oxonoles	1 hora	Absorción dependiente del potencial de membrana o exclusión de tintas.
<b>Gradiente de pH</b>	Medición del pH intracelular usando derivados de fluoresceína	1 hora	Células viables mantiene el gradiente de pH constante

Las posibilidades de tinción y la variedad de criterios que pueden evaluarse con las tintas existentes son enormes. A continuación se muestran las características biofísicoquímicas de las tintas usadas en la realización de éste proyecto.

### **2.2.2.1 4',6'-DIAMIDINO-2-FENILINDOL (DAPI)**

El 4',6'-diamidino-2-fenilindol o 2-(4-Amidinofenil)-6-indolcarbamidina (Figura 7) es una molécula fluorescente de color azul sin cargas que logra penetrar la membrana celular.



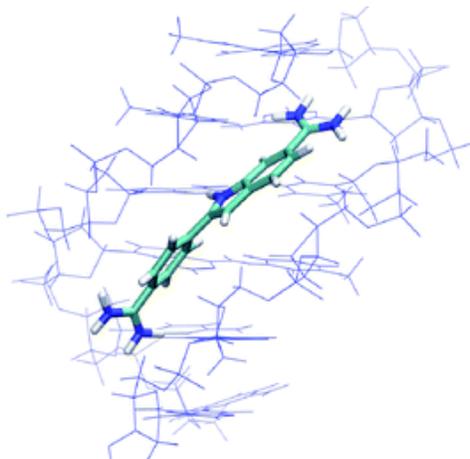
**Figura 7. 2-(4-Amidinofenil)-6-indolcarbamidina.**

Fórmula molecular:  $C_{16}H_{15}N_5$

Peso molecular: 350.25 g/mol

[www.en.chembase.cn](http://www.en.chembase.cn)

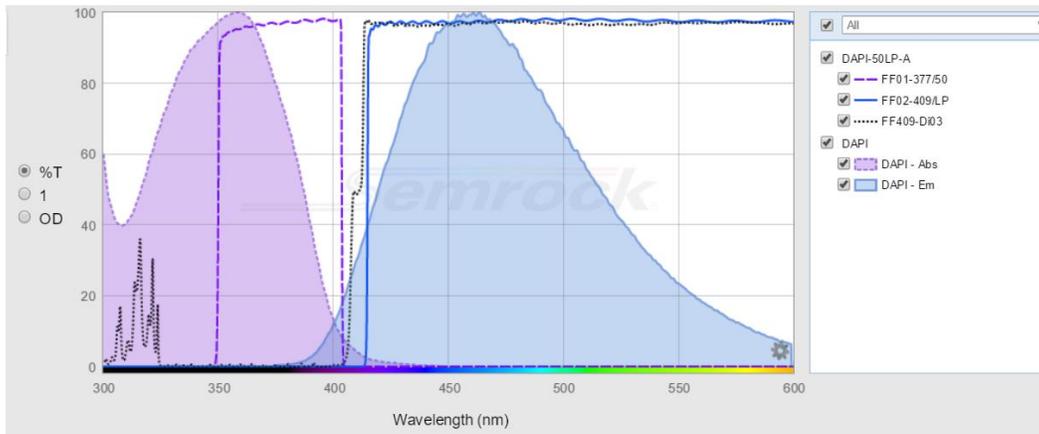
La molécula de DAPI es un compuesto que tiñe los ácidos nucleicos, se une preferencialmente a las bases Adenina:Timina de la doble hélice del ADN. Se encuentra una molécula de DAPI por cada 3 pares de bases de la hélice. La fluorescencia observada es mayor a medida que aumenta la cantidad del material genético presente, con un máximo de emisión a 460 nm. También puede unirse al ARN por medio de otro mecanismo, intercalándose entre las bases Adenina:Uracilo del ARN con un máximo de emisión a 500 nm.[14]



**Figura 8. Unión de la molécula de DAPI a las bases de ADN**

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cp/c3cp44058c#!divAbstract>

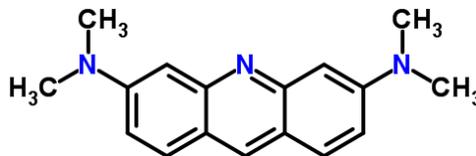
Ésta tinta permite realizar un conteo total de las células presentes en determinada muestra puesto que tiñe células viables y no viables. En la Figura 9 se muestra el espectro de emisión y absorción de éste compuesto unido al material genético. Así como las bandas del set de filtros (DAPI-50LP-A) de absorción y emisión, con los que se trabajó durante este proyecto.



**Figura 9. Espectro de absorción (morado) y emisión (azul) de la molécula de 4',6'-Diamidino-2-Fenilindol.** La línea morada representa la banda del filtro de excitación (FF02-475/50). La línea azul corresponde a la banda del filtro de emisión (FF01-540/50). La línea negra pertenece a las bandas del espejo dicróico (Di02-R561).[15]

### 2.2.2.2 NARANJA DE ACRIDINA

La molécula de naranja de acridina o N,N,N',N'-Tetrametil-3,6-acridindiamina (Figura 10) es una tinta fluorescente muy útil para evaluar el ciclo celular, es permeable a la membrana celular y una vez que penetra la membrana celular, interactúa con el material genético a través de intercalación o por atracción electrostática con moléculas de ADN o ARN. Cuando se une al ADN presenta un máximo de absorción a 502 nm y un máximo de emisión a 525 nm. Por otro lado, cuando se encuentra unido a las bases del ARN muestra un máximo de absorción a 460 nm y un máximo de emisión a 650 nm.[8]



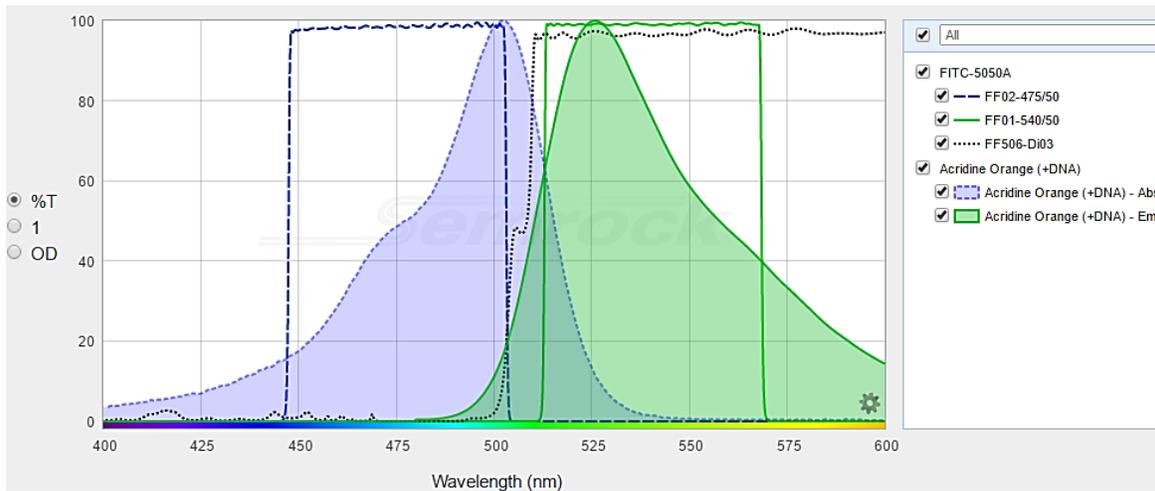
**Figura 10. N,N,N',N'-Tetrametil-3,6-acridindiamina.**

Fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>

Peso molecular: 307.18 g/mol

[www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)

En la Figura 11 se observa el espectro de absorción y emisión de la molécula de naranja de acridina unida al ADN. Así como las bandas del set de filtros FITC-5050A.



**Figura 11. Espectro de absorción (azul) y emisión (verde) de la molécula de Naranja de Acridina unida a las bases del ADN.** La línea azul representa la banda del filtro de excitación (FF02-475/50). La línea verde corresponde a la banda del filtro de emisión (FF01-540/50). La línea negra pertenece a las bandas del espejo dicróico (FF506-Di03).[15]

En la Figura 12 se observa el espectro de absorción y emisión de la molécula de naranja de acridina unida a las bases del ARN. También se observan las bandas del set de filtros LF 561/LP-C.



**Figura 12. Espectro de absorción (verde) y emisión (rojo) de la molécula de Naranja de Acridina unida a las bases del ARN.** La línea verde representa la banda del filtro de excitación (FF01-561/14). La línea roja corresponde a la banda del filtro de emisión (BLP02-561R). La línea negra pertenece a las bandas del espejo dicróico (Di02-R561).[15]

### 2.2.2.3 **BROMURO DE ETIDIO**

El bromuro de etidio o Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio (Figura 13) es una molécula fluorescente de gran tamaño que presenta cargas, por lo tanto no es permeable a través de la membrana celular.

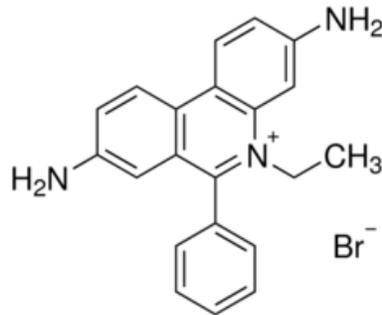


Figura 13. Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio.

Fórmula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>

Peso molecular: 394.31 g/mol

[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Ésta molécula penetra a la célula únicamente cuando la membrana citoplasmática se encuentra comprometida. Al intercalarse en la doble hélice del ADN así como en el material genético ribosomal ARN (Figura 14) se obtiene una fluorescencia 25 veces mayor a la observada al diluir el compuesto. Por ésta razón, es útil para teñir las células que han sufrido un daño en la membrana celular y de ésta forma identificar las células bacterianas que ya no son viables. [6]

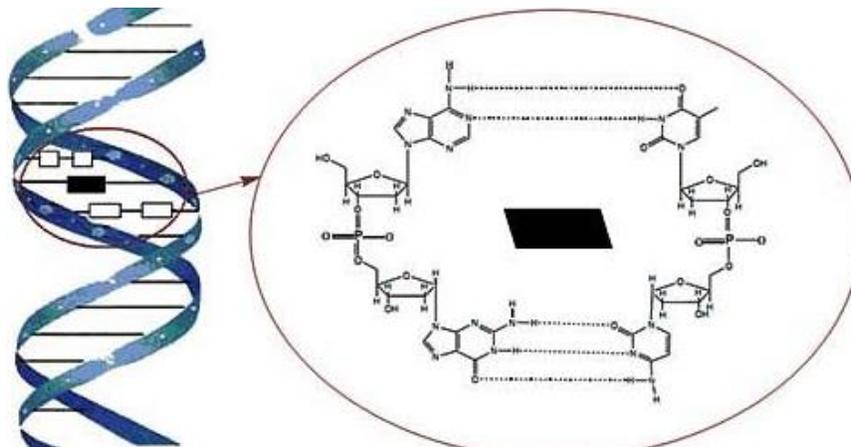


Figura 14. Agente intercalante en la doble hélice de ADN

El bromuro de etidio presenta uno de sus máximos de absorción a 518 nm y un máximo de emisión a 603 nm.[13] En la Figura 15 se observa su espectro de absorción y emisión, así como las bandas del set de filtros LF 561/LP-C.



**Figura 15. Espectro de absorción (verde) y emisión (rojo) de la molécula de bromuro de etidio.** La línea verde representa la banda del filtro de excitación (FF01-561/14). La línea roja corresponde a la banda del filtro de emisión (BLP02-561R). La línea negra pertenece a las bandas del espejo dicróico (Di02-R561).[15]

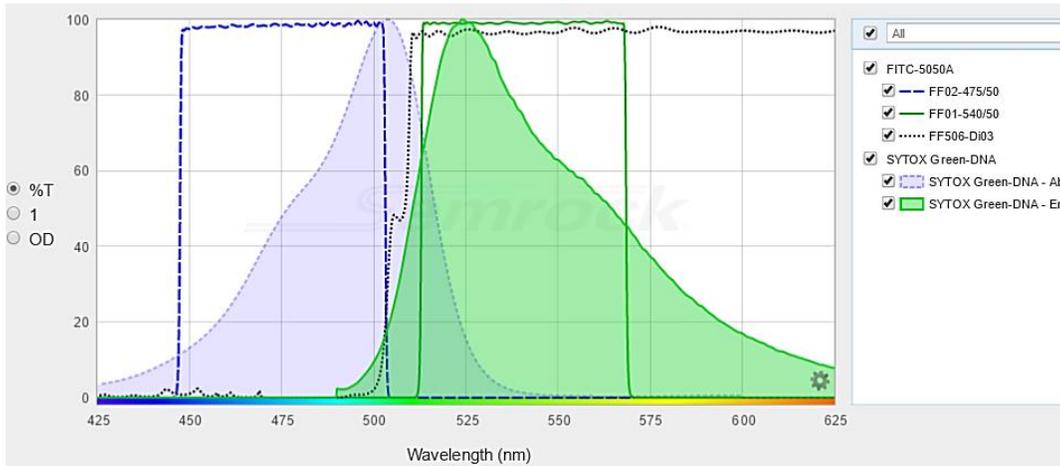
#### 2.2.2.4 SYTOX GREEN®

La molécula de Sytox Green® es una tinta fluorescente de ácidos nucleicos que actualmente se encuentra patentada por la marca Molecular Probes™ de la división Invitrogen™ dentro de la compañía ThermoFisher Scientific. Por ésta razón se desconoce la estructura de la molécula.

La información general que proporciona el fabricante refiere a una molécula antisimétrica de cianina con tres cargas positivas, debido a éstas cargas la molécula de Sytox Green® no penetra la membrana celular de organismos procariontas y eucariotas sin embargo, logra atravesar la membrana citoplasmática cuando ésta se encuentra comprometida. Por ésta razón, el aumento de las células marcadas con Sytox Green® se puede relacionar directamente con el aumento de células no viables. La unión de la molécula de Sytox Green® con el material genético resulta en una emisión de

fluorescencia 500 veces mayor a la fluorescencia observada de la molécula de Sytox Green® únicamente disuelto. [16]

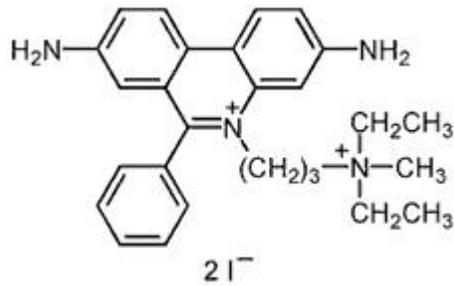
En la Figura 16 se observa el espectro de absorción y emisión de la molécula de Sytox Green®, así como las bandas del set de filtros FITC-5050<sup>a</sup>.



**Figura 16. Espectro de absorción (azul) y emisión (verde) de la molécula de Sytox Green® unida a las bases del ADN.** La línea azul representa la banda del filtro de excitación (FF02-475/50). La línea verde corresponde a la banda del filtro de emisión (FF01-540/50). La línea negra pertenece a las bandas del espejo dicroico (FF506-Di03).<sup>[15]</sup>

### **2.2.2.5 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (SYTO 9®-YODURO DE PROPIDIO)**

El kit de tintas LIVE/DEAD es el par de fluoróforos más comercializado y explorado a nivel mundial para realizar ensayos de viabilidad celular, es comercializado por la compañía Molecular Probes® y sintetizado por la división Invitrogen™. Dicho kit consiste en los compuestos fluoróforos Syto 9® y Yoduro de Propidio. La molécula de Syto 9® se encuentra actualmente bajo una patente, por lo que se desconoce su estructura química. La molécula de yoduro de propidio no se encuentra patentada, por lo que su estructura se muestra en la Figura 17.



**Figura 17.** 3,8-Diamino-5-[3-(diethylmetilamonio)propil]-6-fenilfenantridinio diyodo

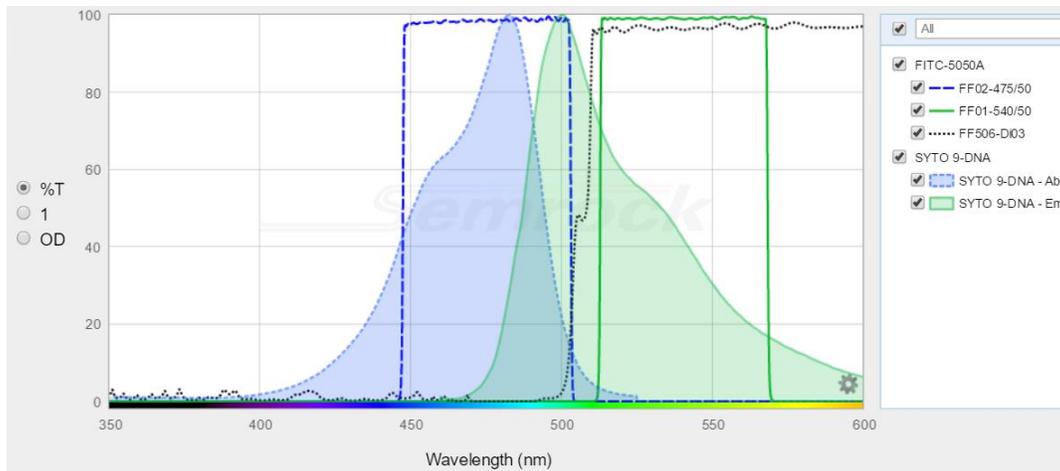
Fórmula molecular:  $C_{27}H_{34}I_2N_4$

Peso molecular: 668.4 g/mol

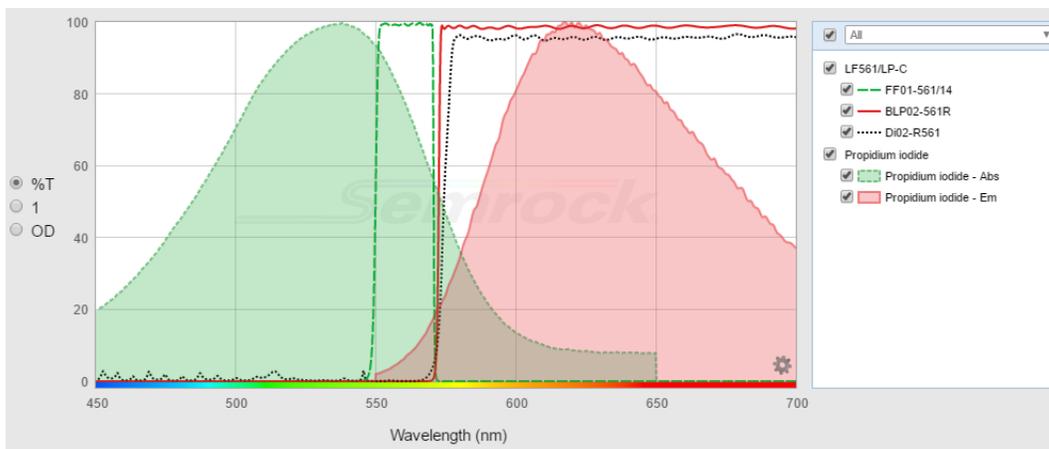
El yoduro de propidio presenta cargas positivas distribuidas en su estructura molecular por lo que, debido a su gran tamaño y a su carácter hidrofílico, no es permeable a la membrana de las bacterias.

El uso del kit LIVE/DEAD requiere de la mezcla, a la concentración adecuada, de Syto 9<sup>®</sup> y de yoduro de propidio. Ambas tintas difieren en sus características espectrales y en su habilidad para permear la membrana de células viables. El fabricante asegura que, si se usa únicamente la tinta Syto 9<sup>®</sup>, se observará la tinción de células viables y no viables. Sin embargo, cuando ambas tintas están presentes, el yoduro de propidio tiñe las células dañadas y ocasiona una reducción en la fluorescencia producida por el fluoróforo Syto 9<sup>®</sup>. Por lo que teóricamente, al usar el kit LIVE/DEAD es posible observar las células viables teñidas de color verde por la tinta Syto 9<sup>®</sup> y las células no viables teñidas de color rojo por el yoduro de propidio. [17]

A continuación se muestran los espectros de absorción y emisión de ambos fluoróforos (Figuras 18 y 19), así como las bandas de los filtros FITC-5050 A y LF561/LP-C que permiten monitorear las células teñidas con Syto 9<sup>®</sup> y yoduro de propidio respectivamente.



**Figura 18. Espectro de absorción (azul) y emisión (verde) de la molécula de Syto 9® unida a las bases del ADN.** La línea azul representa la banda del filtro de excitación (FF02-475/50). La línea verde corresponde a la banda del filtro de emisión (FF01-540/50). La línea negra pertenece a las bandas del espejo dicróico (FF506-Di03).<sup>[15]</sup>



**Figura 19. Espectro de absorción (verde) y emisión (rojo) de la molécula de Yoduro de Propidio.** La línea verde representa la banda del filtro de excitación (FF01-561/14). La línea roja corresponde a la banda del filtro de emisión (BLP02-561R). La línea negra pertenece a las bandas del espejo dicróico (Di02-R561).<sup>[15]</sup>

## 2.3 MICROFLUÍDICA. TECNOLOGÍA EN DESARROLLO

La microfluídica es un campo multidisciplinario que estudia el comportamiento de los fluidos a través de microcanales pero también se refiere a la tecnología para manufacturar dispositivos microminiaturizados que contengan, canales, cámaras y túneles con dimensiones de decenas a cientos de micrómetros que permitan manipular volúmenes en el rango de microlitros ( $10^{-6}$  L) hasta femtolitros ( $10^{-15}$  L).

El concepto clave de los dispositivos de microfluídica es integrar todas las operaciones, que actualmente requieren de un laboratorio completo, en un dispositivo miniaturizado, sistematizado y automatizado.[18]

Los dispositivos de microfluídica presentan diversas ventajas que los hacen muy útiles y atractivos para la industria y la investigación, por ejemplo; se requieren menores cantidades de muestras y reactivos por lo que se logra una disminución de costos y del impacto ecológico asociado, por otro lado, permite llevar a cabo distintas operaciones al mismo tiempo dentro del dispositivo, acorta el tiempo de análisis, permiten el desarrollo de ensayos de muchas áreas como medicina, biología, química y física.[19]

El desarrollo de la microfluídica comenzó en los años 80's con la creación de los MEMS (Sistemas Micro Electro Mecánicos, por sus siglas en inglés), el primer dispositivo con un elemento micro mecánico integrado a una oblea de silicón. Hoy en día, el enorme desarrollo de ésta área multidisciplinaria permite realizar ensayos de gran complejidad, lo que ha llevado a un gran auge en las investigaciones dirigidas principalmente a los campos de la biología, química y biomedicina.[18, 19]

### **2.3.1 APLICACIÓN DE LA MICROFLUÍDICA EN ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.**

Los avances en los campos de la bioingeniería, la nanotecnología y la microfluídica han facilitado la miniaturización de ensayos moleculares que permitan evaluar la susceptibilidad microbiana y detectar cepas resistentes. Los dispositivos de microfluídica pueden incorporar múltiples funcionalidades en un solo microchip incluyendo cultivos celulares, lisis celular, hibridación y amplificación de ADN.[20] Los métodos de detección pueden variar ampliamente en función del dispositivo empleado, puede basarse en la detección espectrofotométrica, electroquímica, magnética, entre otras. [21]

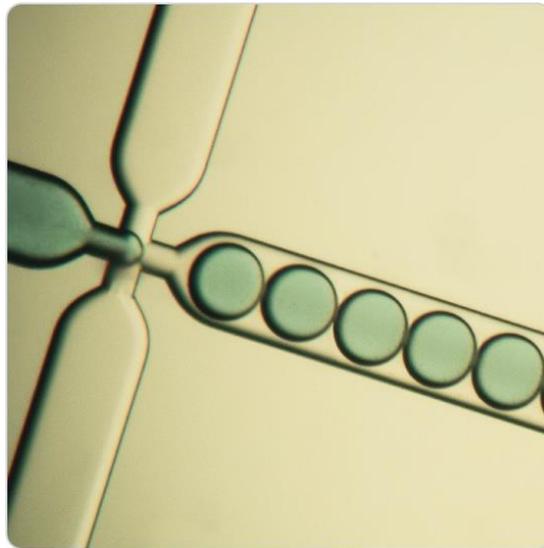
La posibilidad de manejar de forma más eficiente una gran variedad de fluidos ha facilitado la exploración de un mayor espacio químico lo que ha abierto la posibilidad para la identificación de antibióticos de gran potencial en menos tiempo.

Además de facilitar los estudios químicos y microbiológicos, algunos ensayos realizados en microchips de microfluídica permiten la evaluación de múltiples fármacos contra distintos microbios patógenos para determinar el tratamiento más efectivo de ciertos casos clínicos. [2]

### **2.3.1.2 ENSAYOS EN MICROGOTAS**

Las microemulsiones (por ejemplo; agua en aceite) representan una plataforma atractiva para ensayos de investigación en distintas áreas del campo de la bioingeniería e investigación biomédica debido a que las gotas emulsificadas que se generan sirven como compartimentos en la escala de micras que permiten aislar células, enzimas, genes entre otras. Los dispositivos de microfluídica permiten la generación de microemulsiones muy bien controladas.[22]

En la figura 20 se muestra la formación de microgotas en los canales de un microchip de microfluídica.



**Figura 20. Formación de microgotas.** La fase acuosa (fluido colorido) es cortada por la fase oleosa (fluido incoloro) en la intersección de ambos canales, promoviendo la formación de una microemulsión agua en aceite. La encapsulación con el tensoactivo y aceite adecuado forma microgotas estables por un largo periodo de tiempo.

[www.dolomite-microfluidics.com](http://www.dolomite-microfluidics.com)

Recientemente se ha presentado un gran interés en la implementación de ensayos en microgotas con volúmenes de pico y nano litros que permiten el confinamiento de

células (preferencialmente una célula por gota).[23] Los ensayos llevados a cabo dentro de microgotas se han convertido en una clave tecnológica fundamental para el desarrollo y diseño de nuevos experimentos microbiológicos como la detección e identificación de agentes patógenos, evaluación de actividad bactericida, estudios de fisiología microbiana y aplicaciones biotecnológicas. [20]

El uso de microgotas para estudiar microorganismos presenta muchas ventajas en comparación con los métodos clásicos que conllevan el uso de matraces, placas Petri y platos de múltiples pozos. Por ejemplo; es posible el confinamiento de volúmenes en un intervalo de picolitros a nanolitros, éste confinamiento permite que las mismas células sean observadas por largos intervalos de tiempo a través de microscopía. Permite trabajar con una gran cantidad de micro-reactores (microgotas), tienen la capacidad de incorporar mezclas de líquidos complejos. Las microgotas proporcionan un espacio para manipular las muestras sin problemas de dispersión, contaminación o pérdida a través de la interface. [23][20]

#### 2.3.1.2.1 ENSAYOS DE VIABILIDAD CÉLULAR EN MICROGOTAS

Los ensayos de viabilidad celular dentro de microgotas han sido una de las principales áreas beneficiadas por ésta técnica debido a la posibilidad de desarrollar experimentos que permiten evaluar la susceptibilidad bacteriana a mezclas de cócteles de antibióticos o a nuevos compuestos bactericidas.[23] El confinamiento de células bacterianas en microgotas ha abierto la posibilidad de evaluar grandes bibliotecas de compuestos, en donde, en un mismo ensayo, pueda analizarse el efecto bactericida de decenas o cientos de compuestos confinados en microgotas individuales. Para que ésta tecnología sea una realidad, aún existen limitantes técnicas que se encuentran en estudio por distintos grupos de investigación.[24]

Una de las técnicas más empleadas dentro de la microbiología es el uso de marcadores celulares como el resazurin que es convertido a un compuesto fluorescente (resorufin) debido al metabolismo presente en células viables.[23] Por otro lado, se han empleado técnicas de tinción de ácidos nucleicos como el kit LIVE/DEAD que permite distinguir entre células viables y no viables en función de la integridad de la membrana

celular.[25] Estos estudios han demostrado que es posible identificar, en un intervalo de tiempo corto, la fracción de células viables y no viables confinadas dentro de microgotas.[20]

#### 2.3.1.2.2 TENSOACTIVOS BIOCOMPATIBLES

La correcta formación de las microgotas y la máxima eficiencia en el uso de los dispositivos de microfluídica depende no sólo del manejo de los fluidos, sino de la química involucrada en la formación de las gotas.

Para que las gotas sean micro-reactores completamente eficientes, es indispensable que sean estabilizadas por un surfactante adecuado que evite que las biomoléculas se adsorban a la interface y que a la vez proporcionen una superficie interior biológicamente inerte. Los tensoactivos fluorinados con largas colas, como los poliéteres perfluorinados (PFPE), proporcionan una gran estabilidad a las microemulsiones. Sin embargo, algunos de los tensoactivos comerciales que existen actualmente presentan cabezas iónicas carboxiladas que interaccionan con algunas biomoléculas de gran importancia, ocasionando que pierdan su actividad biológica. Para llevar a cabo ensayos que conlleven la incubación de bacterias dentro de microgotas, o que requieran de un contacto prolongado entre el tensoactivo y los organismos biológicos, es indispensable el uso de tensoactivos fluorados con cabezas no iónicas.[26]

### **3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO**

##### **3.1.1 MEDIO LÍQUIDO LB**

Para preparar 100 mL de medio líquido se pesó 1 g de peptona (P6838, Sigma Aldrich, E.U.A), 0.5 g de extracto de levadura (70161, Sigma Aldrich, E.U.A.) y 0.5 g de NaCl (L-B0809, Distribuidora Química AIVI, México). Posteriormente, estos reactivos se disolvieron en 100 mL de agua destilada. La solución se esterilizó en autoclave (SK100C, Yamato Scientific America, E. U. A.) a 120°C por 20 minutos. Finalmente se etiquetó y se usó para el crecimiento de células bacterianas de *E. coli* o se guardó en el refrigerador a una temperatura de 5°C para usarse posteriormente.

##### **3.1.2 PLACAS DE AGAR CON MEDIO LB**

Para preparar 250 mL de medio LB sólido se pesaron 2.5 g de peptona, 1.25 g de NaCl, 1.25 g de extracto de levadura y 3.75 g de agar (A1296, Sigma Aldrich, E. U. A). Los reactivos se disolvieron en 250 mL de agua destilada, a continuación se esterilizó la solución en autoclave a 120°C por 20 minutos. Al finalizar el ciclo de esterilización, la solución se dejó enfriar por 30 minutos. Posteriormente, en ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar (PURAIR FLOW-24, AirScience, EUA) se vertieron aproximadamente 20 mL de la solución en placas Petri de 9 cm de diámetro x 1.5 cm de profundidad. Finalmente la solución se dejó solidificar dentro de las placas, se etiquetaron y se guardaron en el refrigerador a una temperatura de 5°C.

##### **3.1.3 SOLUCIÓN SALINA DE NaCl 0.85 % m/v**

Para preparar 100 mL de solución se pesaron 0.85 g de NaCl, y se disolvieron en un vaso de precipitados con 100 mL de agua destilada. Posteriormente, se vertieron 10 mL de la solución en 10 tubos falcón. La solución dentro de los tubos se esterilizó en autoclave a 120 °C por 20 minutos.

##### **3.1.4 CULTIVO DE CÉLULAS DE *E. coli* BL21 EN MEDIO LÍQUIDO**

Dentro de la campana de flujo laminar, se vertieron 5 mL de medio líquido LB dentro de un tubo de ensaye. Posteriormente, con ayuda de una punta estéril, se tomó una

colonia de células de *E. coli*, de una placa de agar sembrada 16 horas antes, y se inocularon los 5 mL de medio de cultivo.

Finalmente, se vertieron 5 mL de medio líquido LB dentro de otro tubo de ensaye para verificar la esterilidad del medio de cultivo. Se puso el tapón a ambos tubos y se colocaron la incubadora orbital (Excella E24/E24R New Brunswick Scientific, Fisher Scientific, Alemania) por 16 horas a 37 °C con agitación a 200 rpm.

### 3.1.5 CULTIVO DE CÉLULAS DE *E. coli* BL21 EN PLACAS DE AGAR

Dentro de la campana de flujo laminar, se tomó una colonia de una placa de agar con células de *E. coli* BL21, con ayuda de una punta estéril y se estrió en la superficie de otra caja estéril. Finalmente, se colocó en una incubadora a 37 °C por 16 horas.

## 3.2 ARREGLO MICROSCÓPICO

Todo el trabajo experimental efectuado en éste trabajo de tesis fue monitoreado en el microscopio de fluorescencia (DMI3000B, Leica Microsystems, Alemania) usando una fuente de luz de amplio espectro (Photo Fluor, North89, E.U.A.). Se usó el Objetivo 20x con número de apertura de 0.3 (Leica Microsystems). Se dispuso una cámara digital (Canon SX260 HS, E.U.A.) ajustada a los oculares del microscopio para la adquisición de fotos o videos. Los filtros usados para cada fluorocromóforo fueron los siguientes.

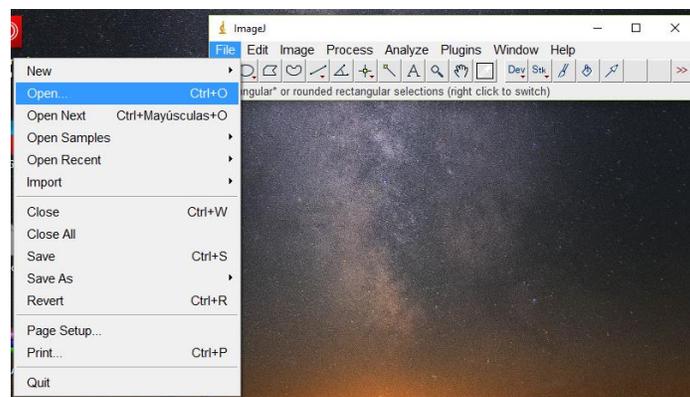
FILTRO	COLOR EMITIDO	FLUOROCROMÓFORO OBSERVADO
<i>DAPI-50LP-A-L01-ZERO/DAPI LongPass BrightLine® Bandpass Filter Set, ZERO™ Pixel Shift, Leica Large.</i>	Azul	4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI)
<i>FITC-5050A-L01-ZERO/FITC High Brightness® Filter Set, Leica Large, ZERO™ Pixel Shift.</i>	Verde	Naranja de acridina-ARN Sytox Green® Syto 9®
<i>LF561/LP-C-L01/561&amp;568 nm BrightLine® Longpass Filter Set, Leica Large.</i>	Rojo	Naranja de acridina-ADN Bromuro de etidio Yoduro de propidio

Todas las fotos y videos obtenidos en éste trabajo fueron analizadas siguiendo el procedimiento que se describe en la sección 3.3.

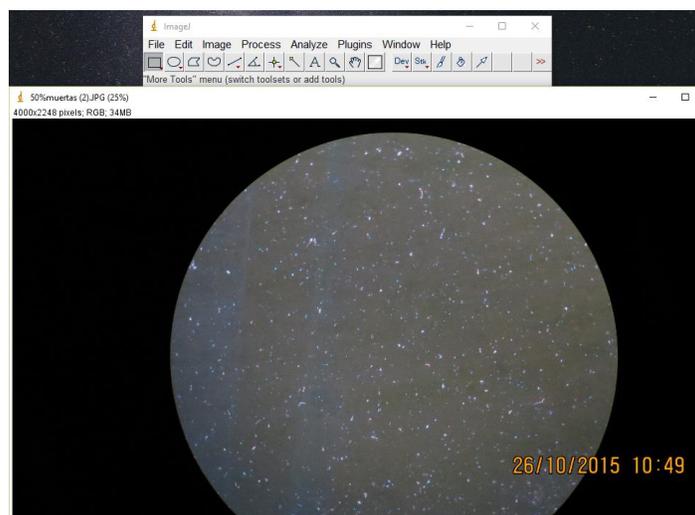
### 3.3 CONTEO DE CÉLULAS *E. coli* CON EL PROGRAMA IMAGE J

El análisis de las fotos y videos adquiridos con la cámara digital se realizó con el programa Image J. Los comandos que se describen a continuación permitieron realizar el conteo de células *E. coli*.

#### 1. File>>Open

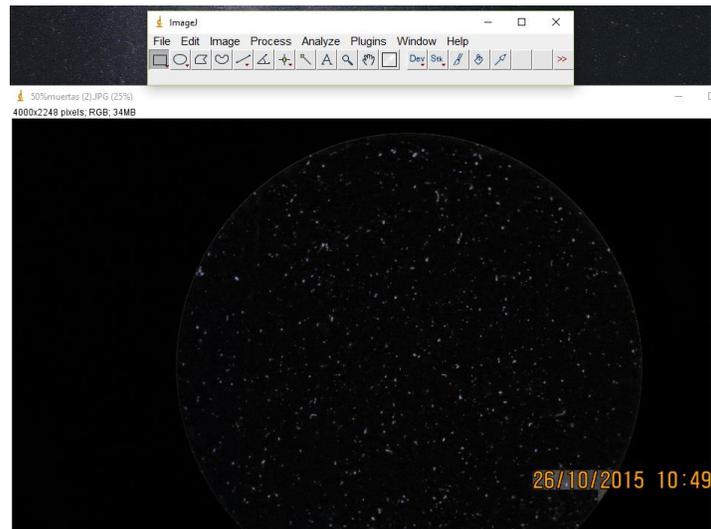


**Figura 21. Abrir archivo.** Permite seleccionar la foto que desea analizarse.



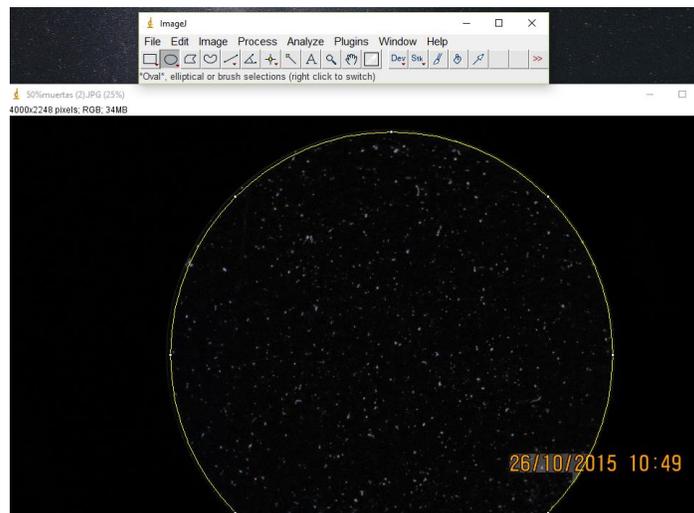
**Figura 22. Archivo seleccionado.** Permite visualizar el archivo seleccionado.

## 2. Process>>Subtract background



**Figura 23. Substraer fondo.** Permite eliminar el fondo de la foto y visualizar los cuerpos fluorescentes en un fondo negro para obtener un mejor contraste.

## 3. \*Oval\*, elliptical selection.



**Figura 24. Selección de área de análisis.** Permite seleccionar el área de la foto que será analizada.

#### 4. Edit->Clear Outside

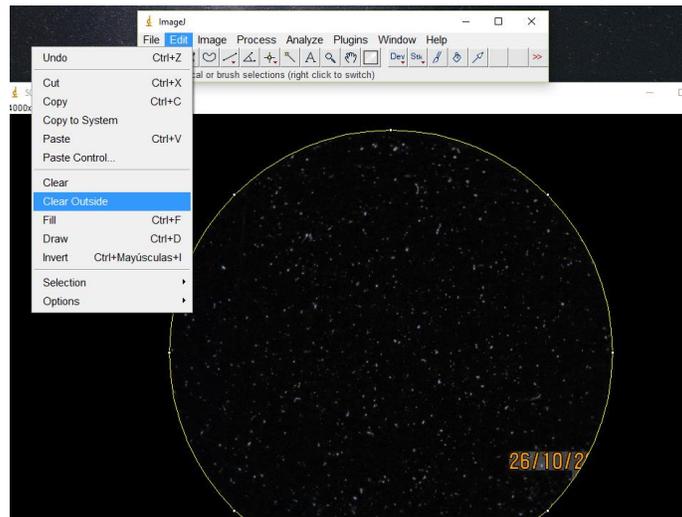


Figura 25. Cortar área exterior. Permite aislar el área de la foto que será analizada, cortando el resto de la imagen.

#### 5. Image->Adjust->Color Threshold-> Brightness

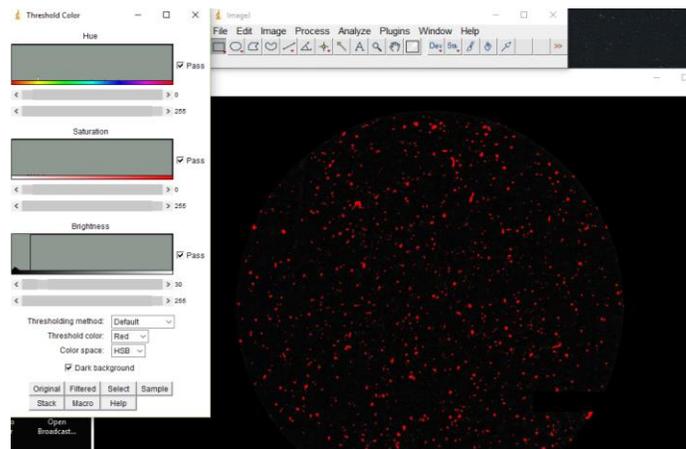
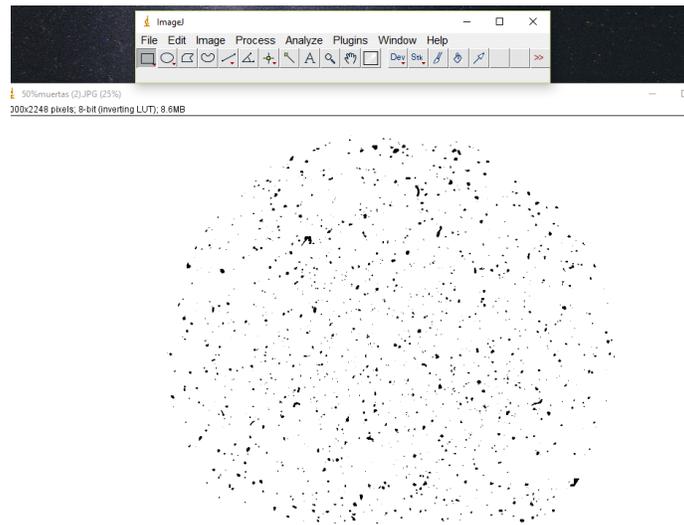


Figura 26. Ajustar entrada de color. Permite visualizar todos los cuerpos fluorescentes de color rojo, creando una imagen binaria.

## 6. Process>>Binary>>Make Binary



**Figura 27. Imagen blanco y negro.** Se crea una imagen binaria en la que los cuerpos fluorescentes destacan de color negro sobre un fondo blanco.

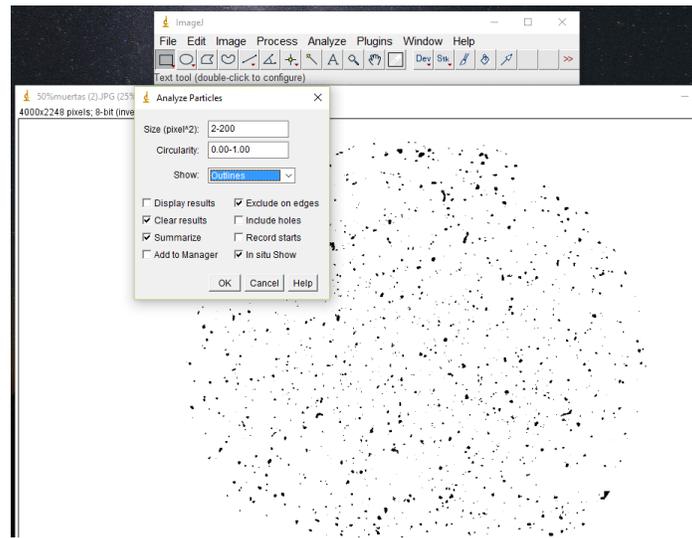
## 7. Process>>Binary>>Watershed

En caso de que existan células muy juntas; se aplica el comando “Watershed” que permite analizarlas como entidades independientes. De no realizar éste paso, el programa las contará como una sola célula.

## 8. Analyze>>Analyze Particles>>Size>>2-200

Permite restringir el intervalo de tamaño, en unidades de pixeles, que puede contabilizar el programa. Se eligió el intervalo de (2-200) debido a que el tamaño observable de las células depende de la tinta que se esté analizando puesto que tiñen estructuras celulares distintas. Aunado a esto, las células que se observan en segundo plano, tienen un tamaño menor a las observables en el primer plano. Éste intervalo permite contabilizar ambos planos.

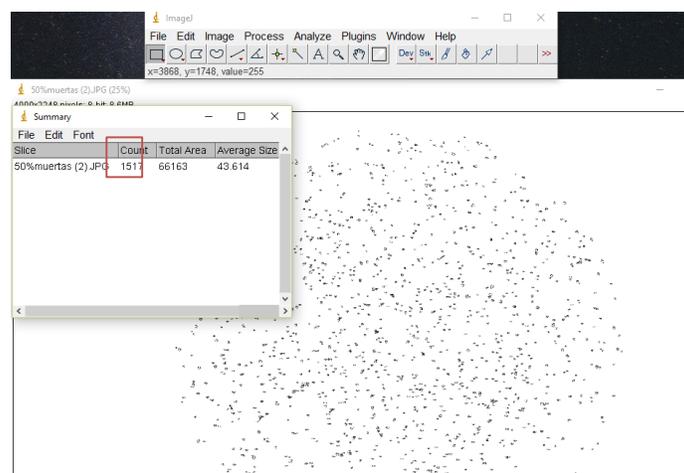
## 9. Analyze>>Analyze Particles>>Show>> Outlines



**Figura 28. Mostrar contornos.** Al desplegar el resultado del conteo, ésta opción delimita los cuerpos contabilizados en forma de contornos.

## 10. Analyze>>Analyze Particles>>Exclude edges, Clear results, Summarize-In situ Show>>Ok

El programa excluye los bordes de la imagen (exclude edges), muestra un resumen de los resultados (Summarize), borra el análisis para no interferir con análisis próximos (Clear results) y muestra las células contabilizadas en la misma imagen (In situ Show).



**Figura 29. Despliegue de resultados.** Se observa un resumen del número de células totales contadas, el área total analizada y la medida promedio de los cuerpos contabilizados.

### **3.4 EXPERIMENTOS EN PORTAOBJETOS DE CÉLULAS *E. coli* BL21**

Se realizaron ensayos en portaobjetos con el fin de probar la efectividad de las distintas tintas para teñir células *E. coli* BL21. A continuación se describe el procedimiento experimental seguido. Para tintas que tiñen el total de células presentes, el total de células muertas y la combinación de pares de tintas.

#### **3.4.1 TINCIÓN DEL TOTAL DE CÉLULAS *E. coli* BL21 PRESENTES EN LA MUESTRA (DAPI/NARANJA DE ACRIDINA)**

El siguiente procedimiento se siguió con el fin de evaluar la efectividad de las tintas DAPI y Naranja de Acridina para teñir el total de células presentes en la muestra. Los ensayos de las dos tintas se realizaron por separado.

Se preparó una solución stock de la tinta DAPI (035M4029V, Sigma)/Naranja de Acridina (Sigma Aldrich) en agua a una concentración 2.85 mM/3.31 mM, posteriormente se realizó una dilución para preparar una solución de trabajo a una concentración 71  $\mu$ M/82.8  $\mu$ M.

Se tomaron colonias de una placa de agar, sembrada 16 horas antes, se disolvieron en 6 mL de una solución de NaCl 0.85%. Se midió la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm y se llevó a una OD<sub>600 nm</sub> de trabajo de 0.6.

A continuación se tomaron 500  $\mu$ L de cultivo y se agregaron 30  $\mu$ L/20  $\mu$ L de tinta DAPI/Naranja de Acridina de la solución de trabajo para obtener una concentración de 4.0  $\mu$ M/3.33  $\mu$ M. La tinta se dejó en contacto con el cultivo por media hora, posteriormente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se resuspendió 0.5 mL de NaCl 0.85%.

Finalmente, se tomó 1  $\mu$ L del cultivo y se puso sobre un portaobjetos; sobre la gota formada se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio con el set de filtros DAPI-50LP-A / FITC-5050 A y LF561/LP-C. Se tomaron fotos con la cámara digital y se analizaron siguiendo el procedimiento de la sección 3.3.

### **3.4.2 TINCIÓN DEL TOTAL DE CÉLULAS *E. coli* BL21 NO VIABLES EN LA MUESTRA (BROMURO DE ETIDIO/YODURO DE PROPIDIO). Tratamiento con calentamiento**

Las tintas bromuro de etidio y yoduro de propidio permiten cuantificar las células que han sufrido daño en su membrana, por lo que han dejado de ser viables. A partir de trabajos anteriores se ha comprobado, a partir de métodos clásicos, que las células sometidas a una temperatura de 65°C por 30 minutos pierden su viabilidad. Para asegurarnos de que las tintas son adecuadas para teñir células no viables se realizó el siguiente experimento con bromuro de etidio y yoduro de propidio de manera independiente.

Se preparó una solución stock de la tinta bromuro de etidio (MKBD5725V, Sigma Aldrich)/yoduro de propidio (1700581, Molecular Probes, E.U.A.) en agua/en DMSO al 99.5% GC (D5879, Sigma Aldrich, E. U. A.) a una concentración 24 mM/20 mM. Posteriormente se realizó una solución de trabajo a una concentración 240 µM/200 µM.

Se tomaron colonias de *E. coli* BL21 de una placa de agar, sembrada 16 horas antes, se disolvieron en 6 mL de una solución de NaCl 0.85%. Se midió la OD<sub>600 nm</sub> y se llevó a una densidad óptica de trabajo de 0.6.

Se tomaron cuatro microtubos para probar dos concentraciones de tinta. Por lo que se colocó 1 mL del cultivo en cada uno. A continuación los cuatro microtubos se etiquetaron; 2 con la etiqueta de “viables” y 2 con la etiqueta de “no viables”. Los dos microtubos etiquetados como “no viables” se colocaron en un baño de agua a 65 °C por 30 minutos.

En cada par de microtubos se probó una concentración final de tinta diferente; bromuro de etidio 10.11 µM y 40 µM/yoduro de propidio 10.06 µM y 40 µM. Los microtubos se mantuvieron a temperatura ambiente y en la oscuridad por 10 minutos.

Finalmente, se tomó 1 µL del cultivo de cada microtubo y se puso sobre un portaobjetos distinto; sobre la gota formada se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio

con el set de filtros LF561/LP-C. Se tomaron fotos con la cámara digital y se analizaron con el programa Image J (Sección 3.3).

### **3.4.3 EXPERIMENTOS DE CÉLULAS *E. coli* BL21 CON TRES PARES DE TINTAS DAPI-BROMURO DE ETIDIO, DAPI-SYTOX GREEN Y SYTO 9-YODURO DE PROPIDIO. Tratamiento con calentamiento.**

Se realizaron experimentos en portaobjetos para determinar si los pares de tintas DAPI-Bromuro de etidio, DAPI-Sytox Green y Syto 9-Yoduro de propidio permitían diferenciar entre células viables y no viables a través de microscopía de fluorescencia. Los tres pares de tintas se analizaron de manera independiente a través del siguiente procedimiento.

Se tomaron colonias de *E. coli* de una placa de agar, sembrada 16 horas antes, se disolvieron en 7 mL de una solución de NaCl 0.85%. Se midió la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm y se llevó a una OD<sub>600 nm</sub> de trabajo de 0.6.

En dos microtubos estériles se colocó 1 ml de cultivo, en cada microtubo se añadieron 60 µL/15 µL de la solución de trabajo de la tinta DAPI/Syto 9 para una concentración final de 4.0 µM/4.93 µM. Se dejaron incubar por 30 minutos, las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 1 mL de NaCl 0.85%.

Ambos microtubos se etiquetaron, uno como “viables” y otro como “no viables” el microtubo con la etiqueta de “no viables” se sometió a calentamiento en un baño de agua (ED-5, Julabo) a 65°C por 30 minutos.

Por otro lado, se preparó una solución de trabajo de bromuro de etidio/Sytox Green/Yoduro de propidio a 2.4 mM/250 µM/2 mM de ésta nueva solución se tomaron 13 µL/21 µL/15 µL para cada microtubo, obteniendo una concentración final 30.8 µM/5.14 µM/ 29.55 µM. Se mantuvieron a temperatura ambiente y en la oscuridad por 10 minutos.

Finalmente, se tomó 1 µL del cultivo de cada microtubo y se puso sobre un portaobjetos distinto; sobre la gota formada se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio

con el set de filtros DAPI-50LP-A para observar las células teñidas con DAPI/ FITC-5050-A para observar las células teñidas con Syto 9®.

Posteriormente se observaron con el set de filtros LF561/LP-C (células teñidas con bromuro de etidio y yoduro de propidio)/ FITC-5050-A (células teñidas con Sytox Green®). Se tomaron fotos con la cámara digital y se analizaron con el programa Image J (Sección 3.3).

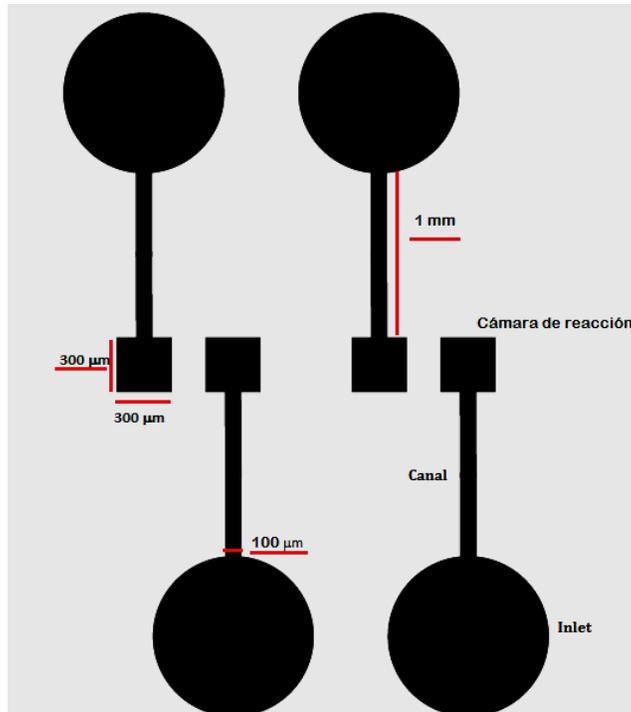
### **3.5 FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS**

La fabricación de dispositivos de microfluídica se llevó a cabo por el método de fotolitografía suave. Para lo cual se requirió, en primer lugar, realizar el diseño del microchip adecuado para desarrollar el ensayo planeado.

Los diseños se realizaron en el software Adobe Illustrator CS6. Éste programa permite dibujar líneas y patrones en escala micrométrica que posteriormente se convertirán en los canales y cámaras del chip. Para los fines de éste trabajo se diseñaron y fabricaron dos prototipos que se describen a continuación.

#### **3.5.1 DISEÑO DE MICROCHIPS SIN FLUJO**

La Figura 30 muestra el diseño del microchip sin flujo. Éste microchip fue diseñado para llevar a cabo cuatro monitoreos de viabilidad celular al mismo tiempo en un espacio físico menor a 1 cm<sup>2</sup>. Los círculos corresponden al espacio de inserción de cada fluido en estudio, que recorre el canal correspondiente de 1 mm de longitud por 100 µm de ancho y llega a la cámara de reacción, un cuadro de 300 µm por lado, que permite el confinamiento del fluido para su análisis.



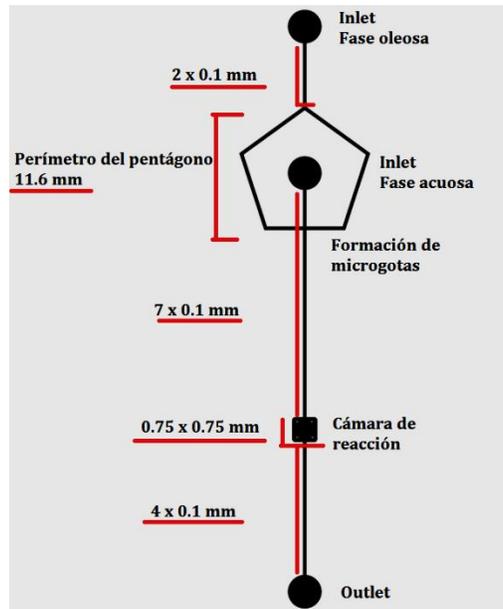
**Figura 30. Diseño de microchip sin flujo.** Los patrones negros representan el diseño del microchip y las líneas rojas indican los puntos a los que corresponde la medida.

### 3.5.2 DISEÑO DE MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO

La Figura 31 muestra el diseño del microchip con flujo continuo. En el primer punto negro (arriba hacia abajo) se introduce la fase oleosa que consiste en aceite y tensoactivo, ésta mezcla recorre un canal de 2 mm de largo por 0.1 mm de ancho, posteriormente recorre un pentágono de 11.6 mm de diámetro hasta llegar a la intersección con la fase acuosa. En el segundo punto negro se introduce el cultivo celular teñido que viaja hacia la intersección con la fase oleosa. Dicha intersección permite la formación de microgotas de agua en aceite que viajan por el canal hasta llegar a la cámara de reacción, un cuadro de 0.75 mm por lado, en donde residen por unos segundos y posteriormente salen del microchip tras recorrer un canal de 4 mm de largo por 0.1 mm de ancho y llegar al tercer punto negro.

La cámara de reacción cuenta con cuatro pilares que impiden que el PDMS colapse sobre la cámara de reacción. Esto debido a la relación que existe entre el ancho del canal y la altura, la relación máxima para que el canal sea estable y no colapse es 1:10 (altura:ancho) [27]. La cámara de reacción del microchip diseñado tiene una altura de

30  $\mu\text{m}$  y un ancho de 750  $\mu\text{m}$  por lo que la relación resultante es 1:25, de ahí la necesidad de colocar pilares en el diseño.



**Figura 31. Diseño de microchip de flujo continuo.** Los patrones negros representan el diseño del microchip y las líneas rojas indican los puntos a los que corresponde la medida.

Después de diseñar el microchip, adecuado para los fines del experimento, el dibujo se mandó imprimir en negativo sobre una hoja de acetato (Gráficos Denver). La impresión que se obtuvo sirvió como máscara para la fabricación del microchip.

### 3.5.3 FABRICACIÓN DE MOLDES POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE FOTOLITOGRAFÍA SUAVE

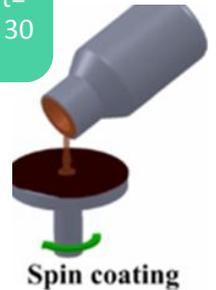
La técnica de fotolitografía suave se compone de dos partes importantes. La primera es la fabricación del molde con el diseño que se desea, para lo cual se emplea una resina fotosensible. La segunda es la obtención de réplicas de éste diseño en polidimetilsiloxano (PDMS) para su posterior sellado mediante plasma.

En el siguiente esquema se muestra el método seguido para la fabricación del molde maestro del microchip con flujo mostrado en la figura 31.

**Tratamiento de la oblea.** Sobre una parrilla a 200° C se colocó una oblea de silicio de 3.81 cm de radio (Sillicon Valley Microelectronics) durante 10 minutos. Posteriormente se colocó en un horno a 60°C (DHO-9032, PROLAB) por 5 minutos para eliminar la humedad.



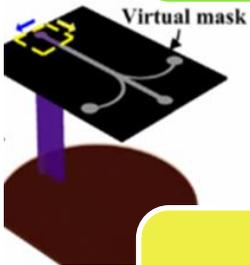
**Spin Coating.** La oblea fue fijada mediante vacío sobre el spin coater. En seguida se vertieron aproximadamente 3 mL de la resina fotosensible SU-8 2015 (14050300, Microchem, EUA). Posteriormente se programó la siguiente rampa en dos tiempos. 1)  $t = 10$  s,  $v = 500$  rpm,  $a = 100$  rpm/s 2)  $t = 30$  s,  $v = 4300$  rpm,  $a = 300$  rpm/s



**Exposición UV.** El diseño impreso en acetato se colocó sobre la oblea de silicio. Posteriormente se expuso a la radiación UV de una lámpara (UVG-L25UV) durante 15 segundos. Lo que permite que las regiones de la máscara expuestas a la luz UV polimericen sobre la resina.



**Calentamiento suave.** La oblea con la resina se colocó en una parrilla a 115° C por 11 minutos. Con la finalidad de evaporar los disolventes de la resina.



**Calentamiento post-exposición.** La oblea fue colocada sobre una parrilla a 95° C por 1 minuto y posteriormente, 3.5 minutos sobre una parrilla a 115° C para coadyuvar a la polimerización de la resina.



Soft baking

**Revelado.** La resina que no se expuso a la luz UV no polimerizó sobre la oblea de silicio por lo que pudo retirarse sumergiendo la oblea por 5 minutos en revelador (1-metoxi-2-propanol-acetato). Finalmente se lavó con isopropanol, se secó con aire y se colocó dentro de un plato Petri.



Developing

Para la fabricación del molde sin flujo se siguieron los mismos pasos, sin embargo la resina fotosensible usada fue la SU-8 3035 (Microchem).

### **3.5.4 FABRICACIÓN DE MICROCHIPS CON PDMS**

Los dispositivos de microfluídica se caracterizan por ser biocompatibles, resistentes a la corrosión de una gran cantidad de reactivos químicos y por ser aptos para ensayos que requieren análisis ópticos. El polidimetilsiloxano (PDMS) cumple con todas esas características que lo hacen el elastómero ideal para el desarrollo de dispositivos de microfluídica por lo que se utiliza para la obtención de las réplicas del molde fabricado en la resina fotosensible

Para la fabricación de las réplicas del molde se pesaron 25 g de PDMS (Sylgard 184, Silicone Elastomer Base, Dow Corning) en un vaso de plástico, posteriormente se pesaron 2.25 g de agente curante (Sylgard 184, Silicone Elastomer curing agent, Dow Corning). Los reactivos se mezclaron mecánicamente por unos minutos.

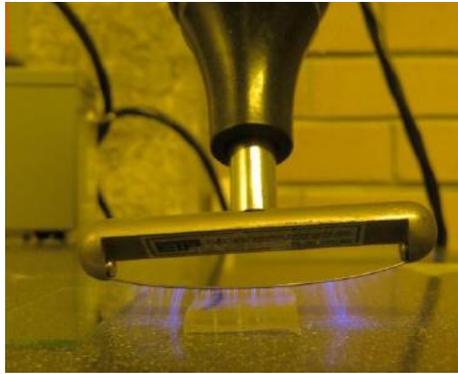
En seguida, se vertió la mezcla sobre el molde colocado dentro de la caja Petri. La caja se colocó dentro de una cámara de vacío durante 25 minutos para eliminar todas las burbujas formadas. Después, se colocó dentro de un horno a 70 °C por 12 horas para contribuir a la polimerización del PDMS.

Finalmente, con ayuda de un bisturí, se cortó el PDMS con el diseño del microchip, cuidando de no dañar el diseño del molde para obtener más réplicas posteriormente. Con ayuda de un punzón de la marca Harris punch de un diámetro de 0.75 mm, se realizaron los orificios para la introducción de los fluidos.

### **3.5.5 SELLADO DE MICROCHIPS MEDIANTE PLASMA**

Los materiales ricos en silicatos como el vidrio, el cuarzo, el PDMS, entre otros, genera radicales libres en su superficie tras ser oxidados por medio de algún tratamiento, por ejemplo; por plasma de oxígeno. Cuando dichas superficies se ponen en contacto, se generan enlaces covalentes entre las mismas, provocando que permanezcan unidas.

En la siguiente figura se muestra el uso del descargador corona (Corona Treater, BD-20AC, Electro Technic Products) para generar radicales libres sobre el PDMS y el vidrio.



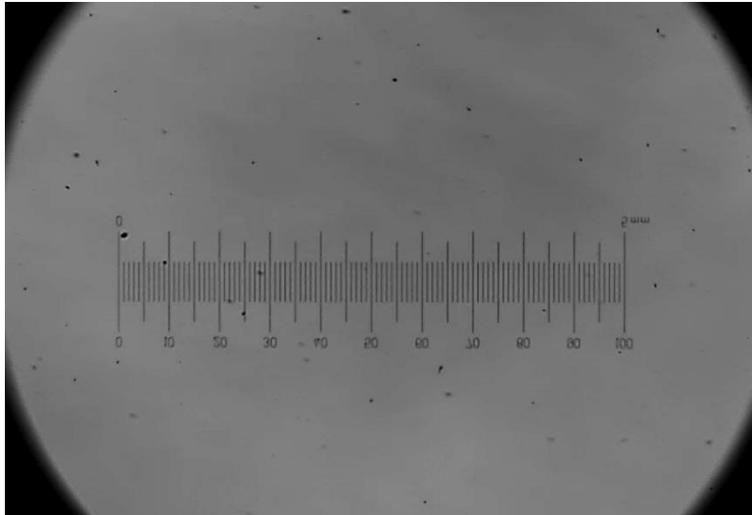
**Figura 32. Plasma de oxígeno sobre una superficie de PDMS.**

El plasma de oxígeno se aplicó durante 60 segundos sobre la superficie de vidrio, posteriormente se aplicó por 15 segundos sobre la superficie de PDMS. Las superficies tratadas se pusieron en contacto y se aplicó una ligera presión manual. (Nota: Para los ensayos realizados con el chip de la figura 37 se pegaron dos réplicas en PDMS por cada portaobjetos de vidrio). Finalmente, el microchip sellado se dejó reposar durante 24 horas en un horno de 70 °C.

### **3.5.6 CARACTERIZACIÓN DE RÉPLICAS DE PDMS POR TÉCNICAS DE MICROSCOPIA**

La caracterización de los microchips permite conocer las dimensiones reales de los canales fabricados a través de la técnica de fotolitografía suave, ya que, a pesar de que las dimensiones fueron fijadas en el diseño, pueden producirse variaciones al realizar el molde.

Las réplicas fueron caracterizadas por medio de microscopía. En primer lugar se realizó una calibración, para lo cual, se tomaron tres fotos de una retícula de dimensiones conocidas (Figura 33) usando el objetivo 20x (Leica Microsystems, apertura numérica= 0.3). Las fotos fueron analizadas con el programa Image J, relacionando los pixeles de la foto, con los micrómetros señalados en la retícula. Ésta relación proporciona la equivalencia entre número de pixeles y micras. Las fotos tomadas para realizar la caracterización se tomaron con una cámara Phantom (Miro M110, AMETEK).



**Figura 33. Retícula de 5 mm vista al microscopio. Objetivo 20x**

A continuación se realizaron cortes transversales del PDMS sobre el diseño del microchip, los cortes obtenidos de las distintas secciones del microchip se observaron al microscopio y se tomaron tres fotos con la cámara Phantom que posteriormente fueron medidas con el programa Image J.

### **3.6 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROCHIPS SIN FLUJO**

Los experimentos de viabilidad celular sin flujo se realizaron en microchips con el diseño que se observa en la figura 30. En primer lugar, se tiñeron células de *E. coli* con los pares; DAPI-BE, DAPI-SX y el kit LIVE/DEAD®; siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.3.

Después de añadir la respectiva tinta que permite teñir las células muertas, se procedió a introducir los fluidos al microchip. Dos de las cuatro entradas del microchip fueron cargadas con células viables y las otras dos entradas se llenaron con células tratadas por calentamiento.

Para lo cual, se conectó el extremo de un tubo flexible (PTFE, Cole Parmer. Diámetro externo 1.07 mm) a la aguja de una jeringa (Becton Dickinson) de 1 mL. En seguida se succionó el cultivo teñido de uno de los microtubos hasta una cuarta parte de la capacidad de la jeringa, a continuación se eliminaron las burbujas presentes y el

volumen de la jeringa se llevó a 0.1 mL. Inmediatamente, se conectó el otro extremo del microtubo en uno de los cuatro orificios del microchip. La jeringa se colocó en una bomba de presión (NE-1002X, New Era), el émbolo se ajustó hasta observar que el microcanal correspondiente se encontraba lleno. La jeringa se mantuvo en la bomba durante todo el experimento sin programar un flujo, únicamente se usó para mantener la presión necesaria que permitiera mantener el cultivo dentro del canal, sin que se regresara a la jeringa. Éste procedimiento se siguió para llenar las cuatro entradas del microchip, manteniendo la presión en las cuatro bombas (270376, 271330, 271326 y 270381. NE-1002X, New Era) En seguida se procedió a observar las células por el microscopio usando el arreglo experimental descrito en la sección 3.2. Las imágenes adquiridas se analizaron siguiendo la metodología de la sección 3.3.

### **3.7 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE ANTIBIÓTICOS CONOCIDOS EN MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO**

Los experimentos de monitoreo de la actividad bactericida en microgotas se llevaron a cabo en microchips con el diseño que se observa en la figura 31. Los ensayos que se realizaron en los microchips de flujo continuo siguieron el siguiente sistema experimental.

#### **3.7.1 SISTEMA EXPERIMENTAL**

En cada ensayo se monitorearon células con y sin antibiótico para realizar una comparación entre su comportamiento. Por ésta razón se pegaron dos réplicas en PDMS del microchip por cada superficie de vidrio. En uno de los microchips se introdujo el cultivo sin antibiótico y en el otro se introdujo el cultivo con antibiótico.

Una vez teñidas las células con el par de tintas correspondiente y con el antibiótico en estudio, se procedió a montar el sistema de microfluídica.

Se conectó el extremo de 20 cm de un tubo flexible de PTFE con un diámetro externo de 1.07 mm a la aguja de una jeringa de 1 mL. El extremo libre del tubo se colocó en el microtubo correspondiente y se procedió a succionar la mezcla de aceite fluorinado con

Krytox®. La jeringa se llenó a la mitad de su capacidad y se eliminaron las burbujas presentes, en seguida se conectó el extremo del tubo a la entrada de la fase oleosa.

Posteriormente, se conectó el extremo de otros 20 cm de tubo PTFE a la aguja de una jeringa de 1 mL. La jeringa se cargó a la mitad de su capacidad con cultivo celular sin antibiótico, se eliminaron las burbujas y el extremo libre del tubo flexible se conectó a la entrada de la fase acuosa del microchip dentro del pentágono. A continuación se cortaron 6 cm del tubo flexible y se conectó a la salida del microchip.

En seguida se procedió a conectar el segundo microchip, siguiendo los pasos ya mencionados. La entrada acuosa del segundo microchip fue conectado a una jeringa unida al tubo flexible y cargada con cultivo celular con el antibiótico en estudio.

Las cuatro jeringas se ajustaron en cuatro bombas de presión, en ellas se ajustó el diámetro de las jeringas utilizadas a 4.699 cm. Posteriormente, las dos bombas con las jeringas que contenían fase oleosa se programaron para entregar 20  $\mu\text{L/h}$  y las bombas con jeringas que contenían fase acuosa se programaron a 10  $\mu\text{L/h}$ .

Por otro lado, se ajustó la cámara digital a los oculares del microscopio y el filtro necesario para el fluorocromóforo en estudio. Cada hora se tomó un video de un minuto en la cámara de reacción del microchip que contenía células sin antibiótico y otro video de un minuto en la cámara de reacción del microchip que contenía células tratadas con el antibiótico en estudio. De cada video se seleccionaron tres imágenes instantáneas, las células fueron contabilizadas usando la metodología descrita en la sección 3.3.

### **3.7.2 TRATAMIENTO DE DATOS**

Posteriormente, el número de células obtenido en las tres imágenes instantáneas de cada video fueron promediadas. Para cada valor de tiempo se obtuvo el promedio del número de células viables y el promedio del número de células no viables. Los promedios calculados se graficaron en función del tiempo. Finalmente, se pensó en hacer otra representación gráfica que tomara en cuenta las variaciones en el número de células totales en cada uno de los experimentos y que permitiera contrastar mejor los resultados de diferentes días. Se decidió entonces graficar el porcentaje de células

viabiles y no viabiles en función del tiempo, ya que de esta forma se normalizarían los datos y se tendría una misma escala en el eje Y para todos los resultados.

Esto es debido a que la cantidad de células totales a lo largo del experimento no es constante ya que, por un lado, las células son elementos discretos que no se encuentran totalmente homogéneos en la solución; por otro lado, la formación de microgotas aumenta la dispersión numérica de las células presentes puesto que el tamaño de las gotas y la cantidad de las mismas en la cámara de reacción no son constantes.

Para los pares de tintas DAPI/Bromuro de Etidio y DAPI/Sytox Green®, el promedio se obtuvo tomando el valor del promedio de las células observables con la tinta DAPI como el total de células presentes debido a que éste compuesto tiñe tanto células viabiles cómo no viabiles, es decir el 100%, [14] las células no viabiles se obtuvieron comparando el promedio de las células teñidas con bromuro de etidio o Sytox Green®, con el promedio del total y calculando el porcentaje correspondiente. A continuación se muestra un ejemplo del algoritmo de cálculo utilizado.

Foto	Células totales	Células no viabiles
1	376	75
2	335	113
3	298	97
Promedio	336.33	95.00

$$\%Células\ no\ viabiles = \frac{Número\ de\ células\ no\ viabiles}{Número\ de\ células\ totales} \times 100$$

$$\%Células\ no\ viabiles = \frac{95}{336.33} \times 100 = 28.2\%$$

$$\%Células\ viabiles = 100 - \%Células\ no\ viabiles$$

$$\%Células\ viabiles = 100 - 28.2\% = 71.8\%$$

**Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de células viabiles y no viabiles con los pares de tintas DAPI-BE y DAPI-SX.**

En el caso de la tinta Syto 9® no es posible hacer una relación tan simple cómo al usar la tinta DAPI que tiñe células viabiles y no viabiles, es decir que, permite contabilizar el

total de células presentes. El fabricante del kit de tintas Live and Dead® asegura que con las concentraciones utilizadas en éste experimento, el yoduro de propidio reemplazará al Syto 9® por lo que ésta tinta permite monitorear únicamente las bacterias viables.

Por ésta razón, se plantea el siguiente tratamiento para los datos obtenidos con el kit Live and Dead®.

Foto	Células viables	Células no viables
1	322	81
2	356	93
3	317	92
Promedio	331.67	88.67

$$\%Células\ no\ viables = \frac{Número\ de\ células\ no\ viables}{Número\ de\ células\ totales} \times 100$$

$$\%Células\ no\ viables = \frac{Número\ de\ células\ no\ viables}{Número\ de\ células\ viables + Número\ de\ células\ no\ viables} \times 100$$

$$\%Células\ no\ viables = \frac{88.67}{331.67 + 88.67} \times 100 = 21.1\%$$

$$\%Células\ viables = 100 - \%Células\ no\ viables$$

$$\%Células\ viables = 100 - 21.1\% = 78.9\%$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de células viables y no viables con el kit Live and Dead®

### 3.7.3 VALIDACIÓN DEL MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON EL MÉTODO CLÁSICO DE MICRODILUCIÓN

Con el fin de asegurarse de que el método que pretendía estudiarse permitiría observar el cambio fisiológico entre células viables y no viables, a la concentración de antibiótico y el tiempo de análisis previsto; se realizó la validación del método de microscopía de fluorescencia comparándolo con el método clásico de microdilución. Así mismo, éste experimento permitió medir el efecto que tienen todos los componentes del sistema sobre la viabilidad de células que no fueron tratadas con antibióticos.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

Se tomó una colonia de *E. coli* BL21 y se sembró en una placa de agar estéril. La placa se dejó incubar por 16 horas a 37 °C. Al siguiente día se tomaron colonias de ésta placa y se resuspendieron en 7 mL de NaCl 0.85 %. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se llevó a 0.8

Consecutivamente, se tomaron 0.75 mL del cultivo y se vertieron en tres microtubos estériles. Las células de dos de los microtubos se tiñeron con DAPI por lo que se agregaron 60 µL de la solución de trabajo. Los microtubos se dejaron en reposo por 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, los tres tubos se centrifugaron a 13 000 rpm durante dos minutos y medio, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0.75 mL de NaCl.

Los tres tubos se etiquetaron cómo “control”, “células viables” y “células no viables”. A los microtubos con las etiquetas “células viables” y “células no viables” se les agregaron 13 µL de la solución de bromuro de etidio 2.4 mM. Al microtubo con la etiqueta “control” se le agregaron 13 µL de agua desionizada con el fin de mantener el mismo volumen en los tres microtubos.

Posteriormente se agregaron 0.25 mL de ciprofloxacino 2 mg/mL en el microtubo de “células no viables”. En seguida se agregaron 0.25 mL de agua desionizada a los microtubos del “control” y de “células viables”. Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones sucesivas de cada microtubo como se muestra en el esquema.



De la Dilución 3 se tomaron 200  $\mu$ L y se sembraron en una placa de agar. El cultivo se dispersó en la placa con ayuda de un “cell scraper”. Éste procedimiento se siguió para sembrar una alícuota de los tres microtubos; “control”, “células viables” y “células no viables”.

A continuación se llevó al cabo el monitoreo del cultivo celular de los microtubos “células viables” y “células no viables” dentro de microchips de microfluídica para lo cual, se montó el sistema que se describe en la sección 3.7.1.

Ambos procedimientos se llevaron a cabo cada dos horas durante siete horas. Finalmente, las placas sembradas se incubaron durante 16 horas a 37°C.

Al siguiente día se llevó a cabo el conteo celular de las placas y el análisis de los videos obtenidos durante el monitoreo.

### **3.7.4 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE TRES ANTIBIÓTICOS CONOCIDOS EN MICROGOTAS**

El monitoreo de la actividad bactericida de gentamicina, ciprofloxacino y fosfomicina se llevó a cabo con los tres pares de tintas disponibles. Cada tinta se probó por duplicado en ensayos independientes con duración de siete horas. Por lo que, por cada antibiótico se realizaron seis experimentos.

Los pasos seguidos para la realización de los ensayos se enumeran a continuación.

#### **1.- PREPARACIÓN DE LA FASE OLEOSA: ACEITE FLUORINADO/KRYTOX**

Para la formación de microgotas se requiere una fase oleosa que permita cortar el flujo del cultivo celular y lo encapsule de forma que quede aislado del medio. Con éste fin se preparó una mezcla de aceite fluorinado y tensoactivo. En un eppendorf de 15 mL se pesaron 10 g de aceite fluorinado 2-(Trifluorometil)-3-etoxidodecafluorohexeno (Q165-07, Synquest Laboratories), posteriormente, se añadieron 0.37 g de tensoactivo Krytox®157 FSH Oil Perfluoropolieter (51798-33-5, Dupont) La mezcla se homogeneizó

y se tapó. Se mantuvo a temperatura ambiente cubriendo la tapa del tubo eppendorf con parafilm.

## 2.- PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE ANTIBIÓTICO

### GENTAMICINA

Se preparó una solución de gentamicina a 2 mg/mL. Para lo cual se taró un microtubo en una balanza analítica (J95431, Mettler AT250), posteriormente se pesaron 2 mg de sulfato de gentamicina (SLBK1443V, Sigma Aldrich, E.U.A.) y se disolvieron en 1 mL de agua destilada. La solución de gentamicina se preparó cada vez que el ensayo fue llevado a cabo. No fue posible almacenar la solución congelada debido a que se observó una disminución en su efectividad. La concentración final de gentamicina en el cultivo celular fue de 500 µg/mL.

### CIPROFLOXACINO

Se preparó una solución de ciprofloxacino a una concentración de 2 mg/mL. Primero se taró un microtubo en una balanza analítica (J95431, Mettler AT250), a continuación se pesaron 2 mg de ciprofloxacino (065M4176V, Sigma, E.U.A.) y se disolvieron en 500 mL de DMSO al 99.5% GC (D5879, Sigma Aldrich, E. U. A.) más 500 mL de agua destilada. La solución de ciprofloxacino se usó fresca, por lo que cada vez de se realizó el ensayo se preparó una nueva disolución. La concentración final de ciprofloxacino en el cultivo celular fue de 500 µg/mL.

### FOSFOMICINA

Se preparó una solución de fosfomicina a 1mg/ mL. Se taró un microtubo en la balanza analítica (J95431, Mettler AT250), en seguida se pesó 1 mg de fosfomicina (125M4168V, Sigma Aldrich, E.U.A) y se disolvió en 1 mL de agua destilada. Se preparó una solución de fosfomicina para cada ensayo llevado a cabo. La concentración final en el cultivo fue de 250 µg/mL.

### 3.- TINCIÓN CELULAR

Las células monitoreadas fueron teñidas previamente a su introducción al microchip, los pares de tintas usados para el monitoreo fueron DAPI-BE, DAPI-SX, y el kit LIVE/DEAD®. El procedimiento de tinción para cada tinta se describe a continuación.

#### DAPI-BROMURO DE ETIDIO, DAPI-SYTOX GREEN y LIVE/DEAD kit®

A continuación se describe el método de tinción descrito para los ensayos en microgotas con los tres pares de tintas DAPI-Bromuro de etidio, DAPI-Sytox Green y Live/Dead kit®.

Se tomaron colonias de *E. coli* de una placa de agar, sembrada 16 horas antes, se resuspendieron en 7 mL de una solución de NaCl 0.85%. Se midió la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm y se llevó a una OD<sub>600 nm</sub> de trabajo de 0.8.

En dos microtubos estériles se colocaron 0.75 mL de cultivo, en cada microtubo se añadieron 60 µL/15 µL de la solución de trabajo de la tinta DAPI/Syto 9® con lo que se obtuvo una concentración final de 4.0 µM/4.93 µM. Se dejaron incubar por 30 minutos, las células se centrifugaron a 13 000 rpm durante 2 minutos y medio, posteriormente se retiró el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 0.75 mL de NaCl 0.85%.

De la solución de trabajo de Bromuro de etidio/Sytox Green®/Yoduro de propidio a 2.4 mM/250 µM/2 mM, se tomaron 13 µL/21 µL/15 µL para cada microtubo. La concentración final de Bromuro de etidio/ Sytox Green®/Yoduro de propidio fue de 30.8 µM/5.14 µM/29.55 µM.

Posteriormente, ambos microtubos se etiquetaron, uno como “viables” y otro como “no viables”. Al microtubo con la etiqueta de “no viables” se le añadieron 0.25 mL del antibiótico correspondiente. Al microtubo etiquetado como “viables” se le agregó 0.25 mL de agua destilada. La densidad óptica se diluyó a 0.6, después de añadir ya sea la solución de antibiótico o agua destilada.

El avance de la actividad bactericida fue seguido con el set de filtros DAPI-50LP-A/FITC-5050-A para observar las células teñidas con DAPI/Syto 9® y con el set de filtros FITC-5050-A/LF561/LP-C para observar las células teñidas con Sytox Green®/Bromuro de etidio y yoduro de propidio.

### **3.7.5 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CON CÉLULAS *E. coli* BL21 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFOMICINA**

Se monitorearon cuatro concentraciones de fosfomicina; 50 µg/mL, 250 µg/mL, 375 µg/mL y 500 µg/mL. Se realizaron cuatro ensayos independientes en días distintos para analizar cada una de las concentraciones, por lo que las disoluciones del antibiótico se prepararon el día que se llevaría a cabo cada experimento.

Se prepararon cuatro soluciones de fosfomicina: 0.2 mg/mL, 1 mg/mL, 1.5 mg/mL y 2 mg/mL. Para preparar la solución de 0.2 mg/mL se pesaron 2 mg de fosfomicina y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada. La solución de 1 mg/mL se preparó pesando 1 mg de fosfomicina y disolviéndolo en 1 mL de agua desionizada. Para preparar la solución a una concentración de 1.5 mg/mL se pesaron 3 mg de fosfomicina y se disolvieron en 2 mL de agua desionizada. Finalmente, la solución a 2 mg/mL se preparó pesando 2 mg del antibiótico y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada.

El análisis de cada concentración se llevó a cabo cómo a continuación se describe.

Se tomó una colonia de células *E. coli* y se sembró en una placa de agar con medio LB. Las células se incubaron por 16 horas. Al día siguiente se tomaron colonias de la placa y se resuspendieron en 7 mL de solución salina al 0.85 % m/v. Se midió su densidad óptica a 600 nm y se ajustó a 0.8. Se tomaron 0.75 mL del cultivo y se vertieron en dos microtubos.

Posteriormente, se procedió a teñir las células con la tinta DAPI, por lo que se vertieron 60 µL de la solución de trabajo de la tinta DAPI. Se dejaron incubar por 30 minutos, en seguida, las células fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 2.5 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 0.75 mL de

NaCl 0.85%. A continuación, se tomaron 13  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo de bromuro de etidio 2.4 mM para cada microtubo.

Los microtubos fueron etiquetados cómo “viable” y “no viable”. Al microtubo marcado como “no viable” se le añadieron 0.25 mL de la solución de fosfomicina correspondiente para la concentración a analizar. Es decir, para la concentración 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se tomaron 0.25 mL de la solución de fosfomicina 0.2 mg/mL, para analizar la concentración 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se vertieron 0.25 mL de la solución 1 mg/mL, la concentración 375  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se obtuvo tras añadir 0.25 mL de fosfomicina a una concentración de 1.5 mg/mL, finalmente para la concentración 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se vertieron 0.25 mL de la solución de fosfomicina 2 mg/mL.

Al microtubo etiquetado cómo “viable” se le agregó éste mismo volumen (0.25 mL) de agua desionizada.

Finalmente, se procedió a montar el sistema experimental que se describe en la sección 3.7.1.

El comportamiento de las concentraciones en estudio se monitoreo cada hora durante 7 horas por medio de la adquisición de videos cuyas fotos instantáneas fueron analizadas por el procedimiento descrito en la sección 3.3

### **3.7.6 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CON CÉLULAS *E. coli* BL21 A 24 HORAS**

Los tres antibióticos se monitorearon durante 24 horas en un mismo experimento usando el par de tintas DAPI-BE. El procedimiento seguido se describe a continuación.

En primer lugar, se prepararon las soluciones de ciprofloxacino, gentamicina y fosfomicina cómo se describe en la sección 3.7.4.

En segundo lugar, se resuspendieron células de *E. coli* BL21, de una placa sembrada 16 horas antes, en 7 mL de NaCl a 0.85 % m/v. Se midió la  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  y se ajustó a 0.8.

Posteriormente, se vertieron 0.75 mL del cultivo a cuatro microtubos estériles. Las células se tiñeron con 60  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo de la tinta DAPI. Se dejaron a

temperatura ambiente por 30 minutos, las células fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 2.5 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 0.75 mL de NaCl 0.85%. A continuación, se tomaron 13  $\mu$ L de la solución de trabajo de bromuro de etidio 2.4 mM para cada microtubo.

En seguida, los cuatro microtubos se etiquetaron como “control”, “gentamicina”, “fosfomicina” y “ciprofloxacino”. Se añadieron 0.25 mL de agua desionizada al microtubo marcado como “control” en los tres microtubos restantes se agregaron 0.25 mL del antibiótico correspondiente.

Subsecuentemente se montó el sistema experimental para lo cual, se usaron cuatro réplicas en PDMS del microchip sellados en dos portaobjetos. En cada microchip se introdujo un cultivo celular distinto.

Se conectó el extremo de 20 cm de un tubo flexible de PTFE con un diámetro externo de 1.07 mm (Cole Parmer) a la aguja de una jeringa de 1 mL (Becton Dickinson). El extremo libre del tubo se colocó en el microtubo correspondiente y se procedió a succionar la mezcla de aceite fluorinado con Krytox®. La jeringa se llenó a la mitad de su capacidad y se eliminaron las burbujas presentes, en seguida se conectó el extremo del tubo a la entrada de la fase oleosa del microchip.

Posteriormente, se conectó el extremo de otros 20 cm de tubo PTFE a la aguja de una jeringa de 1 mL (Becton Dickinson). La jeringa se cargó a la mitad de su capacidad con el cultivo celular, se eliminaron las burbujas y el extremo libre del tubo flexible se conectó a la entrada de la fase acuosa del microchip dentro del pentágono. A continuación se cortaron 6 cm del tubo flexible y se conectó a la salida del microchip.

A continuación se siguió el mismo procedimiento para conectar el segundo microchip del portaobjetos en dónde se introdujo el cultivo con gentamicina.

Las cuatro jeringas se ajustaron en cuatro bombas de presión (NE-1000, New Era), en ellas se ajustó el diámetro de las jeringas utilizadas a 4.699 cm. Posteriormente, las dos bombas con las jeringas que contenían fase oleosa se programaron para entregar 20  $\mu$ L/h y las bombas con jeringas que contenían fase acuosa se programaron a 10  $\mu$ L/h.

Se tomaron los videos correspondientes, se detuvo el flujo de las cuatro bombas y se desmontaron las jeringas.

Después, se conectaron los dos microchips del portaobjetos restante usando el procedimiento descrito anteriormente. En cada uno de ellos se introdujeron los cultivos de ciprofloxacino y fosfomicina. Las cuatro jeringas se colocaron en las bombas y se tomaron los videos correspondientes. Se detuvo el flujo y se desmontaron las jeringas.

El montaje del sistema descrito se repitió después de 4, 17 y 24 horas.

Todos los videos adquiridos se analizaron a partir de imágenes instantáneas obtenidas de los mismos. El procedimiento para el conteo celular se describe en la sección 3.3.

## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

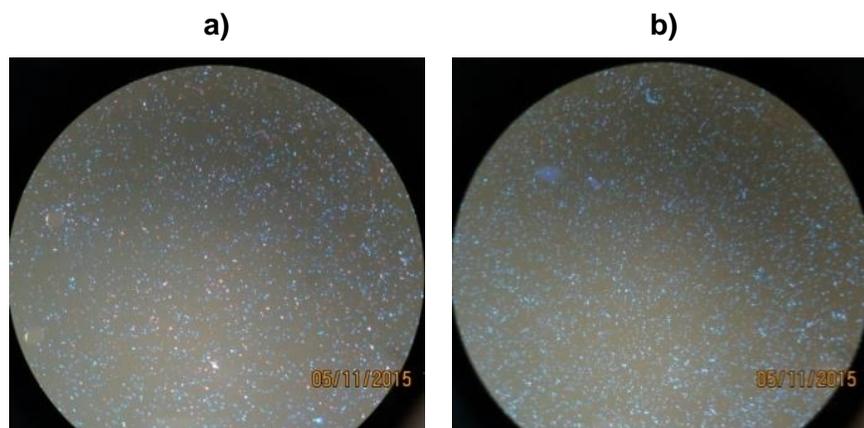
### 4.1 EXPERIMENTOS EN PORTAOBJETOS

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos en portaobjetos permitieron identificar las tintas que se usarían en el desarrollo del método experimental.

#### 4.1.1 CÉLULAS *E. coli* BL21 TEÑIDAS CON DAPI

Moléculas sin carga, como el 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), pueden permear a través de la doble membrana de las células *E. coli*, intercalarse en el material genético de las bacterias y producir fluorescencia. Esta tinta permite realizar un conteo total de las bacterias presentes en determinada muestra puesto que tiñe células viables y no viables. [8]

En las figuras 46 a) y b) se observan células viables provenientes de un cultivo fresco marcadas con DAPI. Los ensayos a) y b) se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones para evaluar la repetibilidad del ensayo.



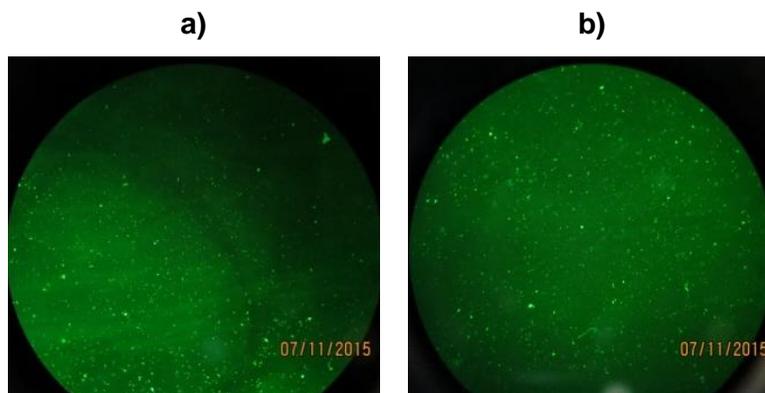
**Figura 34. Células viables teñidas con DAPI 4  $\mu$ M. A) Número de células contabilizadas: 2032 B) Número de células contabilizadas. 2325 Objetivo 20x. Set de filtros: DAPI-50LP-A**

En la figura anterior se observan células *E. coli* BL21 teñidas favorablemente, no se observa un fondo fluorescente que impida el conteo, la cantidad de células contabilizadas corresponde a la densidad óptica empleada y no se observa interferencia en ningún otro rango del espectro. Por estas razones se consideró como una tinta apropiada para continuar el estudio.

#### 4.1.2 CÉLULAS *E. coli* BL21 TEÑIDAS CON NARANJA DE ACRIDINA

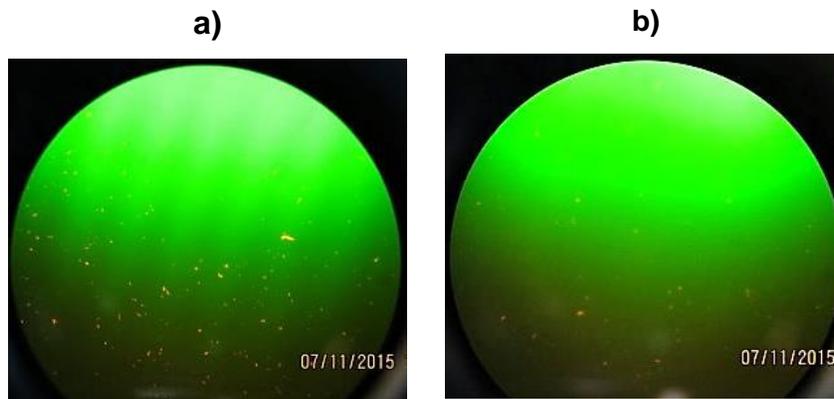
La molécula de naranja de acridina es una molécula sin cargas que puede permear la membrana de las células, una vez que se encuentra dentro de las células se intercala con el ADN y el ARN, de ésta forma se observa fluorescencia tanto de células vivas como muertas.

En la Figura 35 a) y b) se puede apreciar cómo se observan al microscopio las células de *E. coli* BL21 teñidas con naranja de acridina a una concentración 3.31  $\mu\text{M}$ . Se puede apreciar una gran cantidad de células de color verde que se encuentran dentro del rango de número de células esperado.



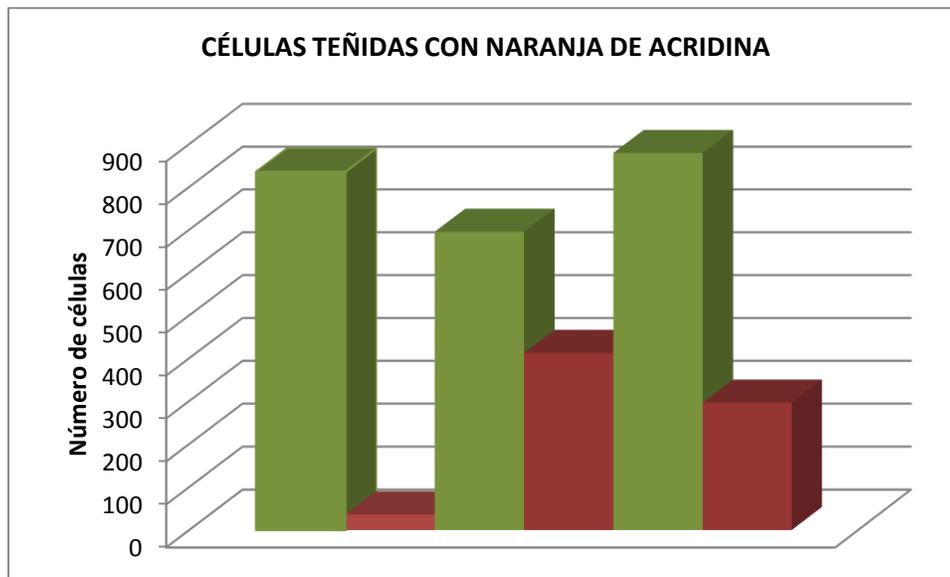
**Figura 35. Células teñidas con 3.31  $\mu\text{M}$  de Naranja de Acridina. A) Número de células contabilizadas:839 B) Número de células contabilizadas: 1072. Set de filtros: FITC-5050-A Objetivo 20x**

La tinta naranja de acridina presenta la desventaja de emitir fluorescencia a 650 nm cuando se encuentra unida al ARN (Figura 11), región en dónde emiten las tintas yoduro de propidio (625 nm) y bromuro de etidio (603 nm).[13] Debido a esta interferencia resulta imposible realizar un seguimiento de células no viables con cualquiera de éstos dos compuestos.



**Figura 36. Células teñidas con 3.31  $\mu\text{M}$  de Naranja de Acridina. A) Número de células contabilizadas: 212. B) Número de células contabilizadas: 91 .Interferencia en la región de los 600 nm. Set de filtros: LF561/LP-C**

En la Gráfica 1 se muestran los resultados de tres ensayos independientes realizados en diferentes días.



**Gráfica 1. Células teñidas con naranja de Acridina visualizadas con los filtros FITC-5050-A Y LF561/LP-C.** Cada barra verde representa las células contabilizadas con el filtro FITC-5050-A, cada barra roja correspondiente, representa las células contabilizadas con el filtro LF561/LP-C.

Como puede verse en la gráfica anterior, se observó una gran cantidad de células verdes en los tres ensayos, sin embargo, también se observó una cantidad aleatoria de células rojas en cada ensayo debido a la interferencia producida por la unión de la molécula de naranja de acridina con el ARN.

Los complejos formados por naranja de acridina con ácidos nucleicos de cadena sencilla emiten fluorescencia en tonalidad rojo a naranja, mientras que el producto de los complejos formados con ácidos nucleicos de doble cadena resultan en fluorescencia verde. Sin embargo, éste efecto metacromático se encuentra influenciado por la relación Naranja de acridina:Ácidos nucleicos. La interpretación clásica de éste efecto metacromático verde y rojo está basada en la relativa abundancia de ARN ribosomal y otras formas de ARN presentes en bacterias que se encuentran en crecimiento en contraste con una menor proporción ARN:ADN presente en células carentes de nutrientes. Debido a esto, de acuerdo con la interpretación clásica, las células que se observan de color verde se consideran inactivas mientras que las células que se observan de color rojizo se piensa que están activas. No obstante, la investigación que se ha desarrollado hasta el momento no ha permitido demostrar que ésta conjetura sea cierta puesto que no ha sido demostrado experimentalmente.[13]

Como consecuencia de la gran interferencia observada para cuantificar el aumento de células no viables, ya sea con yoduro de propidio o bromuro de etidio, que arrojaría resultados falso-positivos en la técnica de tinción diferencial por microscopía de fluorescencia; se decidió no continuar con el estudio de ésta tinta.

#### **4.1.3 CÉLULAS *E. coli* BL21 TEÑIDAS CON BROMURO DE ETIDIO. Tratamiento con calentamiento.**

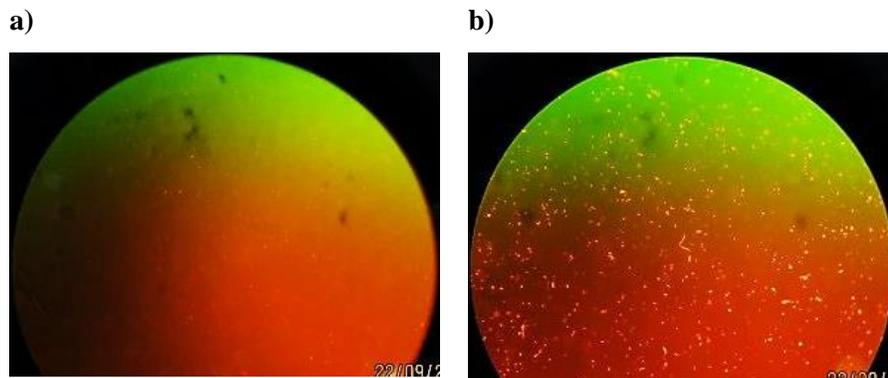
Trabajos anteriores demuestran que las células sometidas a una temperatura de 65°C por un periodo de 30 minutos pierden completamente su viabilidad [28] por lo que se consideró como un buen control para determinar si las tintas estudiadas teñían de forma cuantitativa las células no viables. Así mismo, éste control nos permitiría conocer el escenario que se debería esperar al usar antibióticos de gran potencial bactericida.

La molécula de bromuro de etidio presenta una carga positiva en su estructura, por lo que no es un compuesto permeable a la doble membrana de las células *E. coli*. Cuando la membrana de las mismas se encuentra comprometida, la tinta logra ingresar a la célula se intercala con el material genético (ADN y ARN) y produce fluorescencia. [6]

El tratamiento con calentamiento tiene un efecto letal sobre las bacterias por lo que inhabilita sus funciones vitales. Por lo que tintas con carga como el bromuro de etidio logran teñir las células que han dejado de ser viables. A continuación se muestra un ejemplo de las células teñidas y visualizadas en el microscopio después de haber sido sometidas a calentamiento por 30 minutos a 65°C. Sólo se muestra la concentración de bromuro de etidio 10.11  $\mu\text{M}$  debido a que la concentración 40  $\mu\text{M}$  arrojó resultados equivalentes.

En la figura 37 a) se observa el control de células vivas que no fueron sometidas al tratamiento con calentamiento, en donde el conteo de células marcadas fue de 21. Se sabe que, a pesar de que las células no hayan sido sometidas al efecto tóxico de algún agente, siempre existe una cantidad de bacterias que se encuentran muertas o que sufren algún daño durante el tratamiento de tinción.

Por otro lado en la figura 37 b), se observan las células que fueron sometidas al tratamiento con calentamiento; es evidente un aumento en el número de células contabilizadas (756) y en la intensidad de su fluorescencia.



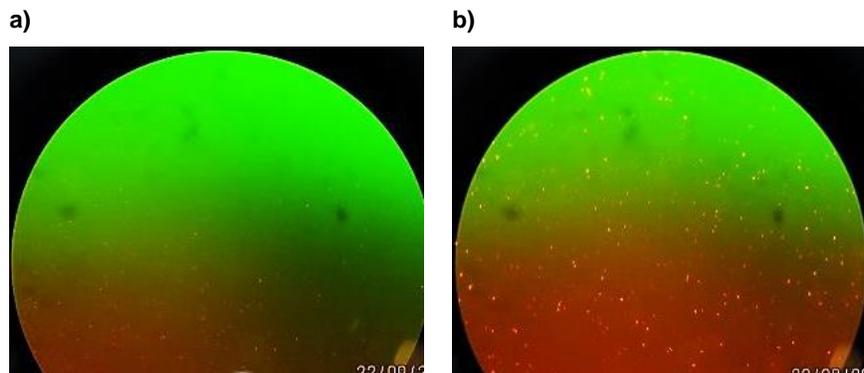
**Figura 37. Células teñidas con bromuro de etidio 10.11  $\mu\text{M}$**  a) Células sin calentamiento. Número de células contabilizadas: 29. b) Células tratadas con calentamiento (30 minutos a 65°C). Número de células contabilizadas: 756. Objetivo 20x. Set de filtros: LF561/LP-C

La diferenciación entre células viables y no viables que permite hacer ésta tinta resultó muy satisfactoria para el objetivo del presente trabajo, pues permite identificar con claridad las células que fueron sometidas a algún proceso bactericida. Por ésta razón, se eligió ésta tinta para continuar con estudios posteriores.

#### 4.1.4 CÉLULAS *E. coli* BL21 TEÑIDAS CON YODURO DE PROPIDIO. Tratamiento con calentamiento.

La molécula de yoduro de propidio presenta dos cargas positivas distribuidas en su estructura y es una molécula de gran tamaño, por lo que requiere que la membrana de la célula se encuentre comprometida para poder atravesarla y unirse a las bases de ADN para observar fluorescencia.

En la Figura 38 a) se observa el control de células vivas que no fueron tratadas con calor, se aprecian 70 células de poca fluorescencia. En la imagen 38 b) se muestran células tratadas con calor (65 °C por 30 minutos), en éste caso se aprecian 230 células.



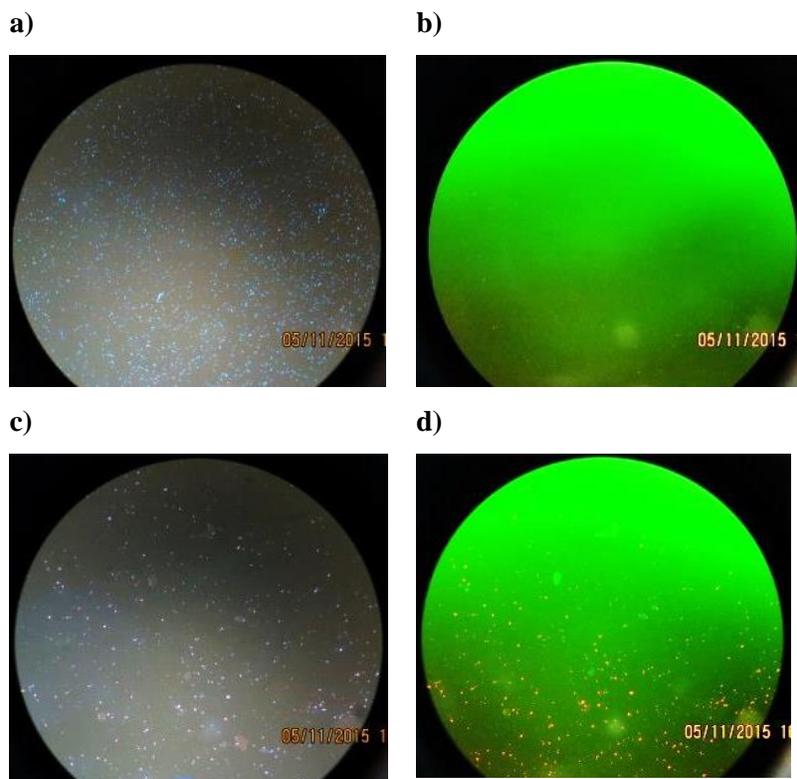
**Figura 38. Células teñidas con yoduro de propidio 10.06  $\mu$ M. a) Células sin calentamiento. Número de células contabilizadas: 70 b) Células tratadas con calentamiento. Número de células contabilizadas: 230. Objetivo 20x. Set de filtros: LF561/LP-C**

Como puede apreciarse en las imágenes anteriores, las pruebas realizadas con yoduro de propidio también arrojaron los resultados esperados; las bacterias no viables se tiñeron en mayor cantidad y presentaron una gran fluorescencia mientras que las células viables no se tiñeron en la misma proporción.

El compuesto de yoduro de propidio permite determinar si las bacterias son viables o no, una aparición de fluorescencia permite concluir que la membrana de la bacteria se encuentra comprometida y que la célula ya no es viable debido a que éstas células no pueden mantener o formar un gradiente electroquímico que genere el potencial de membrana, necesario para mantener a la célula aislada del ambiente externo, por lo que sus componentes externos quedan expuestos provocando su eventual descomposición.[29]

#### 4.1.5 CÉLULAS *E. coli* BL21 TEÑIDAS CON DAPI Y BROMURO DE ETIDIO. Tratamiento con calentamiento

Se realizó un estudio de tinción diferencial usando la tinta DAPI para marcar el total de células presentes en la muestra. Una parte de la población se sometió a calentamiento a 65°C por 30 minutos y la otra se mantuvo a temperatura ambiente. Posteriormente se utilizó bromuro de etidio para marcar las células no viables en ambos cultivos. A continuación se muestra un ejemplo de las células visualizadas al microscopio después de ambos tratamientos de tinción.



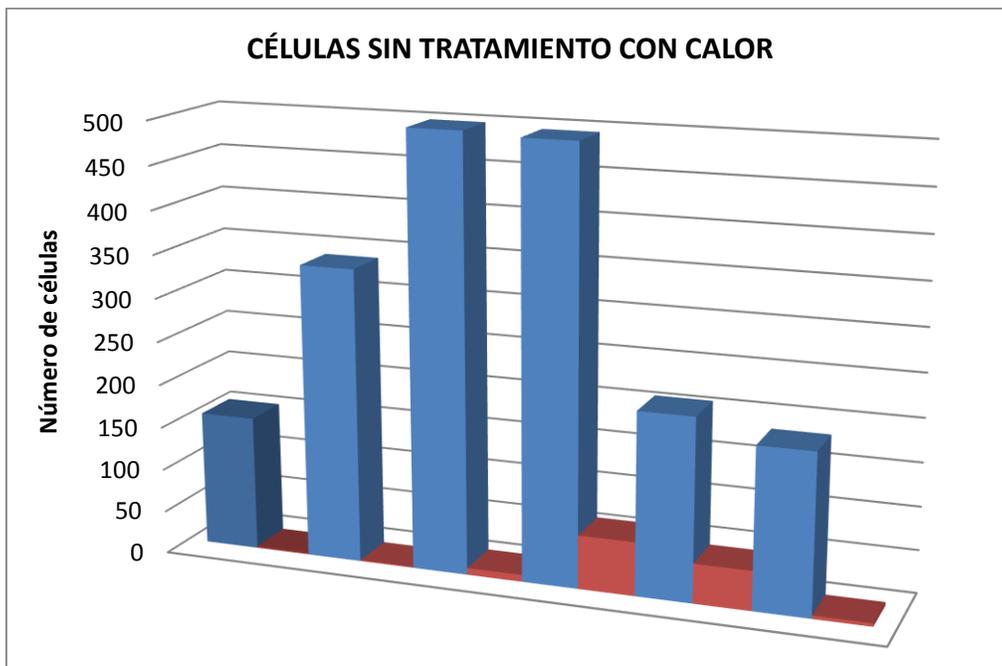
**Figura 39. Células teñidas con 4  $\mu$ M DAPI/ 30.8  $\mu$ M bromuro de etidio. a)** Células viables (sin calentamiento). Número de células contabilizadas: 708 Set de filtros DAPI-50LP-A. **b)** Células viables (sin calentamiento). Número de células contabilizadas: 11 Set de filtros: LF561/LP-C. **c)** Células no viables (sometidas a calentamiento). Número de células contabilizadas: 580 Set de filtros DAPI-50LP-A. **d)** Células no viables (sometidas a calentamiento). Número de células contabilizadas. 480. Objetivo 20x Set de filtros: LF561/LP-C.

En la figura 39 a) y b) se observa una muestra de células que no fueron sometidas a calentamiento. Pueden apreciarse 11 células marcadas de color rojo con la tinta bromuro de etidio mientras que el total de células azules marcadas con DAPI fue de

708. Expresado en porcentaje (tomando como 100 % las células azules) se observaron 1.56 % células no viables.

En la figura 39 c) y d) se aprecia una muestra de las células que fueron sometidas a calentamiento. Es notorio que la cantidad de células marcadas como no viables por la tinta bromuro de etidio se eleva de la forma esperada puesto que se observan 480 células teñidas de color rojos de un total de 580 células azules que fueron teñidas con DAPI. En éste caso se tiene un porcentaje de 82.75 %.

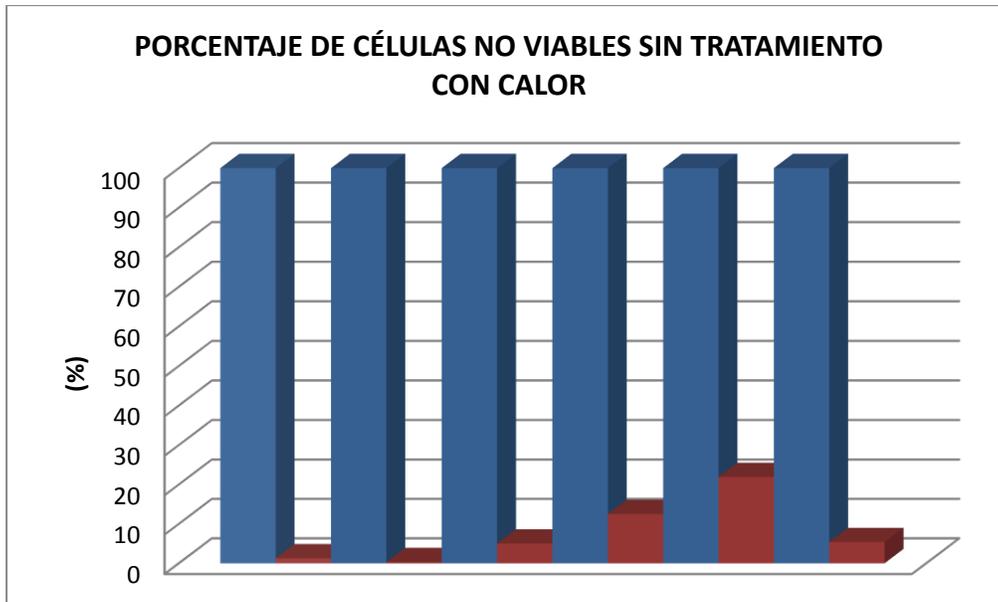
En la Gráfica 2 se muestra una recopilación de los datos de diferentes ensayos llevados a cabo de forma independiente para evaluar la repetibilidad.



**Gráfica 2. Células sin tratamiento con calor.** Cada par de barras (Azul-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de las células presentes que fueron marcadas por DAPI. Las barras rojas representan la cantidad de células no viables que fueron teñidas con bromuro de etidio.

En la gráfica anterior se observa una gran dispersión en la cantidad de células totales contabilizadas, esto se debe a la distribución aleatoria que presentaron las células en cada ensayo sobre el portaobjetos. No obstante, se muestra una clara tendencia en dónde la cantidad de células no viables observadas es muy baja en comparación al

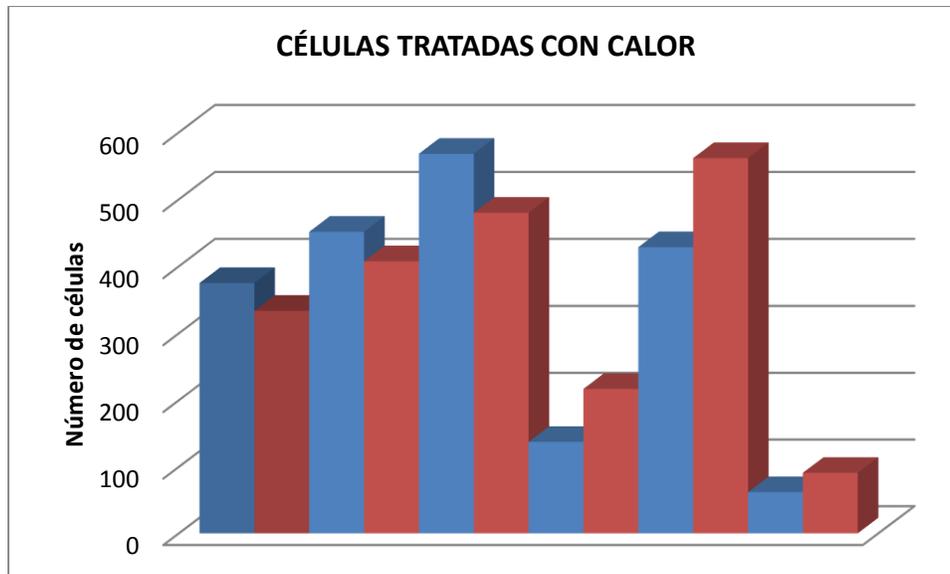
total de células presentes. Para identificar numéricamente el porcentaje de células no viables que se observaron en cada ensayo, se presenta la siguiente gráfica.



**Gráfica 3. Porcentaje de células no viables sin tratamiento con calor.** Cada par de barras (Azul-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de células presentes (100 %). Las barras rojas simbolizan el porcentaje de células no viables que fueron teñidas con bromuro de etidio.

Como se aprecia en la Gráfica 3; el porcentaje máximo de células no viables, que no fueron sometidas a tratamiento con calor, fue de 21.9 % y el mínimo de 0.3 %. Éste comportamiento es el esperado para células que no fueron sometidas a calentamiento debido a que su membrana se encuentra intacta y la tinta bromuro de etidio no logra ingresar a la célula.

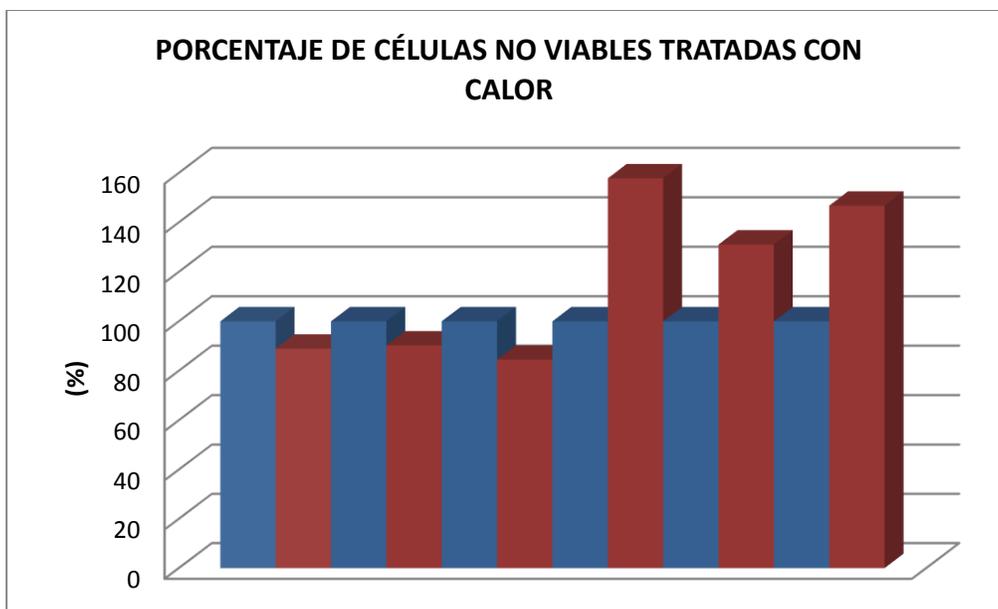
En la Gráfica 4 se presenta una serie de datos del comportamiento observado en ensayos independientes de células tratadas con calentamiento. En ésta gráfica se aprecia una tendencia por completo distinta a la que se observa en células sin calentamiento. Se observa que la cantidad de células no viables teñidas de rojo tiende a igualar o superar la cantidad de células totales teñidas de color azul con DAPI.



**Gráfica 4. Células tratadas con calor.** Cada par de barras (Azul-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de las células presentes que fueron marcadas por DAPI. Las barras rojas representan la cantidad de células no viables que fueron teñidas con bromuro de etidio.

En la Gráfica 5 se observa el comportamiento de los datos expresados en forma de porcentaje. Se observa un porcentaje mínimo de 88.9 % de células no viables que es 4.05 veces mayor que el máximo porcentaje de células no viables (21.9 %) observado en las células que no fueron tratadas con calor.

Debido a que, en algunos ensayos la cantidad de células rojas superó la cantidad de células azules, se observan porcentajes de células no viables mayores al 100%. Una explicación de éste comportamiento es que las moléculas de bromuro de etidio logran reemplazar a las moléculas de DAPI inhibiendo su fluorescencia.



**Gráfica 5. Porcentaje de células no viables tratadas con calor.** Cada par de barras (Azul-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de células presentes (100 %). Las barras rojas simbolizan el porcentaje de células no viables que fueron teñidas con bromuro de etidio.

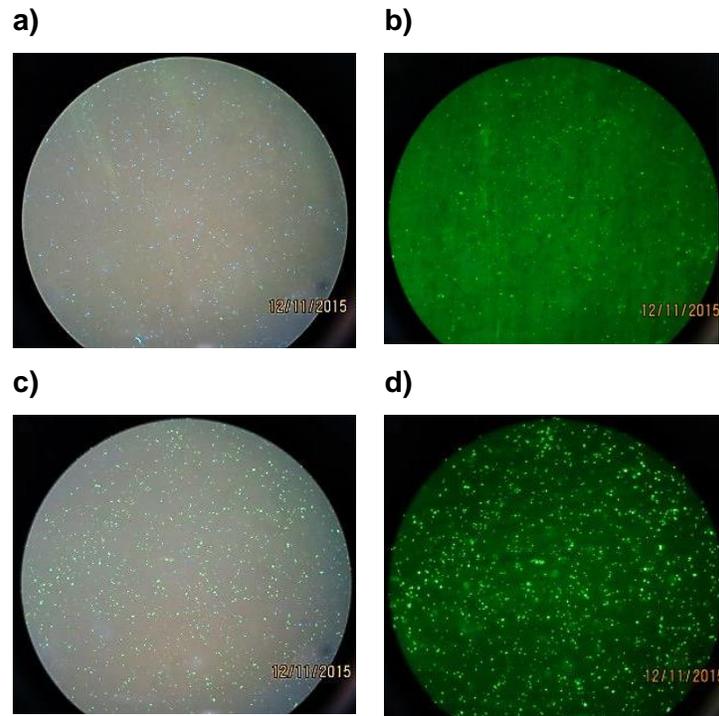
Este ensayo de células tratadas con calentamiento es un control positivo. Los datos obtenidos permiten identificar la tendencia que se observará al evaluar compuestos de gran potencial bactericida.

Estos resultados fueron favorables para el estudio que se llevó a cabo, ya que el par de tintas DAPI-BE permitió contabilizar el total de células presentes (DAPI) y discriminar entre células viables y no viables por medio del conteo de células rojas (BE) con una diferencia muy notoria. Por ésta razón, se eligió al par DAPI-BE para posteriores ensayos de tinción diferencial por microscopía de fluorescencia.

#### **4.1.6 CÉLULAS *E. coli* BL21 TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®. Tratamiento con calentamiento**

Se seleccionó el par de tintas DAPI-Sytox Green® para realizar ensayos de tinción diferencial. La totalidad de células en la muestra se marcaron nuevamente de color azul con la tinta DAPI, el marcaje de células no viables con la membrana comprometida se realizó con la tinta Sytox Green® (SX) que tiñe las células de color verde. El control de células no viables se realizó con células tratadas con calentamiento a 65 °C por 30 minutos, el control de células viables no fue sometido a tratamiento con calor.

En la siguiente figura se observa un ejemplo del comportamiento de las células teñidas con el par de tintas DAPI-SX

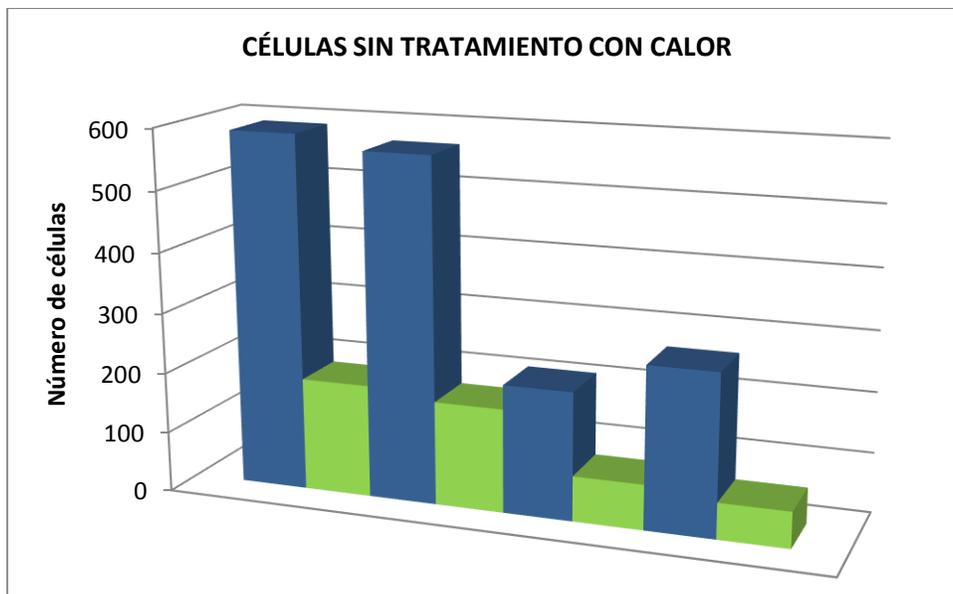


**Figura 40. Células teñidas con 4  $\mu\text{M}$  DAPI/ 5.14  $\mu\text{M}$  Sytox Green. a)** Células viables (sin calentamiento). Número de células contabilizadas: 589. Set de filtros DAPI-50LP-A. **b)** Células viables (sin calentamiento). Número de células contabilizadas: 187. Set de filtros FITC-5050-A. **c)** Células no viables (sometidas a calentamiento). Número de células contabilizadas: 1020. Set de filtros DAPI-50LP-A. **d)** Células no viables (sometidas a calentamiento). Número de células contabilizadas: 1128. Set de filtros FITC-5050-A. Objetivo 20x

En la figura 40 a) y b) se observan células que no fueron sometidas a calentamiento. Puede apreciarse un total de 589 células teñidas de color azul con DAPI y 107 células marcadas de color verde con la tinta Sytox Green<sup>®</sup>. Expresado en porcentaje (tomando como 100 % las células azules) se observaron 31.7 % células no viables.

En la figura 40 b) y c) se aprecian células sometidas a calentamiento. Se observa que la cantidad de células marcadas de color verde aumenta a 1128 células teñidas por Sytox Green<sup>®</sup> mientras que el total de células presentes en la muestra fueron 1020 por lo que se obtiene un porcentaje mayor al 100% de células no viables.

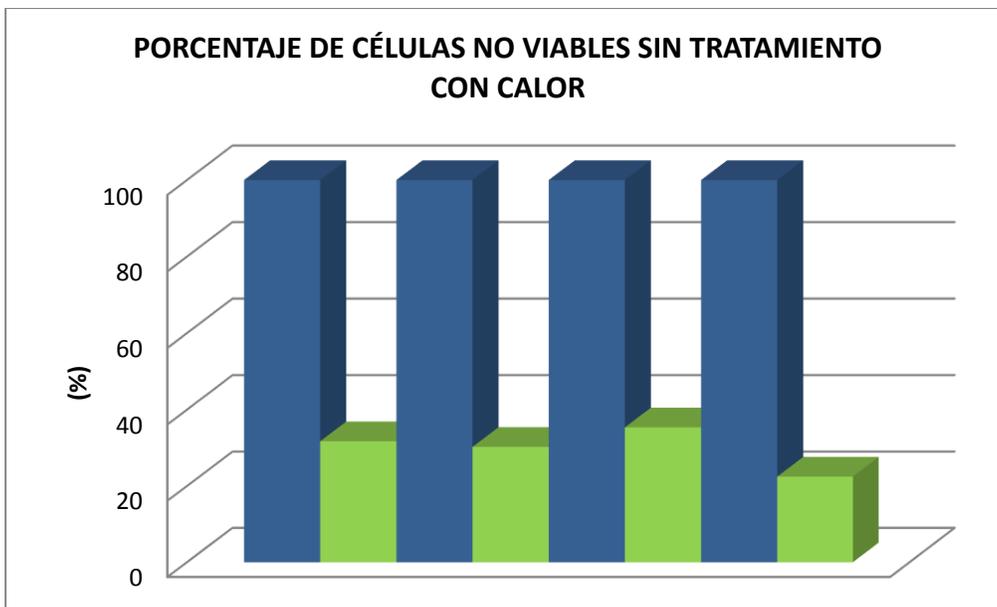
En las gráficas 6 y 7 se muestran las tendencias de los ensayos independientes llevados a cabo.



**Gráfica 6. Células sin tratamiento con calor.** Cada par de barras (Azul-Verde) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de las células presentes que fueron marcadas por DAPI. Las barras verdes representan la cantidad de células no viables que fueron teñidas con Sytox Green®.

En la Gráfica 6 también se observa una gran dispersión en la cantidad de células contabilizadas, debido a la distribución aleatoria de las células sobre el portaobjetos. Por otro lado, se observa que la cantidad de células no viables teñidas de color verde es baja en comparación al total de células presentes pero más alta que las contabilizadas con bromuro de etidio.

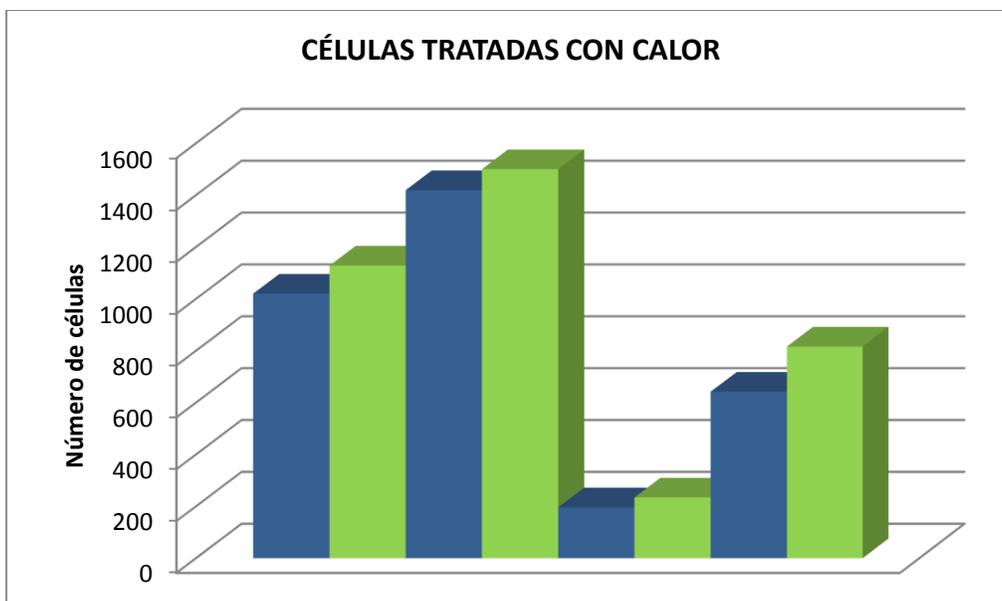
Para realizar una mejor comparación entre los pares de tintas ensayados, se presenta la Gráfica 7 que muestra el porcentaje de células no viables que se observaron en cada ensayo.



**Gráfica 7. Porcentaje de células no viables sin tratamiento con calor.** Cada par de barras (Azul-Verde) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de células presentes (100 %). Las barras verdes simbolizan el porcentaje de células no viables que fueron teñidas con Sytox Green®.

En la Gráfica 7 se observa un porcentaje mínimo de células no viables teñidas con Sytox Green® de 22.5 % y un porcentaje máximo de 35.4 %

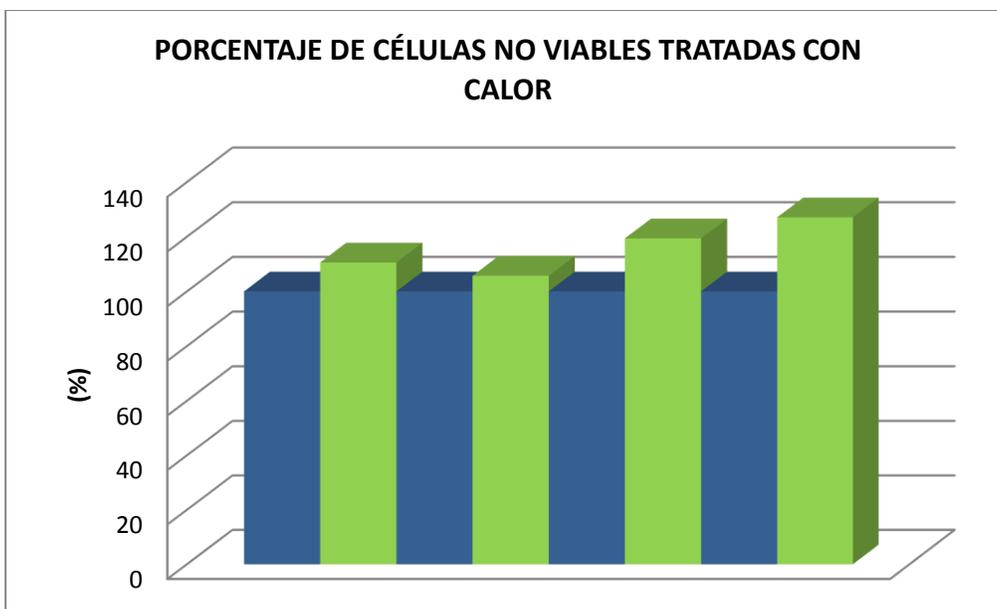
En la Gráfica 8 se muestra el comportamiento de las células sometidas a tratamiento con calentamiento a 65 °C por 30 minutos. Se observa una tendencia marcadamente distinta en comparación con las células que no fueron tratadas con calor. En todos los ensayos realizados con calentamiento, las células marcadas por Sytox Green® superan al total de células contabilizadas por DAPI.



**Gráfica 8. Células tratadas con calor.** Cada par de barras (Azul-Verde) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de las células presentes que fueron marcadas por DAPI. Las barras verdes representan la cantidad de células no viables que fueron teñidas con Sytox Green®.

En la Gráfica 9 se observa el porcentaje de células no viables tratadas con calor. Se observa un porcentaje mínimo de 105.7 % de células no viables que es 2.98 veces mayor que el máximo porcentaje de células no viables (35.4 %) observado en las células que no fueron tratadas con calor.

Debido a que el número de células no viables superó en todos los ensayos al total de células teñidas con DAPI, se observan porcentajes mayores al 100%. Es posible que en éstos casos, la tinta Sytox Green® reemplace a las moléculas DAPI que se encuentran intercaladas en el material genético y debido a esto se observe una mayor cantidad de células de color verde.



**Gráfica 9. Porcentaje de células no viables tratadas con calor.** Cada par de barras (Azul-Verde) representa un ensayo independiente. Las barras azules simbolizan el total de células presentes (100 %). Las barras verdes simbolizan el porcentaje de células no viables que fueron teñidas con Sytox Green®.

En el control de células tratadas con calentamiento; las células marcadas como muertas por la tinta Sytox Green® superan el total de células contabilizadas con DAPI en todos los casos. Lo cual no sucede en el control de células que no fueron sometidas a calentamiento, en dónde si bien la cantidad de células marcadas como muertas es alta, no supera el 35.4 % del total.

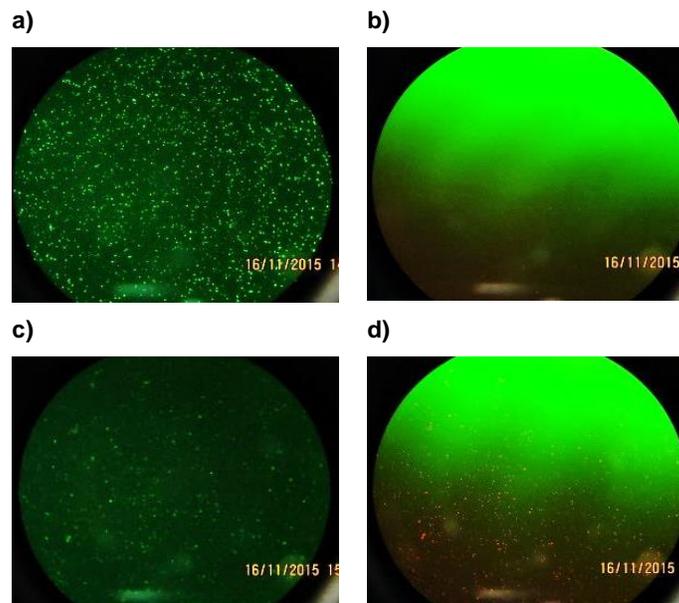
Las gráficas obtenidas con éste par de tintas permiten diferenciar las células que fueron sometidas a algún procedimiento bactericida, de las que no. Por ésta razón, el par de tintas DAPI-SX se eligió para seguir siendo estudiado.

#### **4.1.7 CÉLULAS *E. coli* BL21 TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO. Tratamiento con calentamiento**

Actualmente existe en el mercado un kit para determinar la viabilidad celular comercializado por la compañía Molecular Probes. Éste juego de tintas consta del compuesto conocido como Syto 9 que es una molécula no iónica capaz de penetrar la membrana de la célula uniéndose a las bases del ADN y emitiendo una fluorescencia verde con un máximo a 500 nm. El yoduro de propidio es un compuesto que atraviesa únicamente la membrana comprometida de células no viables.

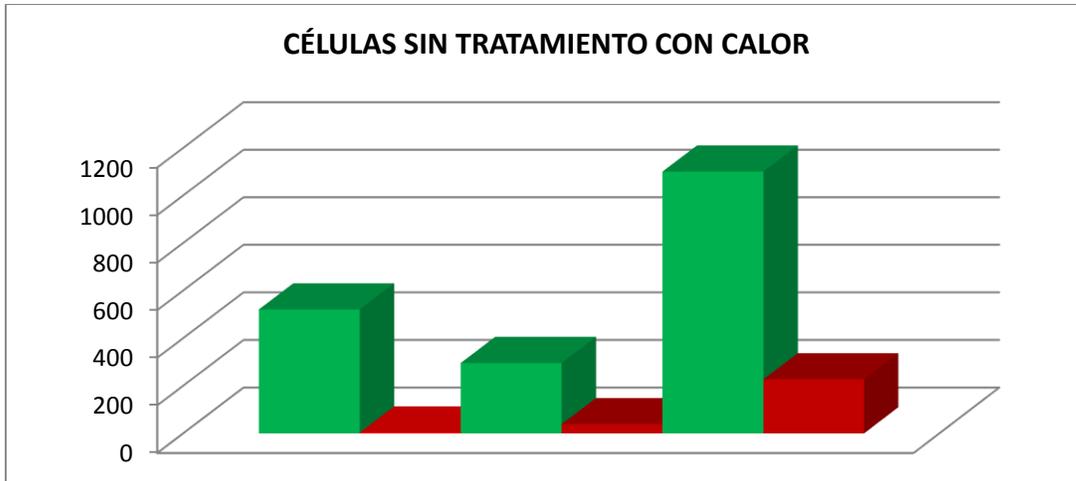
La constante de afinidad del yoduro de propidio ( $K_{afinidad} = 3.7 \times 10^5/M$ ) por las bases del ADN es mayor que la del Syto 9 ( $K_{afinidad} = 1.8 \times 10^5/M$ ), es por esto que el kit está diseñado para que en las células muertas disminuya la fluorescencia verde y se observe únicamente la presencia del yoduro de propidio. [30]

En las figuras 41 a) y b) se observan células viables vistas a través de los dos filtros en donde la cantidad de células marcadas por el yoduro de propidio es mínima (3 células) en comparación de las células viables teñidas con Syto 9 (479 células). En las figuras c) y d) se presentan células tratadas con calentamiento. Se puede apreciar que la cantidad de células teñidas con Syto 9 disminuye considerablemente (143 células) mientras que las células marcadas como muertas aumentan (384 células).



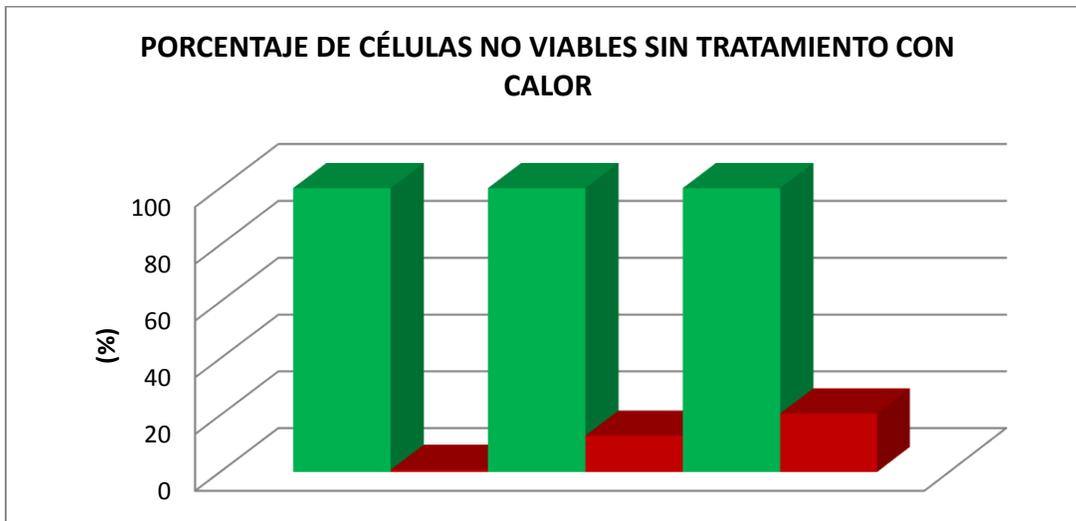
**Figura 41. Células teñidas con 4.93  $\mu$ M Syto 9/ 29.55  $\mu$ M yoduro de propidio.** a) Células viables (sin calentamiento). Número de células contabilizadas: 479. Set de filtros FITC-5050-A. b) Células viables (sin calentamiento). Número de células contabilizadas. 3. Set de filtros: LF561/LP-C. c) Células no viables (sometidas a calentamiento). Número de células contabilizadas: 143. Set de filtros FITC-5050-A. d) Células no viables (sometidas a calentamiento). Número de células contabilizadas. 384. Set de filtros: LF561/LP-C. Objetivo 20x.

En la Gráfica 10 se observan repeticiones del ensayo para células sin tratamiento por calentamiento. A pesar de que se aprecia una gran dispersión entre los datos debido a las condiciones del ensayo anteriormente mencionadas, también se puede distinguir una cantidad mínima de células no viables de color rojo en comparación de las células viables marcadas de color verde.



**Gráfica 10. Células sin tratamiento con calor.** Cada par de barras (Verde-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras verdes simbolizan el total de las células presentes que fueron marcadas por Syto 9®. Las barras rojas representan la cantidad de células no viables que fueron teñidas con yoduro de propidio.

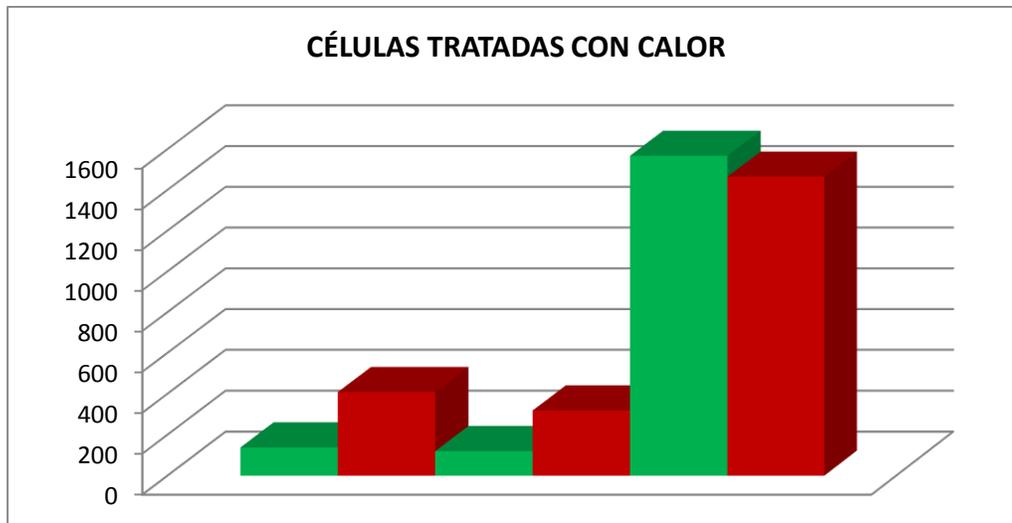
En la Gráfica 11 se muestran los datos de los ensayos de células sin tratamiento con calentamiento, expresadas en porcentaje. En éste caso se tomó como 100% la cantidad de células observadas en color verde. Se aprecia un porcentaje mínimo de células no viables de 0.8% y un máximo de 20.6%



**Gráfica 11. Porcentaje de células no viables sin tratamiento con calor.** Cada par de barras (Verde-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras verdes simbolizan el total de células presentes (100 %). Las barras rojas simbolizan el porcentaje de células no viables que fueron teñidas con yoduro de propidio.

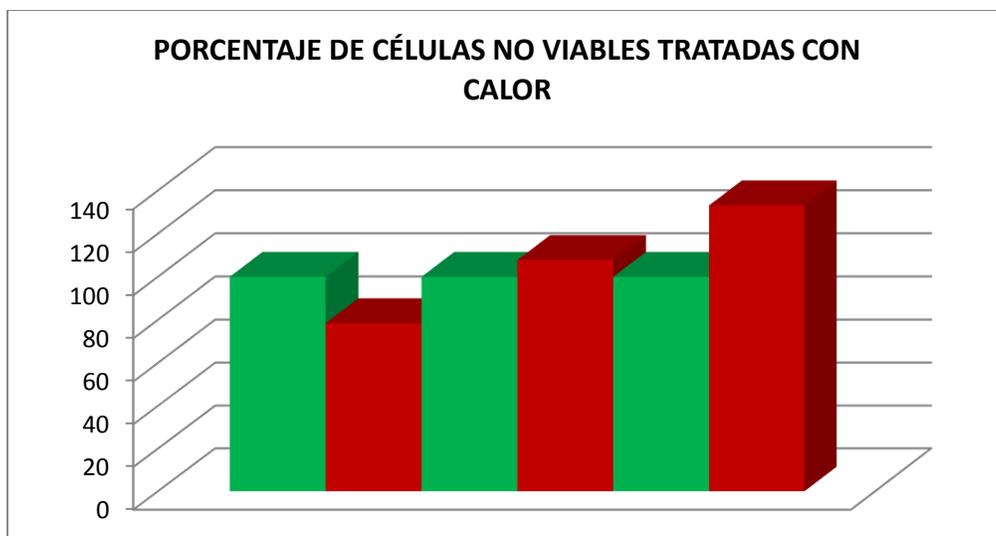
La Gráfica 12 muestra los datos de los ensayos con células tratadas con calor. Se observan fluctuaciones importantes en los datos puesto que, no en todos los ensayos se observa la tendencia de una disminución de células marcadas como células viables

en comparación con el control de células que no fueron tratadas con calor (Gráfica 10). Sin embargo, la cantidad de células tratadas con calentamiento que se observaron teñidas de color rojo fue mucho mayor en todos los ensayos en comparación con el control de células sin calentamiento. En dos de las tres repeticiones realizadas se observa que el conteo de células rojas supera al conteo de células viables teñidas de color verde.



**Gráfica 12. Células tratadas con calor.** Cada par de barras (Verde-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras verdes simbolizan el total de las células presentes que fueron marcadas por Syto 9®. Las barras rojas representan la cantidad de células no viables que fueron teñidas con yoduro de propidio.

Si el funcionamiento del kit coincidiera a la perfección con las especificaciones del fabricante, entonces después del calentamiento las células verdes deberían desaparecer y solo quedar rojas sería imposible sacar un % o sería enorme. Por lo tanto, el porcentaje de células no viables se sacó asumiendo cómo 100% el número de células verdes contabilizadas en el control (células sin calentamiento) correspondiente a cada ensayo.



**Gráfica 13. Porcentaje de células no viables sin tratamiento con calor.** Cada par de barras (Verde-Rojo) representa un ensayo independiente. Las barras verdes simbolizan el total de células presentes (100 %). Las barras rojas simbolizan el porcentaje de células no viables que fueron teñidas con yoduro de propidio.

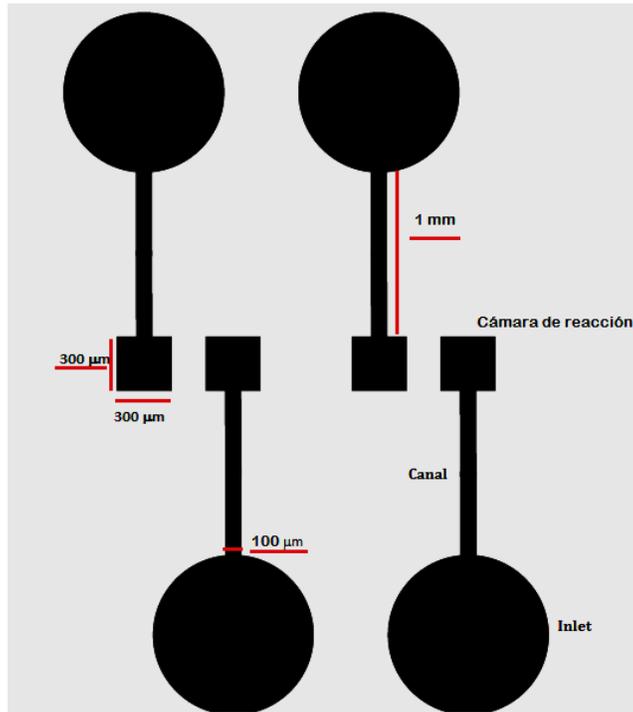
Los datos recopilados demuestran que éste kit permite distinguir entre células viables y no viables. A pesar de que se esperaba que la cantidad de células verdes disminuyera en todos los ensayos de células tratadas con calor, esto no es un impedimento para discriminar entre células vivas y muertas debido a que la determinación de no viabilidad se puede determinar a partir del aumento del número de células rojas. La cantidad de células teñidas de color rojo aumenta en el control de células tratadas con calentamiento, mientras que el control de células viables se mantiene en números bajos.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DE MICROCHIPS

### 4.2.1 MICROCHIPS SIN FLUJO

En las siguientes imágenes se muestra una de las fotos tomadas en diferentes cortes transversales realizados en distintas secciones de microchip: el canal, la cámara de reacción y la entrada (Figura 42.A). Así mismo, se observan las medidas obtenidas y la desviación estándar correspondiente.

A)



B)

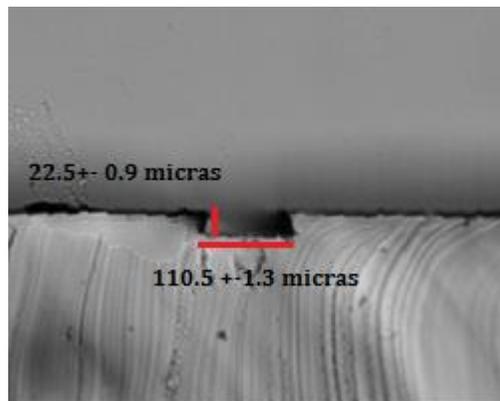
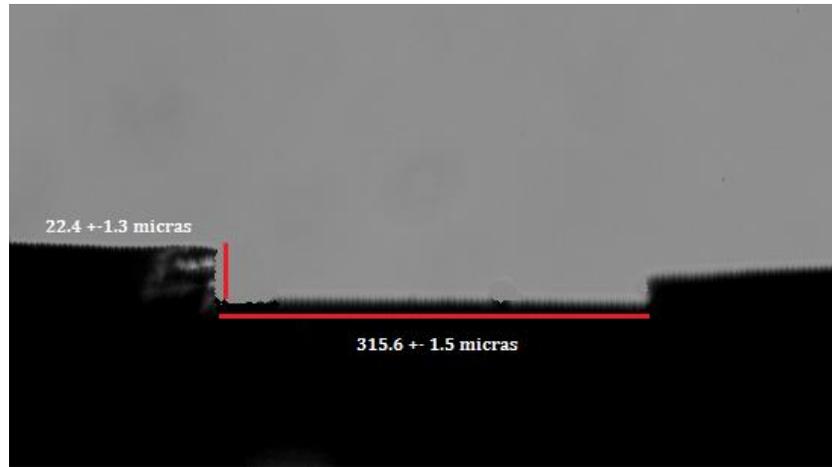
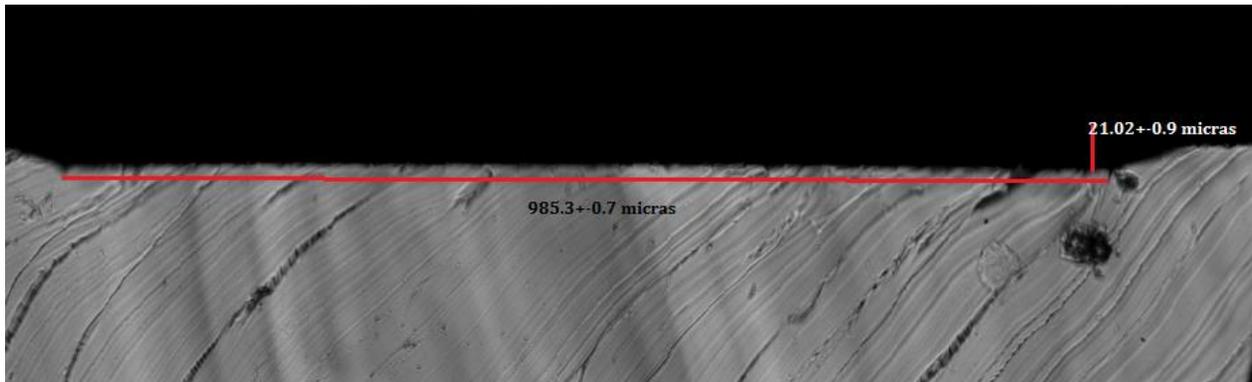


Figura 42. A) Diseño del microchip. Microchip sin flujo. B) Corte transversal realizado en el canal para caracterizar ancho y altura. 110.5 micras de ancho por 22.5 micras de alto.



**Figura 43. Cámara de observación.** 315.6 micras de ancho por 22.4 micras de alto.



**Figura 44. Entrada.** 985.3 micras de ancho por 21.02 micras de alto

El procedimiento seguido para realizar el molde maestro con la resina polimérica se planeó para obtener microchips con 20 micrómetros de profundidad. En las imágenes anteriores se observa que obtuvo una profundidad ligeramente mayor en todas las secciones del microchip caracterizadas. Los cortes realizados permiten apreciar una buena geometría (rectangular) en el canal y en la cámara de reacción, sin embargo la entrada del microchip muestra una figura en forma de trapecio, esto se debe a una mayor exposición a la luz UV.

Por otro lado, el diseño del canal del microchip se realizó con un ancho de 100 micras, sin embargo los microchips fabricados se obtuvieron con un ancho promedio de 110.5 micras, es decir: 10.5 micras mayor al diseño realizado.

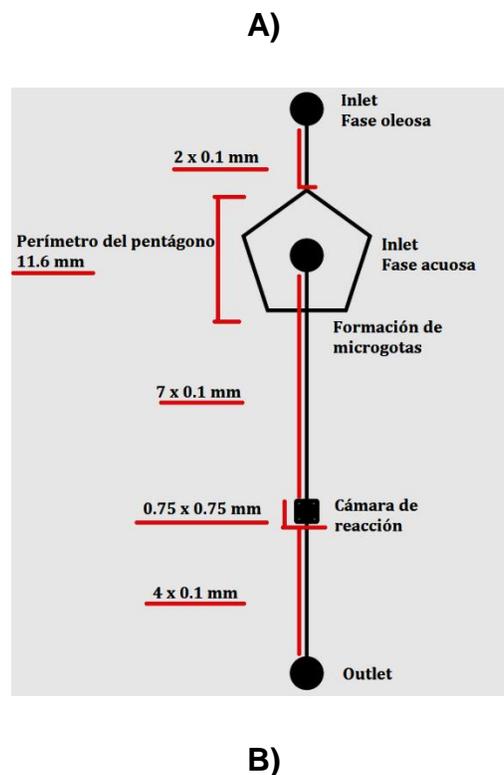
La cámara de reacción del diseño tiene una longitud de 350 micras por lado; la magnitud de los microchips obtenidos fue de 315.6 micras por lado. Esto es 34.4 micras menor al diseño realizado.

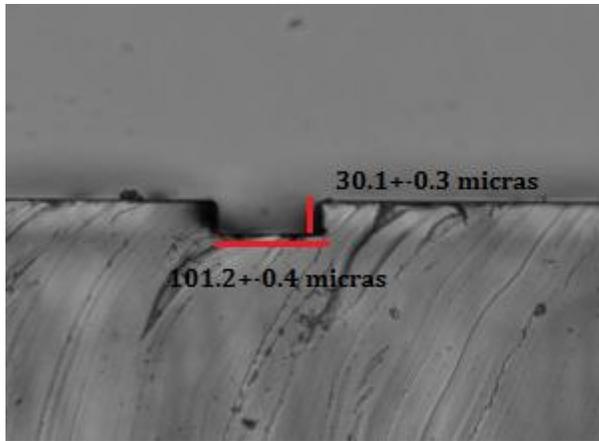
Por último, la entrada del microchip se diseñó con un diámetro de 1 mm, el promedio del diámetro obtenido tras la caracterización fue de 985.3; 14.7 micras más pequeño que el diseño.

Si bien existen diferencias entre el tamaño del diseño realizado, en comparación con las réplicas en PDMS caracterizadas (obtenidas a través del molde maestro), no son significativas para el desarrollo del experimento.

#### 4.2.2 MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO

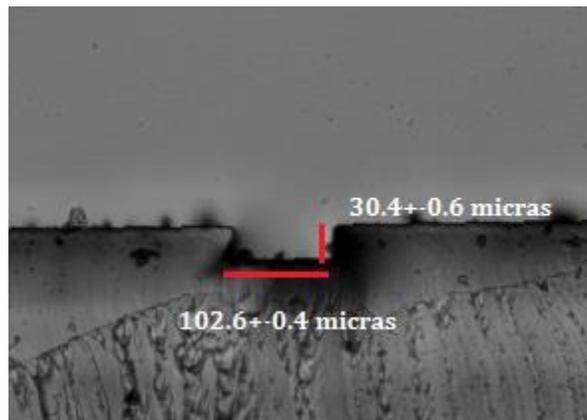
En las siguientes imágenes se muestra un ejemplo de las fotografías tomadas a los cortes transversales realizados en las réplicas del microchip (Figura 45.A). También se observan las dimensiones de cada sección del dispositivo.





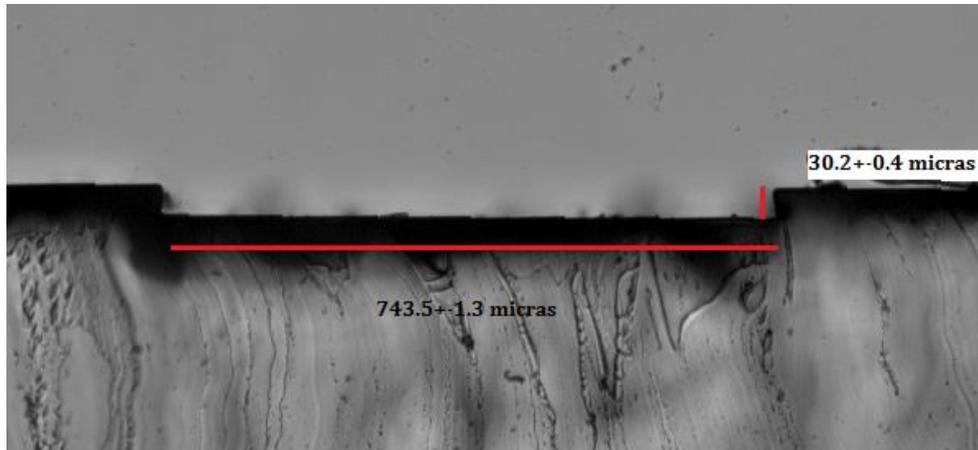
**Figura 45. A) Diseño del microchip.** Microchip de flujo continuo. **B) Canal del microchip.** 101.2 micras de ancho por 30.1 micras de profundidad.

El diseño del microchip de flujo continuo se realizó con canales de 100  $\mu\text{m}$  de ancho. El promedio de los canales obtenidos en el proceso de fabricación fue de 101.2  $\mu\text{m}$ , lo cual representa una diferencia mínima.



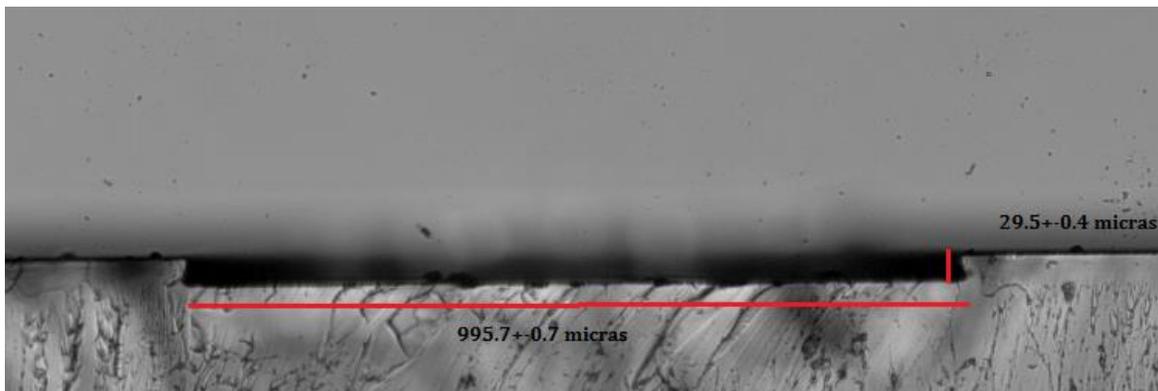
**Figura 46. Canal del pentágono.** 102.6 micras de ancho por 30.4 micras de profundidad.

Los canales que forman el pentágono también se diseñaron con 100  $\mu\text{m}$  de ancho, al igual que el resto de los canales. Las dimensiones obtenidas difieren de forma mínima en 2.6  $\mu\text{m}$ .



**Figura 47. Cámara de observación.** 743.5 micras de ancho por 30.2 micras de profundidad.

Por otro lado, la cámara de reacción del microchip se diseñó con una geometría cuadrada de 750  $\mu\text{m}$  por lado. Las réplicas obtenidas presentaron una dimensión promedio de 743.5  $\mu\text{m}$ , lo que difiere en 6.5 unidades del diseño.



**Figura 48. Entradas del microchip.** 995.7 micras de ancho por 29.5 micras de profundidad.

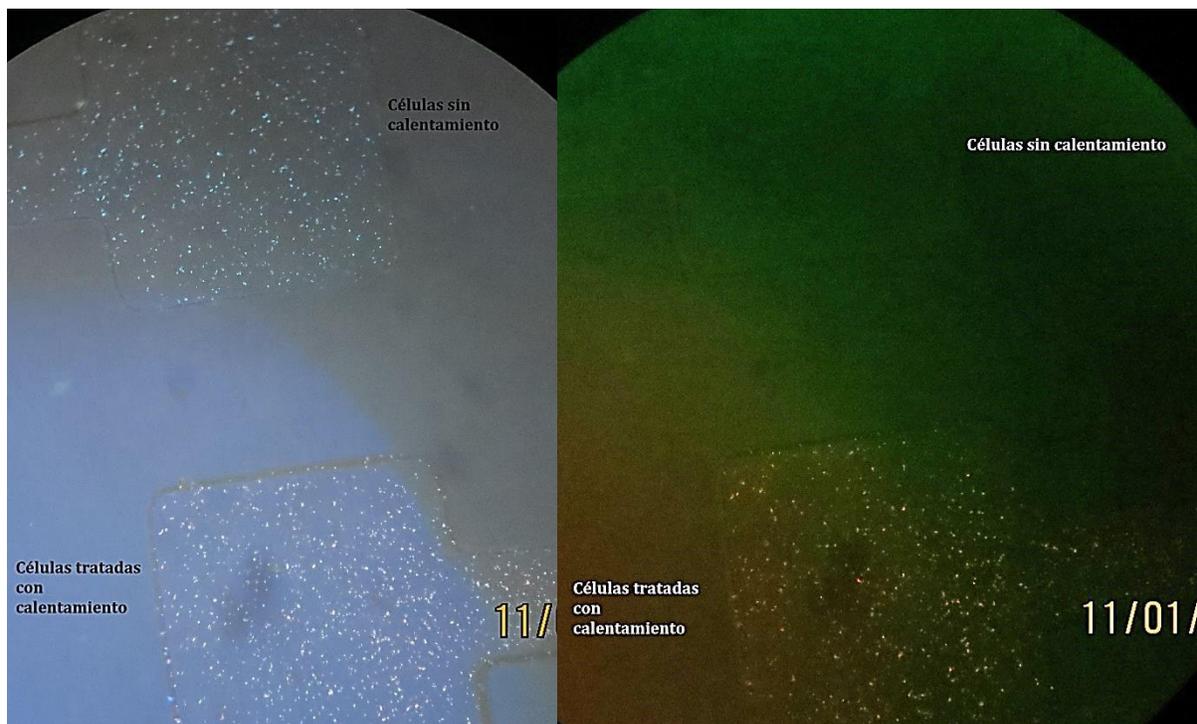
Finalmente, las entradas al microchip se diseñaron en forma de circunferencia, con un diámetro de 1 mm. Las réplicas caracterizadas contaron con un promedio de 995.7  $\mu\text{m}$  de diámetro.

La profundidad del microchip se planeó de 30  $\mu\text{m}$ . En las imágenes se observa que la profundidad en todas las secciones del microchip corresponde en gran medida a los 30  $\mu\text{m}$  planeados, observando ligeras desviaciones.

#### 4.3 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROCHIPS SIN FLUJO

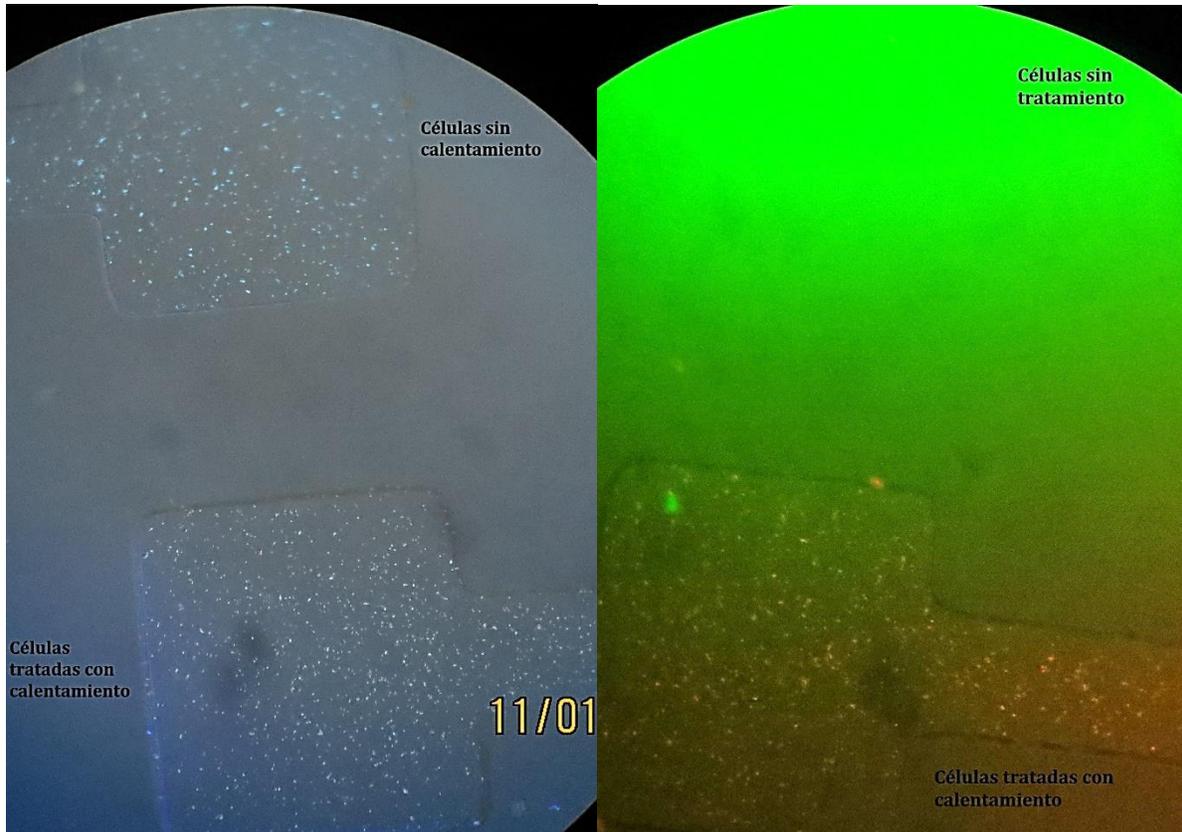
Los primeros ensayos de monitoreo de viabilidad celular dentro de microchips se llevaron a cabo usando el dispositivo de microfluídica sin flujo (Figura 42.A). En el cual se introduce una pequeña cantidad de cultivo (2.016 nanolitros) la cual se puede observar por largos periodos de tiempo. El objetivo de éste experimento consistió en monitorear la viabilidad de las mismas células por un tiempo determinado y posteriormente observar el efecto bactericida de un antibiótico al apreciar un aumento en el número de células no viables. Se monitorearon células viables y células tratadas con calor por 3 horas.

En las siguientes imágenes se muestran los resultados obtenidos con el par de tintas DAPI-BE.

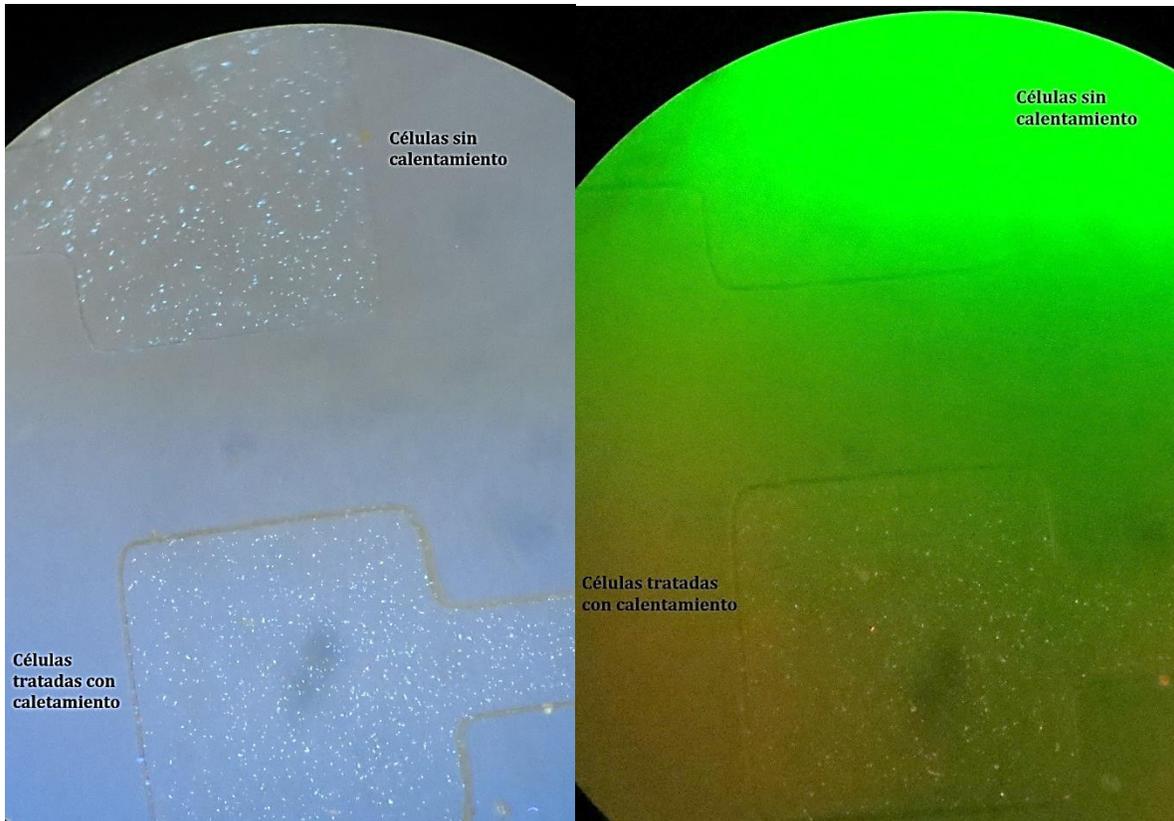


**Figura 49. Células teñidas con el par DAPI-BE. Tiempo=30 minutos. A) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro DAPI-50LP-A.** En el canal superior se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 480. En el canal inferior se observan células sometidas a tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 576. **B) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro LF 561/LP-C.** En el canal superior se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 0. En el canal inferior se aprecian células tratadas con calentamiento. Número de células contabilizadas 376.

El comportamiento observado en la figura 49 A y B es el esperado para células con y sin tratamiento con calentamiento. Las células que no fueron tratadas con calentamiento sólo se observan en el filtro DAPI-50LP-A debido a que son células viables, por otro lado, las células tratadas con calentamiento se observan en ambos filtros debido a que, después de ser tratadas al efecto bactericida del calor, la tinta bromuro de etidio logró penetrar la membrana y unirse al material genético.



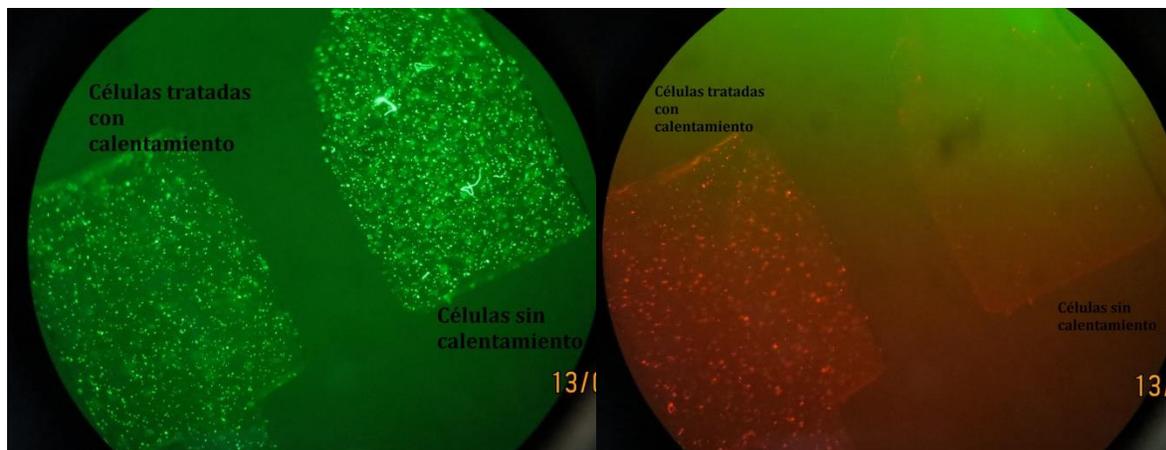
**Figura 50. Células teñidas con el par DAPI-BE. Tiempo= 1 hora 30 minutos. A) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro DAPI-50LP-A.** En el canal superior se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 318. En el canal inferior se observan células sometidas a tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 406. **B) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro LF 561/LP-C.** En el canal superior se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 0. En el canal inferior se aprecian células tratadas con calentamiento. Número de células contabilizadas 293.



**Figura 51. Células teñidas con el par DAPI-BE. Tiempo=2 horas 30 minutos. A) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro DAPI-50LP-A.** En el canal superior se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 295. En el canal inferior se observan células sometidas a tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 406. **B) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro LF 561/LP-C.** En el canal superior se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 0. En el canal inferior se aprecian células tratadas con calentamiento. Número de células contabilizadas 104.

Cómo puede observarse en la figura 49, 50 y 51; el número de células contabilizadas disminuyó considerablemente en función del tiempo tanto en el conteo del número total de células, cómo en el conteo de número de células no viables. El comportamiento esperado para éste ensayo consistía en observar la misma cantidad de células totales durante todo el experimento, se esperaba que el número de células no viables también se mantuvieran constantes o con un ligero aumento debido a la falta de nutrientes del medio.

Al no observar resultados favorables, se procedió a probar el kit de tintas LIVE/DEAD® cuyos resultados se muestran en las siguientes imágenes.



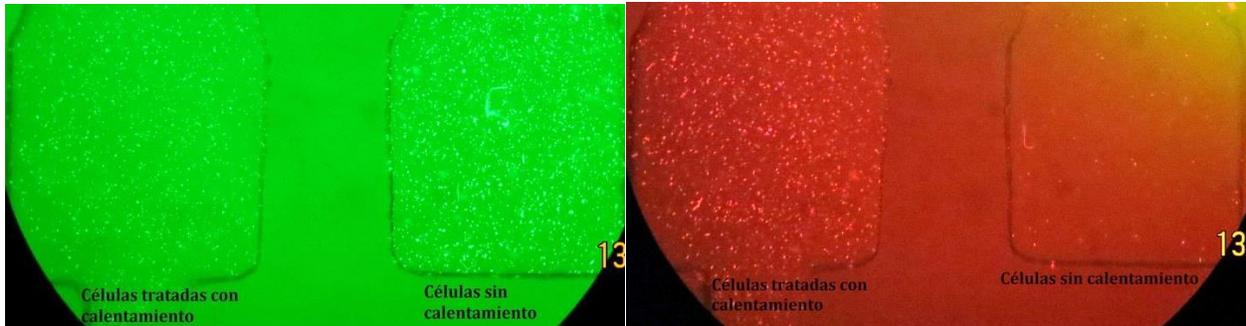
**Figura 52. Células teñidas con el kit LIVE/DEAD®. Tiempo=30 minutos. A) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro FITC-5050-A.** En el canal derecho se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 811. En el canal izquierdo se observan células sometidas a tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 707. **B) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro LF 561/LP-C.** En el canal derecho se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 63. En el canal izquierdo se aprecian células tratadas con calentamiento. Número de células contabilizadas 456.

En la Figura 52 se observa el comportamiento esperado, en dónde sólo las células tratadas con calentamiento se aprecian teñidas en mayor cantidad por la tinta yoduro de propidio. Muy pocas de las células que no fueron sometidas a calentamiento se observan teñidas de color rojo. El número de células viables teñidas por Syto9® disminuye en cantidad e intensidad en las células tratadas con calentamiento en comparación con el control de células que no fueron tratadas con calor.



**Figura 53. Células teñidas con el kit LIVE/DEAD®. Tiempo= 1 hora 30 minutos. A) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro FITC-5050-A.** En el canal derecho se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 763. En el canal izquierdo se observan células sometidas a tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 53. **B) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro LF 561/LP-C.** En el canal derecho se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 51. En el canal izquierdo se aprecian células tratadas con calentamiento. Número de células contabilizadas 410.

En la figura 53.A se observa una marcada disminución en el número de células viables tratadas con calentamiento (canal izquierdo) esto puede atribuirse al desplazamiento de la tinta Syto9® por el yoduro de propidio, tal como lo indica el fabricante). Por otro lado, también se observa una ligera disminución en el número de células que se muestran en el canal derecho, así como en las células teñidas por yoduro de propidio, lo cual puede deberse a un efecto de photobleaching común en compuestos fluorocromóforos.

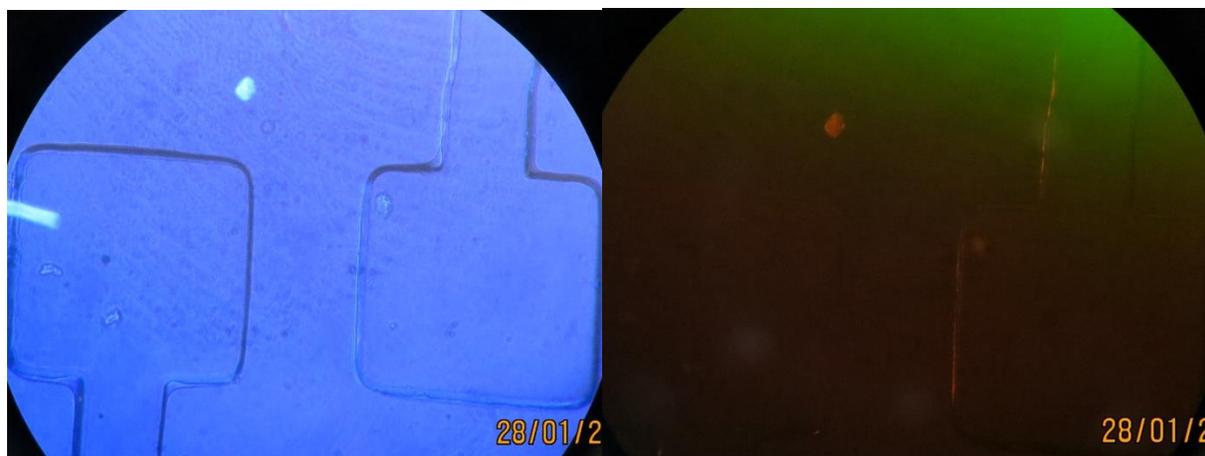


**Figura 54. Células teñidas con el kit LIVE/DEAD®. Tiempo= 2 horas 30 minutos. A) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro FITC-5050-A.** En el canal derecho se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 623. En el canal izquierdo se observan células sometidas a tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 82. **B) Células con y sin tratamiento visualizadas con el filtro LF 561/LP-C.** En el canal derecho se observan células sin tratamiento térmico. Número de células contabilizadas: 12. En el canal izquierdo se aprecian células tratadas con calentamiento. Número de células contabilizadas 397.

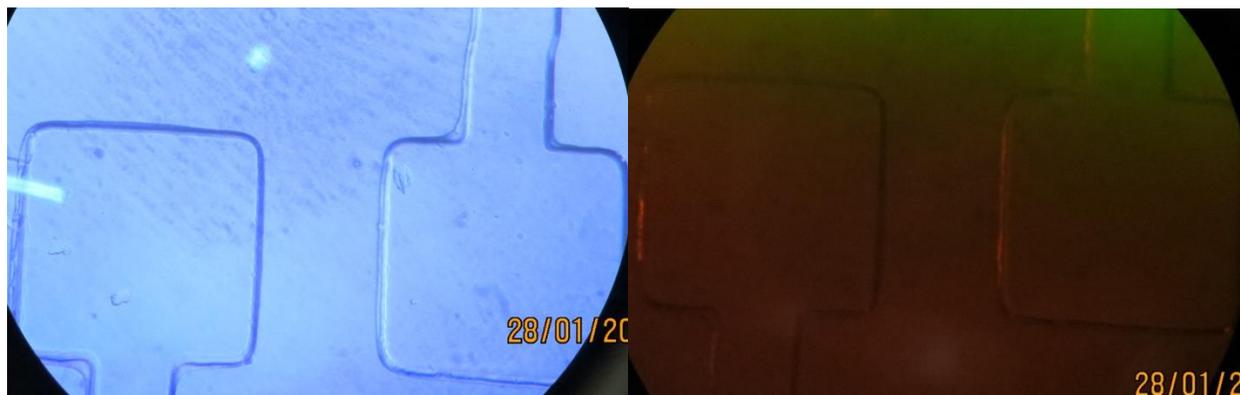
Por otro lado, la figura 54 muestra un gran aumento en la fluorescencia de los canales, tanto dentro del canal, cómo afuera. El número de células observado en cada foto también disminuye en comparación con la figura 53.

Al analizar los resultados obtenidos por el par DAPI-BE y el kit LIVE/DEAD®, en dónde se observó una disminución en el número de células de los canales en función del tiempo y un aumento en la fluorescencia dentro y fuera del canal se pensó en la posibilidad de que las tintas permearan las paredes de PDMS del canal, provocando un aumento de fluorescencia en el exterior y una disminución en la cantidad de moléculas disponibles que permitiera mantener la tinción de las células equilibrada.

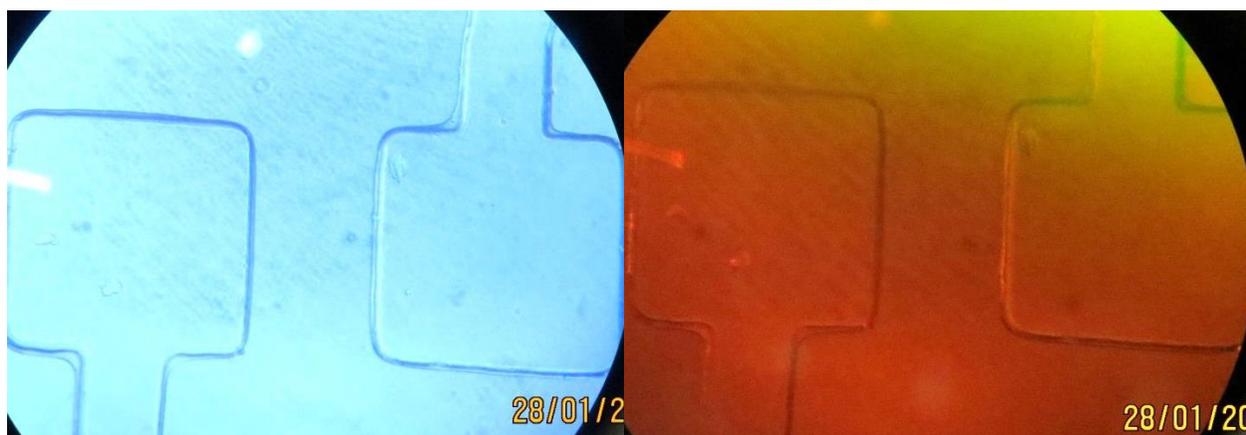
Debido a esto se realizó un ensayo en el que se llenaron dos de los canales del microchip con tintas y dos se mantuvieron vacíos. Se tomaron fotos cada hora y los resultados obtenidos son los que se muestran a continuación.



**Figura 55. Canales con el par de tintas DAPI-BE.** Tiempo= 30 minutos. Visualizados con el set de filtros DAPI-50LP-A (izquierda) y LF 561/LP-C (derecha).

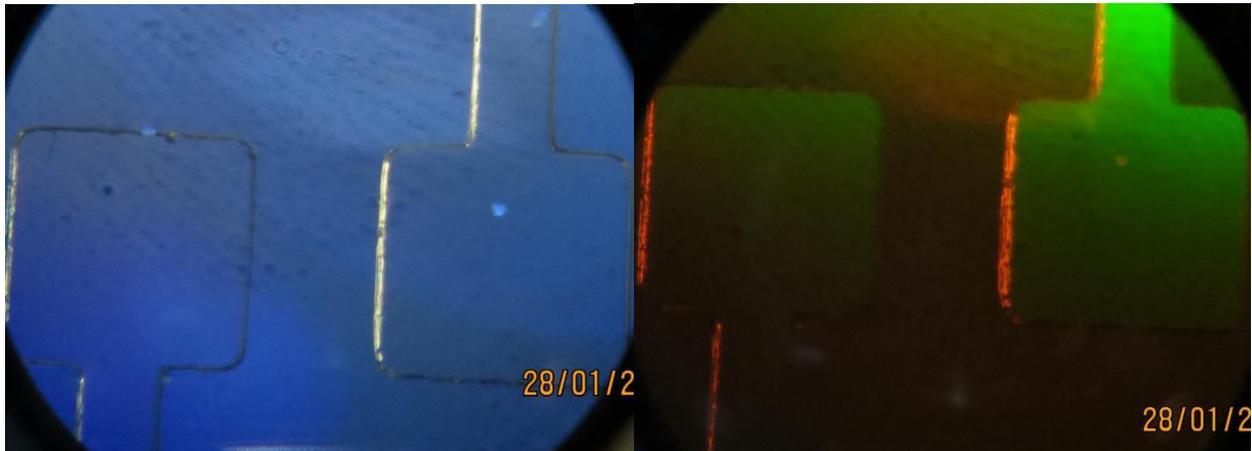


**Figura 56. Canales con el par de tintas DAPI-BE.** Tiempo= 1 hora 30 minutos. Visualizados con el set de filtros DAPI-50LP-A (izquierda) y LF 561/LP-C (derecha).

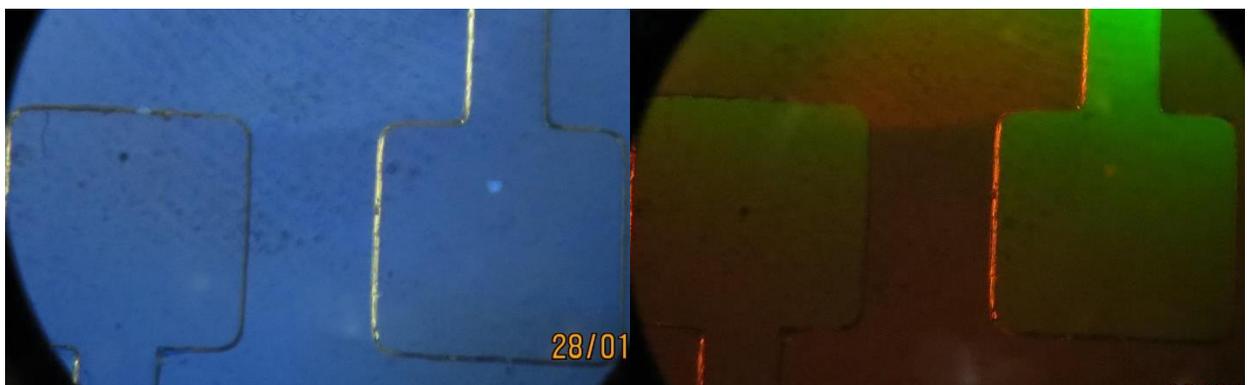


**Figura 57. Canales con el par de tintas DAPI-BE.** Tiempo= 2 horas 30 minutos. Visualizados con el set de filtros DAPI-50LP-A (izquierda) y LF 561/LP-C (derecha).

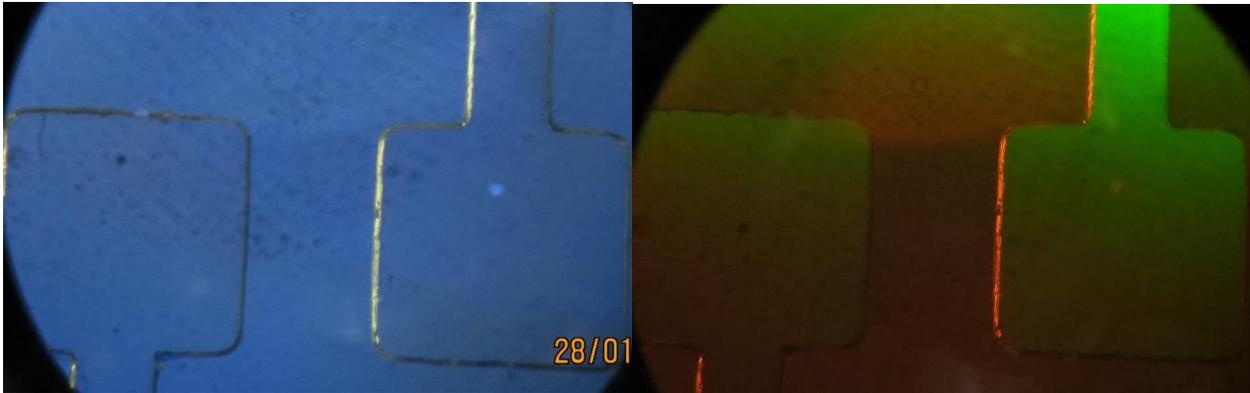
En las figuras 55, 56 y 57 se observa un aumento en la fluorescencia dentro y fuera del canal en función del tiempo.



**Figura 58. Canales sin tintas.** Tiempo= 30 minutos. Visualizados con el set de filtros DAPI-50LP-A (izquierda) y LF 561/LP-C (derecha).



**Figura 59. Canales sin tintas.** Tiempo= 1 hora 30 minutos. Visualizados con el set de filtros DAPI-50LP-A (izquierda) y LF 561/LP-C (derecha).



**Figura 60. Canales sin tintas.** Tiempo= 2 horas 30 minutos. Visualizados con el set de filtros DAPI-50LP-A (izquierda) y LF 561/LP-C (derecha).

En las figuras 58, 59 y 60 no se observa un aumento de fluorescencia dentro o fuera del canal en función del tiempo debido a que estos canales no se llenaron con las tintas. Los resultados obtenidos en éste experimento permiten concluir que el PDMS puede adsorber las tintas, lo que imposibilita el seguimiento de viabilidad celular por medio de tinción. Los resultados concuerdan con distintas fuentes que reportan que el PDMS puede adsorber distintos compuestos orgánicos especialmente compuestos hidrofóbicos, incluyendo tintas fluorescentes, debido a su alta porosidad e hidrofobicidad.[31, 32]-[33]-[34] Así mismo, se reporta que los tratamientos para recubrir las superficies no son biocompatibles, por lo tanto, no son satisfactorios puesto que se observa una interacción entre estos compuestos y las células o moléculas biológicas sujetas a análisis.[31, 32]

Como consecuencia a los resultados obtenidos, se pensó la formación de microgotas dentro de los canales del dispositivo de microfluídica, cómo una forma eficiente para aislar las células dentro de micro-reactores.

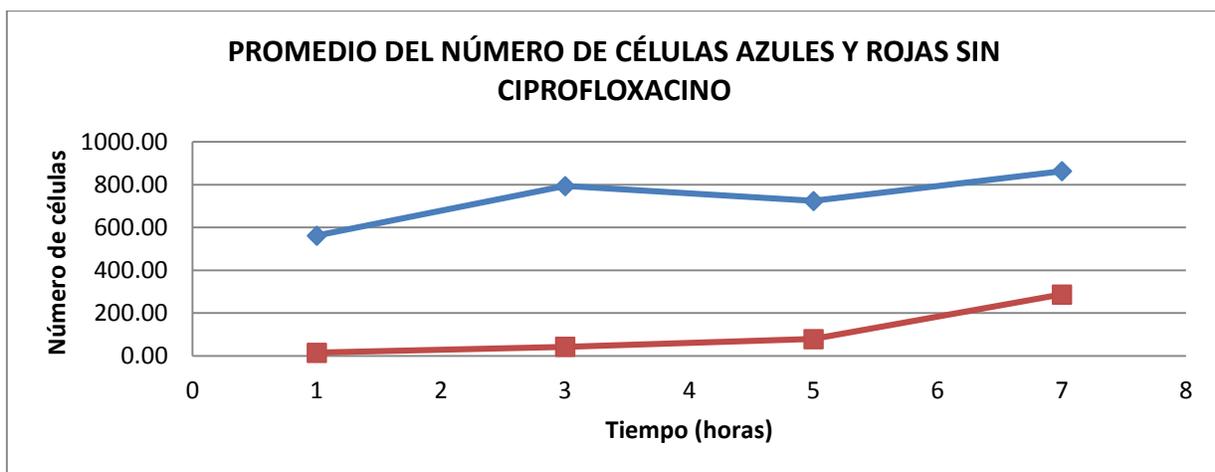
## 4.4 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE ANTIBIÓTICOS CONOCIDOS EN MICROCHIPS DE FLUJO CONTINUO

### 4.4.1 VALIDACIÓN DEL MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON EL MÉTODO CLÁSICO DE MICRODILUCIÓN

Se realizaron dos ensayos para validar el método de monitoreo de la actividad bactericida dentro de chips de microfluídica con formación de microgotas. Para lo cuál, se usó como referencia el método clásico de microdilución. En éste ensayo se determinó si la concentración de antibiótico a usar era la adecuada; para la cantidad de células en el cultivo y para el tiempo de análisis previsto. Por otro lado, permitió evaluar el efecto que tenían los componentes del sistema sobre la viabilidad de células.

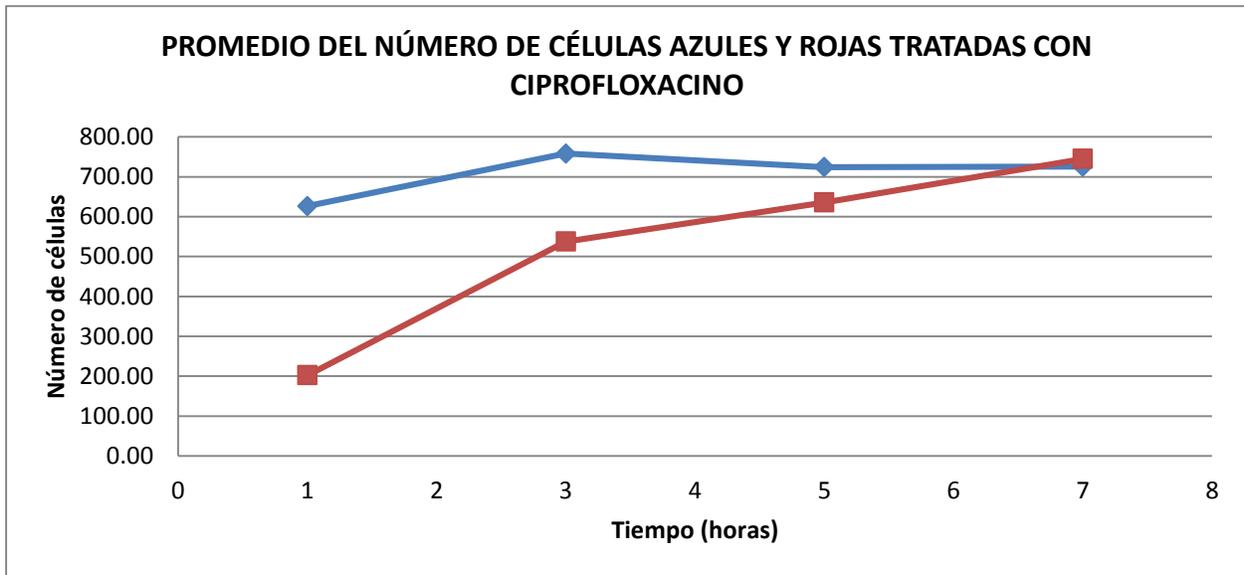
Para esto, se utilizaron cultivos con y sin antibiótico, de los cuáles se tomaron alícuotas cada dos horas y se sembraron en placas de agar con medio LB. Después de 16 horas se contaron las colonias crecidas en las placas. El par de tintas utilizado para realizar los experimentos de validación fue el par DAPI-BE. El antibiótico usado para éste análisis fue el ciprofloxacino a una concentración de 500 µg/mL.

En las Gráficas 14 y 15 se muestran los resultados del primer ensayo realizado usando el método de monitoreo por microscopía de fluorescencia expresado como número de células promedio azules y rojas de tres fotos distintas.



**Gráfica 14. Promedio del número de células azules y rojas sin ciprofloxacino.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

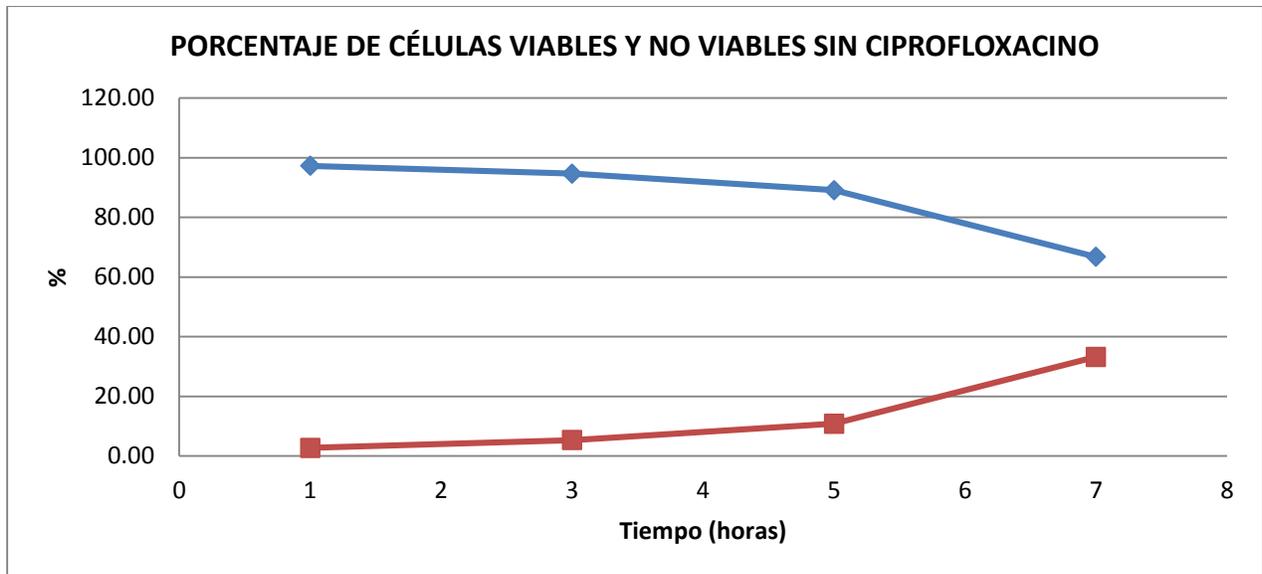
En la gráfica 14 se observa el comportamiento de las células monitoreadas, sin ciprofloxacino, en las primeras 5 horas se observa un aumento del número de células no viables de 15.33 a 78.67 células. En las últimas dos horas el número de células rojas aumentó a 286.67. El número de células totales teñidas de color azul fluctuó en un rango de 562 y 863 células



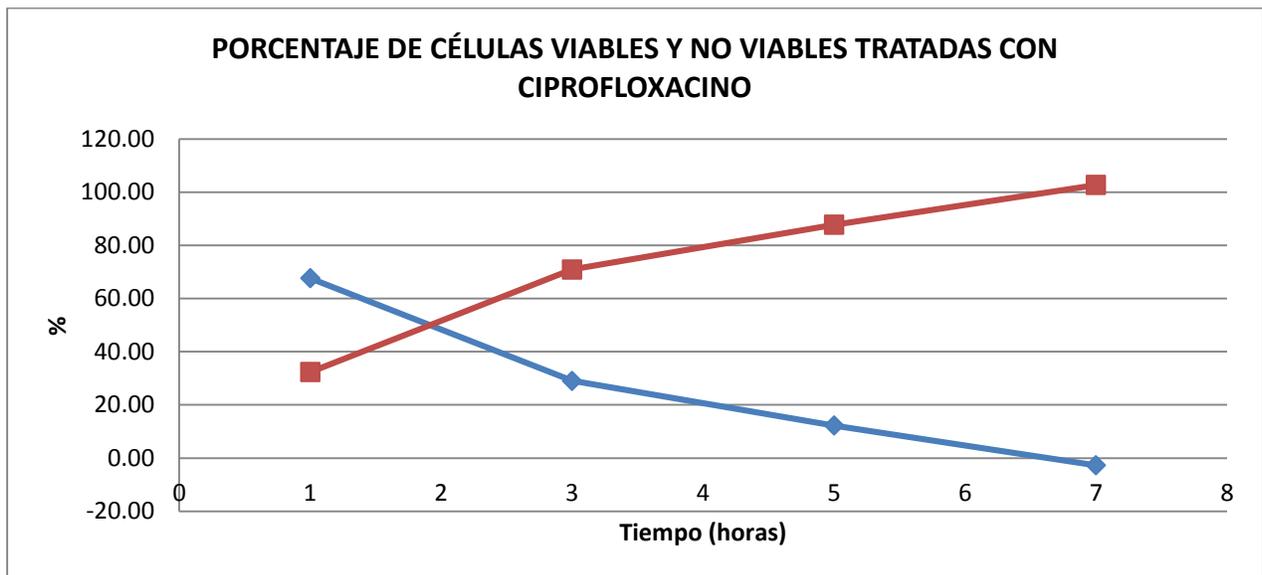
**Gráfica 15. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con ciprofloxacino a 500 µg/mL.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

El comportamiento observado en la gráfica de células tratadas con ciprofloxacino muestra ser por completo diferente a las células sin tratamiento con el antibiótico. Se aprecia un aumento de 202.67 a 537.67 células no viables teñidas de color rojo, en las siguientes dos horas se observa un aumento a 635.67 células. Al finalizar el experimento se observó una mayor cantidad de células teñidas con bromuro de etidio (745 células) que las teñidas con DAPI (725 células).

Las gráficas 16 y 17 expresan los mismos resultados en forma de porcentaje para una mayor claridad.



**Gráfica 16. Porcentaje de células viables y no viables sin ciprofloxacino.** Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.



**Gráfica 17. Porcentaje de células viables y no viables con ciprofloxacino a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

La gráfica 16 muestra un aumento en el porcentaje de células no viables sin ciprofloxacino de 33.22%. Por otro lado, la gráfica 17 muestra que el porcentaje de células no viables tratadas con ciprofloxacino inicia en 32.36 % en la primera hora;

después de siete horas se observa un aumento mayor al 100% que puede deberse a que las moléculas de bromuro de etidio han reemplazado a las moléculas de DAPI unidas al material genético.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del conteo en placas realizado. Los cultivos etiquetados como células “con ciprofloxacino” y “sin ciprofloxacino” también fueron sometidas al monitoreo por microscopía de fluorescencia. Las células “sin tintas” pertenecen al control en solución salina al 0.85% m/v que no fue teñido ni sometido a monitoreo.

**Tabla 2. Control en placas por microdilución.**

<b>CONTROL EN PLACAS</b>			
<b>Tiempo</b>	Con	Sin	Sin
	Ciprofloxacino y con tintas	Ciprofloxacino y con tintas	Ciprofloxacino y sin tintas
<b>30 minutos</b>	10	57	70
<b>2h 30 min</b>	5	53	68
<b>4h 30 min</b>	2	48	65
<b>6h 30 min</b>	0	43	52

Se contabilizó un número máximo de 70 colonias provenientes del control de células sin tintas, 57 colonias en el cultivo sin ciprofloxacino y 10 colonias en el cultivo con ciprofloxacino. De los tres microtubos se observó una disminución continua en el número de colonias contabilizadas. Después de seis horas no se observó crecimiento de ninguna colonia de la placa con ciprofloxacino. En las otras dos placas sí se observó el crecimiento de colonias.

En la Tabla 3 se expresa el número de colonias en forma de porcentaje, el 100% de células se tomó como el máximo contabilizado, 70 colonias en éste ensayo, a partir de éste número se calculó el porcentaje del resto de los controles a diferentes tiempos, de ésta forma se aprecia mejor la disminución propiciada por el antibiótico y por el método

experimental. Éste porcentaje corresponde a las células viables que aún mantenían la capacidad de reproducirse.

Así mismo, se observa el porcentaje de células viables obtenidos mediante el método de monitoreo por microscopía de fluorescencia.

**Tabla 3. Porcentaje de células viables obtenidos por el método de microdilución y por el método de monitoreo por microscopía de fluorescencia.**

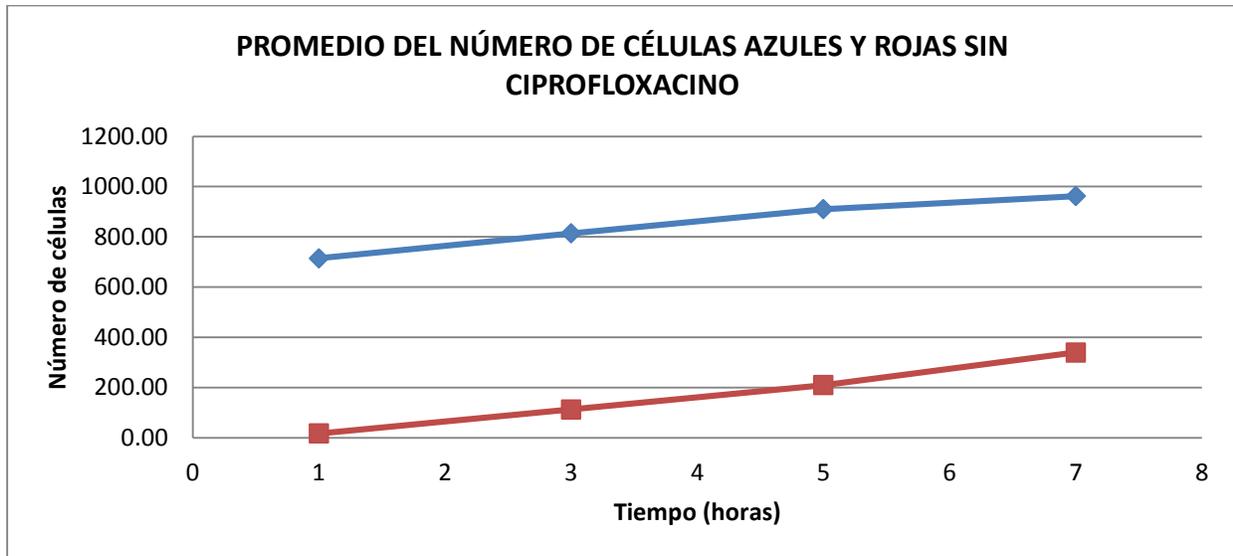
PORCENTAJE					
Tiempo	Con Ciprofloxacino y con tintas		Sin Ciprofloxacino y con tintas		Sin Ciprofloxacino y sin tintas
	Microdilución	Microscopía	Microdilución	Microscopía	Microdilución
<b>30 mi</b>	14.29	67.64	81.43	97.27	100
<b>2h 30 min</b>	7.14	29.07	75.71	94.67	97.14
<b>4h 30 min</b>	2.86	12.24	68.57	89.13	92.86
<b>6h 30 min</b>	0.00	0	61.43	66.78	74.29

El porcentaje máximo de células viables obtenido por el método de microdilución se presentó a los 30 minutos en el plato de células sin tintas, después de seis horas de experimentación el porcentaje desciende a 74.29 %, lo que corresponde a una disminución del 25.71%. El conteo inicial de células teñidas sin ciprofloxacino pero con tintas fue de 81.43%, después de seis horas se observó una disminución de 20%, por lo que al final del experimento se calculó un porcentaje de 61.43%. Por otro lado, el porcentaje de colonias con ciprofloxacino y con tintas a los 30 minutos fue de 14.29%, que disminuyó a 0% después de seis horas.

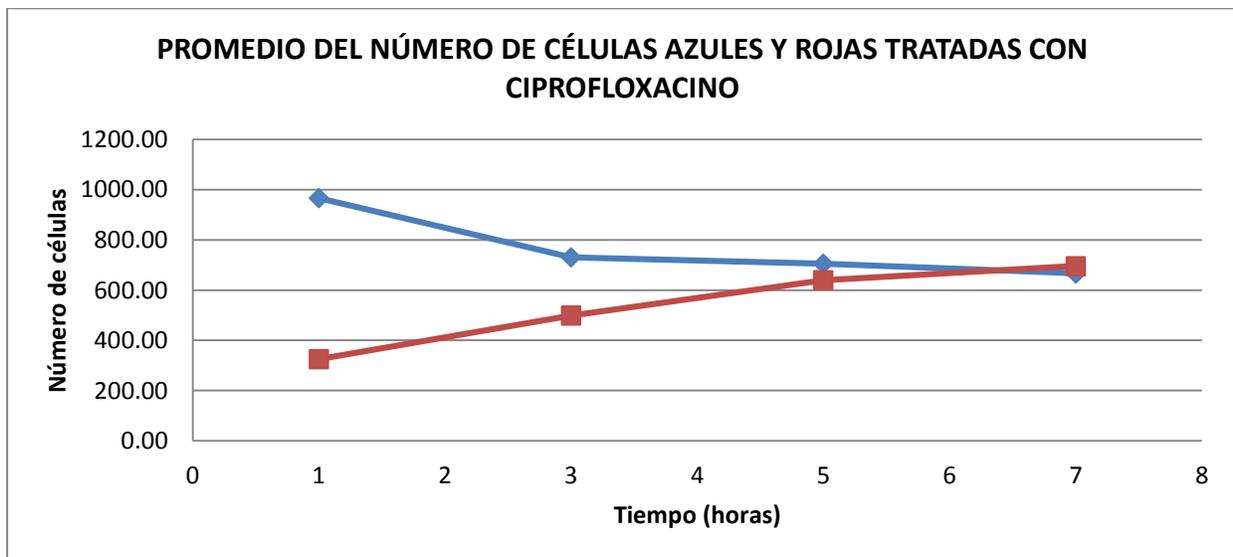
Se observa una buena correlación en la disminución del porcentaje de células viables en los métodos de microdilución y microscopía de fluorescencia. Sin embargo, en todos los casos el porcentaje de células viables calculado es mayor por el método de microscopía que por el método de microdilución. Este efecto puede deberse a que, a pesar de que las células ya no sean cultivables, no se refleja inmediatamente por el método de microscopía de fluorescencia debido a que la tinta bromuro de etidio no ha penetrado la membrana celular, por lo que no se observan esas células teñidas de color

rojo. A pesar de esta desventaja, el método de microscopía de fluorescencia ofrece resultados a las 7 horas de ensayo, mientras que para el método de microdilución se requiere de al menos 16 horas para apreciar las colonias de las células.

A continuación se presentan los resultados del segundo ensayo realizado. En las gráficas 18 y 19 se observa el promedio del número de células con y sin ciprofloxacino.

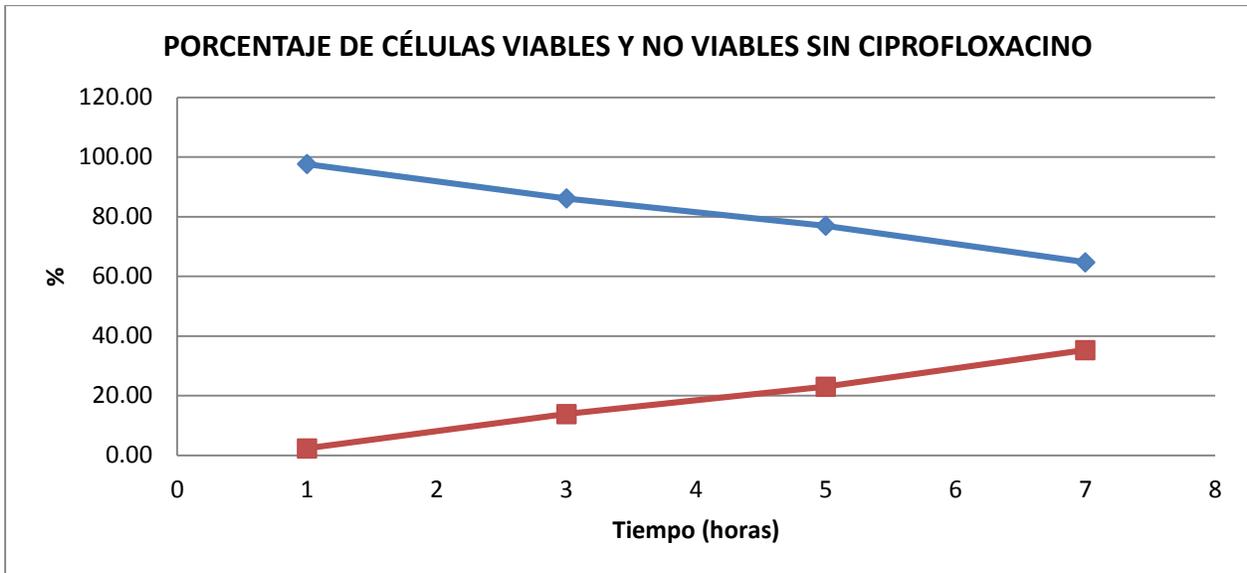


**Gráfica 18. Promedio del número de células azules y rojas sin ciprofloxacino.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

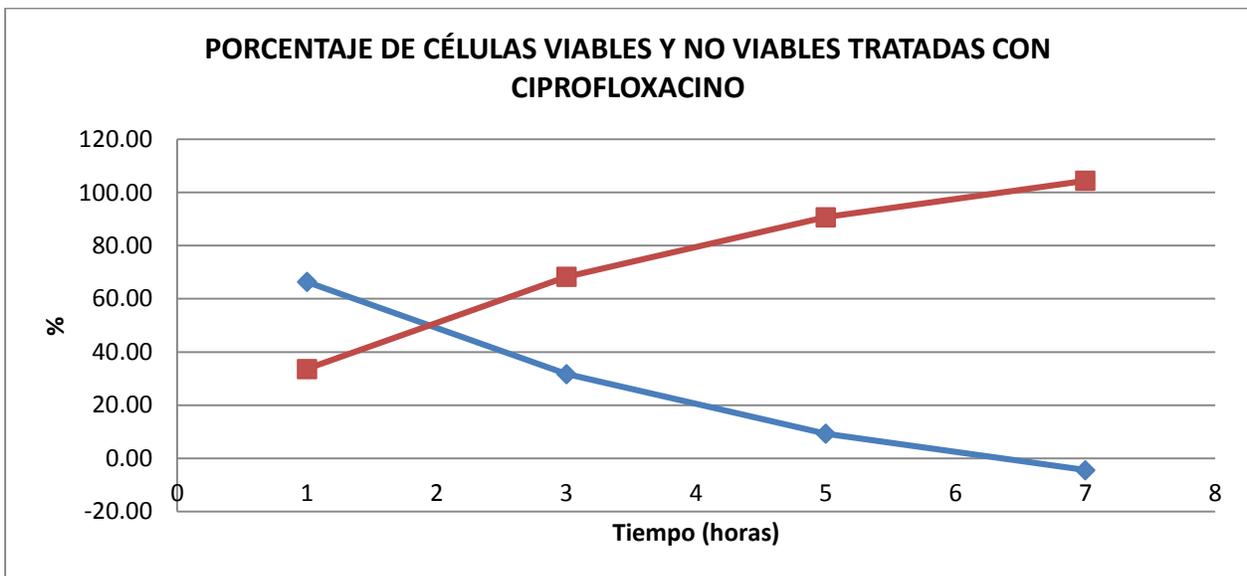


**Gráfica 19. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con ciprofloxacino a 500 µg/mL.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

En las gráficas 20 y 21 se muestran los mismos datos en forma de porcentaje, de ésta forma se aprecian las siguientes tendencias.



**Gráfica 20. Porcentaje de células viables y no viables sin ciprofloxacino.** Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.



**Gráfica 21. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con ciprofloxacino.** Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

En las gráficas 18 y 20 se observa el comportamiento de las células sin ciprofloxacino, se aprecia que las células no viables teñidas de color rojo aumentan en función del tiempo; de 16.67 a 339 células que se traducen a un porcentaje inicial de 2.33% y un porcentaje final de 35.27%. A pesar de que el aumento producido es muy apreciable durante todo el experimento, el aumento observado en las células tratadas con ciprofloxacino es notoriamente mayor, por lo que pueden diferenciarse de forma eficiente.

En las gráficas 19 y 21 se observa el comportamiento de células tratadas con ciprofloxacino, se aprecia un aumento en el promedio del número de células no viables de 325 a 696.33; expresadas en porcentaje, se observó un porcentaje inicial de 33.64% y un porcentaje final que supera el 100% de células.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos por el método de microdilución.

**Tabla 4. Control en placas por microdilución.**

<b>CONTROL EN PLACAS</b>			
<b>Tiempo</b>	Con	Sin	Sin
	Ciprofloxacino	Ciprofloxacino	Ciprofloxacino
	y con tintas	y con tintas	y sin tintas
<b>30 minutos</b>	15	157	121
<b>2h 30 min</b>	3	107	109
<b>4h 30 min</b>	1	81	85
<b>6h 30 min</b>	0	79	81

La Tabla 4 muestra que el número máximo de colonias contabilizadas fue de 157 en el control de células teñidas sin ciprofloxacino, se contabilizaron 121 colonias en el control de células sin tintas y 15 colonias en el control de células con ciprofloxacino. Se observó una disminución continua en el número de colonias contabilizadas en función del tiempo.

En la Tabla 5 se muestra el número de colonias expresado en porcentaje, el mayor número de colonias contabilizadas fue de 157, por lo que éste número se tomó como el 100% y a partir del mismo se calculó el resto de los porcentajes. También se muestra el porcentaje de células viables obtenido por el método de microscopía para comparar los resultados obtenidos por ambos métodos.

**Tabla 5. Porcentaje de células viables obtenidos por el método de microdilución y por el método de monitoreo por microscopía de fluorescencia.**

PORCENTAJE					
Tiempo	Con Ciprofloxacino y con tintas		Sin Ciprofloxacino y con tintas		Sin Ciprofloxacino y sin tintas
	Microdilución	Microscopía	Microdilución	Microscopía	Microdilución
<b>30 minutos</b>	12.40	66.36	100.00	97.67	77.07
<b>2h 30 min</b>	2.48	31.69	68.15	86.15	69.43
<b>4h 30 min</b>	0.86	9.31	51.59	79.94	54.24
<b>6h 30 min</b>	0	0	50.32	64.73	51.59

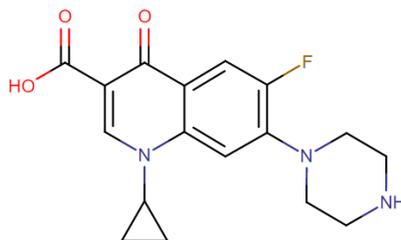
Al igual que en el ensayo anterior, se observa una disminución en el porcentaje de células viables por ambos métodos, sin embargo se aprecia una disminución mayor en el conteo en placas que en el método de microscopía. Es posible que esto se deba a que, a pesar de que las células ya no son viables, aún no se aprecia fluorescencia puesto que la membrana de la célula aún no permite que el bromuro de etidio penetre a la célula.

También se aprecia una disminución en el porcentaje de células viables sin tintas, lo que demuestra que las tintas no provocan una toxicidad tan elevada en las células y sugiere que la muerte de las mismas está más relacionada al método experimental. Es probable que esto se deba al proceso de centrifugación inicial y posteriormente, a la falta de nutrientes en el medio, en el que permanecen más de siete horas.

A pesar de que los porcentajes de células viables no son los mismos por ambos métodos, se aprecia una relación entre la disminución observada en los dos métodos.

#### 4.4.2 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROGOTAS CON CÉLULAS *E. coli* BL21 Y CIPROFLOXACINO

La molécula de ciprofloxacino (Figura 61) pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como ácidos quinolónicos; quinolonas con un grupo carboxílico como sustituyente en una o más posiciones del anillo.[35]



**Figura 61. Ciprofloxacino.**

Ácido-1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico. [35]

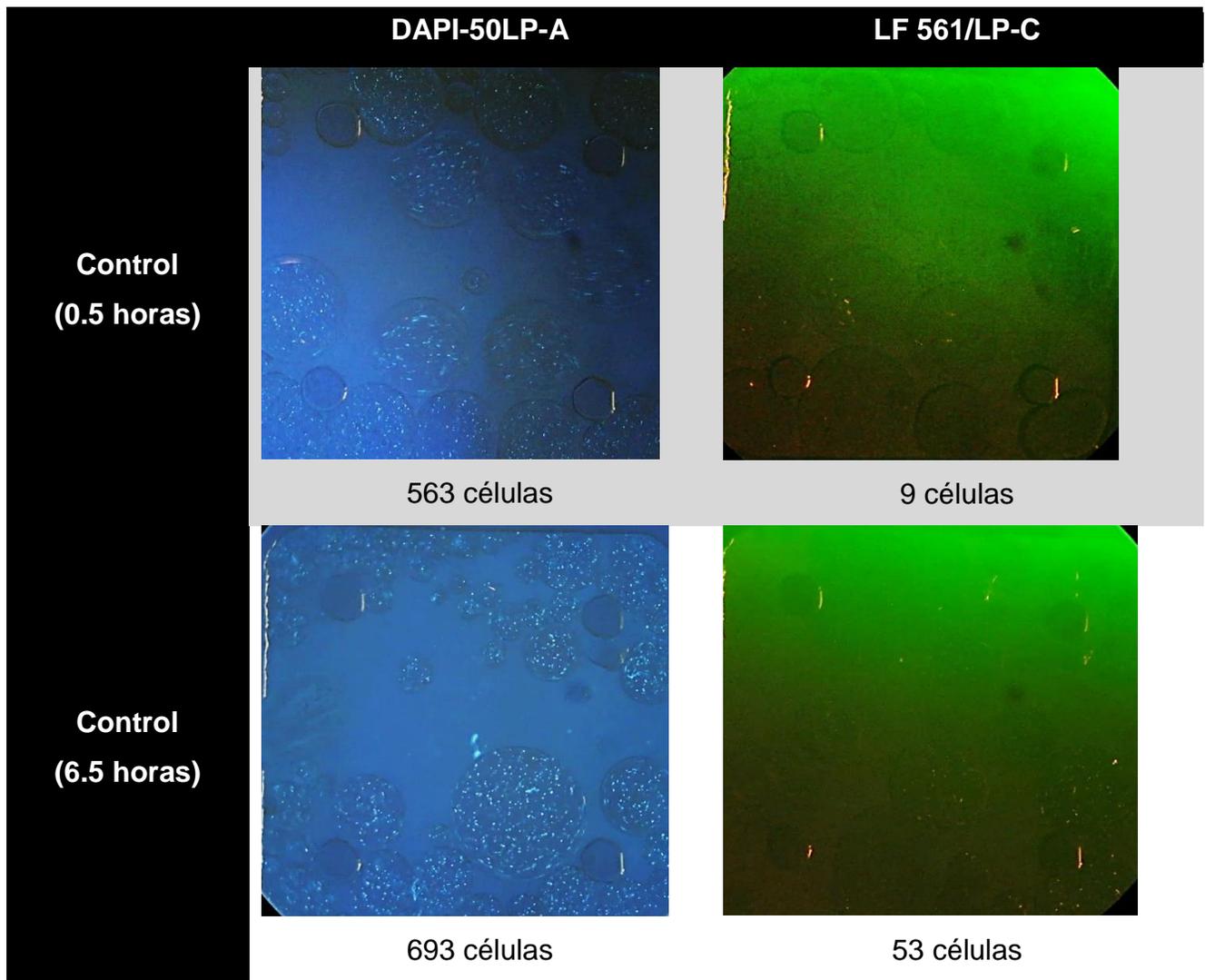
El ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro que forma parte del grupo de las fluoroquinolonas, específicamente de las carboxifluoroquinolonas. Prescrito para el tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias, gastrointestinales, cutáneas, entre otras. Presenta actividad contra microorganismos gram-positivos y gram-negativos. [35] Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las enzimas topoisomerasa II o ADN girasa y topoisomerasa IV. El ciprofloxacino presenta una afinidad por el ADN bacteriano 100 veces mayor que por el ADN de células mamíferas. Estas enzimas son indispensables para la replicación del ADN, transcripción, reparación, superenrollamiento y recombinación, por lo que, tras el tratamiento con éste antibiótico, la célula bacteriana queda inhabilitada para dividirse y replicarse. [35]

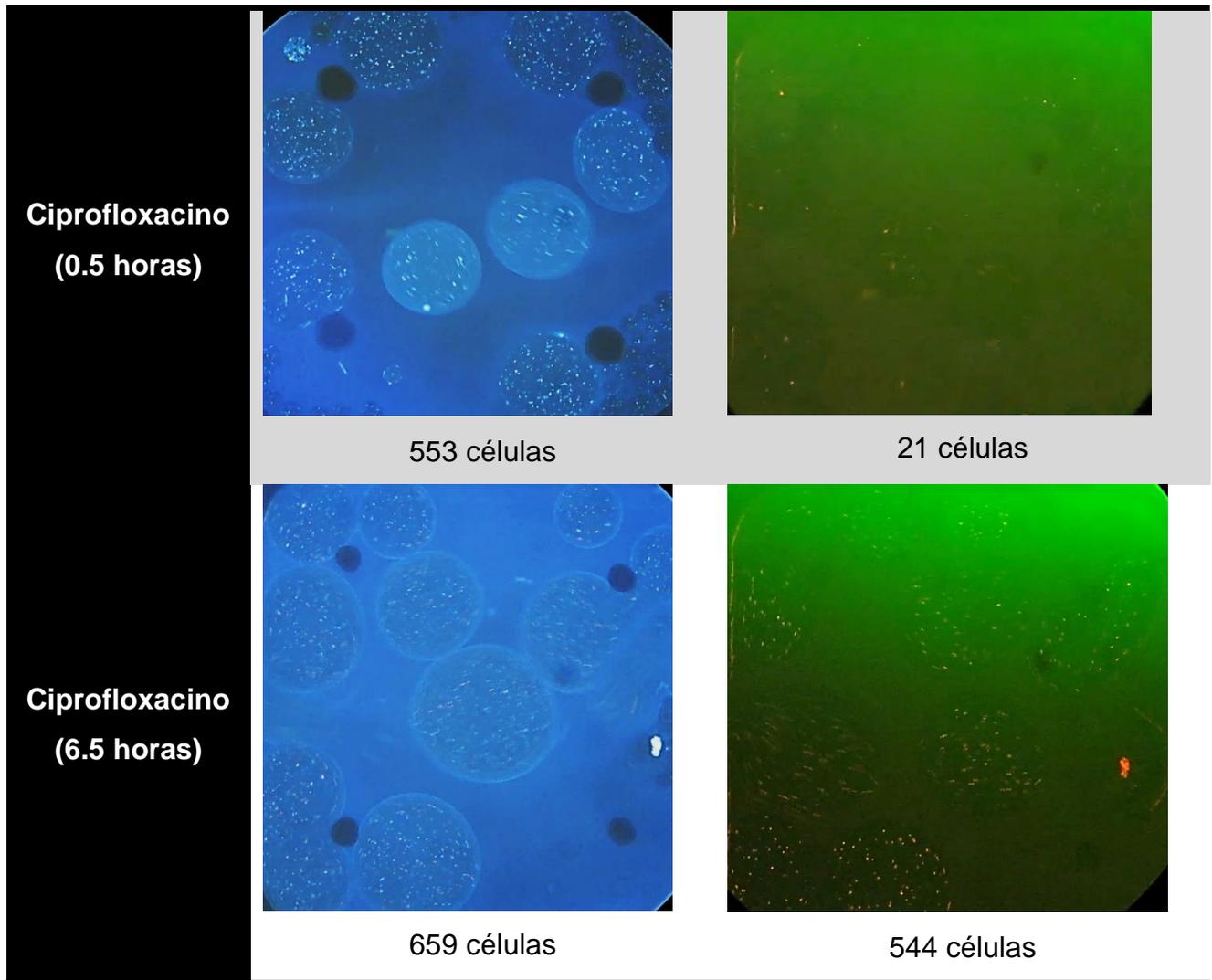
##### 4.4.2.1 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y BROMURO DE ETIDIO

Para realizar el monitoreo de la actividad bactericida de éste antibiótico, se tomó un video cada hora en la cámara de reacción del microchip de las células control y otro video en la cámara de reacción de las células tratadas con gentamicina. De cada video adquirido se obtuvieron seis imágenes instantáneas, tres con el set de filtros DAPI-

50LP-A con el que es posible observar el total de células presentes en la cámara teñidas por la tinta DAPI; y tres con el set de filtros LF 561/LP-C que permite monitorear el aumento de células no viables teñidas con bromuro de etidio. Cada foto fue analizada con el programa Image J usando los comandos mencionados en la sección de Metodología. Éste procedimiento se siguió tanto para las células con antibiótico como para el control. En la tabla 6 se observa un ejemplo del comportamiento de las células sin antibiótico y con ciprofloxacino a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  al inicio del experimento y después de 7 horas.

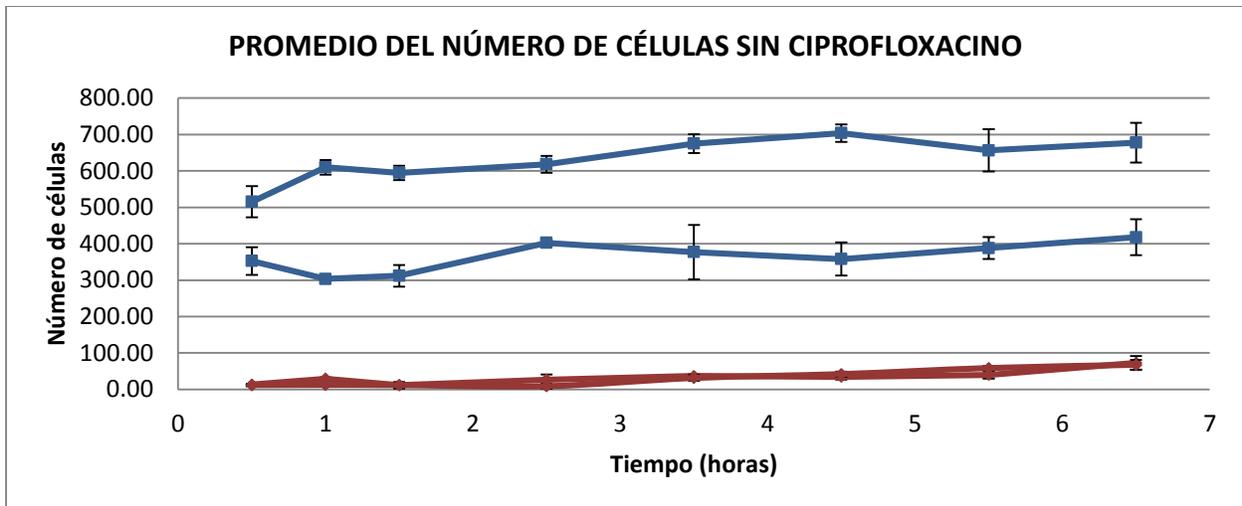
**Tabla 6. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de ciprofloxacino a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el monitoreo de células sin antibiótico.**





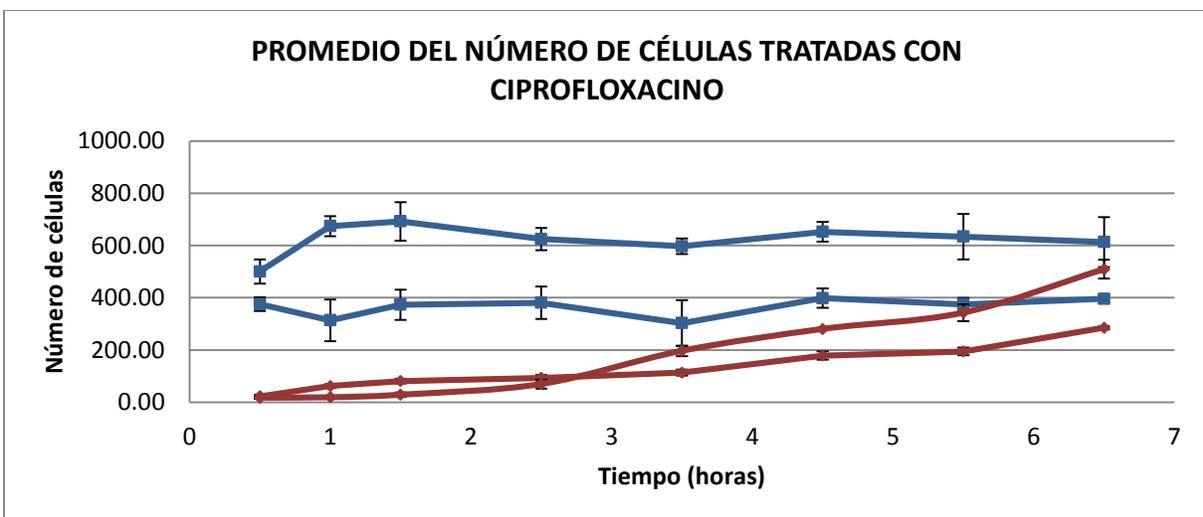
En las imágenes anteriores puede apreciarse un aumento notorio de células no viables tratadas con ciprofloxacino. Se observa un porcentaje inicial de 3.79 %, pero después de seis horas y media el porcentaje de células no viables tratadas con ciprofloxacino se eleva a 82 %. Por otro lado, se observa que el porcentaje de células no viables del control sin antibiótico al inicio del experimento es de 1.59 % y que después de seis horas y media aumenta a 7.6 %.

El ensayo se llevó a cabo por duplicado, por lo que la gráfica 22 y 23 muestra dos líneas de tendencia, tanto para el total de células como para el número de células no viables, que describen el comportamiento de células *E. coli* BL21 ante el efecto de la gentamicina. De cada ensayo se obtuvo el promedio de las tres imágenes instantáneas adquiridas con el filtro DAPI-50LP-A y las tres fotos obtenidas con el filtro LF 561/LP-C.



**Gráfica 22. Promedio del número de células azules y rojas sin ciprofloxacino.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

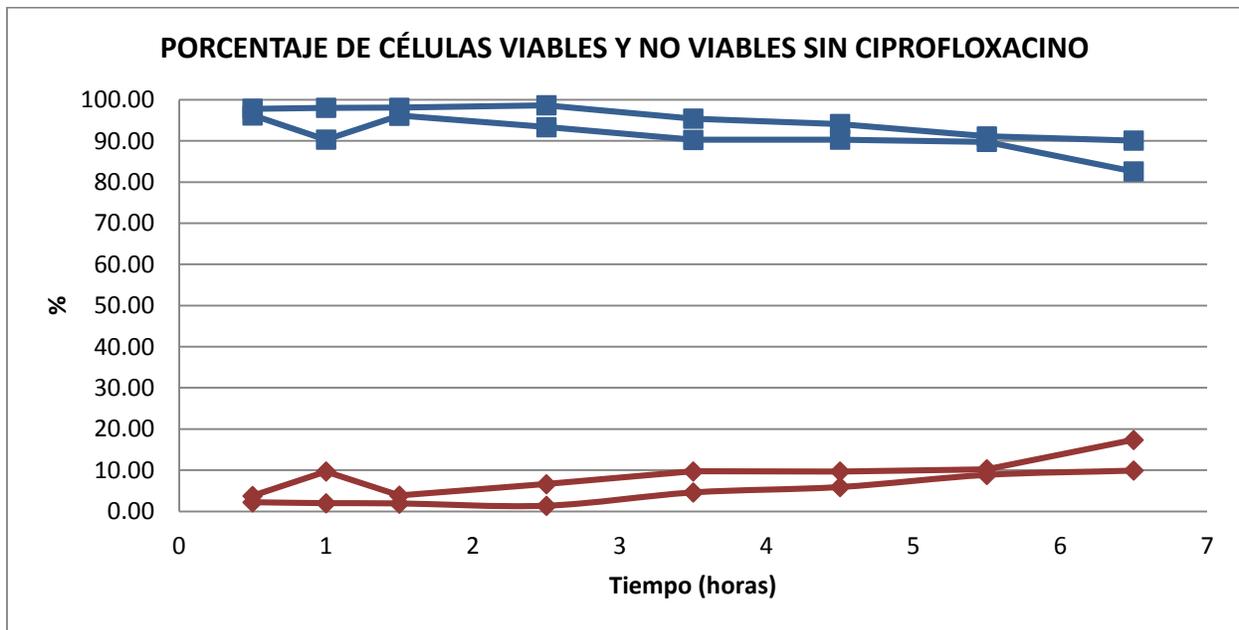
Se observa una diferencia, entre ambos ensayos, en el número de células totales contabilizadas de alrededor de 300 células. Lo cual puede atribuirse a un error experimental. Se aprecia que el número de células totales contabilizadas no varía significativamente en función del tiempo. Por otro lado, el promedio de células no viables aumenta ligeramente después de seis horas y media de un promedio de 11.33 y 12.00 al inicio del experimento a un promedio de 67.33 y 72.67 al finalizar.



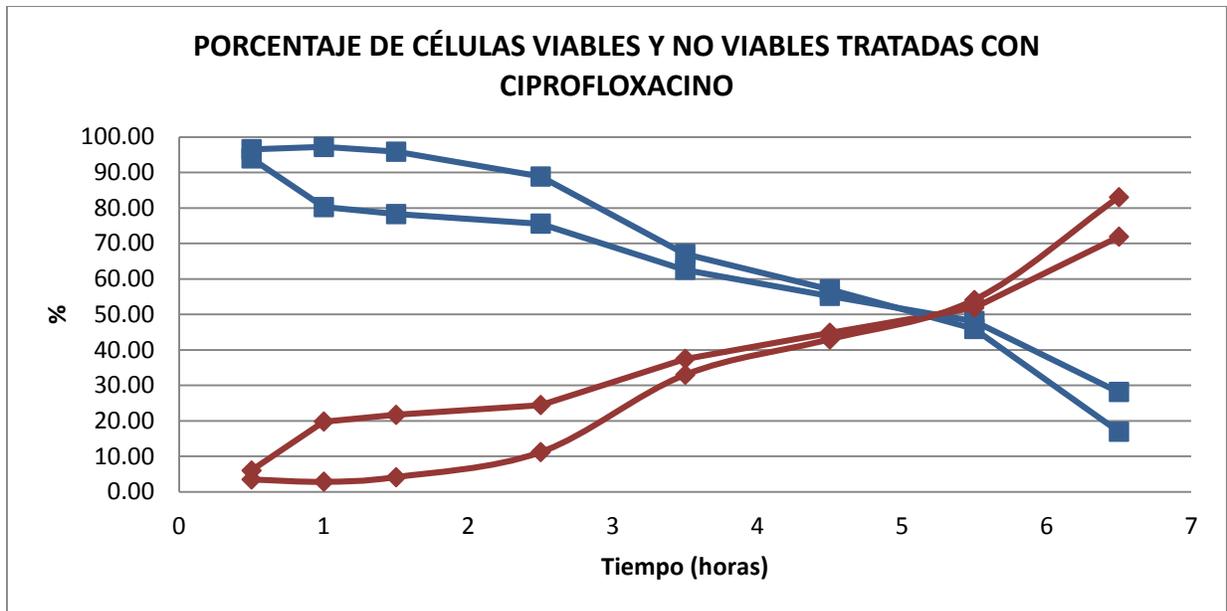
**Gráfica 23. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con ciprofloxacino a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

En la Gráfica 23 se observan el promedio del número de células azules y rojas tratadas con ciprofloxacino, se aprecia una diferencia en el número de células totales aproximadamente de 300 células entre los dos ensayos realizados. El promedio del número de células azules se mantiene relativamente constante en función del tiempo. Se observa un comportamiento distinto en las células no viables teñidas de color rojo debido a que, en ambos ensayos, se aprecia un aumento en función del tiempo. Al inicio del experimento se tiene un promedio de 6.33 y 22.67 células no viables que, después de seis horas y media, aumentan a un promedio de 509 y 284.6 células no viables.

En las gráficas 24 y 25 se muestran los datos de las células sin ciprofloxacino y con ciprofloxacino expresados en forma de porcentaje lo cual nos da una visión más clara de los resultados obtenidos.



**Gráfica 24. Porcentaje de células viables y no viables sin ciprofloxacino.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.



**Gráfica 25. Porcentaje de células viables y no viables con ciprofloxacino a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

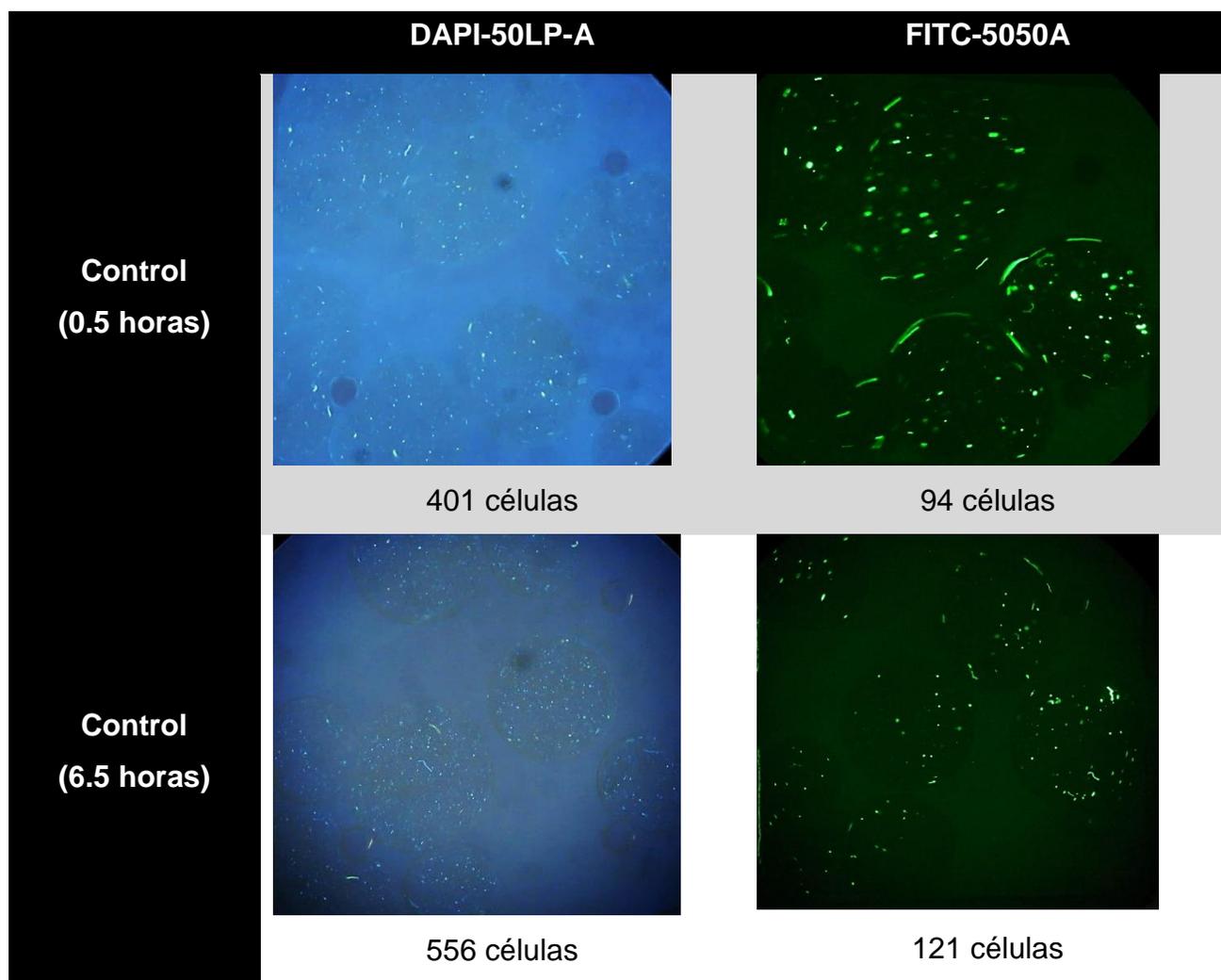
Las gráficas 24 y 25 muestran claramente un comportamiento distinto entre las células tratadas con ciprofloxacino y las células sin antibiótico. Las células que fueron sometidas al efecto bactericida del antibiótico muestran un aumento en la cantidad de células no viables, que después de cinco horas y media llega al 50% en ambos experimentos. Por otro lado, las células sin tratamiento con antibiótico presentaron un comportamiento prácticamente constante iniciando con un porcentaje de células no viables de 2.20 y 3.78 % que después de seis horas y media aumentó a 17.40 y 9.94%.

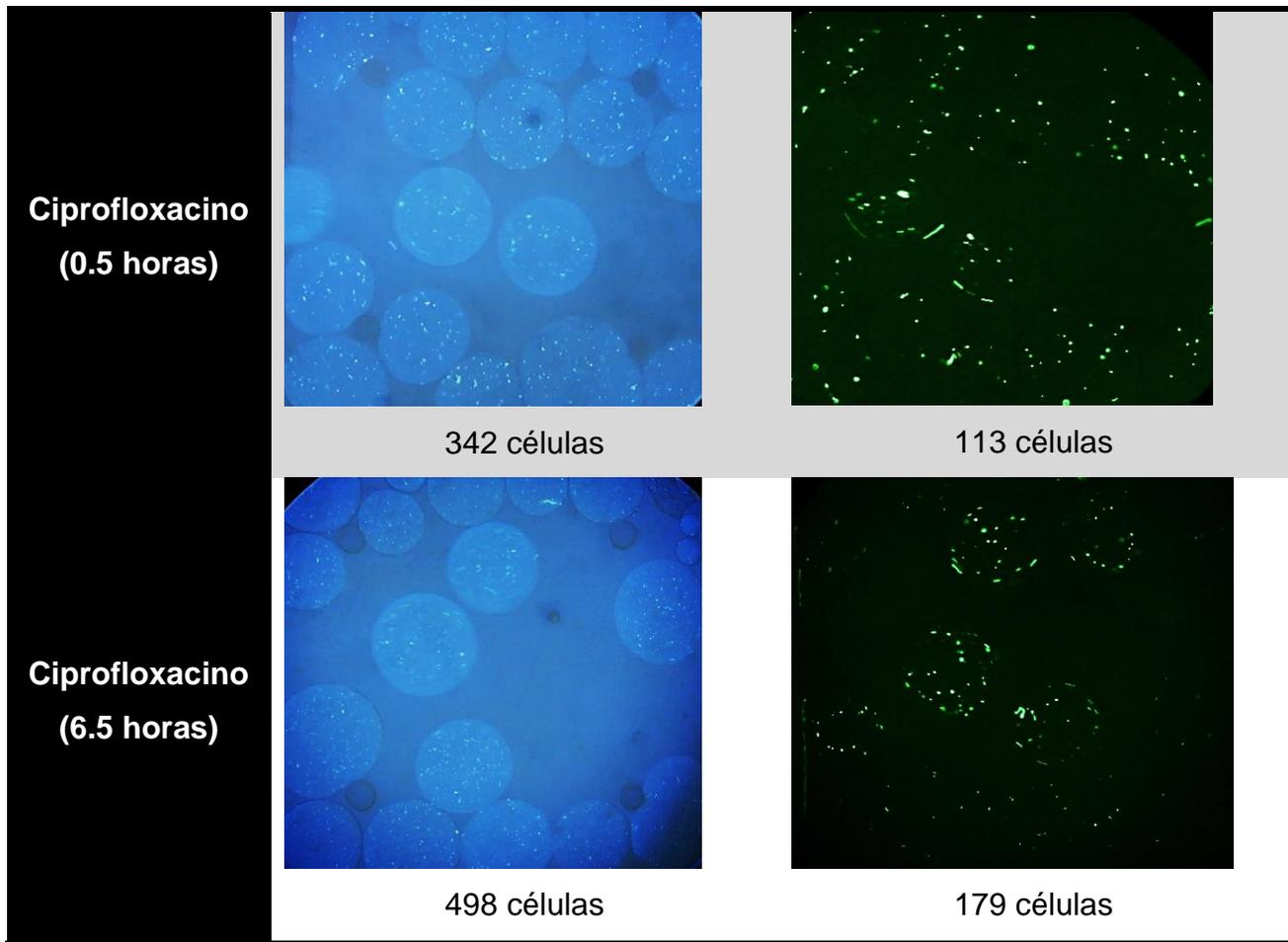
Las condiciones del experimento con este par de tintas permitieron monitorear el efecto bactericida del ciprofloxacino observando un aumento continuo de células no viables en función del tiempo. Durante las primeras dos horas y media se observa un aumento de células no viables con una ligera pendiente. Después de tres horas y media se observa un aumento en la pendiente del porcentaje de células no viables que se mantiene hasta llegar a 83.03 y 71.89 % de células no viables en ambos experimentos.

#### 4.4.2.2 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®

De cada video adquirido con la cámara digital se seleccionaron seis imágenes instantáneas, tres con el set de filtros DAPI-50LP-A para observar el total de células presentes y tres con el set de filtros FITC-5050A para contabilizar el número de células no viables teñidas con Sytox Green®. En la Tabla 7 se observa un ejemplo del comportamiento de las células sin antibiótico y con ciprofloxacino a una concentración de 500 µg/mL al inicio del experimento y después de 7 horas.

Tabla 7. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de ciprofloxacino a 500 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.

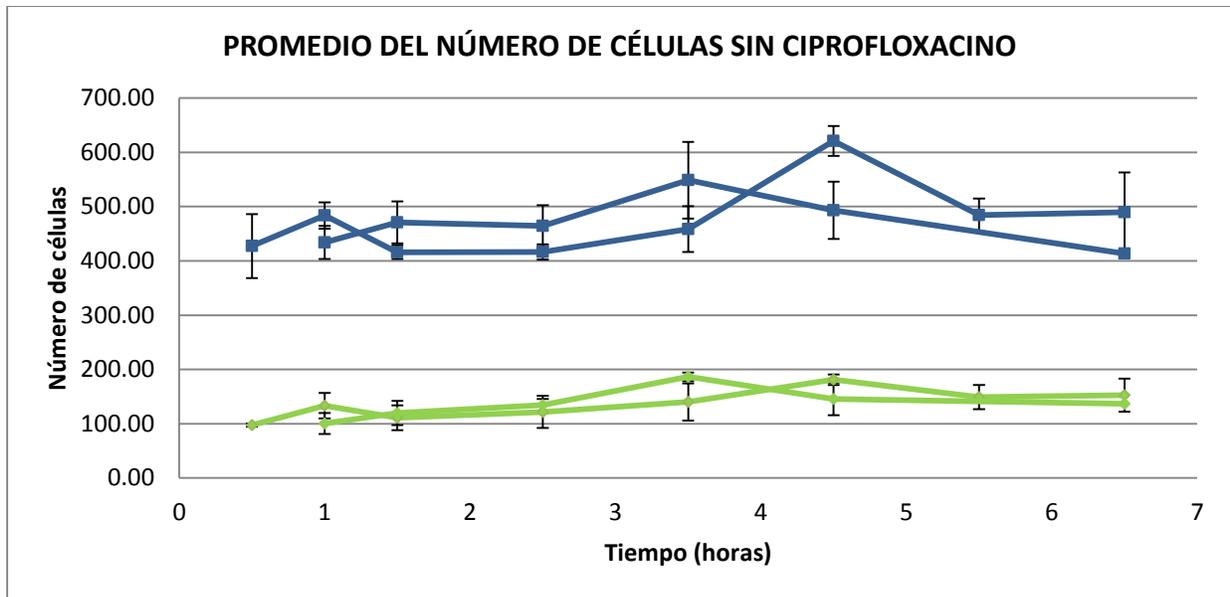




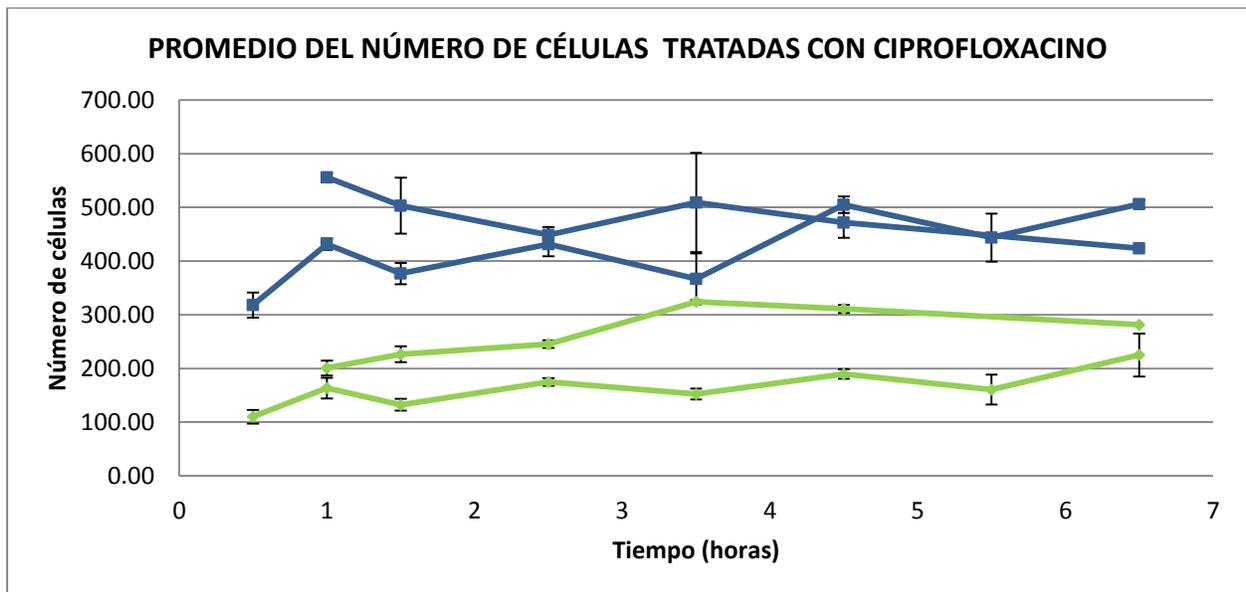
Las imágenes de células sin ciprofloxacino no muestran un aumento en la cantidad de células no viables teñidas con Sytox Green®. En las fotos aquí mostradas se aprecia que al inicio del experimento se obtuvo un porcentaje de 23.44 %, después de seis horas y media se observa 21.76 % de células no viables.

En las células tratadas con ciprofloxacino se aprecian 33.04 % de células no viables al inicio del experimento. Después de seis horas y media se observa un ligero aumento a 35.94%.

Las fotos aquí mostradas representan una parte mínima del total de datos obtenidos durante los ensayos. Para observar todos los datos recopilados, se muestran las gráficas 26 y 27 en dónde se presenta el promedio de las seis fotos contabilizadas cada hora para las células tratadas con ciprofloxacino y las células sin tratamiento.



**Gráfica 26. Promedio del número de células azules y verdes sin ciprofloxacino.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el promedio del número de células no viables teñidas con Sytox Green®.



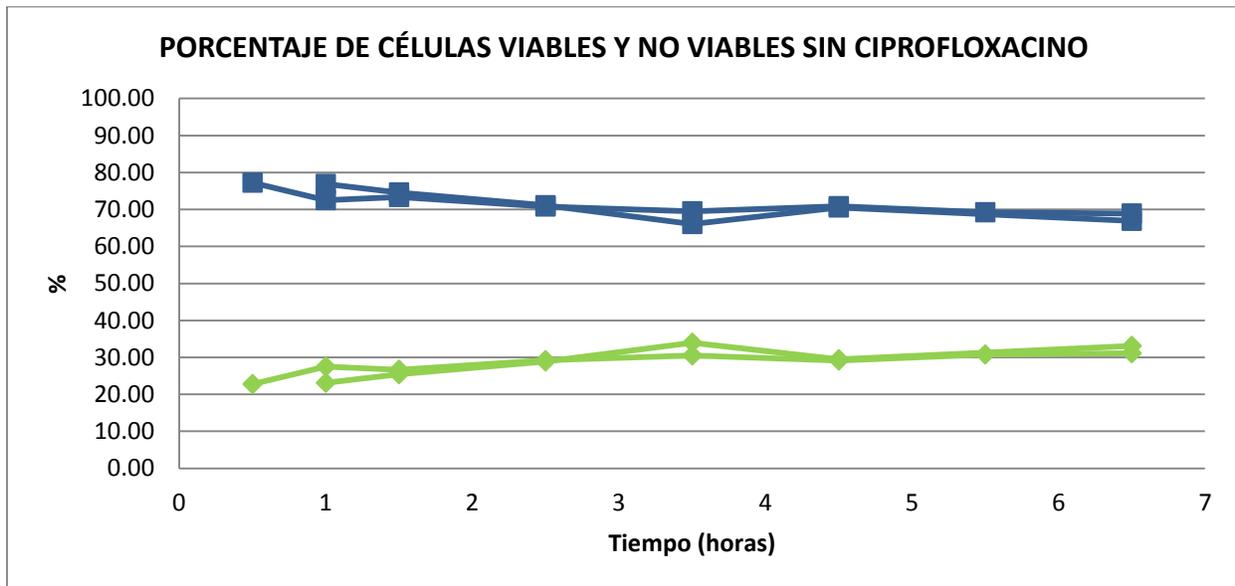
**Gráfica 27. Promedio del número de células azules y verdes tratadas con ciprofloxacino a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el promedio del número de células no viables teñidas con Sytox Green®.

La gráfica 26 muestra un promedio de células totales entre 413 y 621 para ambos ensayos. El promedio del número de células no viables sin tratamiento con

ciprofloxacino inicia en 97.33 y 100.33. Después de 7 seis horas y media aumentan únicamente a 136 y 152 respectivamente.

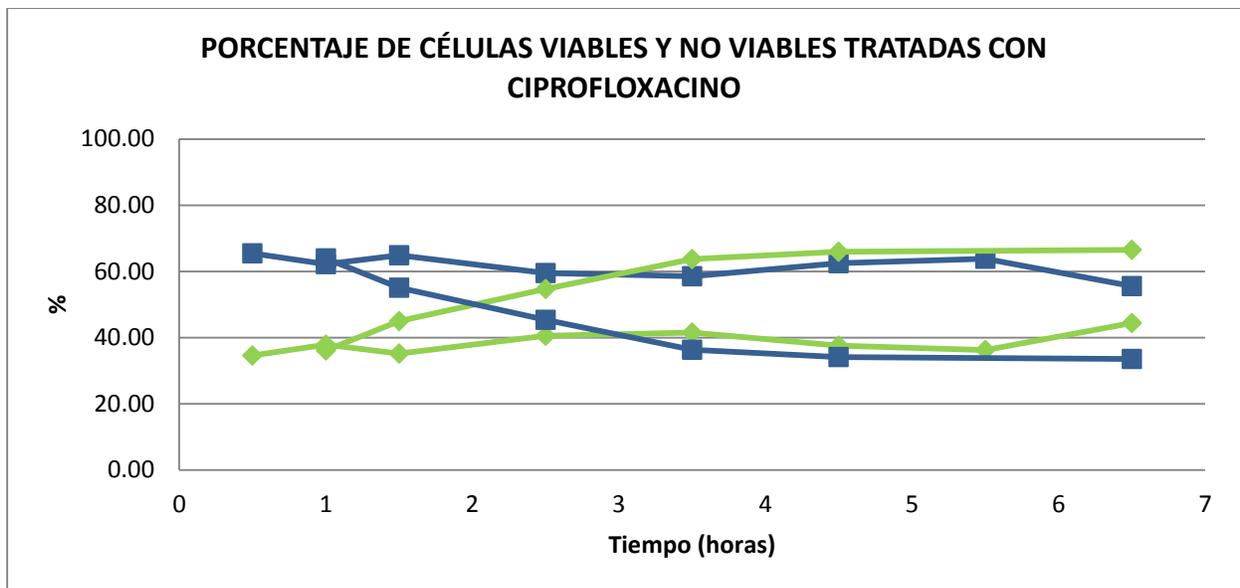
La gráfica 27 muestra que el promedio del total de células tratadas con ciprofloxacino presenta una mayor aleatoriedad que las células sin antibiótico, manteniéndose en un rango de 318 y 555 células. Se observa un ligero aumento en el promedio del número de células no viables, al inicio del experimento se visualizó un promedio de 110 y 200 células no viables, que después de seis horas y media aumentan a 225 y 281 respectivamente.

En las gráficas 28 y 29 se presentan los datos de los ensayos realizados expresados en porcentaje.



**Gráfica 28. Porcentaje de células viables y no viables sin ciprofloxacino.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas verdes representan el porcentaje de células no viables teñidas con Sytox Green®.

Los datos obtenidos del control muestran un porcentaje de células no viables al inicio del experimento de 22.78 y 23.12%, al finalizar el experimento se observa un ligero aumento a 30.06 y 31.16 % respectivamente.



**Gráfica 29. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con ciprofloxacino a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas verdes representan el porcentaje de células no viables teñidas con Sytox Green®.

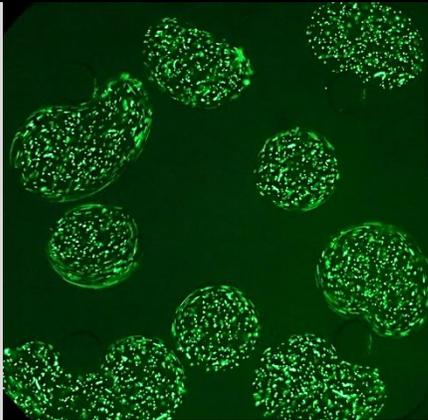
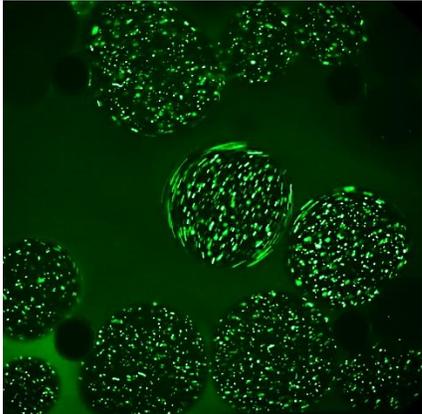
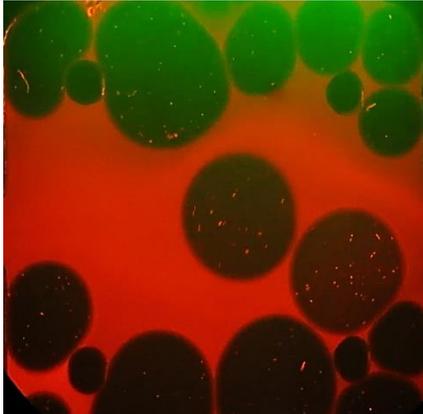
Los ensayos realizados con células tratadas con ciprofloxacino muestran dos resultados distintos. En el primero se observa que el porcentaje de células no viables se mantiene prácticamente constante en función del tiempo pues parte de 34.59% y aumenta únicamente a 44.44%, quedando por debajo del porcentaje de células totales teñidas de color azul. En el segundo experimento se observa un porcentaje inicial, de células no viables, de 36.11% que después de seis horas y media alcanza un porcentaje de 66.48%.

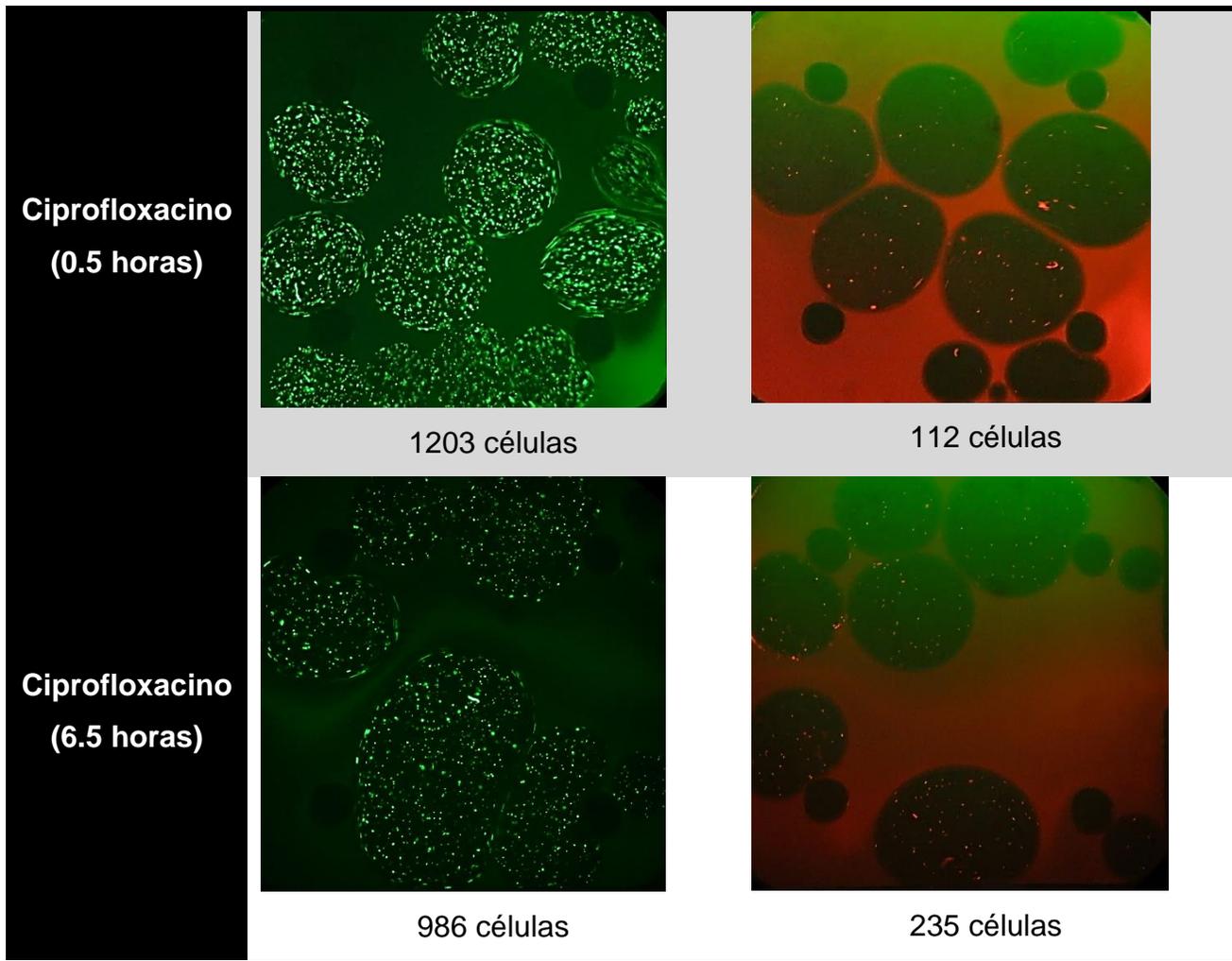
Los resultados obtenidos con el par de tintas DAPI-SX no mostraron ser reproducibles puesto que sólo en un ensayo se logró monitorear apropiadamente el efecto bactericida del ciprofloxacino. Por lo que no resultó ser un par de tintas eficiente para monitorear la actividad bactericida de éste antibiótico.

#### 4.4.2.3 CÉLULAS TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO

De cada video capturado se obtuvieron seis imágenes instantáneas, tres con el set de filtros FITC-5050A para visualizar las células viables teñidas con Syto 9® y tres con el set de filtros LF561/LP-C que permite observar las células no viables teñidas con yoduro de propidio. En la tabla 8 se observa un ejemplo del comportamiento de las células sin antibiótico y con ciprofloxacino a una concentración de 500 µg/mL al inicio del experimento y después de 7 horas.

Tabla 8. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de ciprofloxacino a 500 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.

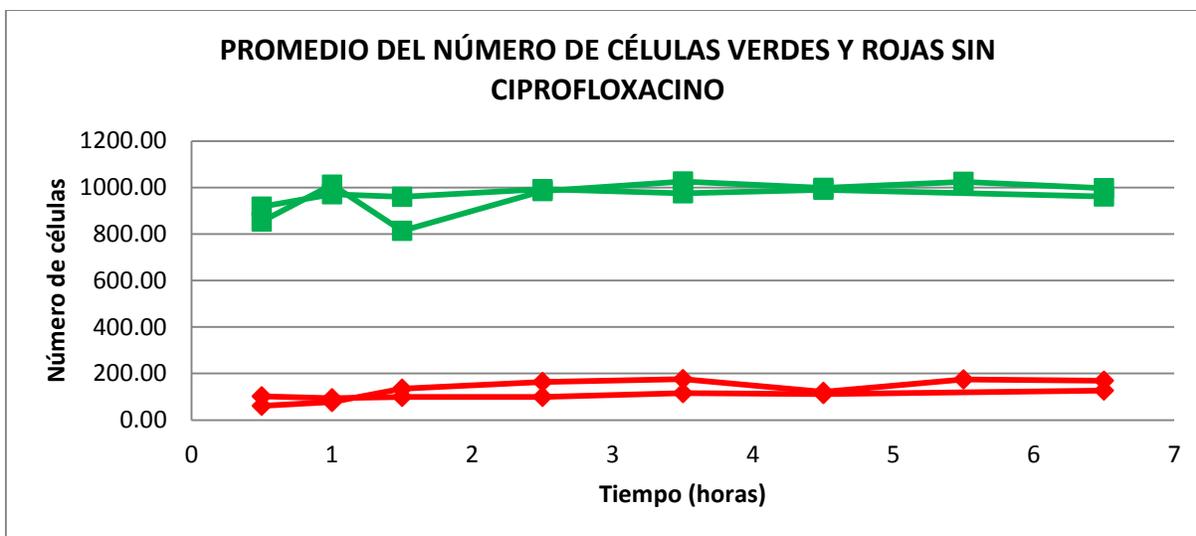
	FITC-5050A	LF561/LP-C
Control (0.5 horas)	 852 células	 60 células
Control (6.5 horas)	 973 células	 159 células



Las imágenes de células sin ciprofloxacino muestran un ligero aumento en la cantidad de células no viables teñidas con yoduro de propidio. En las fotos presentadas se aprecia un porcentaje de 7.04 % al inicio del experimento, después de seis horas y media se observa 16.34 % de células no viables.

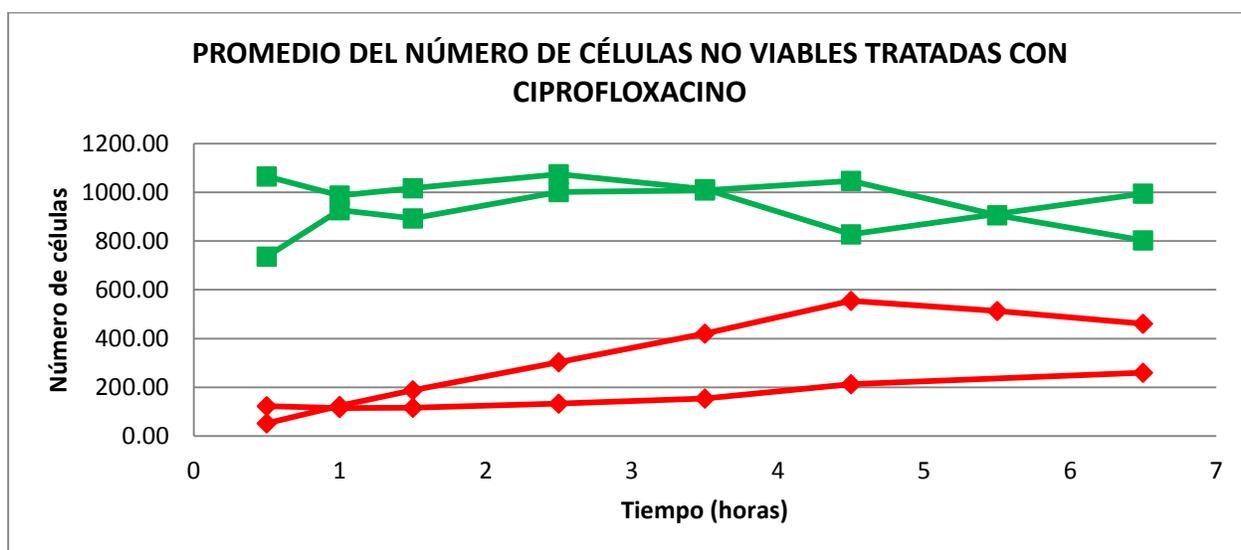
Las células tratadas con ciprofloxacino muestran 9.31 % de células no viables al inicio del experimento que después de seis horas y media aumenta a 23.83 %

El total de datos recopilados se muestra en las gráficas 30 y 31 en dónde se presenta el promedio del número de células de las seis fotos contabilizadas cada hora para las células tratadas con ciprofloxacino y las células sin antibiótico.



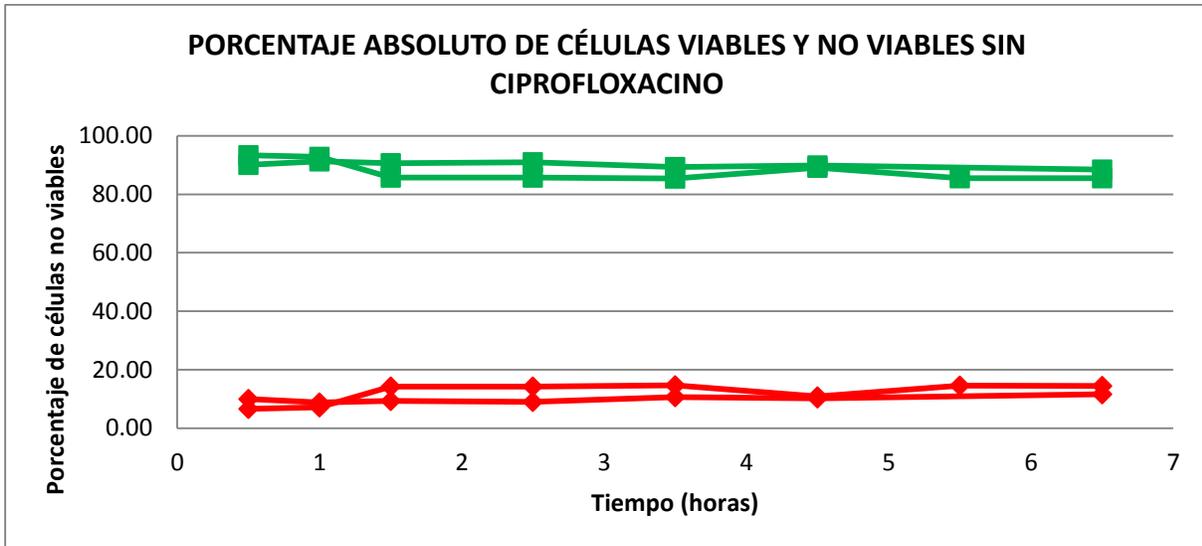
**Gráfica 30. Promedio del número de células verdes y rojas sin ciprofloxacino.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el promedio del número de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

El promedio del número de células viables contabilizadas en ambos ensayos se mantuvo relativamente constante en función del tiempo en un intervalo entre 853 y 1026 células. El número de células no viables teñidas de color rojo por el yoduro de propidio inició en 101.33 y 60.67, se observa un ligero aumento al final del experimento contabilizándose 169 y 126.33 respectivamente.



**Gráfica 31. Promedio del número de células verdes y rojas con ciprofloxacino 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el promedio del número de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

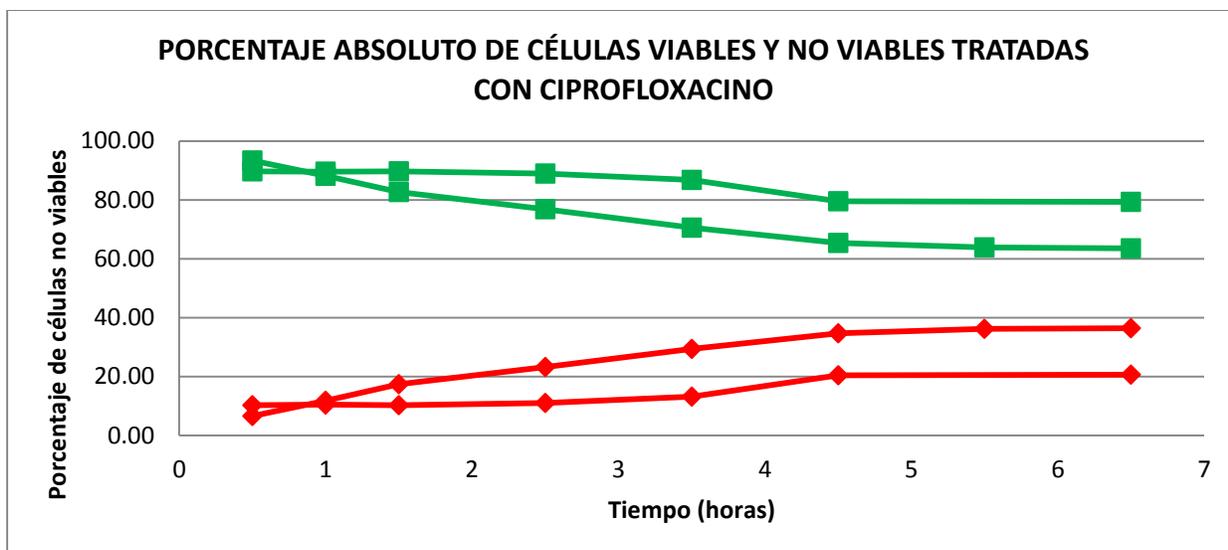
El número de células viables contabilizadas con ciprofloxacino muestra un comportamiento de mayor aleatoriedad. Sólo en uno de los ensayos realizados se observó la disminución de células viables esperada por las especificaciones del fabricante. El número de células viables teñidas de color verde fluctuó en un intervalo de 737 y 1065 células en ambos ensayos. El promedio del número de células no viables aumenta de 52 y 122 a 461 y 259 respectivamente.



**Gráfica 32. Porcentaje absoluto de células viables y no viables sin ciprofloxacino.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el porcentaje absoluto de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el porcentaje absoluto de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

Al analizar la gráfica 32 se observa un porcentaje de células no viables relativamente constante a lo largo del experimento. El porcentaje absoluto inicial fue de 9.95 y 6.64 % que después de seis horas y media aumenta ligeramente a 11.61 y 14.49 %.

En la Gráfica 33, que se muestra a continuación, se aprecia que en ninguno de los experimentos realizados con ciprofloxacino, el porcentaje de células no viables superó el porcentaje de células viables.



**Gráfica 33. Porcentaje absoluto de células viables y no viables con ciprofloxacino 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el porcentaje absoluto de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el porcentaje absoluto de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

El conteo celular con el kit de tintas LIVE/DEAD® resulta difícil de interpretar debido a que, en algunos ensayos sí se observa la disminución de la fluorescencia del Syto 9® en células no viables tratadas con antibiótico, sin embargo en otros ensayos no se presenta ésta tendencia de disminución. Debido a esto, es difícil establecer el tipo de análisis que debe llevarse a cabo.

#### **4.4.2.4 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS DE TINCIÓN**

Los resultados obtenidos para el monitoreo de la actividad bactericida del ciprofloxacino a 500 µg/mL con los pares de tintas DAPI-BE, DAPI-SX y LIVE/DEAD® permitieron concluir que el par de tintas más efectivo para realizar el monitoreo fue DAPI-BE puesto que los dos ensayos realizados con éstas tintas mostraron una reproducibilidad en el aumento continuo del número de células no viables de 81.7 y 65.85 unidades porcentuales. En éstos ensayos se observó un porcentaje final de células no viables de 83.03 % y 71.89 % respectivamente.

Las células teñidas con el par de tintas DAPI-SX no mostraron reproducibilidad en los ensayos realizados. En el primer experimento se partió de un porcentaje de células no

viables de 34.6% que después de seis horas y media aumentó 9.8 unidades porcentuales para llegar a 44.4%. Dicho aumento es muy bajo en comparación a lo observado con la tinta bromuro de etidio. En el segundo ensayo se observó un mayor aumento de células no viables. En éste caso, al inicio del experimento se calculó un porcentaje de 36.11 % que aumentó 30.37 unidades porcentuales en función del tiempo para alcanzar un porcentaje de 66.48% al finalizar el experimento.

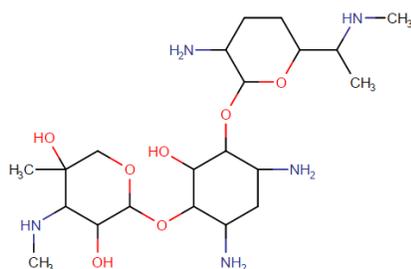
El kit de tintas LIVE/DEAD® también arrojó resultados relativamente favorables en uno de los ensayos realizados; se observó un porcentaje absoluto inicial de 6.6 % que después de seis horas y media llegó a 36.5 %, aumentando 29.9 unidades porcentuales. Este aumento de 29.9 unidades es cercano al observado con Sytox Green® de 30.37. Sin embargo, en las gráficas respectivas es más notorio el cambio producido por la tinta Sytox Green® ya que su porcentaje inicial es también más alto, no obstante, ambos resultados son comparables. A pesar de mostrar un aumento en el porcentaje de células no viables, no es un aumento tan favorable como el observado con el par DAPI-BE.

En cuanto al control de células sin tratamiento con antibiótico, se observó un comportamiento muy similar con las tres tintas. En donde el aumento de células no viables fue muy pequeño. El mayor aumento en unidades porcentuales fue de 15.2 unidades con el par DAPI-BE. EL menor aumento observado fue del kit LIVE/DEAD® con 4.97 unidades porcentuales.

A pesar de que el par DAPI-BE presentó un mayor aumento en el número de células muertas del control, no es comparable con los porcentajes de células no viables teñidas de rojo, observados en células tratadas con ciprofloxacino.

#### 4.4.3 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROGOTAS CON CÉLULAS *E. coli* BL21 Y GENTAMICINA

La molécula de gentamicina (Figura 62) es un aminoglucósido. Es un antibiótico de amplio espectro proveniente de la bacteria *Micromonospora purpúrea* y de otras especies relacionadas. Su uso está indicado para el tratamiento de infecciones serias causadas por los siguientes géneros de bacterias: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Staphylococcus*. [36]



**Figura 62. Gentamicina.**

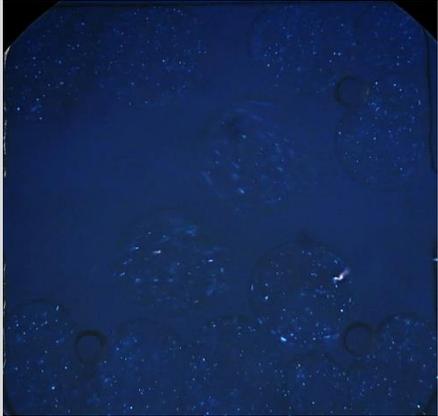
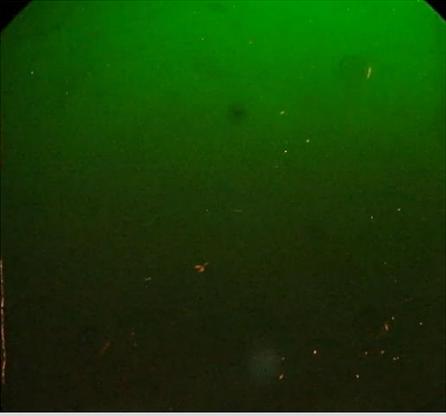
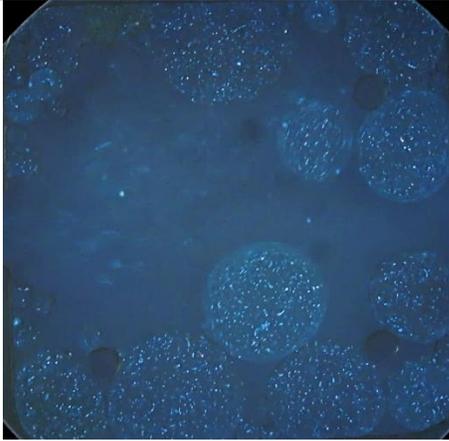
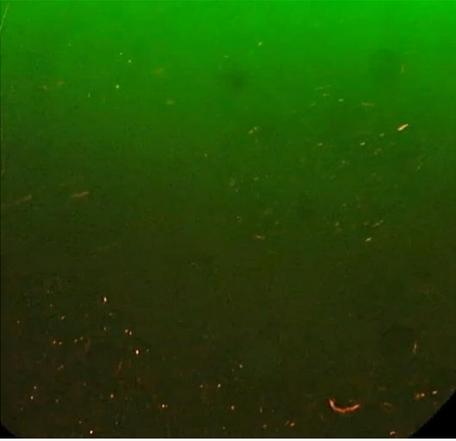
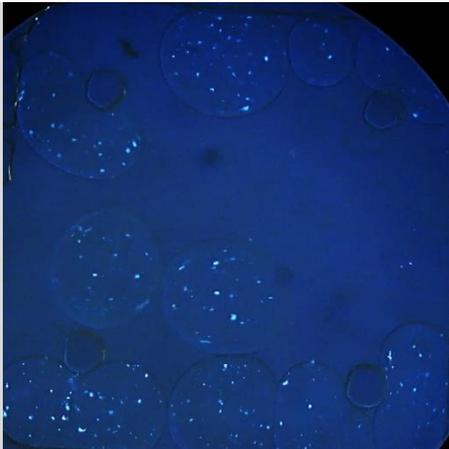
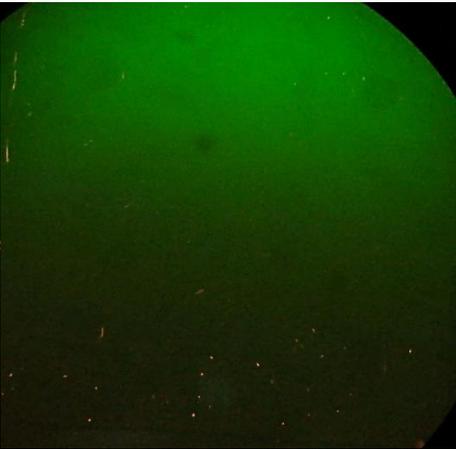
2-[4,6-diamino-3- [3-amino-6-(1-metilaminoetil) tetrahidropiran-2-il] oxi-2-hidroxi- ciclohexoxi]-5-metil- 4-metilamino-tetrahidropiran-3,5-diol [36]

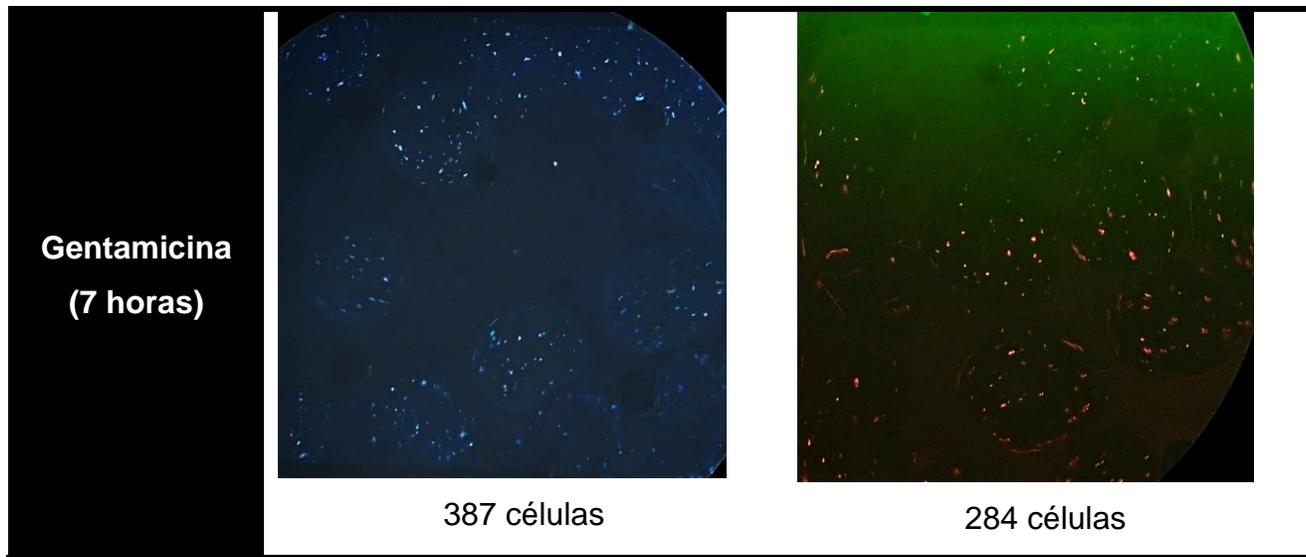
Los aminoglucósidos se unen a la subunidad ribosomal 30S, ocasionando lecturas incorrectas del mRNA. Esto provoca que los amino ácidos incorrectos sean insertados al polipéptido, lo que resulta en la síntesis de péptidos tóxicos o no funcionales en lugar de proteínas vitales para el crecimiento de los microorganismos. [36]

##### 4.4.3.1 CÉLULAS TEÑIDAS DAPI Y BROMURO DE ETIDIO

En la Tabla 9 se observa un ejemplo del comportamiento de las células sin antibiótico y con gentamicina a una concentración de 500 µg/mL al inicio del experimento y después de 7 horas.

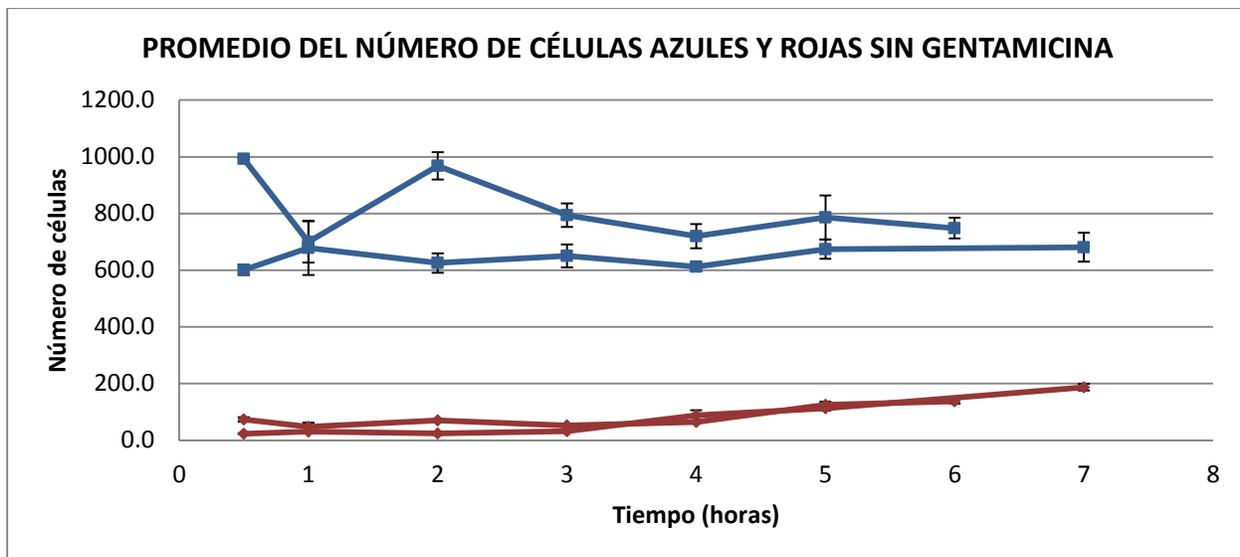
Tabla 9. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de gentamicina a 500 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.

	DAPI-50LP-A	LF 561/LP-C
<b>Control (0.5 horas)</b>	 <p>622 células</p>	 <p>22 células</p>
<b>Control (7 horas)</b>	 <p>715 células</p>	 <p>175 células</p>
<b>Gentamicina (0.5 horas)</b>	 <p>336 células</p>	 <p>42 células</p>

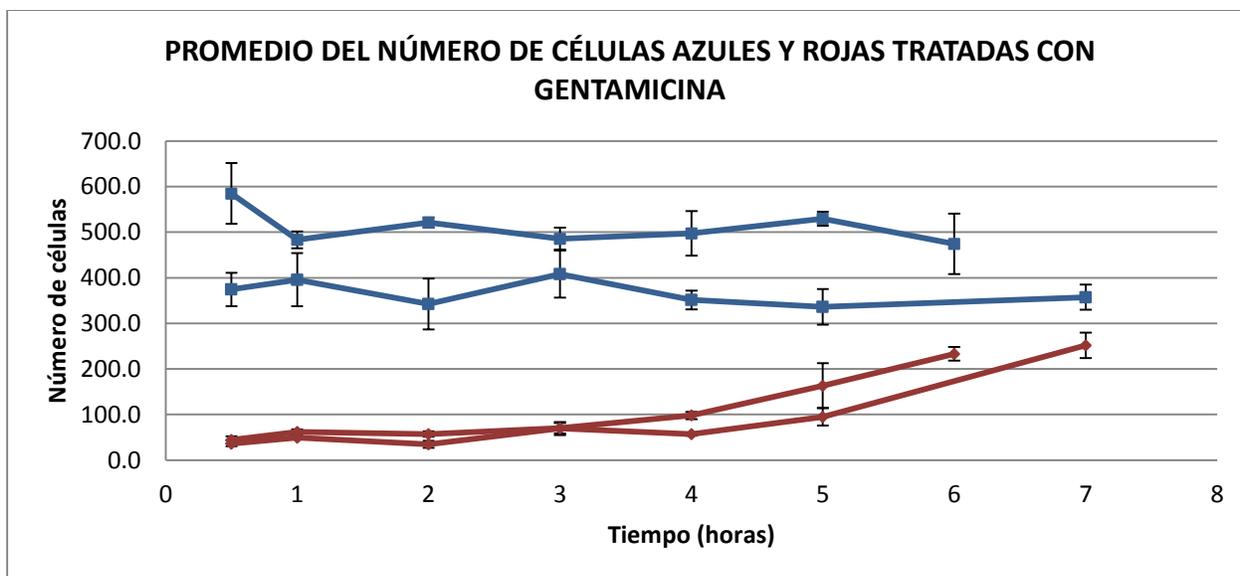


En las imágenes mostradas se puede observar un aumento del número de células no viables después de 7 horas tanto en el control como en las células con antibiótico. Sin embargo, el aumento de células no viables, teñidas con la tinta bromuro de etidio, es mayor en las células con gentamicina. Si se compara el total de células presentes teñidas con DAPI con las células no viables contabilizadas al final del experimento, se puede observar que después de 7 horas, 24.47% de las células control han dejado de ser viables, mientras que en las células con gentamicina se aprecia un 73% de células no viables.

Por otro lado, se observa que el número de células presentes en el control es aproximadamente 2 veces mayor al número de células contabilizadas en presencia de gentamicina, a su vez, se puede observar que el tamaño de las células en el control es menor al tamaño de las células con gentamicina. Por ésta razón se plantea la posibilidad de una aglomeración de células de *E. coli* debido al efecto bactericida de la gentamicina. Las gráficas 34 y 35 muestran el promedio del número de células sin y con gentamicina respectivamente.



**Gráfica 34. Promedio del número de células azules y rojas sin gentamicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

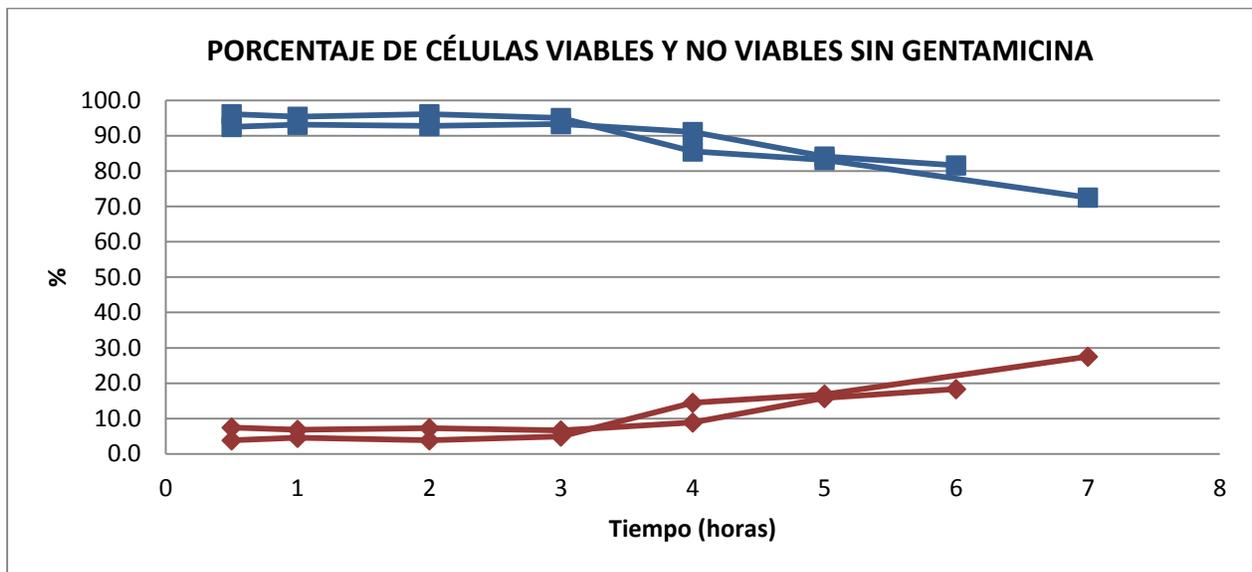


**Gráfica 35. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con gentamicina a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

Las Gráficas 34 y 35 muestran que el número de células azules no cambia en el tiempo, mientras que las células no viables teñidas con bromuro de etidio aumentan en función del tiempo en ambos casos. Es claro que las células tratadas con gentamicina

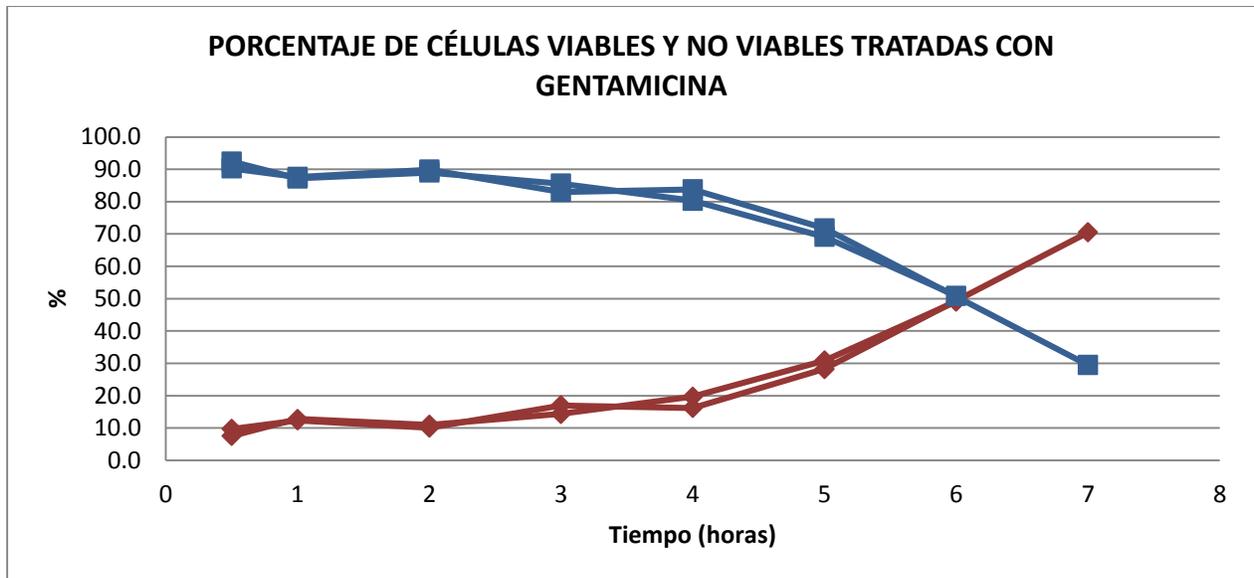
presentan un aumento mayor (de aprox. 35 a 250), con respecto a las células sin antibiótico (de aprox. 45 a 190).

La Gráfica 36 muestra el porcentaje de células viables y no viables sin gentamicina en función del tiempo. Al inicio del experimento el porcentaje de células no viables es de 7.5 y 3.9 %, después de 6 y 7 horas el porcentaje de células no viables alcanza un máximo de 18.4 % y 27.5% respectivamente.



**Gráfica 36. Porcentaje de células viables y no viables sin gentamicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Los datos azules representan el porcentaje de células viables. Los datos rojos representan el porcentaje de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

La Gráfica 37 muestra el comportamiento del porcentaje de células viables y no viables tratadas con gentamicina a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Al inicio del experimento se observa un porcentaje de células no viables de 7.6 y 9.7 % que aumenta de forma continua en función del tiempo. Después de 6 horas el porcentaje de células no viables es de 50.9 % y, después de 7 horas, es de 70.5%.

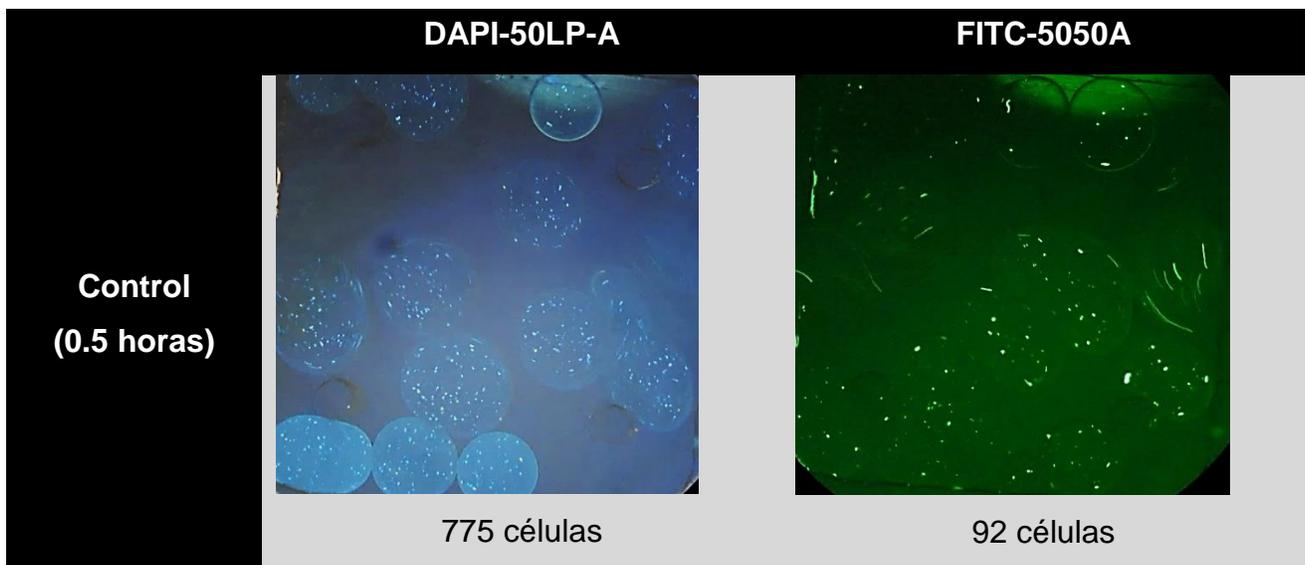


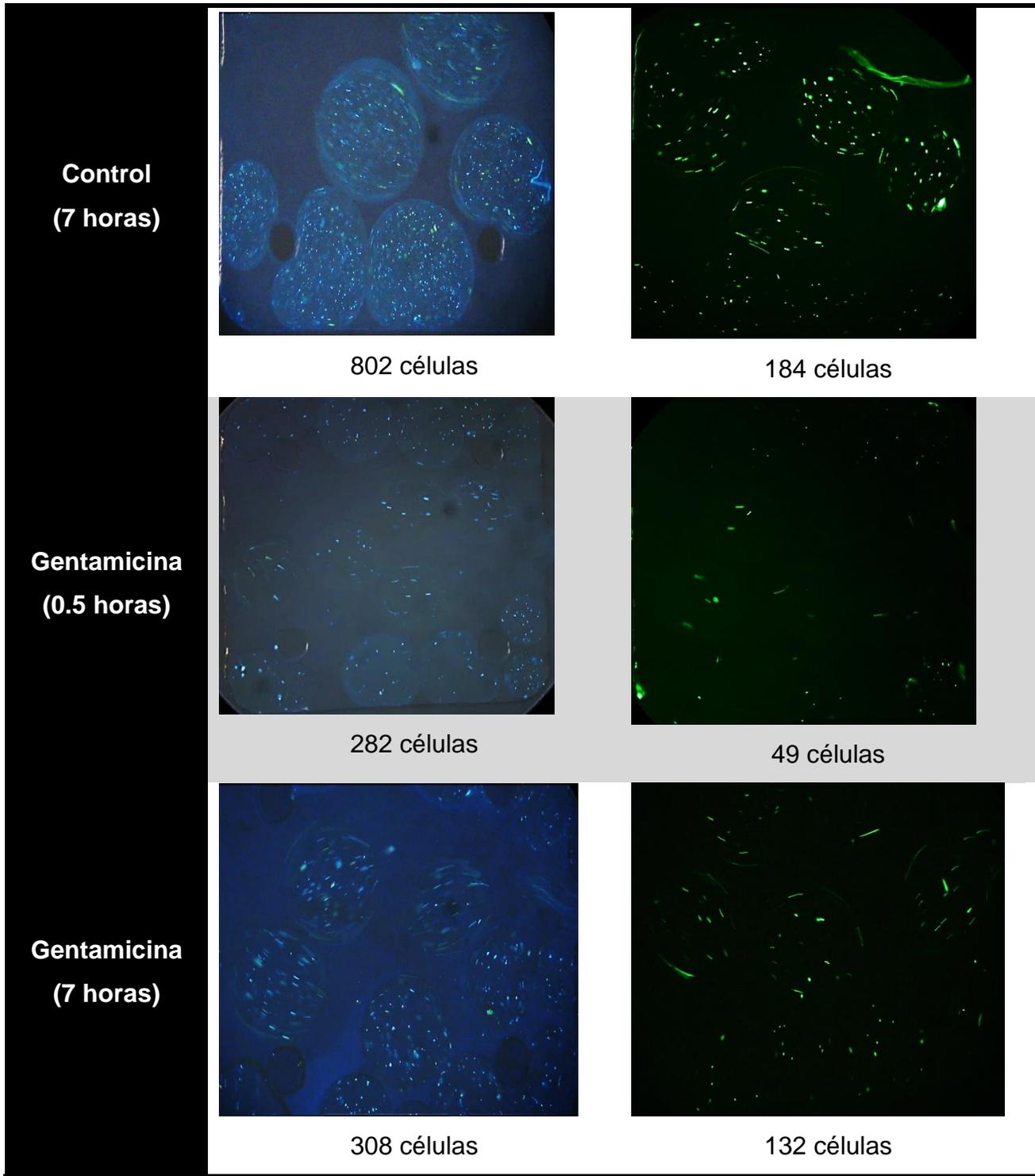
**Gráfica 37. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con gentamicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Los datos azules representan el porcentaje de células viables. Los datos rojos representan el porcentaje de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

#### **4.4.3.2 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®**

En la Tabla 10 se muestra el comportamiento de las células control y las células con gentamicina al inicio del ensayo y después de 7 horas.

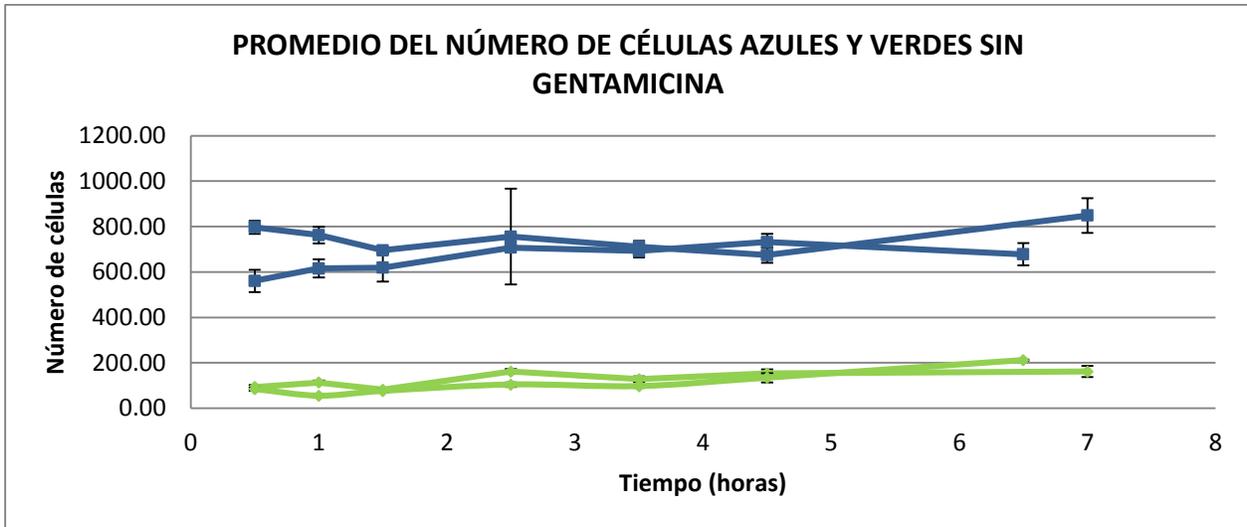
**Tabla 10. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de gentamicina a 500 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.**



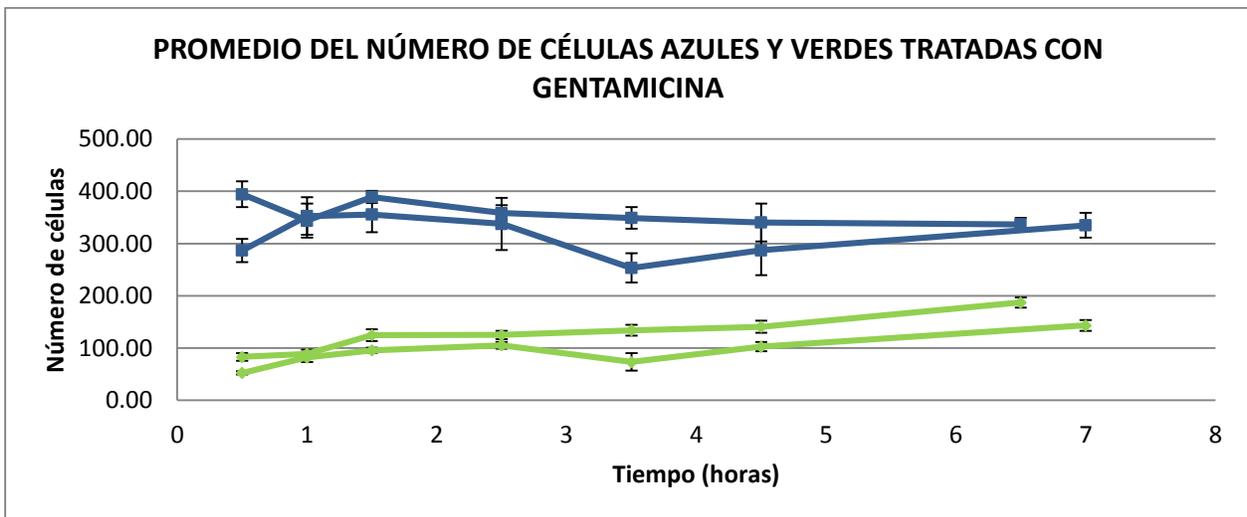


Las imágenes anteriores muestran el comportamiento observado al inicio del experimento y después de 7 horas. En las imágenes instantáneas del control se puede observar que después de 7 horas se presentó un aumento en el número de células no viables que representa el 22.9 % del total teñido de células teñidas con DAPI. De igual

manera, las fotos de las células tratadas con gentamicina a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentan también un aumento en el número de células no viables teñidas con Sytox Green<sup>®</sup>, sin embargo el porcentaje con respecto al número de células totales es mayor que en el control pues alcanza 42.8% de células no viables. En las gráficas 38 y 39 se muestra de forma más detallada el comportamiento de las células azules y verdes con y sin gentamicina en función del tiempo.



**Gráfica 38. Promedio del número de células azules y verdes sin gentamicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el promedio del número de células no viables teñidas con Sytox Green<sup>®</sup>.

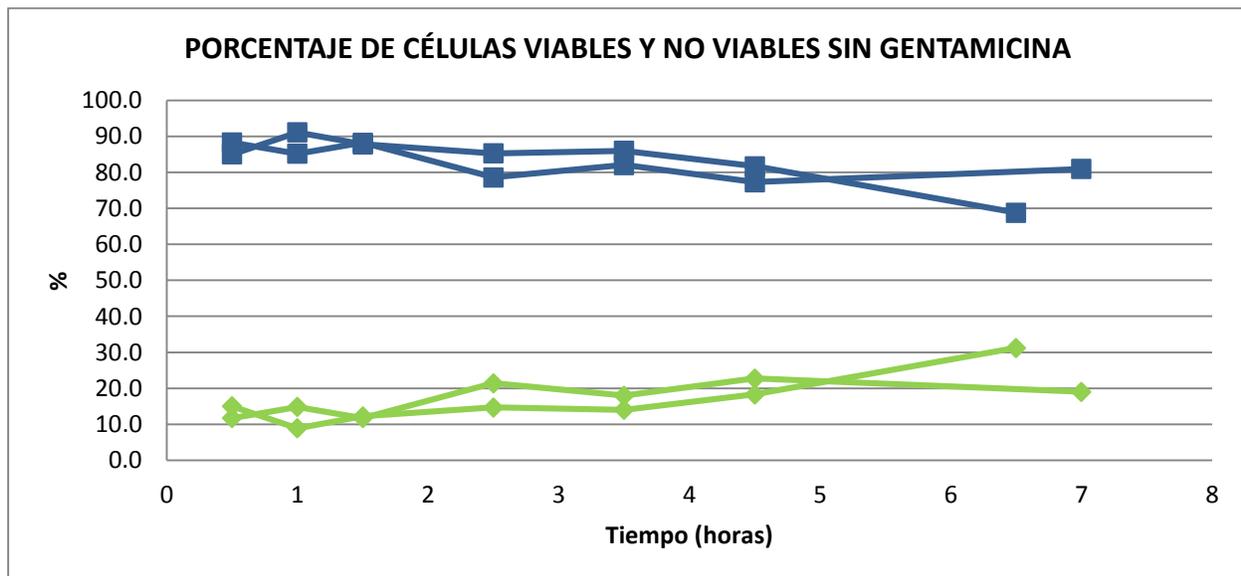


**Gráfica 39. Promedio del número de células azules y verdes tratadas con gentamicina a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el promedio del número de células no viables teñidas con Sytox Green<sup>®</sup>.

Por un lado, en la Gráfica 38 (células sin gentamicina) puede observarse un promedio del número total de células que fluctúa entre 560 y 849 células a lo largo de los dos experimentos. Las células no viables, teñidas de verde con Sytox green®, parten de 84 células llegando a un máximo de 211 células.

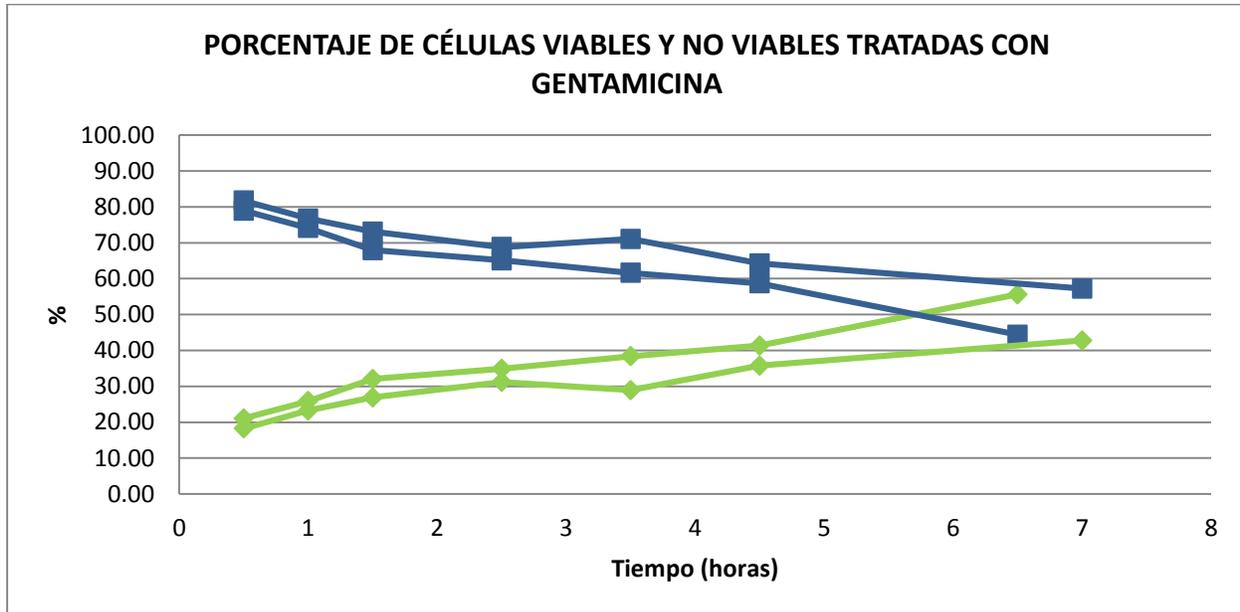
Por otro lado, la gráfica del monitoreo de células con gentamicina a 500 µg/mL (Gráfica 39) muestra un promedio del número total de células en un rango de 253 y 394 células a lo largo de ambos experimentos. Estos datos son considerablemente menores que el total de células contabilizadas en el control, lo anterior coincide con los resultados obtenidos previamente descritos en los ensayos con el par DAPI-BE. El número de células no viables inician con un mínimo de 52 células y aumentan a 187 células al final del experimento.

Debido a ésta aleatoriedad entre los datos del número de células, se presentan las gráficas 40 y 41 que muestran el porcentaje de células viables y no viables tratadas sin y con gentamicina para apreciar de forma más clara los datos obtenidos durante el monitoreo.



**Gráfica 40. Porcentaje de células viables y no viables sin gentamicina.** Se observan los datos de los dos ensayos independientes. Los datos azules representan el porcentaje de células viables. Los datos verdes representan el porcentaje de células no viables teñidas con Sytox Green®.

El monitoreo de las células control muestra un porcentaje de 11.71 y 14.98 % de células no viables al inicio del ensayo. Después de 6.5 y 7 horas se observó un aumento de 31.22 y 19.04% respectivamente.



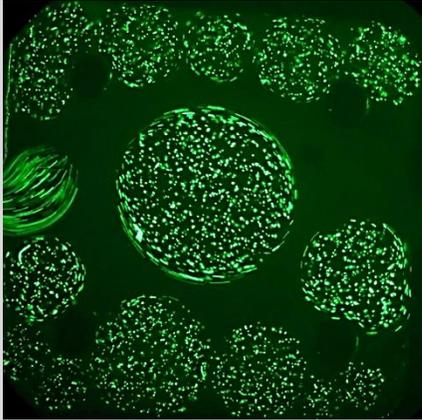
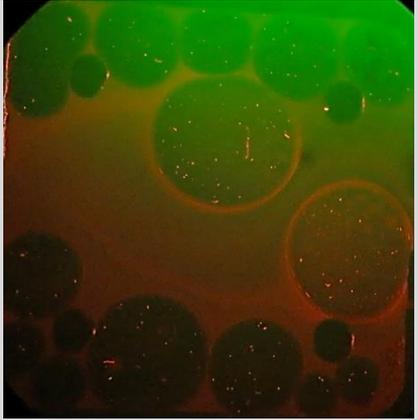
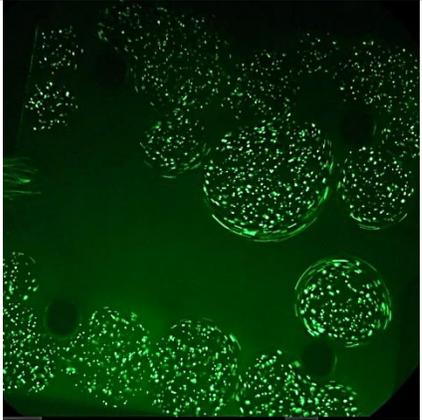
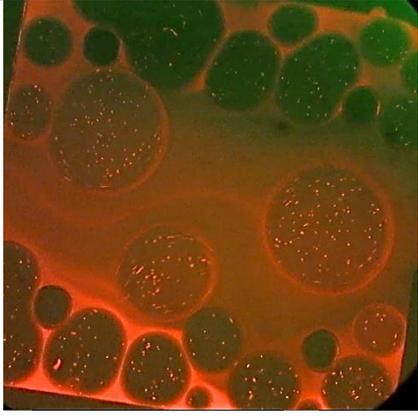
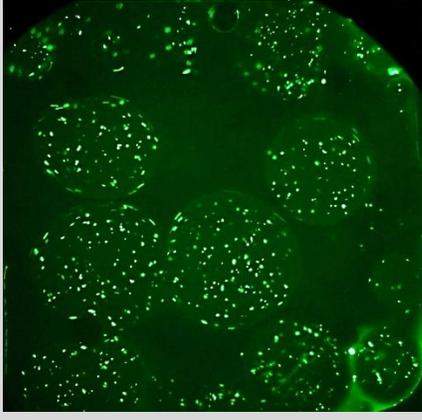
**Gráfica 41. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con gentamicina a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos independientes. Los datos azules representan el porcentaje de células viables. Los datos verdes representan el porcentaje de células no viables teñidas con Sytox Green®.

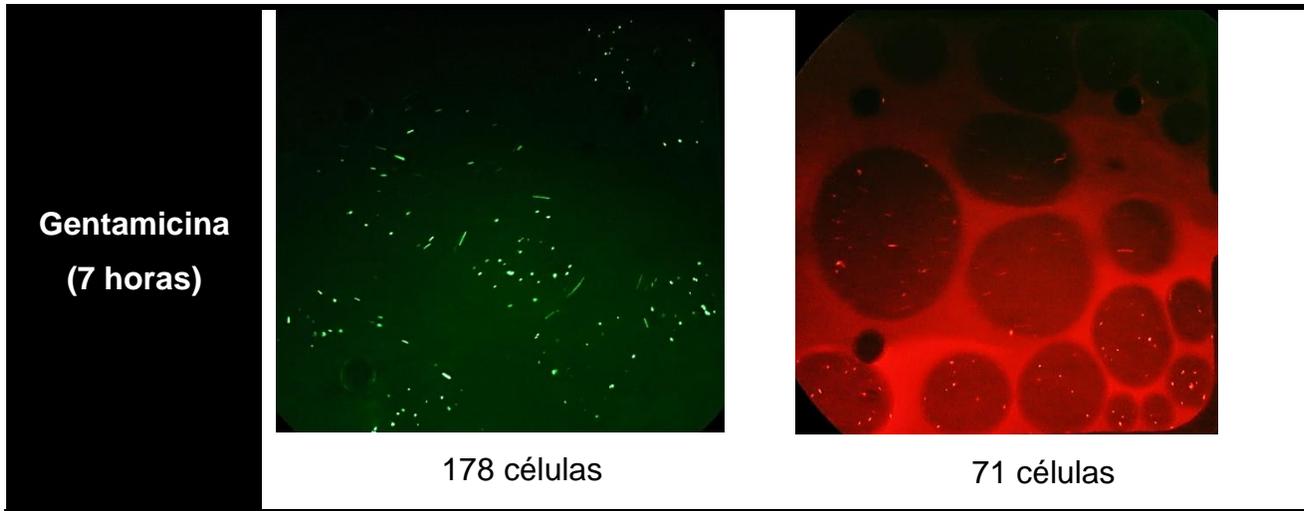
En la Gráfica 41 se observa el monitoreo de las células con gentamicina en función del tiempo. Al tiempo 0.5 horas el porcentaje de células no viables es de 18.26 y 21.05 % aumentando de forma continua, Después de 6.5 y 7 horas se observa 55.64 y 42.79 % de células no viables respectivamente.

#### **4.4.3.3 CÉLULAS TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO**

En la Tabla 11 se muestra un ejemplo de las fotos obtenidas para realizar el monitoreo de la actividad bactericida con el par de tintas Syto 9® y yoduro de propidio.

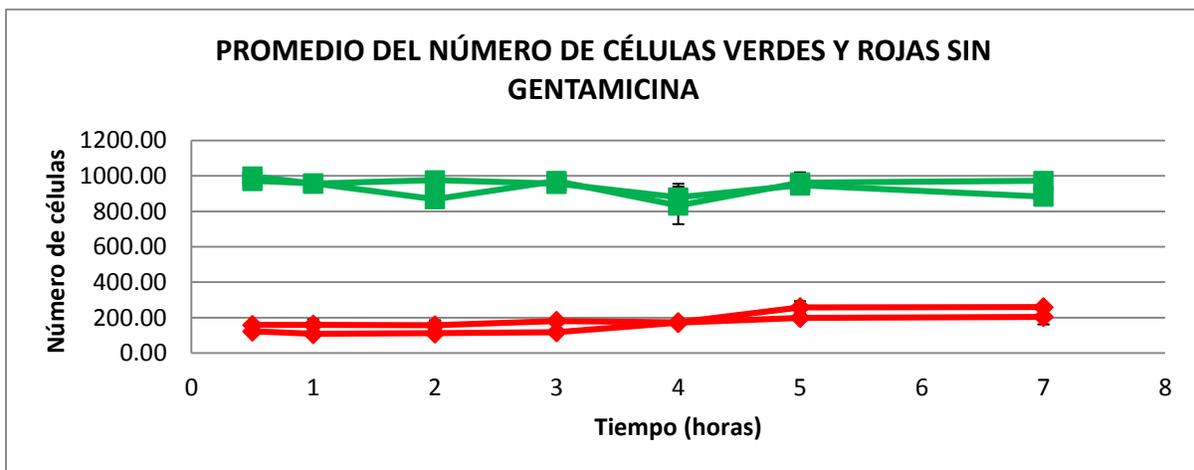
Tabla 11. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de gentamicina a 500 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.

	FITC-5050A	LF561/LP-C
Control (0.5 horas)	 <p>998 células</p>	 <p>145 células</p>
Control (7 horas)	 <p>926 células</p>	 <p>267 células</p>
Gentamicina (0.5 horas)	 <p>464 células</p>	 <p>59 células</p>



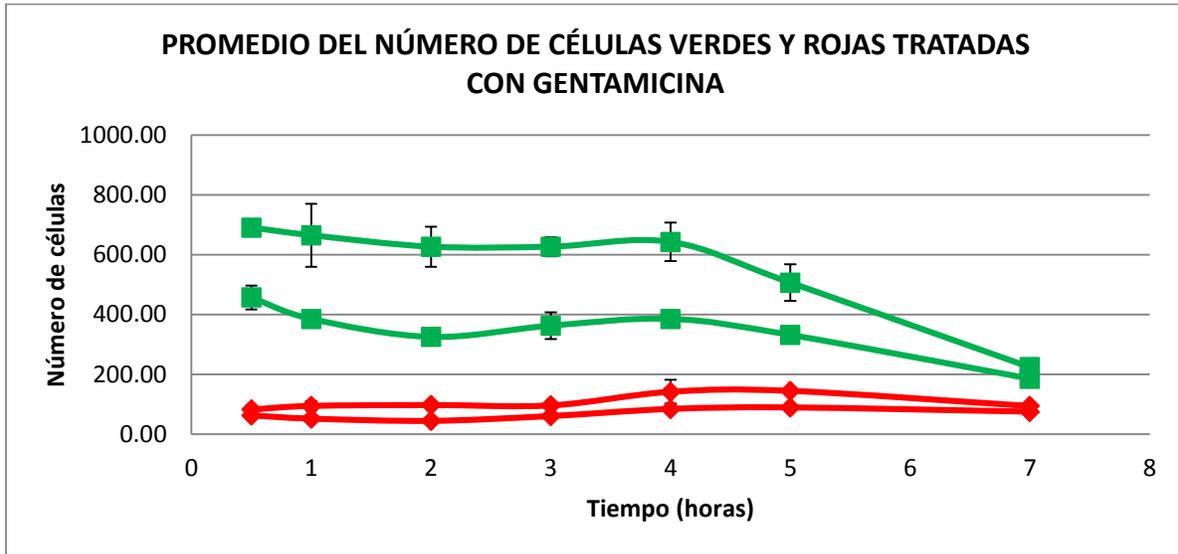
Estas imágenes muestran una visible diferencia en la cantidad de células contabilizadas con gentamicina en comparación con el control. Siendo menor la cantidad de bacterias observadas con gentamicina que en el control. A su vez, las células con gentamicina muestran un tamaño mayor. Lo cual sigue el patrón observado con los dos pares de tinta anteriores.

Por otro lado, se observa un aumento en el número de células no viables después de 7 horas tanto en el control, como en las bacterias con gentamicina a 500 µg/mL. Para realizar una comparación efectiva entre éstos dos resultados se presentan las gráficas 30 y 31 que muestran el monitoreo del número de células contabilizadas a lo largo del experimento y el tratamiento de datos llevado a cabo.



**Gráfica 42. Promedio del número de células verdes y rojas sin gentamicina.** Se observan los datos de los dos ensayos independientes. Los datos verdes representan el promedio del número de células viables teñidas con Syto 9®. Los datos rojos representan el promedio del número de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

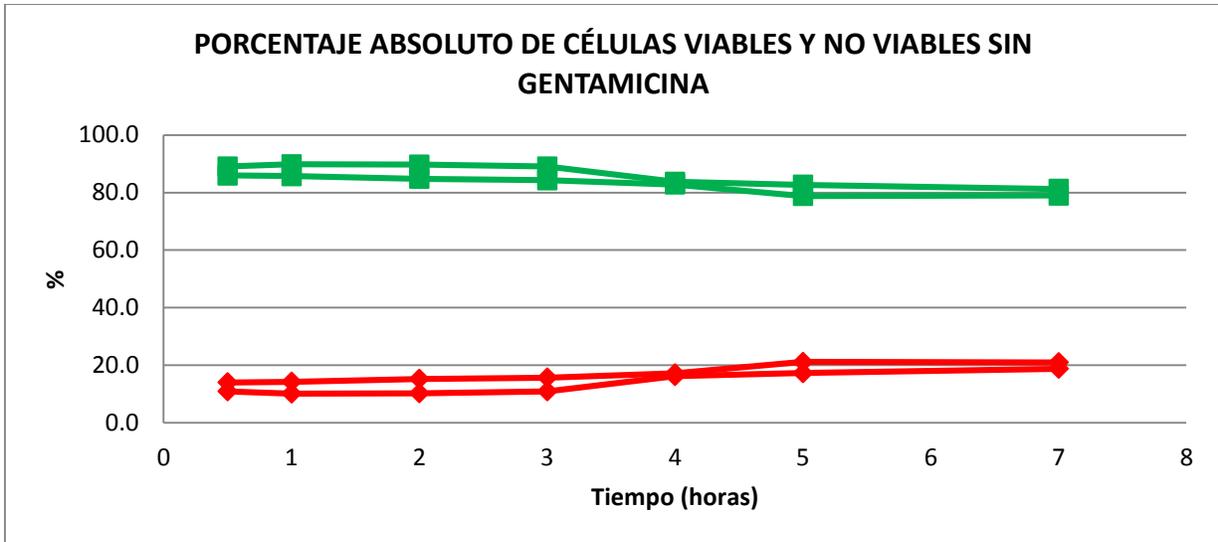
El número de bacterias viables teñidas con Syto 9<sup>®</sup> al inicio del experimento es de 972 y 997 células, al final de ambos experimentos, disminuyen ligeramente a 883 y 972 bacterias respectivamente. El conteo del número de células no viables teñidas con yoduro de propidio inicia en 158 y 122, después de 7 horas aumentan a 204 y 258.



**Gráfica 43. Promedio del número de células verdes y rojas tratadas con gentamicina a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos independientes. Los datos verdes representan el promedio del número de células viables teñidas con Syto 9<sup>®</sup>. Los datos rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

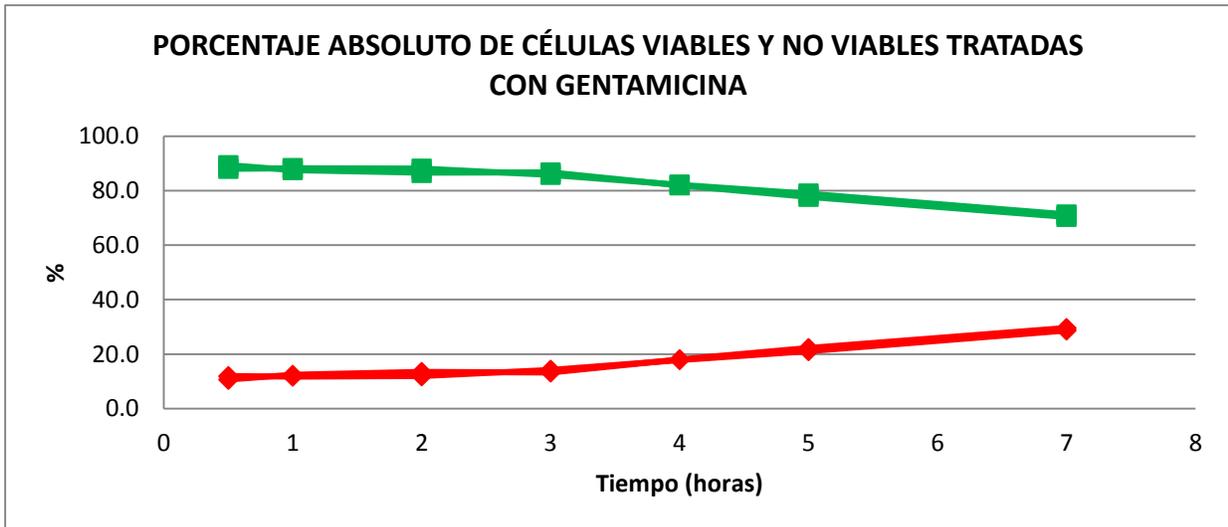
Las células viables con gentamicina presentan un comportamiento distinto al control pues al inicio de ambos ensayos se observa un promedio de 456 y 690 células que disminuyen notablemente después de 7 horas a un promedio de 185 y 223 bacterias viables respectivamente. Las células no viables se encuentran en un promedio de 82 y 62 bacterias al iniciar el experimento, después de 7 horas no se observó un aumento realmente considerable pues el promedio del número de bacterias no viables de las fotos analizadas aumentó únicamente a 94 y 74 células respectivamente.

La gráfica 44 muestra el porcentaje absoluto de células viables y no viables que no fueron tratadas con gentamicina. Se observa que el porcentaje de células no viables en uno de los ensayos parte de 10.9% y en otro de 14%, después de 7 horas el porcentaje de células no viables alcanza 18.8 y 21% respectivamente.



**Gráfica 44. Porcentaje absoluto de células viables y no viables sin gentamicina.** Se observan los datos de los dos ensayos independientes. Los datos verdes representan el porcentaje absoluto de células viables teñidas con Syto 9®. Los datos rojos representan el porcentaje absoluto de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

La gráfica 45 muestra el comportamiento porcentual, en función del tiempo, de células viables y no viables que fueron tratadas con gentamicina. El porcentaje absoluto de células no viables al inicio del experimento fue de 10.7 y 12.0% aumentando en función del tiempo a 28.7 y 29.6% después de 7 horas.



**Gráfica 45. Porcentaje absoluto de células viables y no viables tratadas con gentamicina a 500 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Los datos verdes representan el porcentaje absoluto de células viables teñidas con Syto 9®. Los datos rojos representan el porcentaje absoluto de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

Comparando el porcentaje absoluto de células no viables entre el control (18.8 y 21 %) y las células tratadas con gentamicina (28.7 y 29.6 %), se aprecia una diferencia poco cuantitativa.

#### **4.4.3.4 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS DE TINCIÓN**

El monitoreo del efecto bactericida de la molécula de gentamicina sobre células bacterianas *E. coli* BL21, arrojó resultados positivos ya que a partir del aumento de células no viables fue posible seguir el efecto bactericida de éste antibiótico y diferenciarlo del comportamiento observado en las bacterias control.

Los resultados obtenidos con éste antibiótico resultan ser más favorables para los pares de tintas DAPI-BE y DAPI-SX que para el kit Live and Dead<sup>®</sup> debido a que se observó un mayor aumento en el porcentaje de células no viables que permite realizar un monitoreo más efectivo del efecto bactericida.

Por otro lado, con los tres métodos de tinción se observó una menor cantidad de células presentes en la cámara de reacción del microchip cuando se suministró gentamicina a 500 µg/mL en comparación a la cantidad de bacterias observadas en el control. También se observó que el tamaño de las bacterias con gentamicina fue más grande que las visualizadas en el control. La gentamicina actúa sobre la unidad ribosomal S de las bacterias inhibiendo la síntesis de proteínas vitales, algunas de ellas proteínas de membrana. Al verse afectada la constitución de su membrana es posible que se aglomeren resultando en una menor cantidad de células visibles pero de mayor tamaño.

Para corroborar ésta observación, se analizaron 5 fotos obtenidas al inicio del experimento con gentamicina y 5 fotos sin gentamicina. Usando el programa Image J se midieron 5 células bacterianas en cada foto y posteriormente se promediaron. El mismo procedimiento se siguió en 5 fotos con gentamicina y 5 fotos sin gentamicina obtenidas después de 7 horas. En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 12. Comparación del diámetro de células con y sin gentamicina

Tiempo	Gentamicina	Sin gentamicina
0.5 horas	6.94 ± 2.54 μm	1.91 ± 0.70 μm
7 horas	7.25 ± 1.79 μm	1.93 ± 0.67 μm

Algo interesante es que esta aglomeración (aumento en el tamaño) se da desde la primera media hora, mientras que el cambio en el color de las tintas ocurre en un periodo prolongado de 7 horas, por lo que el tamaño de las bacterias o sus aglomerados pudiera ser utilizado como un criterio de viabilidad (al menos para este tipo de antibiótico).

#### 4.4.4 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE VIABILIDAD CELULAR EN MICROGOTAS CON CÉLULAS DE *E. coli* BL21 Y FOSFOMICINA

La molécula de fosfomicina (Figura 63) pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como ácidos orgánicos fosfónicos sintetizado a partir de bacterias del género *Streptomyces*. [37]

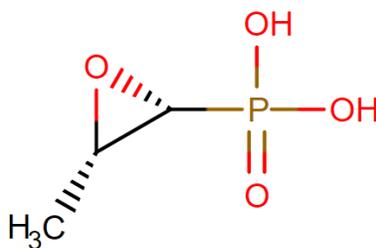


Figura 63. Fosfomicina

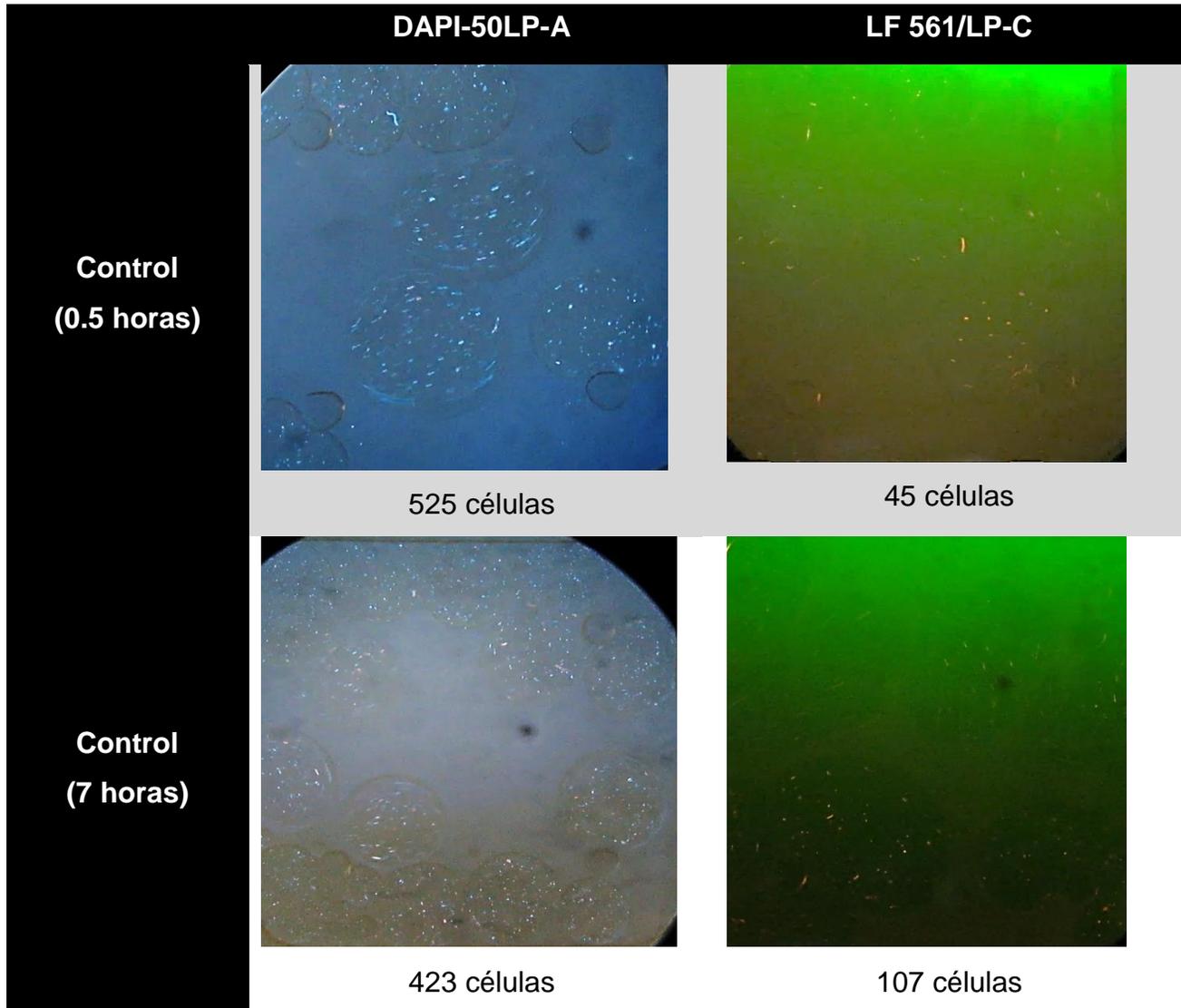
Ácido-cis-(1R,2S)-epoxipropilfosfónico [37]

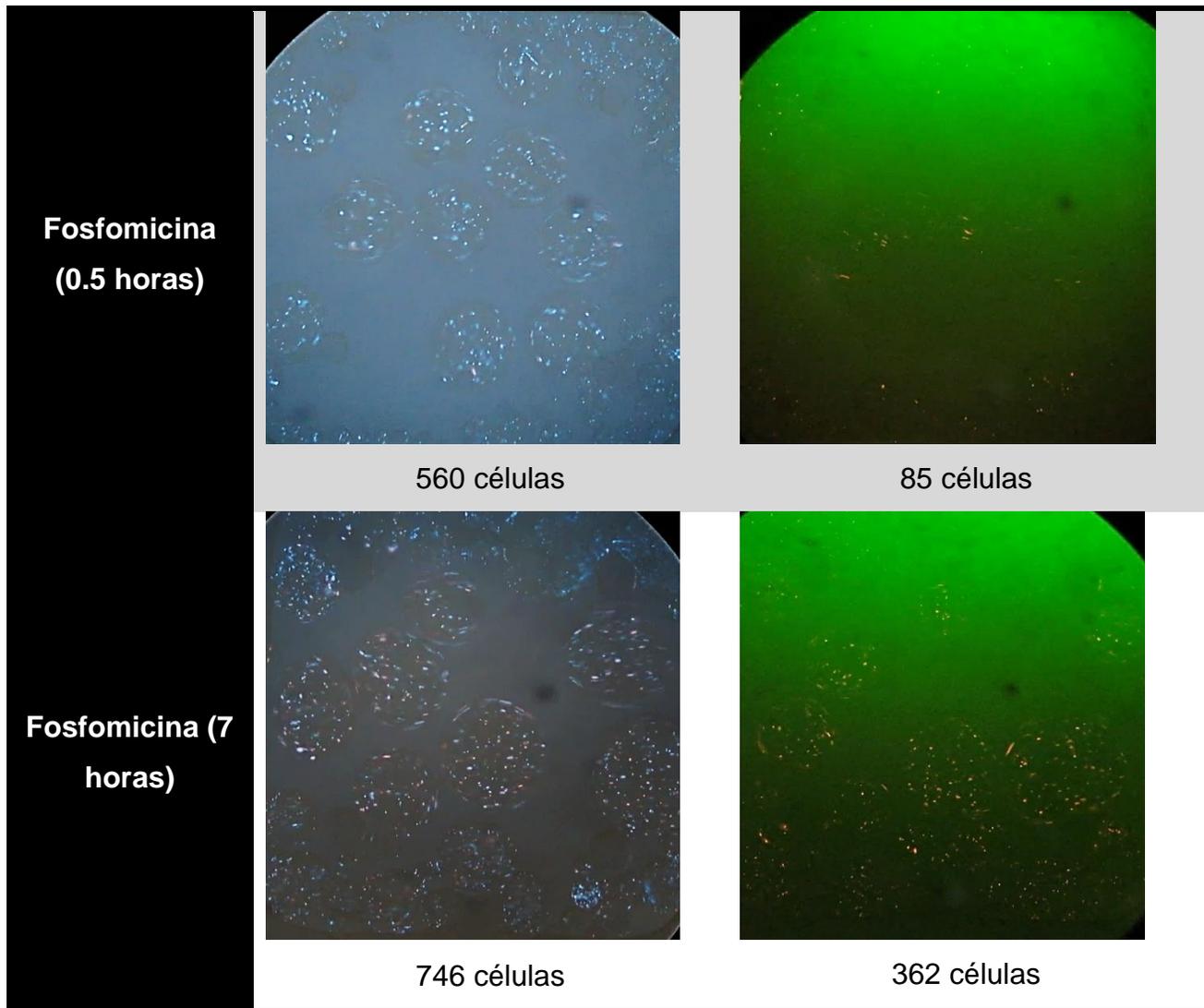
La fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro que se concentra en los riñones y la vejiga y es recetado para tratar infecciones urinarias. Este compuesto es un análogo del fosfoenolpiruvato por lo que inactiva la enzima UDP-*N*-acetilglucosamina-3-0-enolpiruvil transferasa (MurA) por medio de la alquilación del sitio activo correspondiente a un residuo de cisteína Cys 115 de la enzima. De ésta forma se inhibe la síntesis del ácido *N*-acetilmurámico, componente esencial de la pared celular de peptidoglicano. [37]

#### 4.4.4.1 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y BROMURO DE ETIDIO

En primera instancia se planeó un experimento a una concentración de 500 µg/mL de fosfomicina, sin embargo, desde el inicio del monitoreo se observó una gran cantidad de células no viables tratadas con fosfomicina (Ver sección 4.8), por lo que se disminuyó la concentración del antibiótico a 250 µg/mL. Esta concentración se usó con los tres pares de tintas evaluados. En la Tabla 13 se observa un ejemplo del comportamiento de las células sin antibiótico y con fosfomicina a una concentración de 250 µg/mL al inicio del experimento y después de 7 horas.

Tabla 13. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de fosfomicina a 250 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.





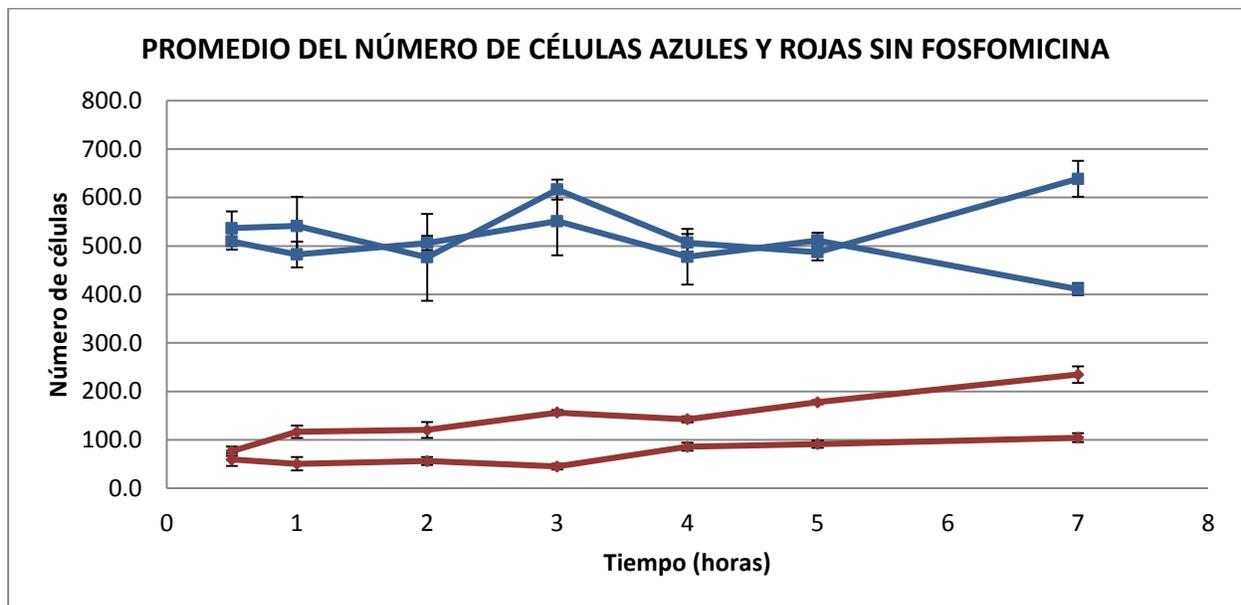
Las imágenes anteriores son un ejemplo de cómo se observan las células de *E. coli* teñidas con el par de tintas DAPI-BE con y sin antibiótico al inicio del experimento y después de 7 horas de tratamiento. En la foto que representa el total de células con fosfomicina después de 7 horas, puede observarse que algunas células han adquirido una fluorescencia en tonalidades rojas, esto se debe a que el bromuro de etidio ha penetrado a la célula y su fluorescencia puede observarse en el set de filtros DAPI-50LP-A. Éste efecto se debe a que el filtro de emisión de dicho set de filtros se encuentra abierto desde los 420 nm en adelante (Ver figura 15. Sección de Antecedentes); el bromuro de etidio emite a una longitud de onda de 603 nm por lo que es posible visualizar su fluorescencia dentro del filtro de emisión del set DAPI-50LP-A.

Dicho efecto puede observarse en algunas de las fotos capturadas, no obstante, es más fácil de apreciar al observar los videos.

Por otro lado, se observa que el porcentaje de células no viables en el control sin antibiótico al inicio del experimento es de 8.57 %, que después de siete horas aumenta a 25.29 %. Así mismo, se aprecia un gran aumento en la cantidad de células no viables que fueron tratadas con fosfomicina. Se observa un porcentaje inicial de 15.17 %, después de siete horas el porcentaje de células no viables se eleva a 48.52 %.

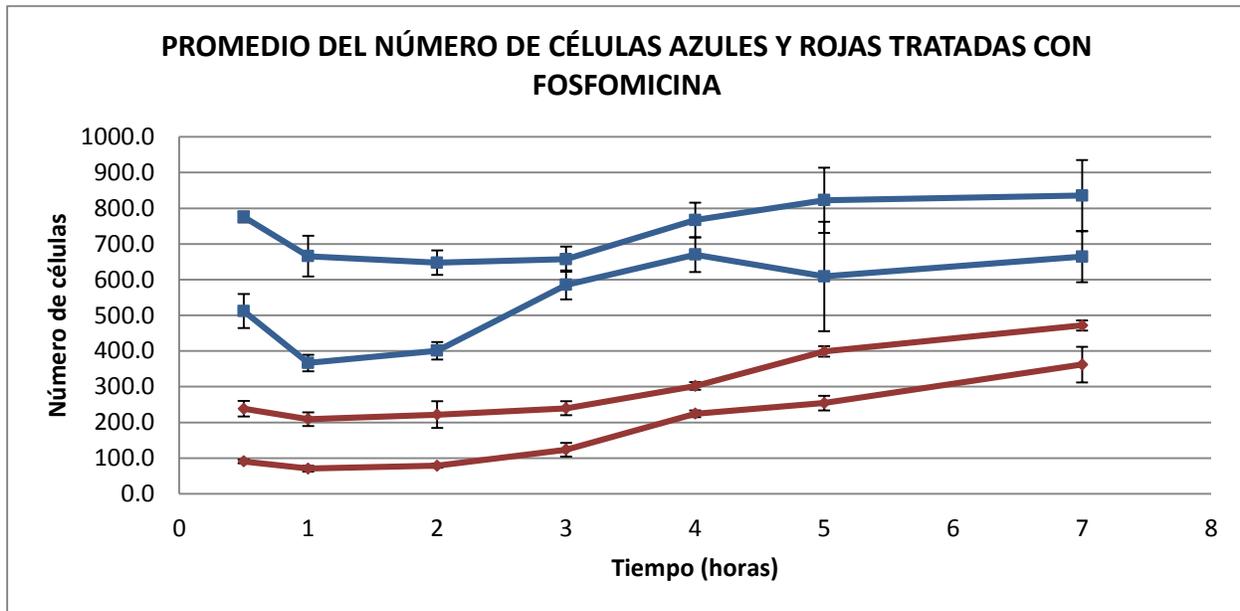
Las imágenes mostradas en la tabla anterior no representan el total de datos recopilados ni el comportamiento observado cada hora.

En las siguientes gráficas (46 y 47) se muestra el promedio del número de células azules y rojas contabilizadas en todas las fotos adquiridas durante las siete horas del experimento. El ensayo se llevó a cabo por duplicado por lo que en las siguientes gráficas se observan dos pares de datos (células azules y células rojas) que representan cada uno de los ensayos.



**Gráfica 46. Promedio del número de células azules y rojas sin fosfomicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

La gráfica 46 muestra el promedio del número de células totales teñidas de color azul sin presencia de fosfomicina. El promedio total se mantiene entre 411 y 638 células. Se observa un ligero aumento en el número de células no viables, al inicio de los experimentos se observó un promedio de 76 y 59 células que después de siete horas aumentan a 234 y 104 respectivamente.

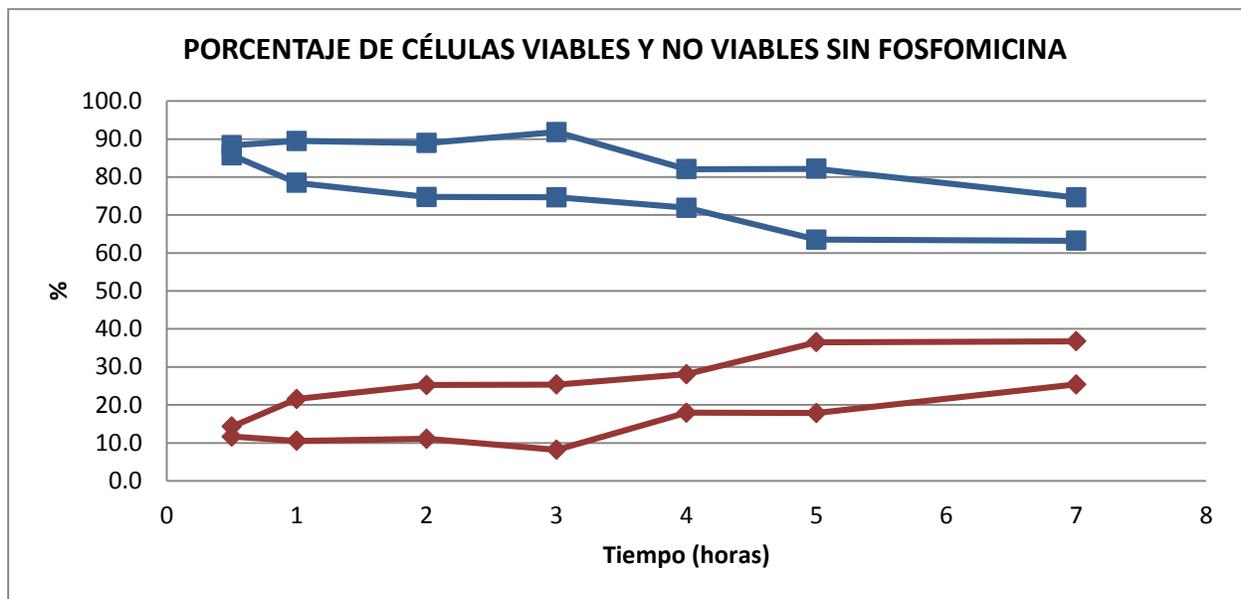


**Gráfica 47. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con fosfomicina a 250 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

En la gráfica 47 se presentan los datos recopilados en siete horas de experimentación con células de *E. coli* tratadas con fosfomicina. Se observa que en los dos ensayos realizados existe una variación aleatoria en el número total de células presentes, esto debido al número de gotas observadas durante cada experimento.

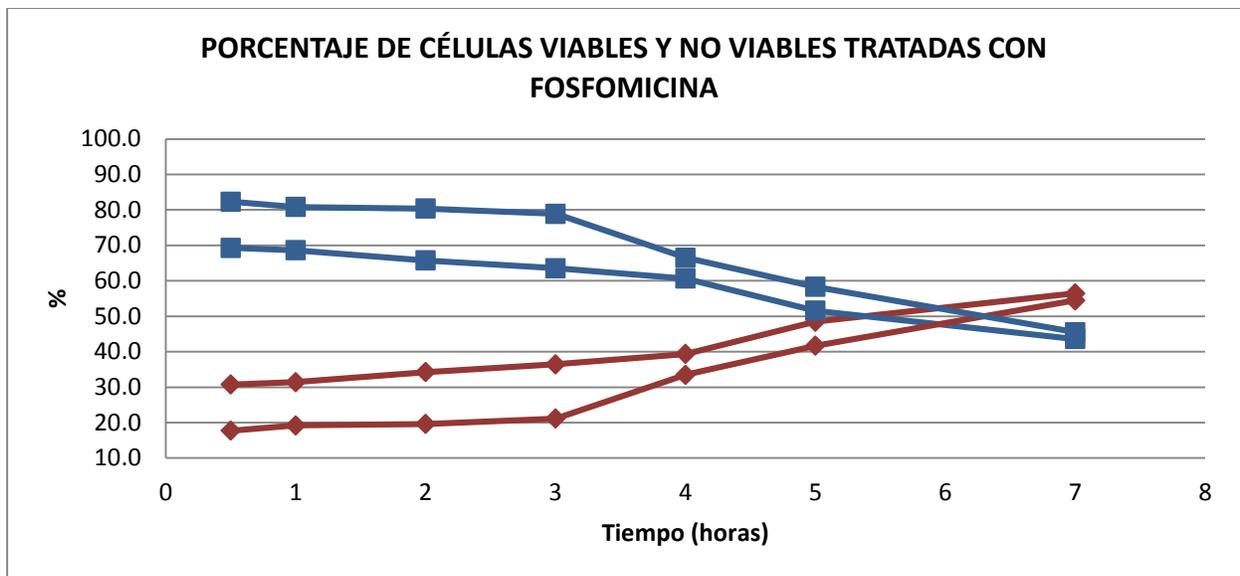
El promedio del número de células no viables muestra un aumento después de siete horas de experimentación. Al inicio de los experimentos se observaron 238 y 90 células, la gráfica muestra un aumento continuo del número de células no viables llegando a un promedio de 471 y 362 células respectivamente.

El número de células observado en cada punto varía en cada experimento debido al flujo continuo de células encapsuladas en microgotas. Las gráficas 48 y 49 muestran los datos anteriores expresados en porcentaje, éstas gráficas permiten apreciar mejor las tendencias presentadas durante el experimento, ya que toman en cuenta las variaciones ya mencionadas del número de células.



**Gráfica 48. Porcentaje de células viables y no viables sin fosfomicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

La Gráfica 48 muestra un aumento de células no viables de 22.5 y 13.8 unidades porcentuales en los dos ensayos realizados. Alcanzando un porcentaje de 36.8% y 25.4% respectivamente.



**Gráfica 49. Porcentaje de células viables y no viables con fosfomicina a 250 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

En la Gráfica 49 se observa un porcentaje inicial de células no viables de 30.7 y 17.7 %, que aumentan en función del tiempo, al finalizar el experimento se observa un porcentaje final de células no viables de 56.4 y 54.5 % respectivamente.

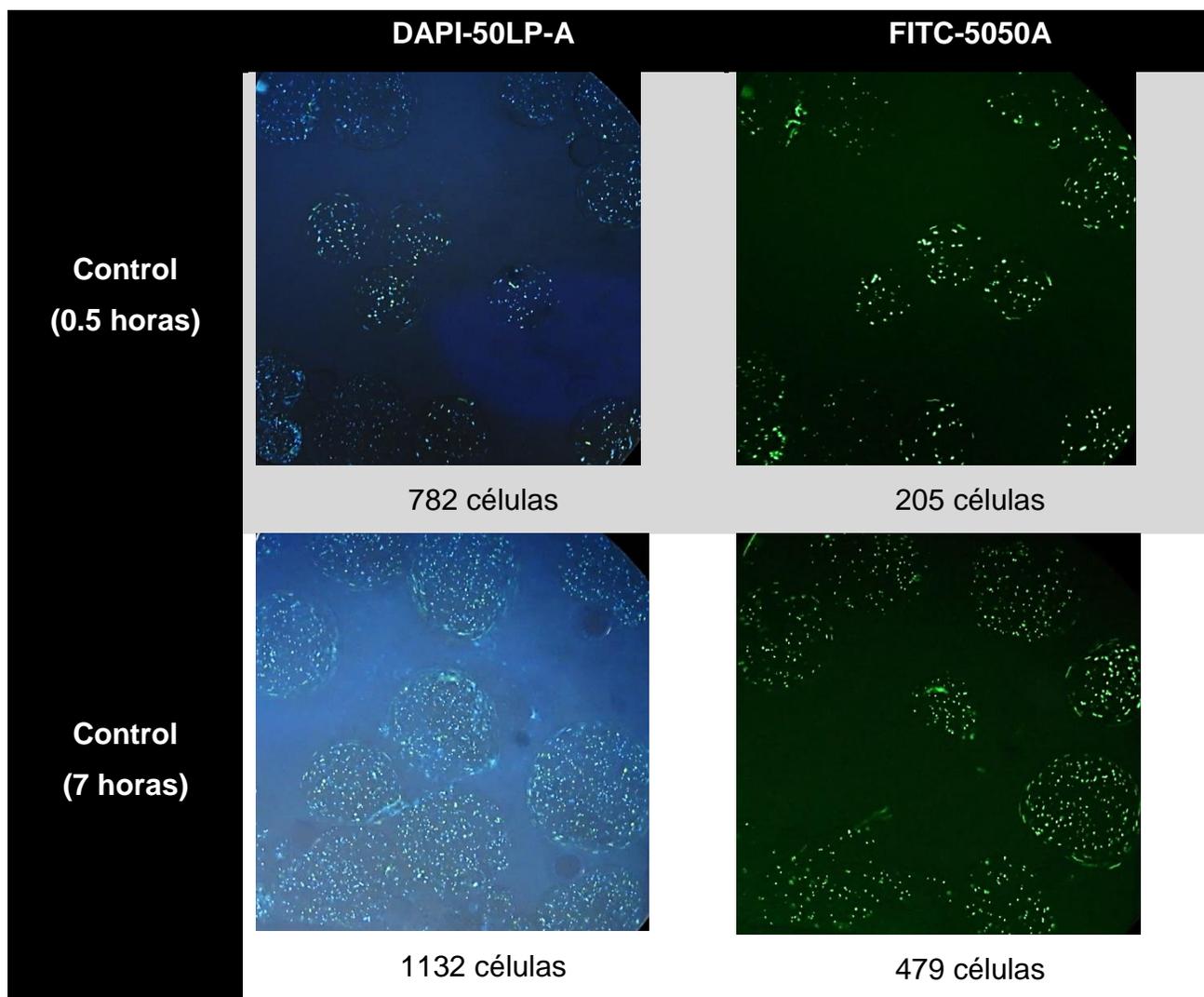
Los porcentajes iniciales observados en las células tratadas con fosfomicina son mayores a los calculados en el control de células sin tratamiento con antibiótico. Esto puede deberse a que el efecto bactericida de la fosfomicina se presentó desde la primera media hora del ensayo. Esto no se observó en los ensayos llevados a cabo con ciprofloxacino y gentamicina que incluso fueron administrados en una dosis dos veces mayor a la concentración de fosfomicina.

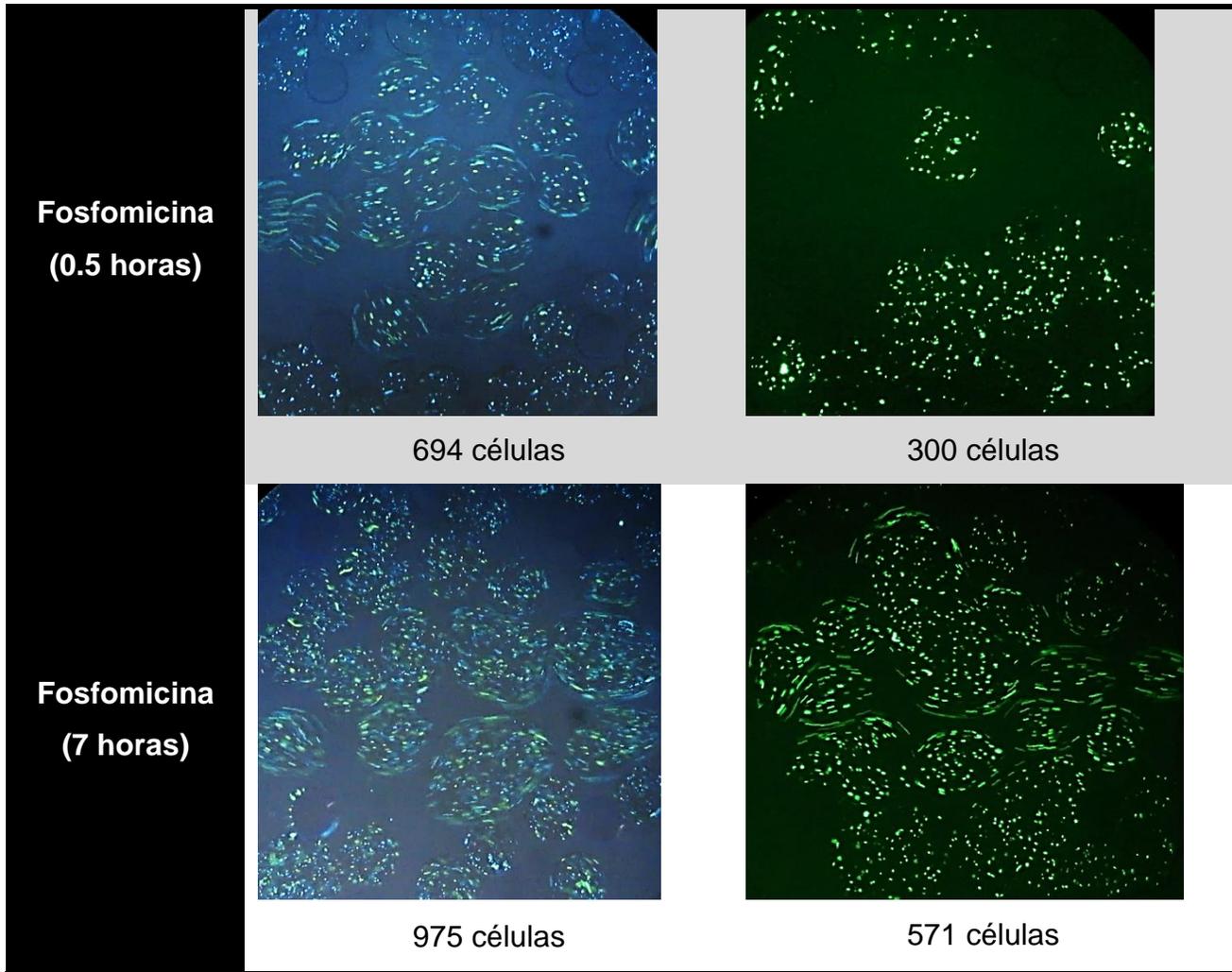
La fosfomicina ataca directamente la síntesis de la pared celular de las bacterias, y el bromuro de etidio permite detectar células con la integridad de la membrana comprometida, ambos efectos se encuentran directamente relacionados, por lo que es posible que a esto se deba un porcentaje mayor de células no viables al inicio del experimento en comparación con los otros dos antibióticos probados.

#### 4.4.4.2 CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI Y SYTOX GREEN®

En la Tabla 14 se observa un ejemplo del comportamiento de las células sin antibiótico y de células tratadas con fosfomicina a una concentración de 250 µg/mL al inicio del experimento y después de 7 horas.

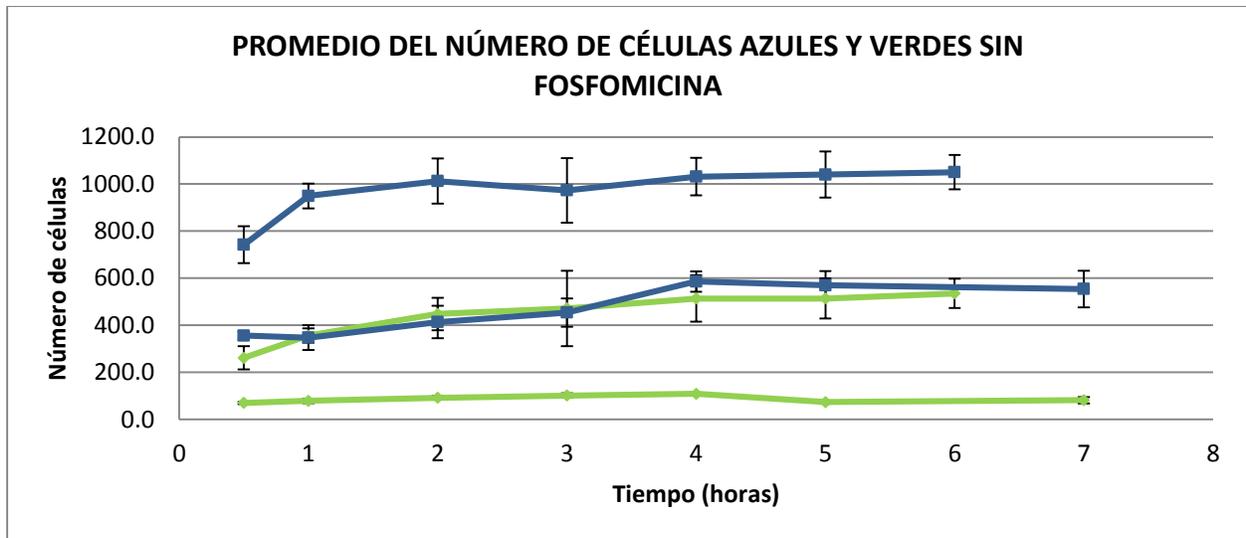
Tabla 14. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de fosfomicina a 250 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.





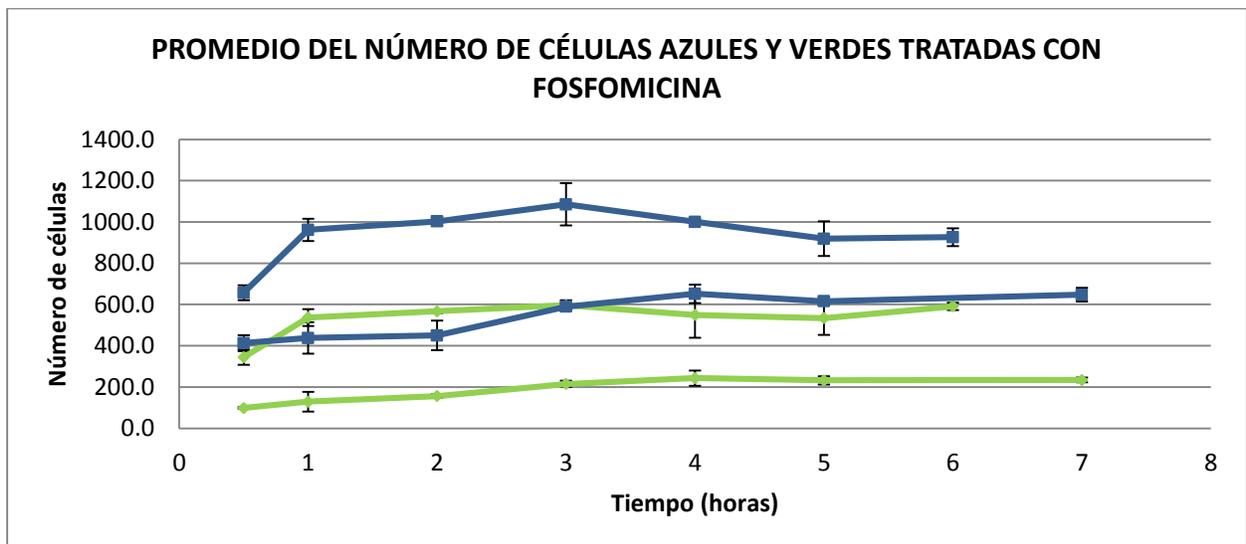
En las imágenes de células que no fueron tratadas con fosfomicina se aprecia un aumento significativo en la cantidad de células no viables teñidas con Sytox Green®. En las fotos aquí mostradas se aprecia que al inicio del experimento hay un porcentaje de células no viables de 26.21%, después de siete horas éste porcentaje aumenta a 42.3% de células no viables.

Las imágenes de células tratadas con fosfomicina muestran un mayor aumento en la cantidad de células no viables. Al inicio del experimento se aprecia un porcentaje de 43.22% de células no viables. Después de siete horas se observa un aumento a 58.56%. La gráfica 50 muestra el promedio, del número total de células y del número de células no viables, contabilizadas durante siete horas de experimentación.



**Gráfica 50 Promedio del número de células azules y verdes sin fosfomicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el promedio del número de células no viables teñidas con Sytox Green®.

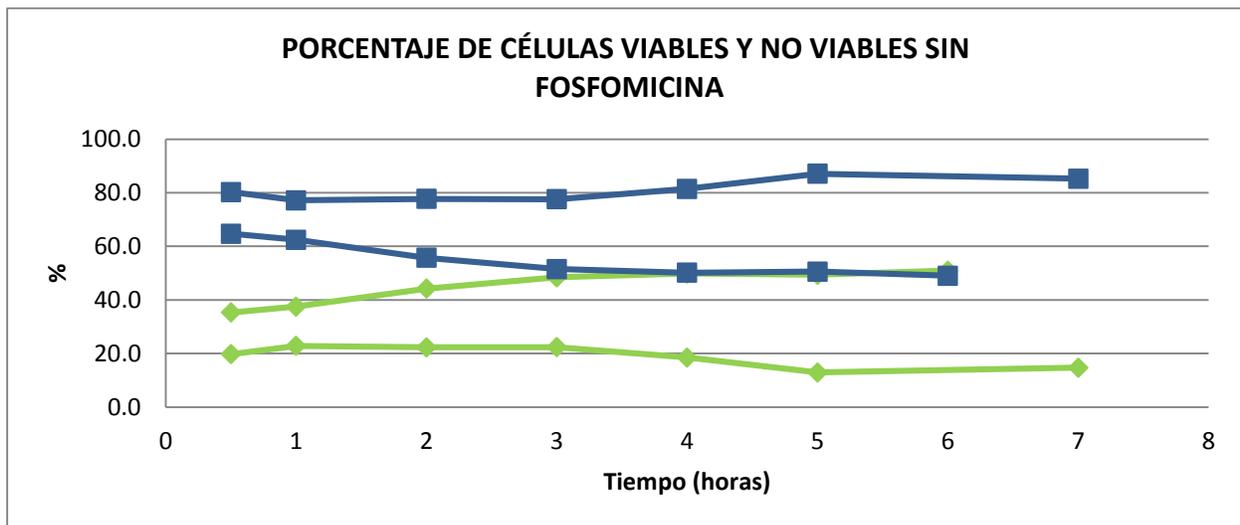
Como puede verse, los datos muestran una gran variación en el promedio de ambos ensayos. Se aprecia una diferencia de hasta 598 células. Esta variación puede atribuirse al número de gotas presentes en cada ensayo. El sistema es muy sensible a cualquier cambio en el sistema de introducción; el ensayo que presenta una menor cantidad de células fue llevado a cabo con bombas de infusión distintas a las usadas en el resto de los ensayos debido a que no se encontraban disponibles.



**Gráfica 51. Promedio del número de células azules y verdes tratadas con fosfomicina a 250 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el promedio del número de células totales teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el promedio del número de células no viables teñidas con Sytox Green®.

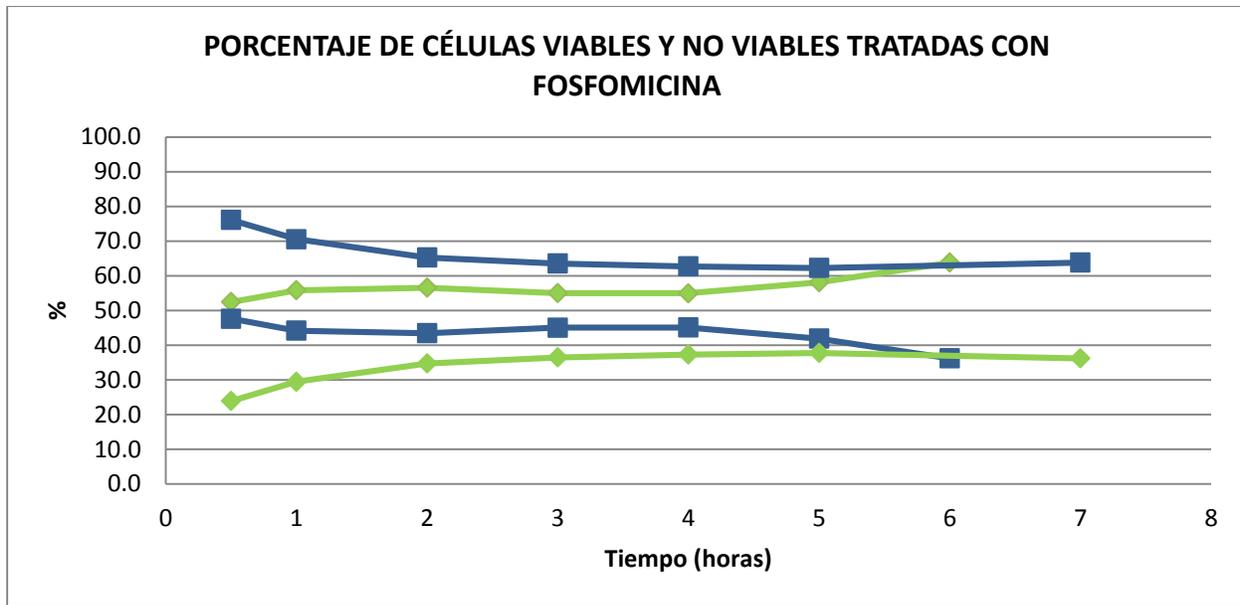
En la gráfica 51 también puede apreciarse una variación grande en la cantidad de células presentes por las razones anteriormente mencionadas. Por otro lado, se observa que el número de células no viables no aumenta de manera significativa en función del tiempo, si no que se mantiene prácticamente en el mismo rango de valores promedio.

Las gráficas 52 y 53 muestran los datos de células tratadas con fosfomicina y sin fosfomicina expresadas en porcentaje.



**Gráfica 52. Porcentaje de células viables y no viables sin fosfomicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el porcentaje de células no viables teñidas con Sytox Green®.

La gráfica 51 muestra un ensayo no favorable en el que las células no viables aumentan hasta llegar a un porcentaje de células no viables de 51%, éste comportamiento sólo se esperaba para células tratadas con antibiótico. El segundo ensayo muestra el comportamiento esperado en donde el porcentaje de células no viables se mantiene relativamente constante en 22.8 y 14.7%.



**Gráfica 53. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con fosfomicina a 250 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas azules representan el porcentaje de células viables teñidas con DAPI. Las líneas verdes representan el porcentaje de células no viables teñidas con Sytox Green®.

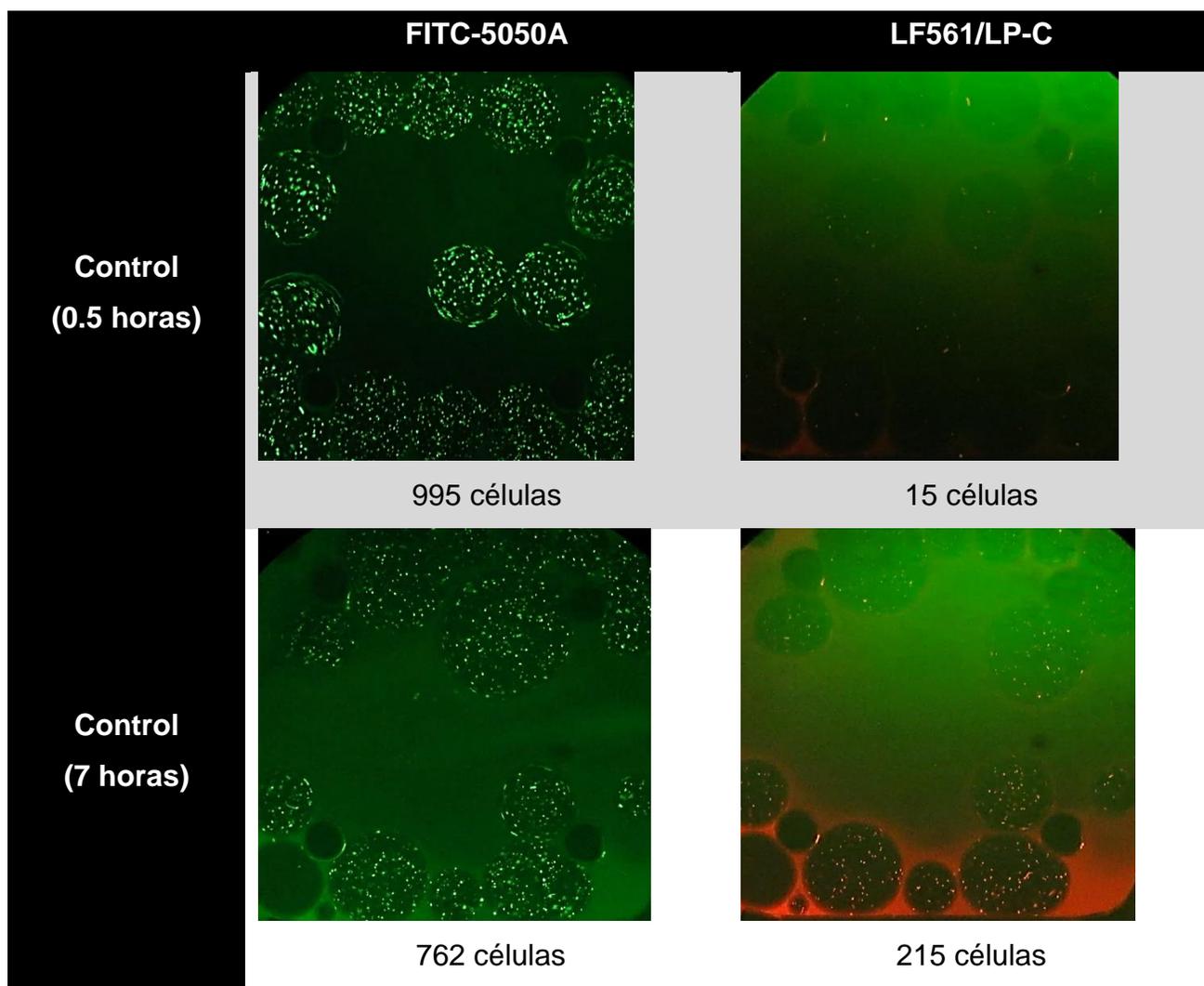
La gráfica 57 muestra el porcentaje de células tratadas con fosfomicina. Se observa que en ninguno de los ensayos se observó un aumento considerable en el porcentaje de células no viables. En el primer ensayo se observó un porcentaje inicial de 47.6% que aumentó únicamente 16.2 unidades porcentuales para alcanzar un porcentaje final de 63.8%. El segundo experimento mostró un porcentaje de células no viables de 23.9% que después de siete horas llegó a 36.2%, aumentando únicamente 12.3 unidades porcentuales.

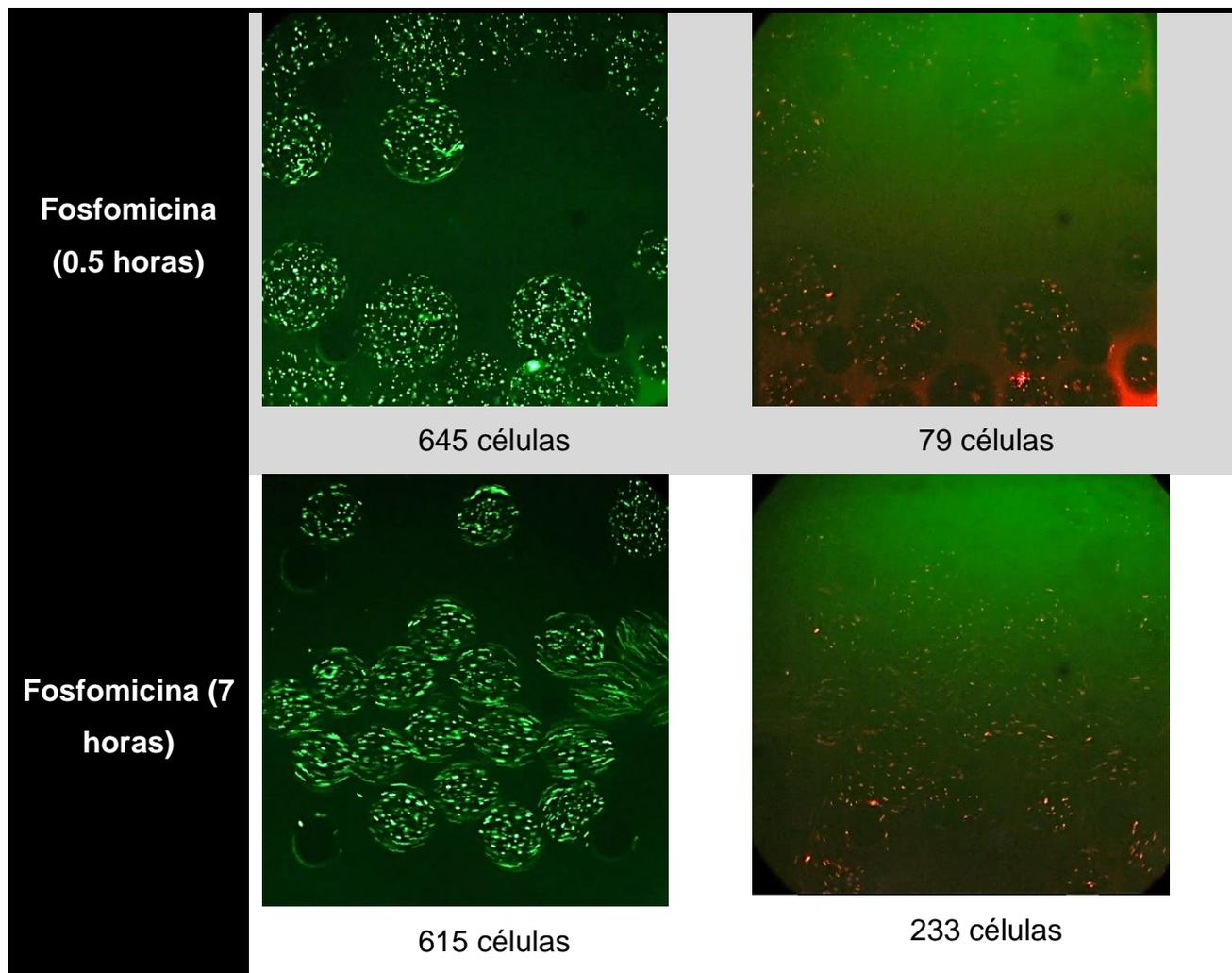
El par de tintas DAPI-SX no resultó ser un par adecuado para el monitoreo de la actividad bactericida de células *E. coli* tratadas con fosfomicina, debido a que, por un lado no se observó reproducibilidad en los experimentos realizados, y por otro no se apreció un aumento considerable de células no viables tratadas con fosfomicina durante el experimento. Aunado a esto, no se observó una discriminación satisfactoria entre células con fosfomicina y células sin tratamiento.

#### 4.4.4.3 CÉLULAS TEÑIDAS CON SYTO 9® Y YODURO DE PROPIDIO

En la Tabla 15 se observa un ejemplo del comportamiento de las células sin antibiótico y con ciprofloxacino a una concentración de 250 µg/mL al inicio del experimento y después de 7 horas.

Tabla 15. Imágenes del monitoreo del efecto bactericida de fosfomicina a 250 µg/mL y el monitoreo de células sin antibiótico.

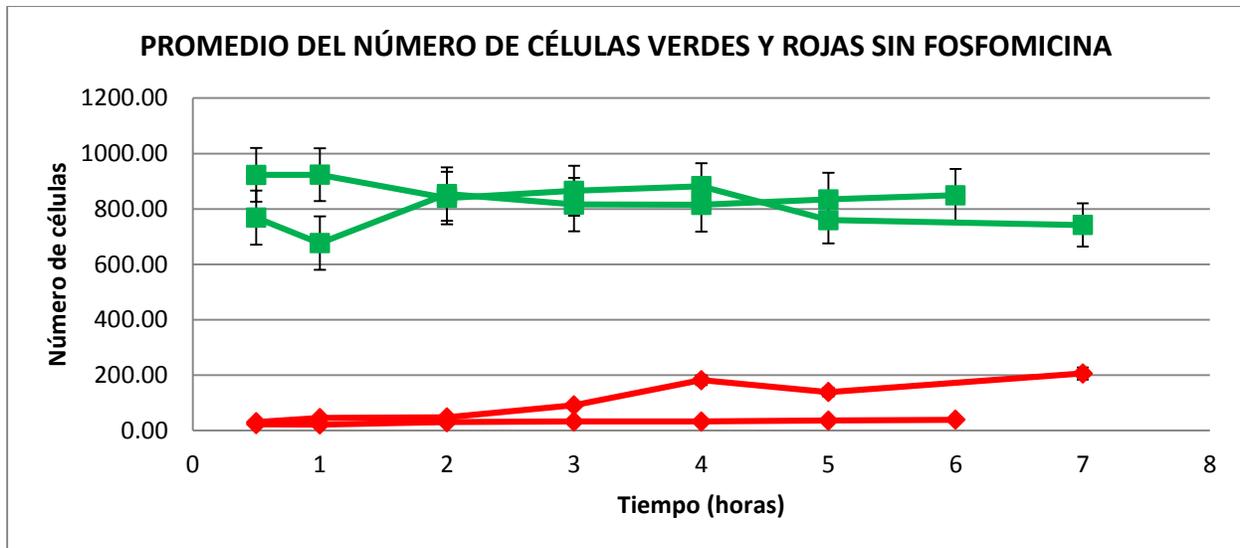




Las fotos mostradas en la Tabla 14 son un ejemplo de cómo se observaron las células al microscopio al minuto 30 y después de 7 horas del ensayo. Como puede observarse, las imágenes de células sin fosfomicina muestran un aumento en la cantidad de células no viables después de 7 horas de experimentación. Al inicio del experimento se observa un porcentaje de células no viables de 1.5%, después de 7 horas, el porcentaje de células no viables aumentó a 28.21%.

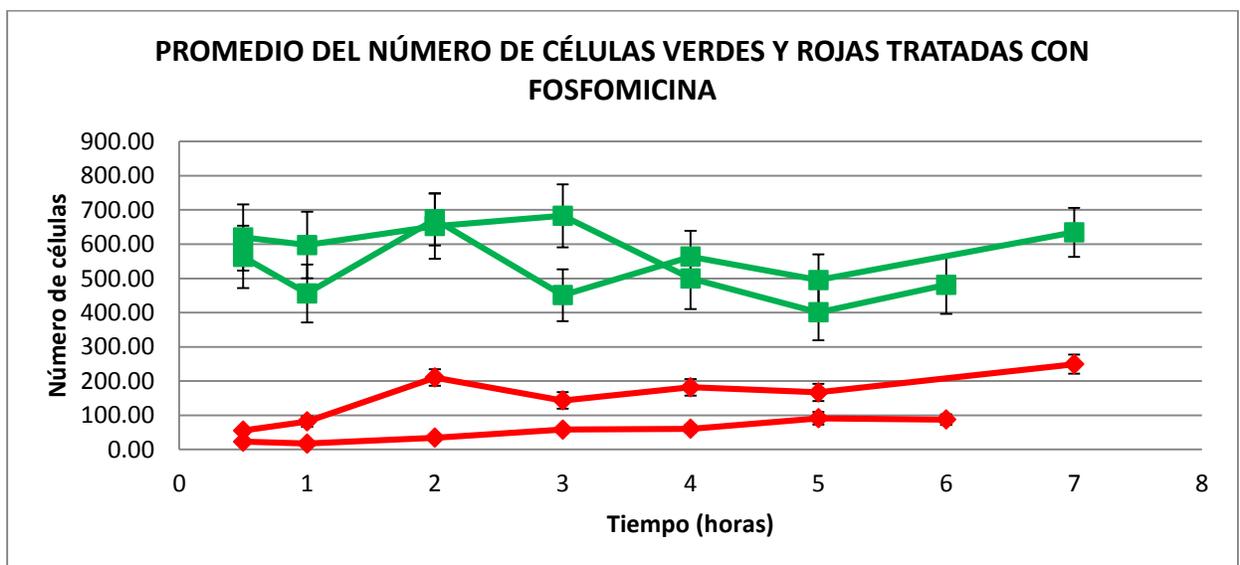
Las células tratadas con fosfomicina mostraron un porcentaje inicial de células no viables de 12.24% al finalizar el experimento, se observa un porcentaje de 37.88%

Las imágenes aquí mostradas no representan el total de datos recopilados, por lo que las gráficas 54 y 55 muestran un resumen del promedio del número de células viables y no viables teñidas con Syto 9® y yoduro de propidio respectivamente.



**Gráfica 54. Promedio del número de células verdes y rojas sin fosfomicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el promedio del número de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

La Gráfica 54 muestra las tendencias de los dos experimentos realizados sin fosfomicina. Se aprecia un promedio del número de células viables que se mantiene entre 676 y 923 durante todo el experimento. El promedio del número de células no viables aumenta en uno de los ensayos, de 30 a 206, mientras que el otro ensayo muestra un comportamiento prácticamente constante de 23 a 39 células.

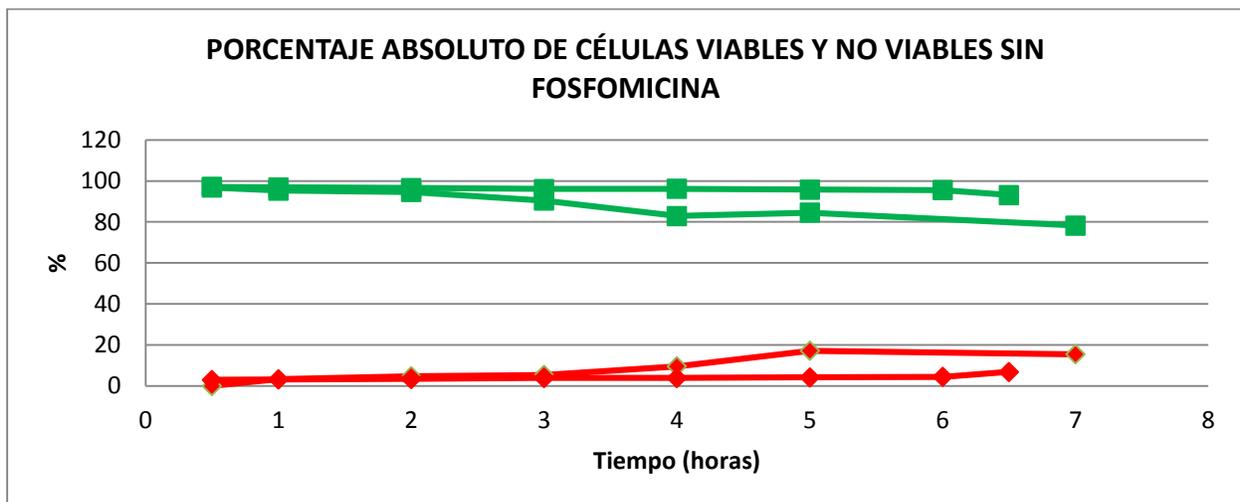


**Gráfica 55. Promedio del número de células verdes y rojas con fosfomicina 250 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el promedio del número de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

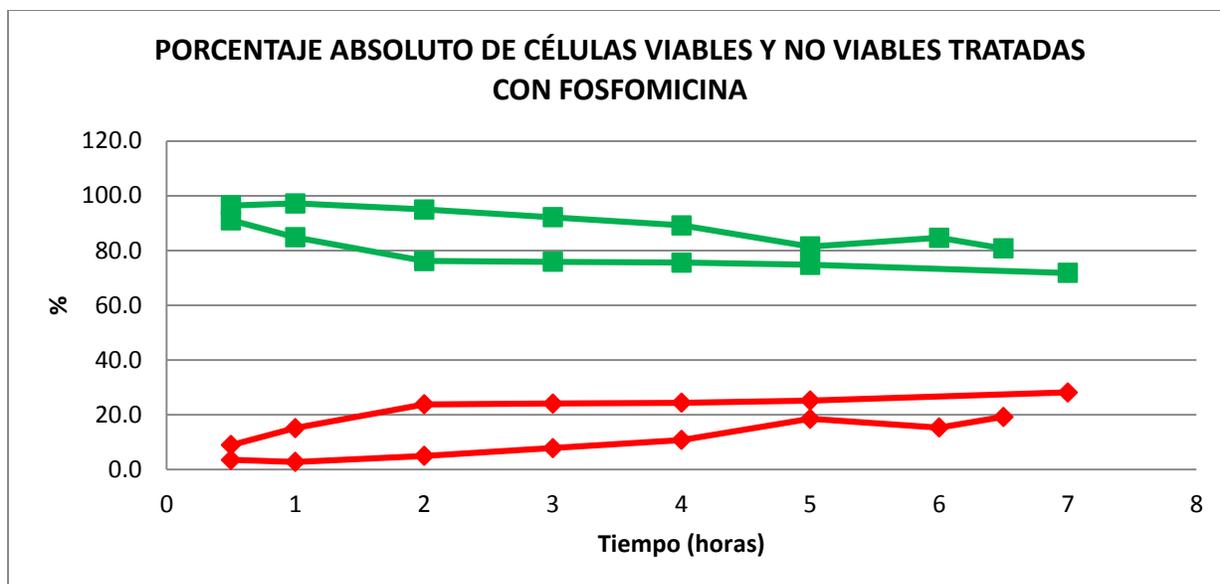
La Gráfica 55 muestra el comportamiento de células tratadas con fosfomicina. Se observa que el número de células viables teñidas por Syto 9®, contrastando con especificaciones del fabricante, no tienden a disminuir de manera significativa en uno de los ensayos se observa un número inicial de 619 y un número final de 634 células viables, en el segundo experimento se aprecian 562 células viables al inicio y 481 al final del ensayo.

Por otro lado, se observa un ligero aumento del número de células no viables, de 55 a 249 en el primer ensayo y de 23 a 87 en el segundo, éste aumento es muy bajo para células tratadas con un antibiótico.

Las gráficas 56 y 57 muestran el porcentaje absoluto de células viables y no viables con y sin fosfomicina, en éstas gráficas se calculó el total de células presentes en la muestra al sumar las células viables más las células no viables. A partir de éste total de células se obtuvo el porcentaje de células muertas en cada punto.



**Gráfica 56. Porcentaje absoluto de células viables y no viables sin fosfomicina.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el porcentaje absoluto de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el porcentaje absoluto de células no viables teñidas con yoduro de propidio.



**Gráfica 57. Porcentaje absoluto de células viables y no viables con fosfomicina 250 µg/mL.** Se observan los datos de los dos ensayos realizados. Las líneas verdes representan el porcentaje absoluto de células viables teñidas con Syto 9®. Las líneas rojas representan el porcentaje absoluto de células no viables teñidas con yoduro de propidio.

En la gráfica 57 se puede apreciar que las células no viables aumentan de forma poco significativa. Al inicio del experimento se observa un porcentaje de 3.6% que aumenta a 19.2% al finalizar el experimento. Éste aumento de 15.6 unidades porcentuales es muy bajo para poder monitorear el efecto bactericida.

El kit LIVE/DEAD® no permitió realizar un monitoreo satisfactorio del efecto bactericida de la fosfomicina, debido a que por un lado, después de 7 horas no se observó el aumento esperado de células rojas tratadas con fosfomicina, el incremento observado es comparable incluso con el calculado para las células sin fosfomicina por lo que tampoco permite realizar una discriminación aceptable entre células tratadas con algún compuesto bactericida y células sin tratamiento.

#### **4.4.4.4 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LOS TRES MÉTODOS DE TINCIÓN**

Los resultados obtenidos para el monitoreo de la actividad bactericida de la molécula de fosfomicina, a una concentración de 250 µg/mL, con los pares de tintas DAPI-BE, DAPI-SX y el kit LIVE/DEAD® mostraron grandes diferencias en su efectividad, al realizar una

comparación en los resultados es posible concluir que el par DAPI-BE permitió un monitoreo más efectivo.

Los dos ensayos realizados con el par DAPI-BE mostraron reproducibilidad y permitieron apreciar el aumento de células no viables esperado. En éstos ensayos se observó aumento de 25.7 y 37.4 unidades porcentuales alcanzando un porcentaje final de células no viables de 56.4 % y 54.5 %. Se observó un porcentaje inicial de células no viables relativamente alto (30.7% y 17.7% respectivamente). No obstante, éste efecto no se observó en las células sin fosfomicina (11.6% y 14.3%) por lo que es atribuible a un efecto bactericida desde los primeros minutos.

Las células del control presentaron un aumento de 22 y 13 unidades porcentuales, sin embargo no se acercaron al porcentaje obtenido en células tratadas con fosfomicina en ninguno de los ensayos.

El par DAPI-SX no mostró un aumento considerable en el porcentaje de células no viables en ninguno de los ensayos realizados. A pesar de que en el primer ensayo se observó un porcentaje final de 63.8 %, el aumento presentado fue únicamente de 16.2 unidades porcentuales, esto debido a que los ensayos iniciaron en un porcentaje alto de células no viables (47.6%). Sin embargo, a diferencia de lo observado con el par de tintas DAPI-BE, éste porcentaje inicial alto también se observó en células sin tratamiento con antibiótico (porcentajes iniciales; 19.8% y 35.5%) por lo que no podría atribuirse a un efecto bactericida de la fosfomicina desde el minuto 30. Aunado a esto, no se observó reproducibilidad en los experimentos realizados.

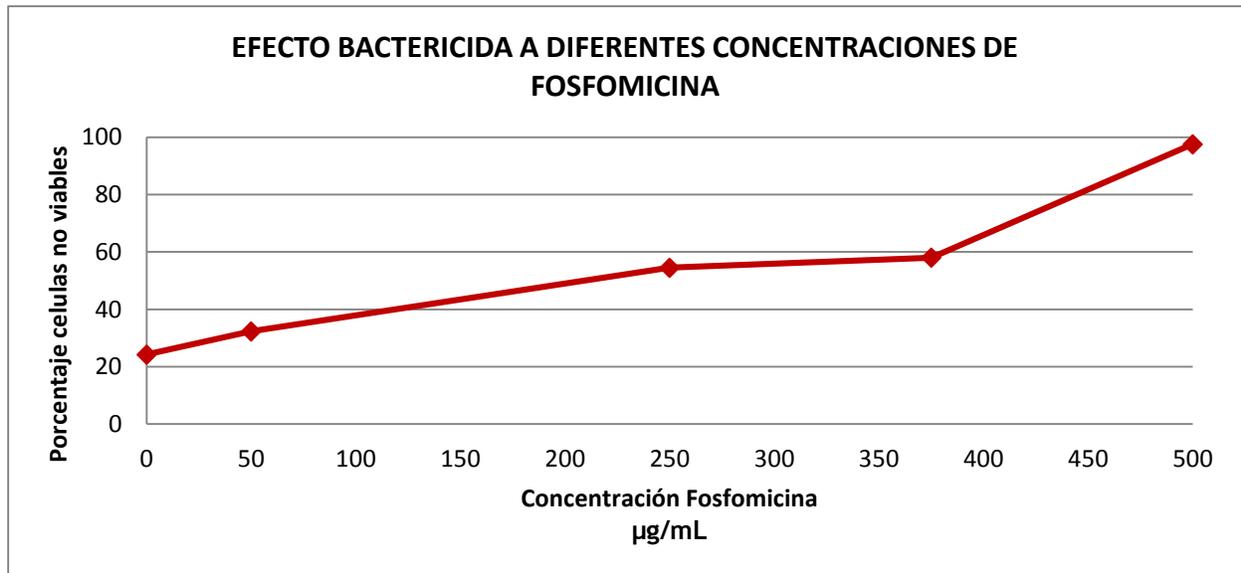
Las células del control teñidas con DAPI-SX mostraron un porcentaje final de 51% en uno de los ensayos, el cual es muy alto y sería esperado únicamente en células tratadas con antibiótico, por lo que tampoco permite una discriminación efectiva entre células vivas y muertas.

El kit de tintas LIVE/DEAD® no mostró resultados satisfactorios en ninguno de los ensayos puesto que el aumento de células no viables tratadas con fosfomicina fue muy pequeño, alcanzó un porcentaje máximo de 28.2 y 19.2 %. Estos porcentajes son muy bajos y no permiten observar el efecto bactericida del antibiótico.

#### 4.4.5 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CON CÉLULAS *E. coli* BL21 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFOMICINA

Los experimentos de monitoreo de la actividad bactericida de la fosfomicina a diferentes concentraciones se realizaron con el fin de conocer si el método desarrollado permite observar diferencias en el efecto del antibiótico a diferentes concentraciones. Se eligió el método de tinción DAPI-BE porque se observó una mayor reproducibilidad entre los ensayos realizados. Se eligió el antibiótico fosfomicina debido a que el primer ensayo realizado a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostró una gran cantidad de células no viables desde el primer monitoreo realizado a los 30 minutos. Por lo tanto, se probaron concentraciones más bajas para determinar el comportamiento a menores cantidades de antibiótico.

En la Gráfica 58 se muestra el porcentaje de células no viables obtenido después de 7 horas de experimentación en las cuatro concentraciones evaluadas.



**Gráfica 58. Efecto bactericida de fosfomicina a diferentes concentraciones después de 7 horas.** Cada símbolo representa un ensayo independiente. Para cada concentración se grafica únicamente el máximo porcentaje de células no viables alcanzado después de 7 horas de experimentación.

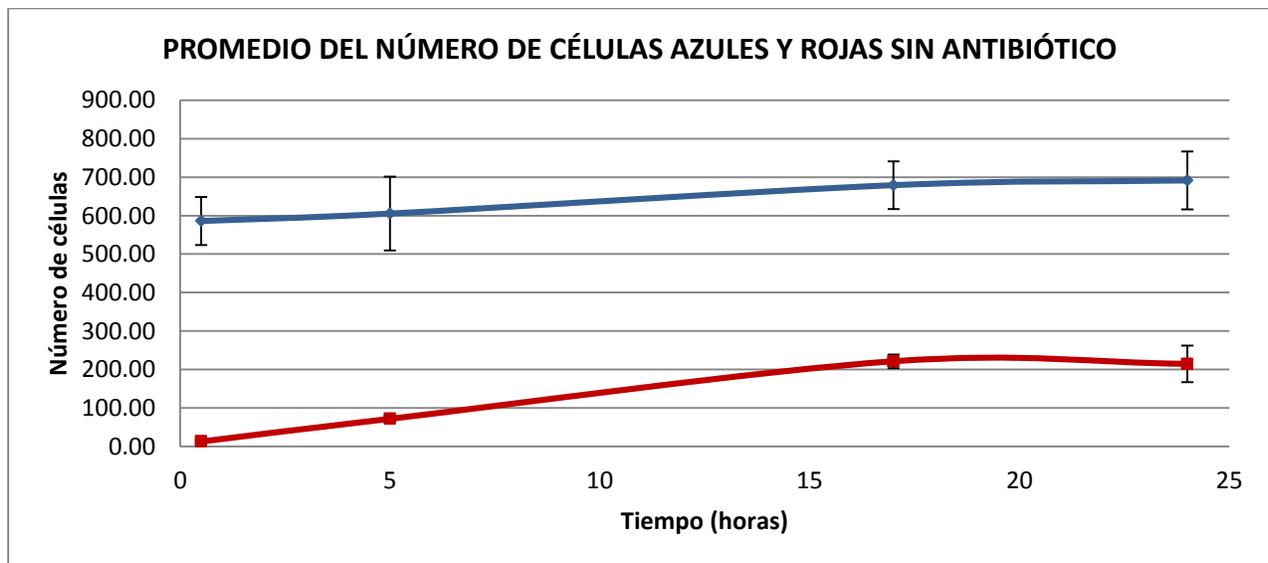
Se aprecia un aumento en el porcentaje de células no viables en función de la concentración de fosfomicina analizada. Se observa un aumento con una pendiente pronunciada entre las concentraciones 50 a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , posteriormente se aprecia una

pendiente menor entre las concentraciones 250 a 375  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y finalmente un aumento pronunciado en el porcentaje de células no viables entre 375  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

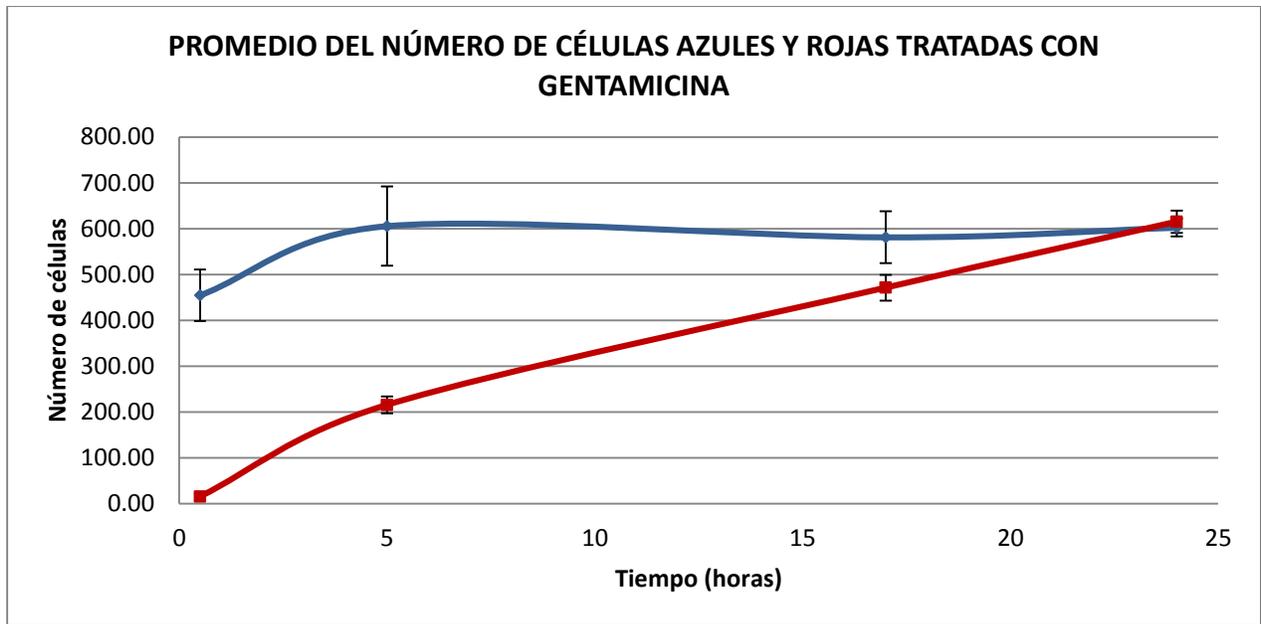
Los resultados mostrados en la gráfica anterior permiten concluir que el método utilizado es útil para identificar el efecto bactericida a diferentes concentraciones de antibiótico.

#### 4.4.6 EXPERIMENTOS DE MONITOREO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CON CELULAS *E. coli* BL21 A 24 HORAS

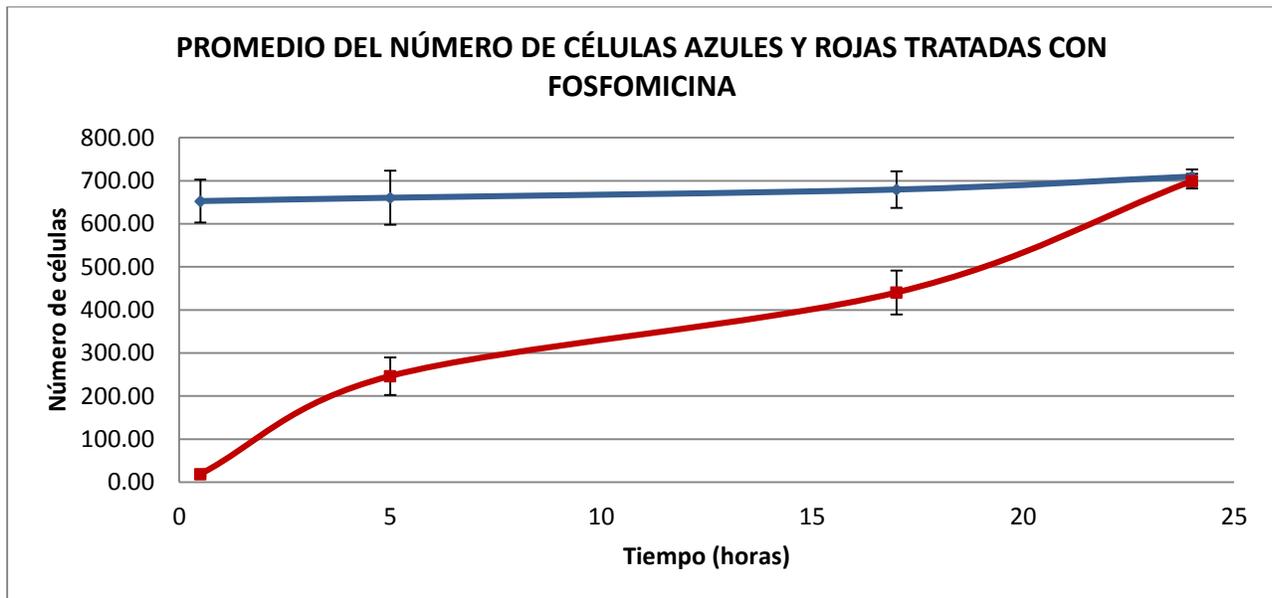
Se realizó el monitoreo de la actividad bactericida de los tres antibióticos en estudio usando el par de tintas DAPI-BE. El objetivo de éste ensayo consistió en analizar un intervalo de tiempo mayor y observar si se alcanzaba el 100% de células no viables en todos los antibióticos o si se observaba un comportamiento constante después de llegar a un punto máximo. En las siguientes gráficas (59, 60, 61, 62) se muestra el promedio del número de células azules y rojas, obtenido en el monitoreo de células sin antibiótico, con gentamicina, fosfomicina y ciprofloxacino.



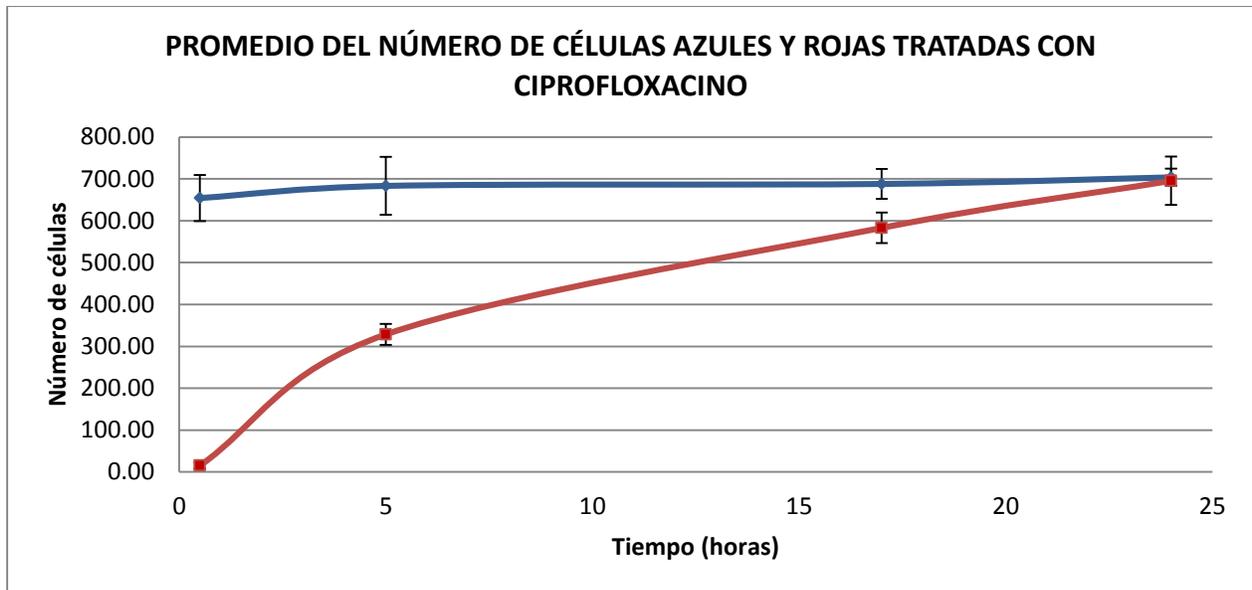
**Gráfica 59. Promedio del número de células azules y rojas sin antibiótico.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.



**Gráfica 60. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con gentamicina 500 µg/mL.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.



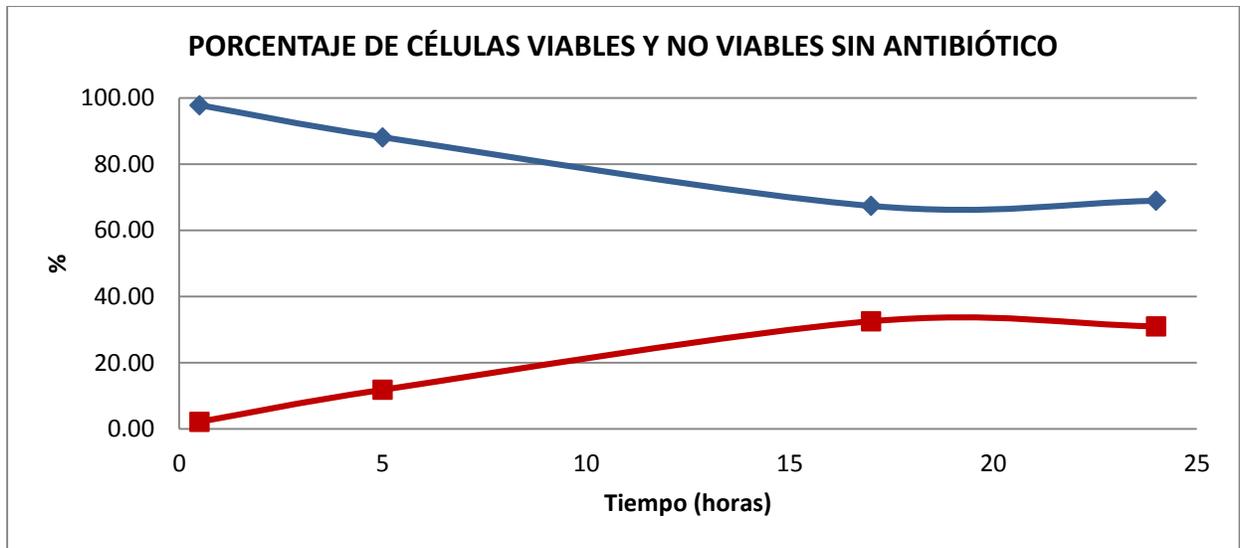
**Gráfica 61. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con fosfomicina 250 µg/mL.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.



**Gráfica 62. Promedio del número de células azules y rojas tratadas con ciprofloxacino 500 µg/mL.** Las líneas azules representan el promedio del número de células viables teñidas con DAPI. Las líneas rojas representan el promedio del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

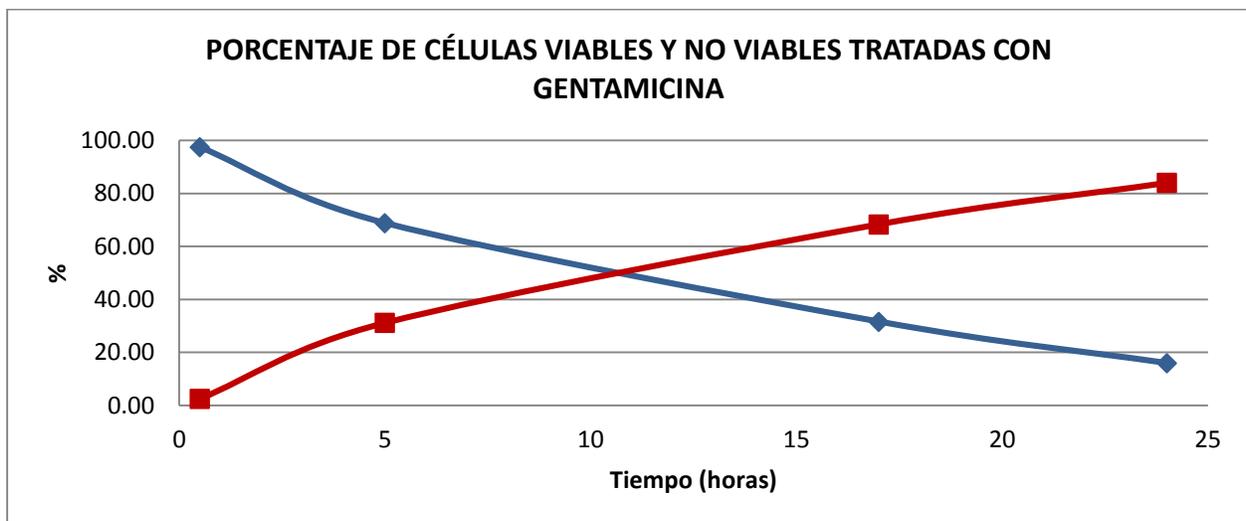
En las gráficas anteriores se observa que el promedio del número de células totales teñidas de color azul se mantiene relativamente constante, mientras que las células no viables teñidas de color rojo aumentan en función del tiempo.

La gráfica 59, a diferencia de las otras tres gráficas, no muestra un aumento tan pronunciado en el número de células no viables puesto que, después de 24 horas aumenta únicamente a 214 células no viables. En contraste, las gráficas 60, 61 y 762 muestran un aumento mucho mayor, en las tres gráficas se observa que, después de 24 horas, el promedio del número de células rojas iguala el total de células observadas de color azul. Las siguientes gráficas (63, 64, 65, 66) presentan los datos obtenidos en forma de porcentaje.



**Gráfica 63. Porcentaje de células viables y no viables sin antibiótico** Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

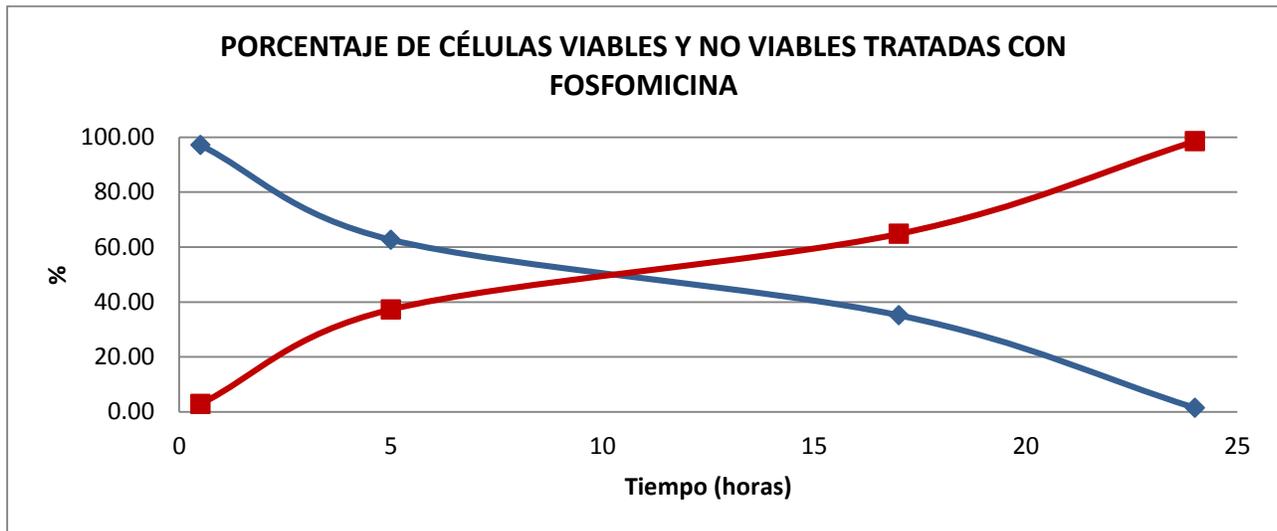
La gráfica 63 muestra un porcentaje máximo de células no viables de 32.55% a las 17 horas, posteriormente el último monitoreo llevado a cabo mostró 31% de células no viables. Los resultados obtenidos a 17 y 24 horas sugieren que el porcentaje de células no viables se mantiene constante de 17 horas en adelante, debido a ésta tendencia, es posible sugerir que un monitoreo a tiempos más largos probablemente arrojaría un porcentaje de células no viables de alrededor de 31%.



**Gráfica 64. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con gentamicina 500 µg/mL.** Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

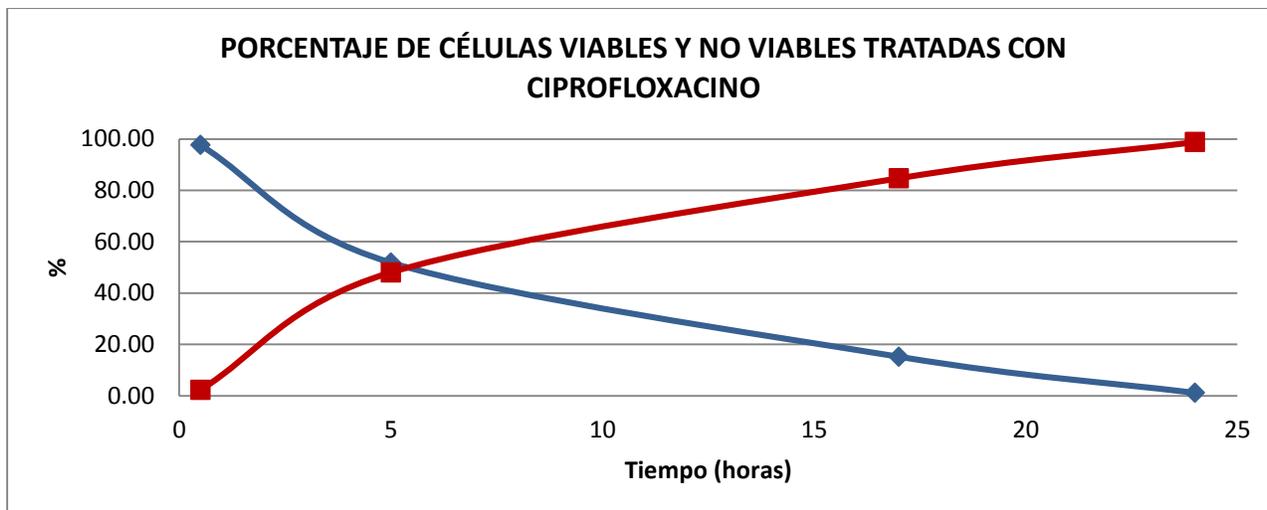
La Gráfica 64 muestra el comportamiento de células tratadas con gentamicina, expresado en forma de porcentaje. Se aprecia que, después de 24 horas, las células no viables teñidas de color rojo alcanzan 84.02 %.

Haciendo una comparación con el monitoreo realizado durante siete horas con gentamicina y el par DAPI-BE (ver Sección 4.4.3.1) que mostró un porcentaje máximo de células no viables de 70%; el aumento observado después de 24 horas no fue tan grande como se esperaba.



**Gráfica 65. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con fosfomicina 250 µg/mL.** Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

En la gráfica anterior se muestra el comportamiento de células tratadas con fosfomicina en donde se aprecia un porcentaje máximo de células no viables de 98.54% después de 24 horas. El porcentaje máximo presentado en el monitoreo de siete horas (ver sección 4.4.4.1) fue de 54%. En éste caso se distingue una diferencia de 44 unidades porcentuales entre el ensayo de siete horas y el ensayo de 24 horas, lo cual es una diferencia muy favorable.



**Gráfica 66. Porcentaje de células viables y no viables tratadas con ciprofloxacino 500 µg/mL.** Las líneas azules representan el porcentaje de células viables. Las líneas rojas representan el porcentaje del número de células no viables teñidas con bromuro de etidio.

En la Gráfica 66 se muestra el porcentaje de células viables y no viables tratadas con ciprofloxacino. Después de 24 horas se presenta un porcentaje máximo de células no viables de 98.82 %. Que comparado con el porcentaje máximo de 83% obtenido en el ensayo de siete horas (ver sección 4.4.2.1), no es un aumento muy significativo.

Los ensayos a 24 horas mostraron un aumento en el análisis de los tres antibióticos, en comparación con los ensayos a siete horas. Sin embargo, únicamente en la gráfica del comportamiento con fosfomicina se observó una diferencia grande entre el ensayo de 24 y de 7 horas. Los ensayos con ciprofloxacino y gentamicina no mostraron diferencias de más de 15 unidades porcentuales.

La información que aportan los ensayos a 24 horas es más relevante cuando se estudia un antibiótico con una cinética más lenta, o a una menor concentración (como el caso de la fosfomicina) que no muestra porcentajes mayores de 54 % en ensayos a siete horas.

A pesar de que los experimentos a tiempos más largos permiten apreciar cuando el total de las células dejan de ser viables, no reemplazan en su efectividad a los ensayos de siete horas, puesto que en éste intervalo de tiempo es posible observar las tendencias del compuesto en estudio y concluir si se trata de una molécula con

potencial bactericida o no. Uno de los objetivos de la implementación de éste método fue reducir los tiempos de análisis, lo cual se logra favorablemente en ensayos de siete horas en lugar de 16 horas mínimas requeridas para el estudio por métodos clásicos.

## 5. CONCLUSIONES

Las tintas DAPI y bromuro de etidio permitieron cuantificar el número total de células presentes en una muestra y el número de células no viables.

La mezcla DAPI - bromuro de etidio empleada en este trabajo, hasta donde sabemos, no ha sido reportada en la literatura, pero presenta una alternativa más confiable para el seguimiento de viabilidad celular por microscopia de fluorescencia que el kit Live/Dead®. Además de resultar 8.24 veces más barato (Kit Live/Dead® = \$8513.12 MXN + I.V.A. DAPI + BE = \$1032.00 MXN + I.V.A.).

La encapsulación en microgotas, de células de *E. coli* previamente teñidas, dentro de los canales de un microchip de microfluídica permitió realizar un monitoreo eficiente de la actividad bactericida de los antibióticos; gentamicina, ciprofloxacino y fosfomicina, en tiempos de 7 horas y utilizando un volumen máximo de 100 microlitros de cultivo.

El método diseñado es congruente con los resultados obtenidos usando métodos clásicos, lo que corrobora su validez.

## **6. TRABAJO A FUTURO**

En el laboratorio 309 de Biofísicoquímica se trabaja en el acoplamiento de un microchip de microfluídica a la salida de un equipo HPLC, lo que permitirá separar los compuestos de un extracto natural e identificar moléculas con potencial bactericida para lo cual, se hará uso del método de tinción descrito en éste trabajo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Diseases., U.S.D.o.H.a.H.S.N.I.o.A.a.I. 18 Febrero 2009. 20/03/2016]; Available from:  
<https://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialresistance/understanding/Pages/definitions.aspx>.
2. Churski, K., Kaminski, T. S., Jakiela, S., Kamysz, W., Baranska-Rybak, W., Weibeld, D. B., Garstecki, P., *Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated microdroplet system*. Lab Chip, 2012(12).
3. Liu, T., Zhao, Y., Zhang, Z., Zhang, P., Li, J., Yang, R., Yang, C., Zhou, L., *A fiber optic biosensor for specific identification of dead Escherichia coli O157:H7*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014(196): p. 161-167.
4. Barer, M.R., Harwood, C. R., *Bacterial Viability and Culturability*. Advances in Microbial Physiology, 1999(41): p. 93-126.
5. Roszak, D.B., Colwell, R. R., *Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment*. American Society for Microbiology, 1987. 3(51): p. 365-379.
6. Kell, D.B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Barer, M. R., *Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues*. Antonie van Leeuwenhoek, 1998(73): p. 169-187.
7. Joux, F., Lebaron, P., *Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level*. Microbes and Infection, 2000(2): p. 1523-1535.
8. Breeuwer, P., Abee, T. , *Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques*. International Journal of Food Microbiology, 2000(55): p. 193-200.
9. Hou, Z., An, Y., Hjort, K., Hjort, Kl., Sandegrenc, L., Wu, Z. , *Time lapse investigation of antibiotic susceptibility using a microfluidic linear gradient 3D culture device*. Lab Chip, 2014.
10. Chen, W., Li, Q., Zheng, W., Hu, F., Zhang, G., Wang, Z., Zhang, D., Jiang, X., *Identification of Bacteria in Water by a Fluorescent Array*. Angewandte Chemie, 2014(53): p. 13734-13739.
11. Thomas., V. 12 Agosto 2013 25/03/2016]; Available from: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/step-by-step-guide-to-fluorescence-microscopy/>.

12. Bunthof, C.J., Van den Braak, S., Breeuwer, P., Rombouts, F. M., Abee, T. , *Fluorescence assessment of Lactococcus lactis viability*. International Journal of Food Microbiology, 2000(55): p. 291-294.
13. McFetersa, G.A., Yu, F. P., Pyle, B. H., Stewartb, P. S. , *Physiological assessment of bacteria using fluorochromes*. Journal of Microbiology Methods, 1995(21): p. 1-13.
14. Kapuscinski, J., Szer, W., *Interactions of 4', 6- diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides*. Nucleic Acid Research, 1979(6).
15. Semrock. 26/03/2016]; Available from: [www.searchlight.semrock.com](http://www.searchlight.semrock.com).
16. Roth, B., Poot, M., Yue, S., Millard, P., *Bacterial viability and antibiotic susceptibility tesitng with SYTOX green nucleic acid stain*. Applied and Enviromental Microbiology, 1997. **63**(6): p. 2421-2431.
17. Probes, M., *LIVE/DEAD®BacLight Bacterial Viability Kits*. 2004.
18. Elveflow. *Microfluidics and Microfluidic Devices*. 2015 2015 05/07/2016]; Available from: <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/>.
19. Fluigent. *What is microfluidics?* [cited 2016 05/07/2016]; Available from: <http://www.fluigent.com/what-is-microfluidics/>.
20. Kaminski, T., Scheler, O., Gartecki, P., *Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges*. Lab Chip, 2016. **16**(447).
21. Pulido, M., Quintanilla, M., Martínez, R., Cisneros, J., McConeell, M., *Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013.
22. Chiu, Y., Chan, H., Phua, K., Zhang, Y., Juul, S., Knudsen, B., Ho, P., Leong, K., *Synthesis of fluorosurfactants for emulsion based biological applications*. American Chemical Society, 2014. **8**(4): p. 3913-3920.
23. Boedciker, J., Li, L. Ismagilov, Rustem, F., *Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets usin plug-based microfluidics*. Lab Chip, 2008. **8**: p. 1265-1272.
24. Casadevall, X., Niu, X., Leeper, K., Cho, S., Chang, S., Edel, J., deMello, A., *Fluorescence detection methods for microfluidic droplet platforms*. Journal of Visualizad Experiments, 2011. **58**: p. 1-9.

25. Kang, D., Gong, X., Cho, S., Kim, J., Edel, J., Chang, S., Choo, J., DeMello, J., *3D Droplet Microfluidic Systems for High-Throughput Biological Experimentation*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(21): p. 10770-10778.
26. Holtze, C., Rowat, A., Agresti, J., *Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions*. Lab Chip, 2008. **8**: p. 1265-1271.
27. University, S., *Designing Your Own Device: Basic Design Rules*.
28. Romero, A., *Viabilidad de células E. coli BL21 dentro de microgotas en microchips por medio de fluorescencia inducida por láser*, in Facultad de Química. 2015, Universidad Nacional Autónoma de México: Dirección General de Bibliotecas. p. 94.
29. Nebe-von-Caron, G., Stephens, P., Hewitt, C., Powell, J., Badley, R., *Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting*. Journal of Microbiological Methods, 2000. **42**: p. 97-114.
30. Stocks, S., M., *Mechanism and use of commercially available viability stain, Bac Light*. Cytometry Part A, 2004: p. 189-195.
31. Midwoud, P., Janse, A., Merema, M., Groothuis, G., Verpoorte, E., *Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(9): p. 3938-3944.
32. Nikcevic, I., Bange, A., Peterson, E., Papautsky, I., Heineman, W., Halsall, B., Seliskar, C., *Adsorption of Fluorescently Labeled Microbeads on PDMS Surfaces*. Microfluidics, Bio MEMS and Medical Microsystems. , 2005. **5718**: p. 159-167.
33. Li, N., Schwartz, M., Ionescu-Zanetti, C., *PDMS Compound Adsorption in Context*. Journal of Biomolecular Screening, 2009. **14**(2): p. 194-202.
34. Toepke, M., Beebe, D., *PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications*. Lab Chip, 2006. **6**: p. 1484-1486.
35. *Drug Bank*. 2005 03/07/2016 03/07/2016]; Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00537#identification>.
36. *Drug Bank*. 2005 28/06/2016 28/06/2016]; 22/05/2014:[Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00798>.
37. *Drug Bank*. 2005 03/07/2016 04/07/2016]; 16/04/2013:[Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00828>.