



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE *E. COLI* DENTRO UN MICROCHIP
DE MICROFLUÍDICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICA

PRESENTA

TANIA MARCELA ALTAMIRANO RIVERA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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 ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF: OLGUÍN CONTRERAS LUIS FERNANDO.

VOCAL: PROF: GARCIA IÑARRITU ANA ELENA.

SECRETARIO: PROF: FLORES DE LA ROSA JUVENAL.

1er. SUPLENTE: PROF: HERNÁNDEZ SEGURA GERARDO OMAR.

2° SUPLENTE: PROF: RODRIGUEZ ALEGRÍA MARÍA ELENA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 309 DE BIOFISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

SUSTENTANTE:

TANIA MARCELA ALTAMIRANO RIVERA

ASESOR DEL TEMA:

LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS

Agradecimientos:

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 (No. de Becario 21180).**

Por medio del cual recibí una beca nivel I para la realización de esta tesis de licenciatura.

Agradecimientos:

Al Dr. Luis Olguín por permitirme realizar el Servicio Social y ésta Tesis en su laboratorio. Por sus innumerables consejos, su apoyo, su confianza, los pequeños regaños y en especial por todas las enseñanzas como investigador y como persona. Lo admiro y respeto más de lo que pensaría.

A los profesores de la Facultad de Química por sus enseñanzas, pero en especial al profesor Juan Carlos Chacón por ser un apoyo incondicional y ejemplo de buen profesor. Al Dr. Lino Reyes y al profesor Stivalet por sus revisiones durante los seminarios I y II donde presenté los avances de ésta tesis.

A mis compañeros del laboratorio 309 de Biofísicoquímica, pero en especial a Arturo Romero quien compartió sus conocimientos para la fabricación de los microchips, así como del uso de todos los equipos empleados en ésta tesis, agradezco su infinita paciencia conmigo. A Juan Sánchez por sus consejos y su apoyo en la parte del desarrollo de mis experimentos, por su agradable compañía y los momentos de alegría compartidos. A Pedro Basilio y Abraham Ochoa por hacer más ameno el proceso de escritura de ésta tesis con su compañía, su música y sus bromas.

A la Dra. Andrea Witt, al Dr. Carlos Levi, Lucía Torres, Tania Ramírez y Andrea Miranda por escucharme en los momentos más oscuros y ser una luz en mi camino.

A mis padres por su apoyo, su paciencia, sus consejos y su cariño incondicional. A mi papá Tacho por enseñarme que la vida está llena de momentos felices, gracias por celebrar mis logros y ayudarme en mis caídas. A mi mamá Guadalupe por ser el mejor ejemplo de una mujer responsable y trabajadora, gracias porque sus palabras me hicieron buscar ayuda para salir adelante y no rendirme ante la adversidad.

A mis hermanos por su cariño incondicional. Gracias Adrián por ser la fuerza que me levanta todos los días, por compartir conmigo tus logros, por escucharme y regañarme cuando lloraba y por reír cuando lo necesitaba. A mi hermano Rodrigo por ser un ejemplo de nobleza y amor.

A mi familia y amigos, en especial a mis padrinos Leonor y Pedro por estar con nosotros en todo momento, ayudarnos cuando más lo necesitamos y a reír cuando celebramos algún logro. A Esteban, David Enríquez y José Miguel por su amistad, su apoyo y su cariño.

As I began to love myself I stopped craving for a different life.
and I could see that everything that surrounded me was inviting me to grow.

Today I call it "MATURITY".

As I began to love myself I recognized that my mind can disturb me
and it can make me sick. But As I connected it to my heart, my
mind became a valuable ally. Today I call this
connection "WISDOM OF THE HEART".

We no longer need to fear arguments, confrontations or any kind of problems
with ourselves or others. Even stars collide, and out of their crashing
new worlds are born. Today I know THAT IS "LIFE"!

Charles Chaplin Fragmento "As I Began to Love Myself", 1959.

Dedico ésta Tesis a mi hermana Lupita y a mi primo Héctor.

Siempre estarán en mi corazón.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Planteamiento del Problema	1
1.2	Objetivos	4
1.3	Hipótesis	4
2	ANTECEDENTES	5
2.1	La microfluídica	5
2.2	Ventajas de la microfluídica	6
2.3	Laboratorio en un chip (lab on chip)	6
2.4	Fabricación de dispositivos (PDMS) por fotolitografía suave	7
2.5	Aplicaciones de la microfluídica	9
2.6	Viabilidad celular	9
2.7	Ensayos de viabilidad celular y funcionamiento del Kit LIVE/DEAD BacLight L7012	10
3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	13
3.1	Medios de cultivo y soluciones empleadas	13
3.1.1	Medio Luria Beltrani (LB) para el crecimiento de bacterias de <i>E. coli</i>	13
3.1.2	Medio Luria Beltrani-Agar para la siembra y crecimiento de colonias	13

3.1.3	Solución de NaCl 0.85% m/v para el lavado del cultivo de <i>E. coli</i>	14
3.1.4	Preparación de isopropanol 70% v/v para la obtención de células “muertas”	15
3.1.5	Solución de glicerol al 38.1% m/m para resuspender a las células	15
3.1.6	Preparación de Syto9 0.334 mM	15
3.1.7	Preparación de Aceite mineral con Span 80 al 1.8% m/m para la formación de microgotas dentro de los microchips	15
3.2	Preparación y crecimiento del cultivo de <i>E. coli BL21(DE3)</i>	16
3.3	Experimentos con cultivo de células de <i>E. coli BL21(DE3)</i> por el método de macrodilución	16
3.4	Lavados del cultivo overnight (previos a la tinción)	17
3.5	Tinción de células de <i>E. coli BL21(DE3)</i> con el kit LIVE/DEAD BacLight L7012	17
3.6	Funcionamiento del microscopio de fluorescencia	18
3.7	Diseño microchip de 300 μm de ancho por 100 μm de profundidad	21
3.8	Fabricación de moldes de microchips por la técnica de fotolitografía suave ..	22
3.9	Fabricación de microchips con Polidimetilsiloxano (PDMS)	25
3.9.1	Proceso de pegado del microchip con el portaobjetos para la obtención de microcanales cerrados	26
3.10	Experimentos en portaobjetos con células vivas en NaCl al 0.85% y células muertas incubadas en isopropanol al 70%	28
3.11	Ensayos de células en presencia de Ampicilina	29
3.12	Ensayos de células en presencia de Kanamicina	29
3.13	Experimentos de viabilidad celular en microchips a flujo de agua 0 $\mu\text{L/hr}$ en ausencia de la fase orgánica	30

3.14 Experimentos de viabilidad celular en microchip formando microgotas	31
3.15 Uso del programa ImageJ para el conteo de células vivas y muertas	32

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37

4.1 Experimentos para definir la densidad óptica de trabajo.....	37
4.2 Determinación del tiempo de incubación de células de <i>E. coli</i> con isopropanol al 70%	39
4.3 Experimentos de viabilidad celular siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante del kit LIVE/DEAD kit BacLight L7012	42
4.4 Optimización de la concentración de los agentes intercalantes de ADN (Syto9 y yoduro de propidio)	46
4.5 Fabricación y Caracterización del microchip	49
4.6 Cuantificación de células viables en función del tiempo dentro de microchips de 300 μm de ancho a flujo de agua 0 $\mu\text{L/hr}$ en ausencia de la fase orgánica	52
4.7 Viabilidad celular en microchips a flujo de agua 0 $\mu\text{L/hr}$ en ausencia de la fase orgánica	54
4.8 Efecto en la estabilidad y fluorescencia de las microgotas formadas en los microchips debido al cambio en la concentración de surfactante (Span 80) presente en el aceite mineral	67
4.9 Formación de microgotas en microchips usando células resuspendidas en NaCl al 0.85% m/v	70
4.10 Experimentos en microchips de 300 μm para seleccionar en medio en el cual se resuspenderían las células para los ensayos donde se formaron microgotas	71
4.11 Pruebas en portaobjetos con células de <i>E. coli</i> vivas a OD_{670} nm 0.1 y 0.04 resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v, al 50% y NaCl al 0.85%	73
4.12 Experimentos en microchips de 300 μm con un cultivo de células vivas (resuspendidas en glicerol)	75

4.12.1	Análisis del número de células presentes por área relativa de la microgota	75
4.13	Experimentos en microchips de 300 μm con un cultivo de células tratadas con isopropanol al 70%	78
4.13.1	Análisis del número de células tratadas con isopropanol al 70% presentes por área relativa de la microgota	78
4.14	Viabilidad celular en microchips con un cultivo en presencia de ampicilina (500 $\mu\text{g/ml}$)	80
4.15	Incremento del tiempo de los experimentos en microchips con un cultivo de células con ampicilina (500 $\mu\text{g/mL}$)	82
4.16	Viabilidad celular en microchips con un cultivo en presencia de kanamicina (125 $\mu\text{g/mL}$)	89
4.17	Viabilidad celular en microchips con un cultivo en presencia de con kanamicina (500 $\mu\text{g/mL}$) resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v	93
5	CONCLUSIONES	95
6	TRABAJO A FUTURO	97
7	LITERATURA CITADA.....	98
8	ANEXO.....	100

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del Problema.

Actualmente la población a nivel mundial está haciendo frente a un grave problema en salud pública, debido a que cada vez es más frecuente la aparición de nuevas cepas bacterianas fuertemente resistentes a los antibióticos conocidos, por lo que la población mundial se ha visto en la necesidad de crear nuevos antibióticos capaces de combatir éstas bacterias resistentes ¹.

De acuerdo a las estadísticas mundiales publicadas por la OMS (Figura 1), enfermedades tales como infecciones en las vías respiratorias, el paludismo, la tuberculosis y la meningitis entre otras, se encuentran entre las 20 principales causas de muerte prematura en hombres y mujeres en el 2012 ².

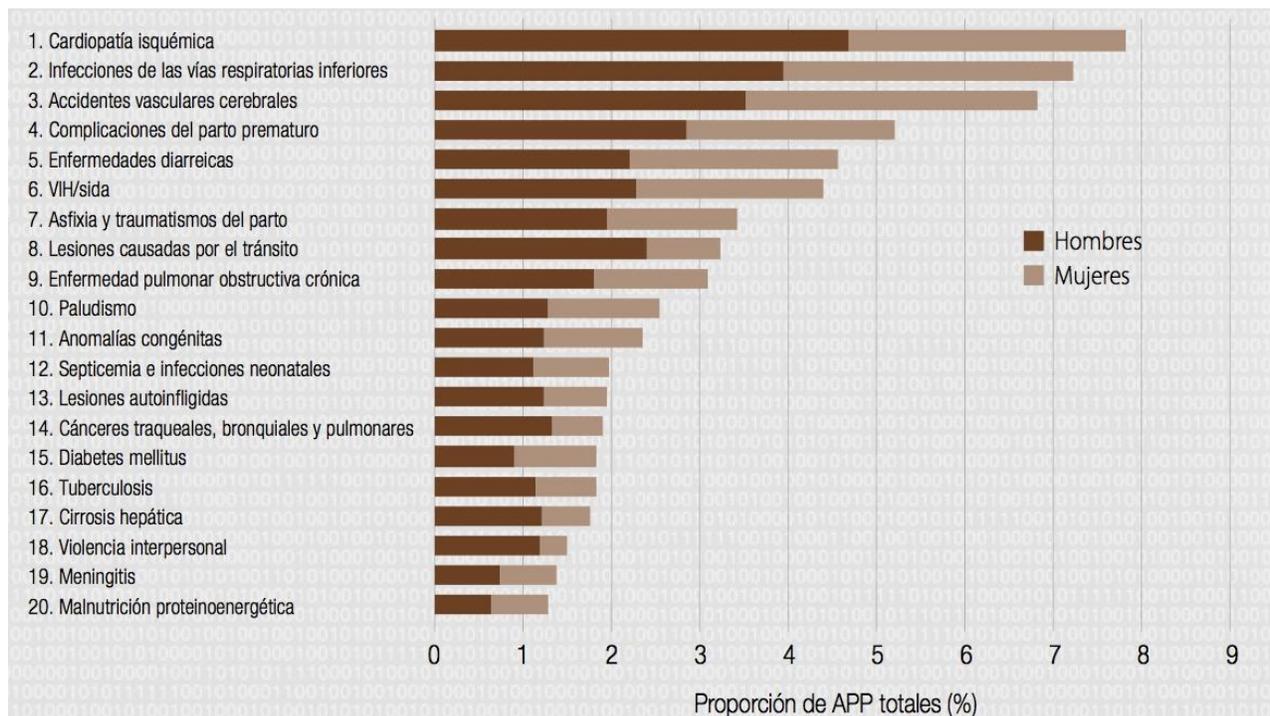


Figura 1. Principales causas de muerte prematura en hombres y mujeres durante el 2012 de acuerdo a la OMS. Tomado de ²

Además de esto, se presenta un problema más y es que muchas de las industrias farmacéuticas han perdido interés en desarrollar nuevos antibióticos debido a que la alta inversión que se requiere para llevar a cabo la investigación, no se compensa con las ventas en el mercado ¹.

La corta duración de las prescripciones de antibióticos, que por lo general dura sólo una o dos semanas, hace que sea difícil para estos medicamentos competir con los rendimientos económicos de los medicamentos que pueden ser prescritos para toda la vida, tales como tratamientos para la diabetes ¹.

Un claro ejemplo de esto ocurre en la farmacéutica Merck, fabricante de Januvia, medicamento para la diabetes cuyas ventas superaron a su principal antibiótico “Invanz” por más de \$ 11 mil millones de dólares durante cinco años (Figura 2) ¹.

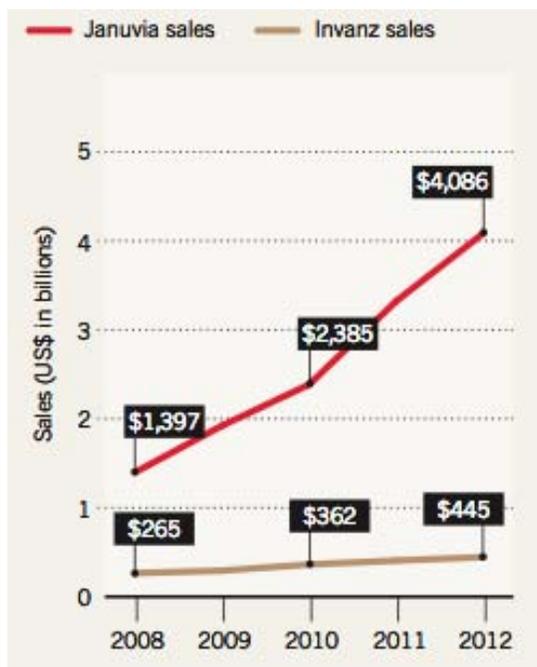


Figura 2. Ventas (en billones de dólares) durante 5 años de Merck.

Debido a este problema económico muchas compañías dejaron de producir o desarrollar nuevos antibióticos y prefieren invertir más dinero en otro tipo de productos. Sin embargo, aún hay algunas que permanecen en el mercado de los antibióticos, pues compañías como Merck (pioneras en la producción de antibióticos) tienen la esperanza de que el avance tecnológico brinde las herramientas necesarias para acelerar el desarrollo de medicamentos capaces de combatir muchas infecciones ¹.

Durante años, los análisis rutinarios de nuevos compuestos antibióticos se han llevado a cabo utilizando métodos de dilución para determinar el crecimiento de un microorganismo en presencia de algún agente antibiótico. Éstos métodos se fundamentan en la preparación de medios de cultivo en los que se encontrará diluida una concentración creciente de antibiótico ³.

La macrodilución se realiza en tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antibiótico. Debido a que ésta metodología requiere el uso de una gran cantidad de material y de manipulaciones para llevarse a cabo, con el paso del tiempo se popularizó el método de microdilución, debido a la aparición de micropipetas y de placas de microtitulación ⁴.

El método de microdilución consiste en el uso de pozos en lugar de tubos y en cada uno se coloca una concentración determinada de antibiótico. Éste método es fácilmente integrable en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el inconveniente del incremento en costos ⁴.

Además se sabe que la preparación de una serie de diluciones se ve afectada por errores cometidos a través del pipeteo, el cual afecta de manera directa la precisión. El error en cada paso de una serie de diluciones es capaz de conducir a errores significativos durante un análisis. Esto afecta la evaluación de posibles candidatos a fármacos y sus comparaciones ⁵.

En éste proyecto en particular se diseñará un microchip de microfluídica, en el cual se formarán microgotas capaces de encapsular células bacterianas, a las cuales se les realizará el análisis y evaluación del posible efecto antimicrobiano de diferentes compuestos por microscopía de fluorescencia en función del tiempo (es decir un estudio cinético), con la ventaja de que en un microchip se tendrá un análisis que requiera la menor cantidad reactivos posible, lo cual se verá reflejado en una disminución importante en costos. Además de que se podrá cuantificar el número de bacterias que mueren en función del tiempo a distintas concentraciones de antimicrobiano.

1.2 Objetivos.

General:

- Desarrollar ensayos de fluorescencia que permitan la detección, distinción y cuantificación de células viables y no viables de *E. coli BL21(DE3)* dentro de microchips de microfluídica para hacer el seguimiento de la cinética de acción antibacterial de distintos compuestos.

Particulares:

- Desarrollar un ensayo fluorescente utilizando el kit comercial LIVE/DEAD *BacLight* L7012 que permita distinguir entre células viables y no viables.
- Fabricar microchips de microfluídica capaces de encapsular células bacterianas de *E. coli BL21(DE3)* en microgotas.
- Seguir la cinética de acción antibacterial en un microchip utilizando microscopía de fluorescencia para determinar el cambio en el número de células viables con el tiempo bajo distintas concentraciones de antibiótico.

1.3 Hipótesis.

Si el kit comercial LIVE/DEAD *BacLight* L7012 empleado permite distinguir entre células viables y no viables en un cultivo de *E. coli BL21(DE3)*, entonces será posible cuantificar el número de células vivas o muertas dentro de microgotas formadas en un microchip de microfluídica, lo cual permitirá realizar un estudio de la cinética antibacterial de la ampicilina y sentará las bases para en un futuro estudiar posibles fármacos nuevos.

2 ANTECEDENTES

2.1 La microfluídica.

La microfluídica surgió alrededor de principios de la década de 1980 a partir del desarrollo de los MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems) por sus siglas en inglés, los cuales se caracterizan por la miniaturización de dispositivos multifuncionales de alta precisión, motivos por los que esta tecnología ha sido muy exitosa (Figura 3) ⁶.



Figura 3. Micrófono tipo MEMS (AKUSTICA AKU340 analógico) diseñado de dos chips con un amplificador de sonido (tomado de mobiledev&design.com)

La microfluídica, se define como el estudio de líquidos confinados en canales muy pequeños con un tamaño que va desde las 10 a las 250 μm y microvolúmenes de 10^{-9} y 10^{-12} L (Figura 4) ⁷. Con ello se han hecho numerosos dispositivos, que van desde cabezales de impresión hasta sistemas microtérmicos y de micropropulsión ⁸.

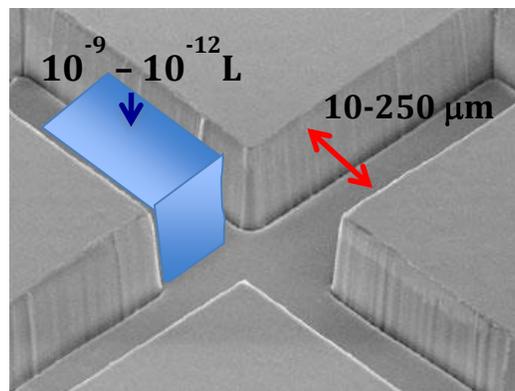


Figura 4. Microcanales en microfluídica (modificado de: resonetics.com).

La microfluídica es un campo que abarca un gran número de disciplinas. Surge como el resultado de la combinación de áreas tales como la Física, la Ingeniería, la Química, la Biotecnología y la Microtecnología. Su principal objetivo es el desarrollo de sistemas en los que se utilizan volúmenes muy pequeños ⁹.

De momento, la microfluídica se encuentra en desarrollo, pero se planea que en un futuro llegue a ser comercial la explotación de los nuevos fenómenos que ocurren en los fluidos a nivel micro. Lo que permitirá el manejo de sistemas con volúmenes desde los nanolitros hasta los picolitros ¹⁰. Sus avances prometen cambiar los procesos de biología molecular y los análisis enzimáticos, como por ejemplo en ensayos de glucosa y lactosa, análisis de ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc. En el mundo comercial la aplicación más exitosa es la cabeza impresora inkjet ¹⁰.

2.2 Ventajas de la microfluídica.

Algunas de las ventajas de la microfluídica son que nos permite realizar análisis rápidos y a distintas concentraciones de reactivos, así como utilizar una menor cantidad de los mismos lo que implica una importante reducción en costos ⁵.

Debido a que los análisis se pueden realizar de manera eficiente dentro de un chip, se puede hablar acerca de los sistemas Lab-on-a-chip.

2.3 Laboratorio en un chip (lab on chip).

La tecnología de laboratorio en un chip (lab on chip), es un sistema que unifica el análisis biológico o químico con la tecnología del chip. Estos sistemas, crean capacidades de procesamiento de laboratorio a pequeña escala y de manera automatizada en la superficie de un chip (de a veces unos cuantos milímetros cuadrados).

Los dispositivos de laboratorio en un chip pueden usarse para múltiples aplicaciones, como el análisis y caracterización de proteínas, análisis de posibles medicamentos y análisis de muestras clínicas ¹¹. También han sido empleados eficientemente en aplicaciones biomédicas y de monitoreo ambiental, así como para la detección de la presencia de iones en fluidos orgánicos, la identificación forense de explosivos, el seguimiento de contaminantes en el agua y atmósfera, el control de la calidad de alimentos, técnicas analíticas o de preparación tales como separación, marcaje químico, detección y otros procesos de la industria química ⁷.

Los chips pueden fabricarse a partir de una variedad de materiales, entre los que se incluyen silicio, cerámica, plásticos y vidrio, dependiendo de la aplicación ¹².

2.4 Fabricación de dispositivos por fotolitografía suave.

Los procesos actuales de microfabricación permiten crear estructuras en escalas micrométricas y aún menores, y han dado lugar a un importante desarrollo en la obtención de dispositivos que permiten el transporte y manejo de líquidos de manera muy precisa¹².

Un proceso representativo para la fabricación de un microdispositivo para microfluídica por la técnica de fotolitografía y litografía suave se muestra en la Figura 5. El primer paso consiste en tener una oblea de silicio (1), la cual es recubierta con una fotoresina con un grosor específico. Una de las resinas más empleadas se denomina SU-8 (Figura 6). Después, la resina se expone a rayos UV (2) usando una máscara con el diseño de los microcanales. A continuación se trata la resina con un solvente (revelado) de modo que quedan impresas únicamente las partes expuestas a la luz UV (3-4) formando lo que será el micromolde. El siguiente paso es el vertido del polímero polidimetilsiloxano (PDMS) al molde (5). Esta sustancia es un polímero orgánico (Figura 7), que pertenece al grupo de los compuestos de organosilicio (conocidas como siliconas). Es transparente y generalmente inerte, inocuo y no inflamable por lo que es ampliamente utilizado para la fabricación de microchips ¹². Después de la polimerización (6) se quita el pedazo de PDMS donde se encuentra el microcanal (7). Por último se pega el PDMS en una placa de vidrio (8), lo cual formará los microcanales para microfluídica (9) ¹³.

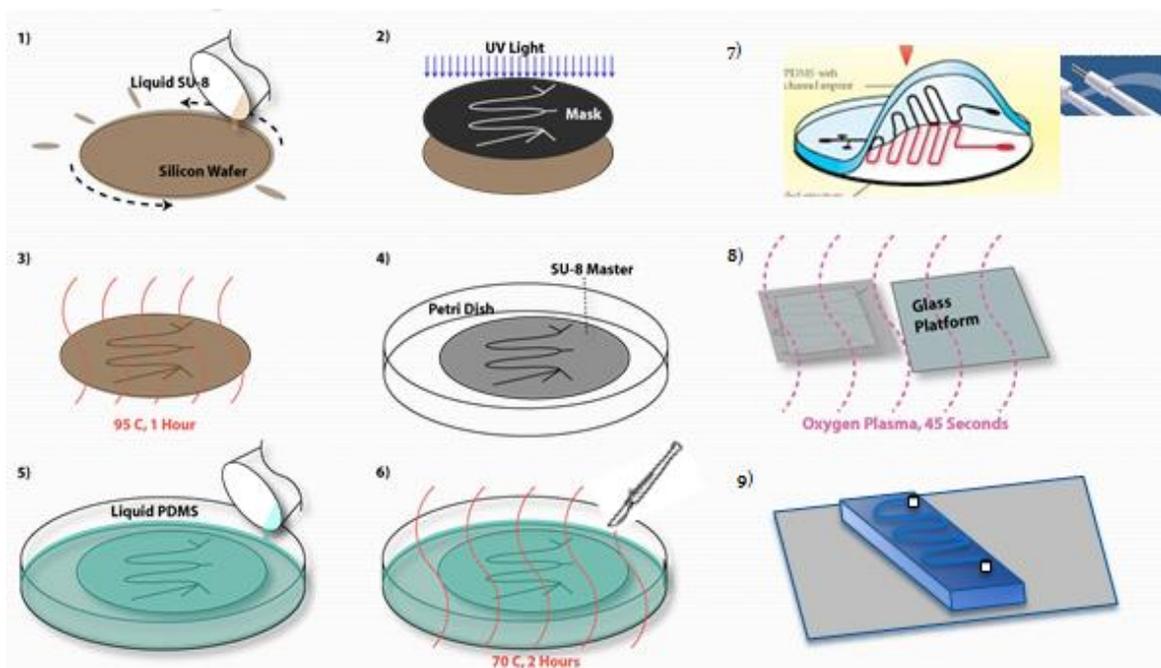


Figura 5. Fabricación de dispositivos (PDMS) por fotolitografía suave (tomado de ¹⁴).

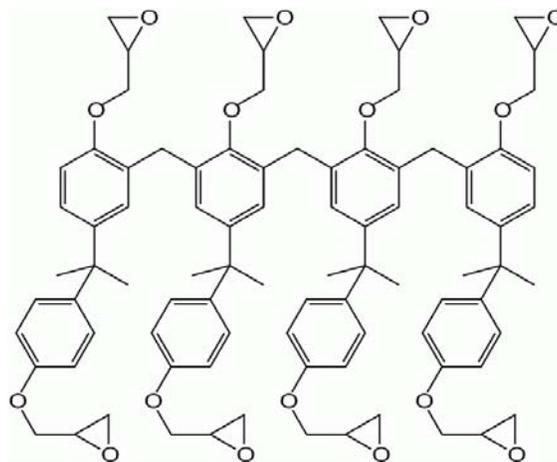


Figura 6. Estructura química de la resina fotosensible SU-8.

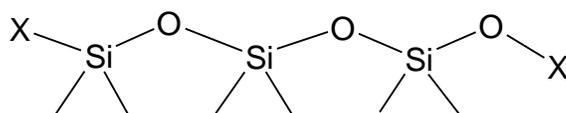


Figura 7. Estructura química del PDMS.

2.5 Aplicaciones de la microfluídica.

Entre las aplicaciones más frecuentes de la microfluídica, se encuentran: diagnóstico médico, secuenciado genético, análisis químico y producción química ^{14, 15}. Esto es posible debido a que los microchips permiten incrementar la eficiencia de los protocolos analíticos no solo a través de la disminución de pasos, sino también en una constante mejora del sistema reduciendo tamaños, automatizando etapas e incrementando la velocidad de realización, para la obtención de resultados iguales o superiores en mucho menor tiempo ¹⁶.

Sin duda se observa la llegada de una época en la que se sustituirán (en la medida de lo posible), microplacas, vasos de cultivos de células, cromatógrafos líquidos, citómetros, etc; por microsistemas programables que lleven a cabo estos análisis biomédicos y/o bioquímicos de modo rápido y eficiente. De manera que se automatizarán y se reducirán las tareas del laboratorio con el fin de tener todo un sistema “en la palma de una mano” ¹³.

2.6 Viabilidad celular.

La viabilidad celular es la determinación de células vivas o muertas presentes en un cultivo celular. De acuerdo con el concepto usado en microbiología, las células vivas o viables, son aquellas que retienen la capacidad de replicarse bajo un cierto tiempo. Por otro lado, las células muertas o no viables serán aquellas que han perdido de forma permanente su capacidad para reproducirse, incluso bajo condiciones óptimas de crecimiento.^{17, 18}

La determinación de la viabilidad celular, es uno de los estudios más importantes hechos en medicina, biotecnología y biología celular ¹⁹. En ésta tesis, se determinará el número de células vivas y muertas haciendo uso de los agentes intercalantes Syto9 y yoduro de propidio, para poder observar la muerte celular ocasionada por distintos antibióticos (ampicilina y kanamicina) en función del tiempo.

2.7 Ensayos de viabilidad celular y funcionamiento del Kit LIVE/DEAD BacLight L7012.

De manera tradicional, la viabilidad bacteriana se puede determinar mediante el método de “conteo en placa”. Éste método consiste en la preparación de diluciones de un cultivo celular, siembra de los microorganismos en cajas Petri con medio sólido y conteo de las colonias formadas. Para llevar a cabo éste proceso se requiere un gran número de materiales, además de ser muy tardado (típicamente de 16 horas a 5 días) ¹⁹.

Actualmente varios métodos dentro de la microscopía se han usado como alternativa al método tradicional del conteo de células en platos. Algunos de estos métodos consisten en la observación de células individuales, mediante la tinción con compuestos coloridos.

Dentro de los compuestos empleados en la microscopía para la determinación de la viabilidad celular se encuentran: azul de tripano, el cual tiñe a las células muertas de color azul y permite que sean observadas con ayuda de un microscopio ²⁰. También se usan compuestos fluorescentes para la detección de células viables como el diacetato de fluoresceína (FDA) que tiñe a las células vivas de color verde, el bromuro de etidio que emite fluorescencia roja por intercalación con el ADN de células con la membrana comprometida y el naranja de acridina que emite fluorescencia verde por intercalación con el ADN en células viables y no viables ²⁰.

En éste trabajo de investigación se realizó un ensayo fluorescente el cual permitió distinguir entre células vivas y muertas. Para realizar dicho ensayo se empleó el kit comercial (LIVE/DEAD) BacLight L7012 (Life Technologies, Molecular Probes, E. U. A.) el cual consiste en dos agentes intercalantes en el ADN de las células, los cuales son yoduro de propidio y Syto9 ²¹. El uso de éste kit, se ha popularizado y se han hecho estudios que dan conocimiento de su mecanismo de acción para la emisión de fluorescencia ¹⁹.

En el caso del Syto9, éste se intercalará con el ADN de las células vivas, ya que a diferencia del yoduro de propidio, logra atravesar la membrana celular cuando está intacta, pues carece de carga eléctrica. Pero cuando las células tienen su membrana comprometida, el yoduro de propidio (PI),

competirá por los sitios entre las pares de bases del ADN con el Syto9. De modo que el yoduro de propidio tenderá a desplazar a las moléculas de Syto9 para intercalarse en el ADN.

Como el Syto9 tiene una constante de afinidad al ADN ($K_{\text{Syto9}} = 1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) menor que la constante de afinidad al ADN del yoduro de propidio ($K_{\text{PI}} = 3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), las moléculas de Syto9 podrán ser desplazadas por las moléculas de PI.

A continuación se muestra un esquema representativo de la manera en la cual funcionan éstos tintes para distinguir entre células vivas o muertas (Figura 8).

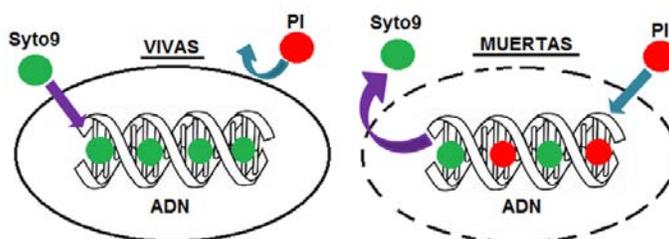


Figura 8. Función de los tintes. El Syto9 se intercala en el ADN ($K_{\text{Syto9}} = 1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) de células vivas, mientras que el yoduro de propidio ($K_{\text{PI}} = 3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) se intercala en el ADN de células muertas, debido a que la membrana celular se encuentra comprometida ¹⁹.

La razón de que el yoduro de propidio no pueda atravesar la membrana celular de las células vivas, se debe a su estructura (Figura 9), pues tiene dos cargas positivas en solución por lo cual no puede atravesar la membrana celular ¹⁹. Por lo tanto, no se intercalará con el ADN de las células vivas, pero sí se intercalará en el ADN de las células con su membrana comprometida, emitiendo fluorescencia a los 617 nm, observándose así una tinción de color rojo mediante el uso de un filtro de excitación adecuado (530 nm) ²¹.

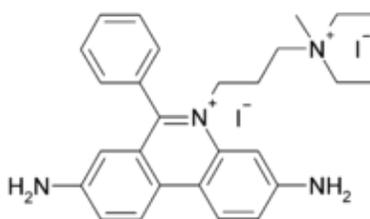
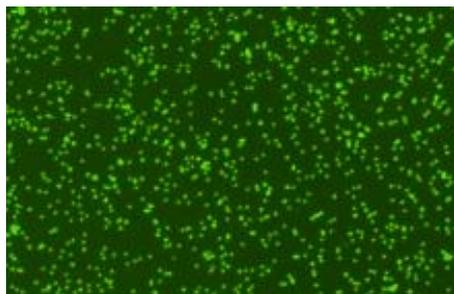


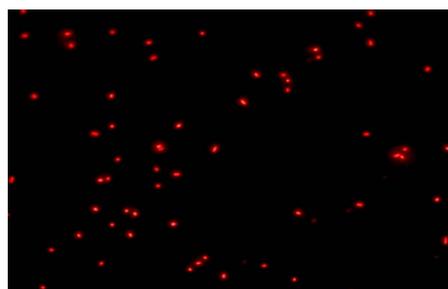
Figura 9. Estructura química del yoduro de propidio.

La emisión de fluorescencia debida a la intercalación del Syto9 en el ADN, será observada como una tinción de las células de color verde, con el uso de un filtro de excitación adecuado (488 nm). La estructura del Syto9 no está reportada por el fabricante ²².

En la siguiente figura se muestra la tinción de las células de *E. coli* con los intercalantes mencionados (Figuras 10 y 11).



**Figura 10. Tinción con Syto9
(células vivas)**



**Figura 11. Tinción con PI
(células muertas)**

3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Medios de cultivo y soluciones empleadas.

Para la elaboración de los ensayos fue necesaria la preparación de distintos medios y soluciones. El procedimiento para su elaboración se describe a continuación.

3.1.1 Medio Luria Beltrani (LB) para el crecimiento de bacterias de *E. coli*.

La preparación de 600 mL medio líquido LB, se realizó pesando:

- 6.3 g de peptona (P6838, Sigma Aldrich, E.U.A).
- 3.15 g de extracto de levadura (70161, Sigma Aldrich, E.U.A.).
- 6.3 g de NaCl (L-B0809, Distribuidora Química AIVI, México).

Los reactivos se mezclaron y luego se adicionó agua destilada hasta obtener un volumen de 600 mL. Finalmente el medio preparado se esterilizó en la autoclave (SK100C, Yamato Scientific America, E. U. A.) a 120°C durante 20 min.

El medio preparado se etiqueta con fecha y nombre y se guarda en el refrigerador a 5°C.

3.1.2 Medio Luria Beltrani-Agar para la siembra y crecimiento de colonias.

Para preparar el medio Luria Beltrani-Agar, se pesaron los siguientes reactivos:

- 6.3 g de peptona (P6838, Sigma Aldrich, E.U.A.).
- 3.15 g de extracto de levadura (70161, Sigma Aldrich, E.U.A.).
- 6.3 g de NaCl (L-B0809, Distribuidora Química AIVI, México).
- 9 g de agar para la solidificación del medio (A1296, Sigma Aldrich, E. U. A).

Todos los reactivos se mezclaron y luego se adicionó agua destilada hasta obtener un volumen de 600 mL al igual que en la sección 3.1.1. Luego, el medio preparado se esterilizó en la autoclave (SK100C, Yamato Scientific America, E. U. A) a 120°C durante 20 min.

Después de los 20 min se saca el medio y se deja enfriar hasta que sea posible tomar el recipiente con la mano sin quemarse. En un área estéril, se llenan cajas Petri de 90 x 15 mm estériles con 20 mL de medio LB-Agar, se distribuye el medio en toda la caja tapando la caja Petri y moviéndola lentamente hacia los lados y en círculos sobre la mesa.

Finalmente se deja secar el medio en las cajas, se etiquetan con nombre y fecha de preparación y se guardan en el refrigerador a 5°C.

Una de las cajas se colocó dentro de la estufa (IC103CW, Yamato Scientific, China) y se dejó por 16 horas a 37°C. Al día siguiente se revisa que no haya crecimiento de colonias o de hongos para comprobar su esterilidad.

3.1.3 Solución de NaCl 0.85% m/v para el lavado del cultivo de *E. coli*.

Para preparar la solución de NaCl al 0.85% m/v, se pesaron 0.42 g de NaCl al 99% (L-B0809, Distribuidora Química ALVI, México) y posteriormente se disolvió con 10 mL de agua destilada en un vaso de precipitados. Luego la solución se pasó a un matraz aforado de 50 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

La solución se pasó por un filtro de 5 µm y luego se dividió en alícuotas de 10 mL, colocando las alícuotas dentro de tubos falcón (SC-200250, Santa Cruz Biotechnology, E. U. A.).

Luego se esterizaron los tubos falcón con la solución de NaCl al 0.85% en la autoclave a 120°C por 20 min. Finalmente se guardó en el refrigerador a 5°C para conservarlo hasta su uso.

3.1.4 Preparación de isopropanol 70% v/v para la obtención de células “muertas”.

Para preparar el isopropanol al 70% v/v, se tomaron 28.14 mL de isopropanol al 99.5% (27 847-5, Sigma Aldrich, E.U.A) y se disolvieron en 11.86 mL de agua destilada para obtener un volumen total de 50 mL.

3.1.5 Solución de glicerol al 38.1% m/m para resuspender a las células.

Para preparar el glicerol al 38.1% m/m, se pesaron en una balanza analítica (AT250, Mettler Toledo, E. U. A.) 4.82 g de glicerol al 99% (GB0232, Bio Basic Inc, Canadá), colocando el glicerol dentro de tubos falcón estériles. Finalmente se disolvió con NaCl al 0.85% hasta obtener un volumen final de 10 mL.

El glicerol preparado se esterilizó en la autoclave a 120°C por 20 min y se guardó en el refrigerador a 5°C para conservarlo hasta su uso.

3.1.6 Preparación de Syto9 0.334 mM.

La solución de Syto9 a una concentración de 0.334 mM, se realizó en un volumen final de 10 μ L a partir del Syto9 3.34 mM comercial (BacLight L7012) utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) al 99.5% GC (D5879, Sigma Aldrich, E. U. A.). La dilución se usó para la tinción de las células de *E. coli* que previamente pasaron por el proceso de lavado descrito en la sección 3.4.

NOTA: La dilución de Syto9 debe ser preparada cada vez que se haga una prueba nueva.

3.1.7 Preparación de Aceite mineral con Span 80 al 1.8% m/m para la formación de microgotas dentro de los microchips.

Se pesaron 9.970 g de aceite mineral (11385-C, Reactivos y Productos Químicos Finos, S. A de C. V., México) en una balanza analítica y luego se añadieron 0.192 g de Span 80 (S6760, Sigma Aldrich, E. U. A.) para obtener una masa total de 10.162 g.

Posteriormente se mezclaron los reactivos con ayuda de un vortex y se guardó la solución dentro de un tubo falcón a temperatura ambiente, etiquetada como “Aceite mineral + Span 80 al 1.8% m/m” y la fecha de elaboración.

La preparación se hace al menos una vez al mes para mantenerlo “fresco”.

3.2 Preparación y crecimiento del cultivo de *E. coli BL21(DE3)*.

La preparación de un cultivo de 16 horas (overnight) de *E. coli BL21(DE3)* fue necesaria para realizar los experimentos para la obtención de un valor experimental del número de unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/mL) y para las pruebas de viabilidad celular en microchips.

El procedimiento se llevó a cabo del siguiente modo:

- a. Se inoculó un cultivo de 3.0 mL de medio LB, tomando una colonia de bacterias de *E. coli BL21(DE3)* (ver NOTA 1) de una caja Petri con LB-agar.
- b. Se dejó crecer el cultivo en una incubadora orbital (Excella E24/E24R New Brunswick Scientific, Fisher Scientific, Alemania) por toda la noche (16 h aprox) a 37 °C y 200 rpm.

NOTA 1: Fue necesario resembrar las bacterias de *E. coli* una vez a la semana en una caja Petri con agar, para evitar posibles contaminaciones.

3.3 Experimentos con cultivo de células de *E. coli BL21(DE3)* por el método de macrodilución.

Para los experimentos con el cultivo de células de *E. coli* por el método de macrodilución, se tomó una alícuota 1.2 mL del cultivo overnight y se diluyó en 3 mL de medio LB fresco, con la finalidad de tener 3 mL de un cultivo “fresco”. El cultivo “fresco” se dejó crecer en la incubadora (Excella E24/E24R New Brunswick Scientific, Fisher Scientific, Alemania) durante 2 horas, previas a los

experimentos. Esto se realizó con la finalidad de disminuir el número de células muertas en el cultivo que se usaría para la determinación del valor experimental de CFU/mL.

Después de incubar el cultivo “fresco”, se mide la densidad óptica (OD) a 600 nm. Si la OD era mayor a 1.0, se preparaba una dilución para tener una OD_{600 nm} de 1.0. Posteriormente se prepararon una serie de diluciones (1:100, 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000, 1:10 000 000), considerando el valor teórico reportado de 2×10^9 CFU/mL para una OD de 1.0 a 600 nm ²³.

Finalmente, se dejaron crecer en cajas Petri con agar, alícuotas de 100 µL de las diluciones preparadas (1:100, 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000, 1:10 000 000). Las cajas Petri se colocan dentro de una incubadora (IC 103 CW, Yamato Scientific, China) a 37°C durante 16 horas. Después de las 16 horas, se cuenta el número de colonias presentes en cada plato para determinar el valor de CFU/mL.

3.4 Lavados del cultivo overnight (previos a la tinción).

El protocolo de lavado del cultivo overnight se rediseñó a partir del protocolo proporcionado por el fabricante ²², considerando las observaciones experimentales y los resultados obtenidos, de los cuales se hablará en el capítulo 4.

- a. Se concentraron 1.5 ml del cultivo bacteriano de 16 horas por centrifugación a 10000 rpm durante 5 minutos.
- b. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1.5 mL de NaCl al 0.85% con ayuda de una micropipeta y nuevamente se centrifugó la muestra a 10000 rpm durante 5 min.
- c. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 1.5 mL de NaCl al 0.85%.
- d. Se determinó la densidad óptica del cultivo celular a 670 nm.
- e. Se diluyó el cultivo celular a una OD de 0.04 a 670 nm con NaCl 0.85%.

3.5 Tinción de células de *E. coli BL21(DE3)* con el kit LIVE/DEAD BacLight L7012.

El procedimiento siguiente de tinción fue optimizado para los ensayos dentro de los microchips considerando el protocolo proporcionado por el fabricante, así como las observaciones y resultados experimentales que se presentarán en el capítulo 4.

- Por cada 0.5 mL de cultivo lavado y a una OD de 0.04 a 670 nm, se adicionaron 1.5 μ L de yoduro de propidio (20 mM) y 1 μ L del Syto9 diluido (0.334 mM).
- La o las muestras preparadas (según el ensayo a realizar), se dejaron incubar por 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Posteriormente se pasa a las observaciones con el microscopio de fluorescencia.

3.6 Funcionamiento del microscopio de fluorescencia.

Para realizar las pruebas de viabilidad celular en microchips, se usó el arreglo experimental que se muestra de manera esquemática en la Figura 12:

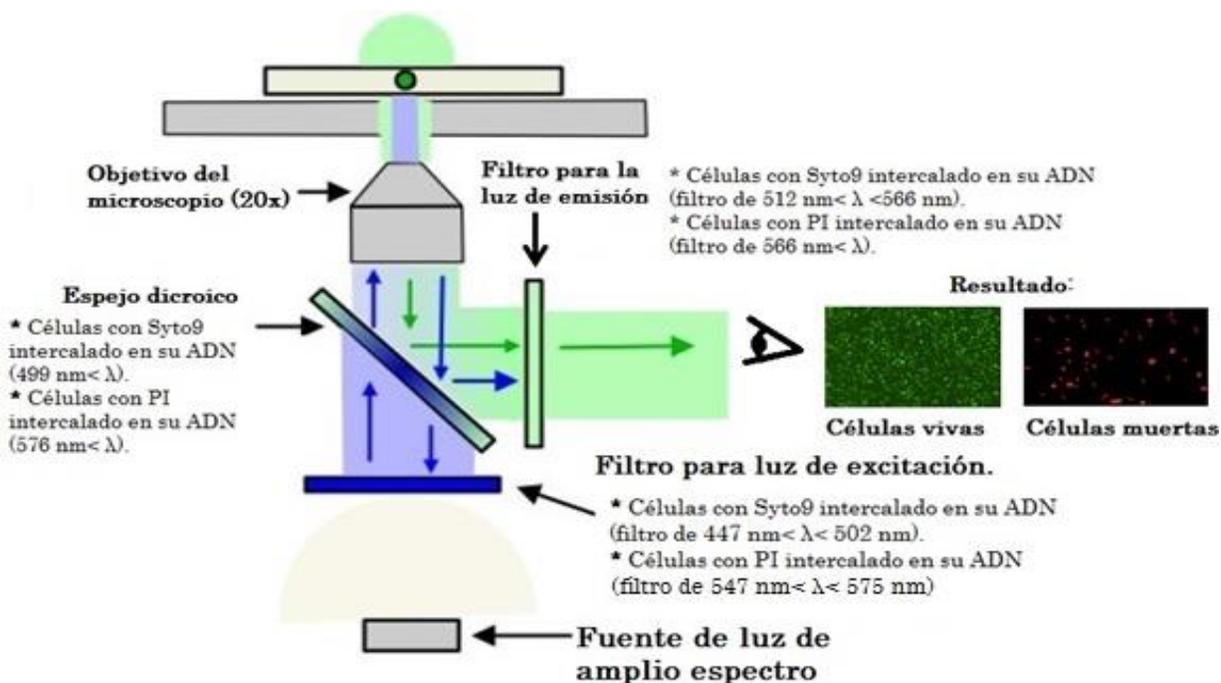


Figura 12. Diagrama esquemático del funcionamiento del microscopio de fluorescencia (Modificado de ²⁴).

El arreglo experimental consiste en una fuente de luz de amplio espectro (North89 Photo Fluor, E. U. A.), la cual es filtrada para la longitud de onda de absorción máxima del compuesto fluorescente. La luz que pasa a través del filtro, es transmitida por el espejo dicroico y el objetivo del microscopio (en la tesis se usó un objetivo de 20x de Leica, número de apertura 0.3), de tal modo que el campo visual ocular fue iluminado. La muestra absorbe la luz filtrada y emite (debido al fenómeno de fluorescencia) en una longitud de onda mayor a la longitud de excitación.

La fluorescencia emitida por la muestra, es recogida por el objetivo del microscopio y pasa hacia el espejo dicroico. El espejo dicroico, refleja la luz hacia un tercer filtro que permite el paso de luz en una longitud de onda de la luz emitida por la muestra fluorescente (para células verdes será de 475 nm y para células rojas de 560 nm) ²⁴.

Para observar a las células de color verde, las cuales tienen al Syto9 intercalado en su ADN, se usó un filtro de excitación que sólo permite el paso de luz a longitudes de onda en el intervalo de $447 \text{ nm} < \lambda < 502 \text{ nm}$ (FF02-475/50, Semrock). Mientras que, para la detección de células muertas que se verán de color rojo, se usó un filtro de excitación que deja pasar luz con longitudes de onda de los 547 nm a los 575 nm (FF01-561/14, Semrock). Para el filtro de luz azul, +/- 50 nm alrededor de su valor de 475 nm, mientras que el filtro de luz verde tiene un rango de +/-14 nm alrededor de su valor de 561 nm ²⁵.

En las Figuras 13 y 14, se muestran los espectros de absorción y emisión de los agentes intercalantes empleados (Syto9 y yoduro de propidio (PI)) y el set de filtros empleados durante los experimentos hechos en esta tesis.

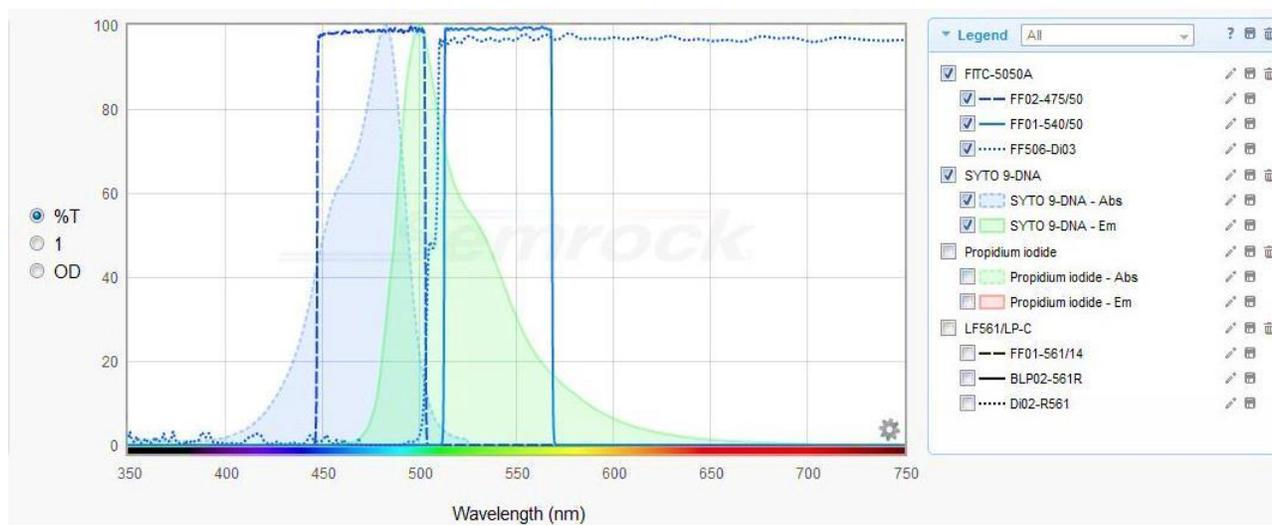


Figura 13. Espectro de absorción y emisión del Syto9 cuando está intercalado en el ADN. Se muestra además el set de filtros empleados (FITC-5050A, Semrock). La línea discontinua corresponde al filtro de excitación (FF02-475/50, Semrock); la línea azul continua corresponde al filtro de emisión (FF01-540/50) y la línea punteada corresponde al espejo dicróico (FF506-DI03, Semrock). La figura se realizó en Search Light, Semrock.com.

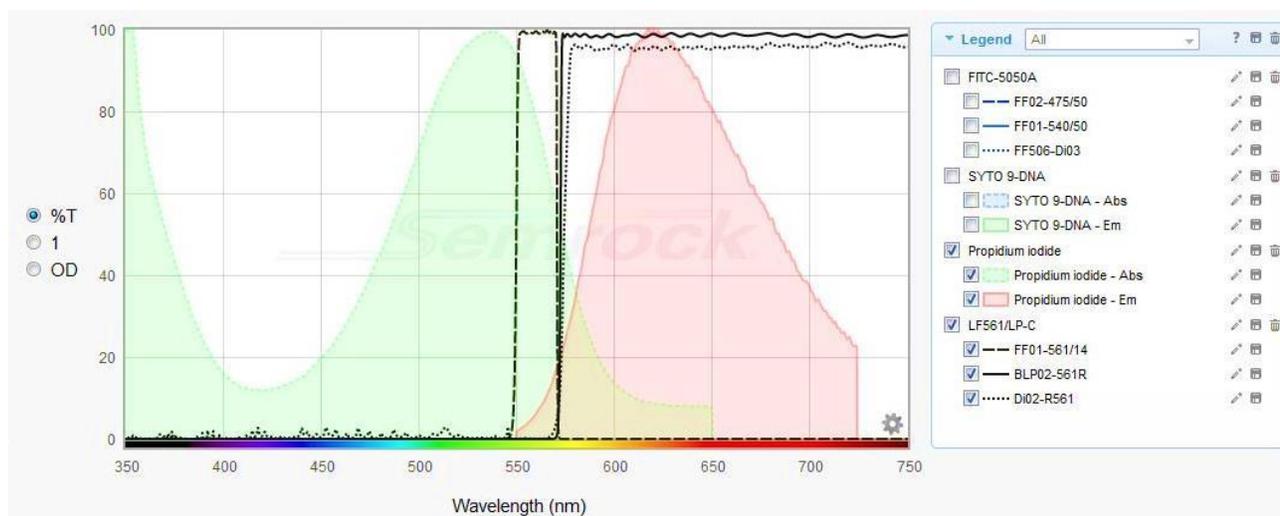


Figura 14. Espectro de absorción y emisión del yoduro de propidio (PI) cuando está intercalado en el ADN. Se muestra además el set de filtros empleados (LF561/LP-C, Semrock). La línea discontinua corresponde al filtro de excitación (FF01-561/14, Semrock); la línea continua corresponde al filtro de emisión (BLP02-561R) y la línea punteada corresponde al espejo dicróico (DI02-R561, Semrock). La figura se realizó en Search Light, Semrock.com.

Para hacer la captura de foto y/o toma de video, se usó una cámara digital (Canon SX260 HS, E.U.) usando los settings siguientes:

- Para la toma de fotos: modo “fácil”, sin flash y sin zoom.
- Para la toma de video: modo “resumen video”.

3.7 Diseño microchip de 300 μm de ancho por 100 μm de profundidad.

Para diseñar los microchips con sus respectivos canales y las entradas para la generación de las microgotas, se utilizó el software de diseño asistido por computadora Adobe Illustrator CS6. De acuerdo al trabajo que previamente se realizó en el laboratorio ²⁴, se ha observado que la formación de microgotas es más estable cuando dos corrientes de fase orgánica (fase continua) intersectan a la fase acuosa (fase dispersa) (Figura 15).

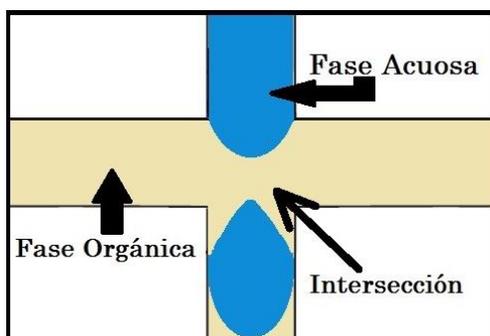


Figura 15. Formación de microgotas dentro de los microchips mediante la intersección de dos corrientes de fase orgánica (fase continua) y una de fase acuosa (fase dispersa)

Después de tener los diseños de los microchips, éstos se colocaron en una circunferencia de 65 mm de diámetro (espacio del tamaño de una oblea de silicio para un molde). Finalmente, se imprimieron en negativo en un acetato (Gráficos Digitales Denver). Ésta impresión servirá como la máscara con la cual se hará la transferencia de los diseños al molde por la técnica de fotolitografía suave.

3.8 Fabricación de moldes de microchips por la técnica de fotolitografía suave.

Como ya se mencionó en el apartado 2.4 de la introducción, la técnica de fotolitografía suave es una técnica sencilla ampliamente usada para la fabricación de microdispositivos de microfluídica. Para la elaboración de ésta tesis, se siguió el procedimiento siguiente:

- a. Se colocó una oblea de silicio de 3 pulgadas de diámetro (grosor: $381 \pm 25 \mu\text{m}$) (Silicon Valley Microelectronics, E. U.) en una parrilla (Thermo Scientific, Modelo Cimarec, E. U.) a 210°C por 5 minutos.
- b. Se introdujo la oblea en el horno (Prolab, DHP90-32, México) a 65°C durante 10 minutos.
- c. Se abrió el gas (nitrógeno) y la bomba de vacío. Posteriormente se conectó el spin coater (Laurell Technologies, WS-650MZ-23NPPB, E. U.).
- d. Se acomodó la oblea con las pinzas en el spin coater.
- e. Se cerró el equipo y se encendió el vacío con el botón “vacuum” (la flecha hacia arriba indica que el vacío está abierto, por el contrario, la flecha hacia abajo indica que el vacío está cerrado).
- f. Se programó el spin coater a 500 rpm por 10 segundos, y a una aceleración de 100 rpm/s, para distribuir la resina por toda la oblea uniformemente.
- g. Se colocaron 3 mL de resina SU-8 2035 (Microchem, SU-8 2000, E. U.) sobre el centro de la oblea de silicio (para detener la adición de SU-8, se hizo un giro rápido con la mano).
- h. Se programó el spin coater a 1300 rpm durante 30 segundos con una aceleración de 300 rpm/s, para obtener microchips con microcanales de $100 \mu\text{m}$ de profundidad (Figura 16.)

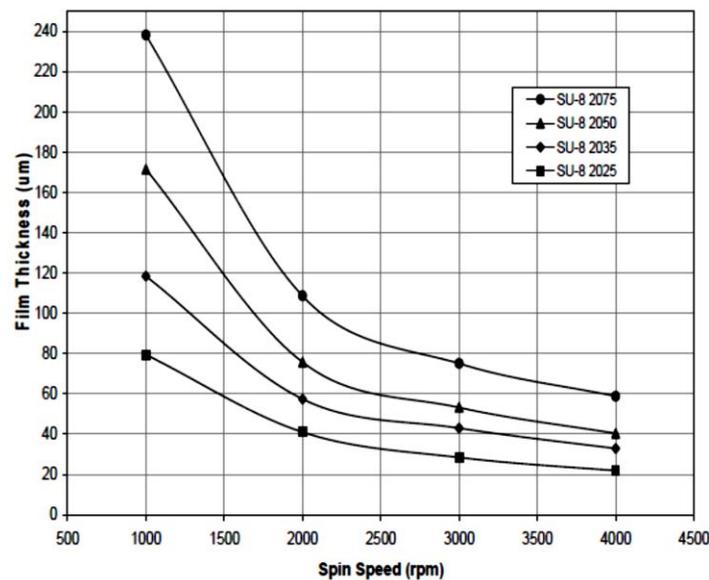
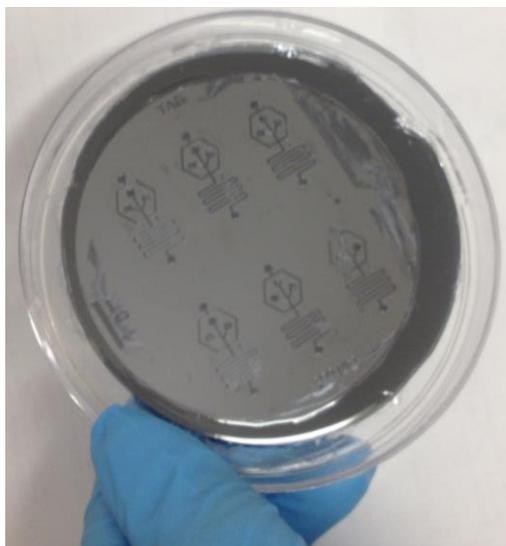


Figura 16. Ancho de los microcanales del microchip (μm) en función de la velocidad del spin coater, para la resina SU-8 2000. Tomado de ²⁶

- i. Se colocó la oblea de silicio con la resina en la parrilla a 75°C durante 1 minuto con la ayuda de unas pinzas de disección.
- j. Después la oblea de silicio con la resina se pasó a una parrilla a 105°C por 3 minutos.
- k. Luego, la oblea se puso en un vidrio y encima de la misma se colocó la máscara con el diseño del chip. Finalmente se tapó con otro vidrio, colocándolo lentamente para evitar que la máscara se levante por el aire.
- l. Se expuso la oblea a la luz UV durante 30 segundos, usando la lámpara UV (Black-Ray, B-100AP, E. U) a una distancia de ~ 30 cm.
- m. Se quitó la máscara y se colocó la oblea en la parrilla (post-cocido) durante 1 min a 75°C .
- n. Se puso la oblea en la parrilla a 105°C durante 3 min.
- o. La oblea se introdujo en un recipiente con revelador (la cantidad de revelador cubrió por completo a la oblea) por ~ 10 min.
- p. Se lavó la oblea con 1-propanol. Si la oblea se teñía de blanco, entonces se sumergía nuevamente en el revelador (éste paso se repitió hasta que al añadir 1-propanol, la oblea no se veía blanca).

- q. Una vez que la oblea estuvo lista, se secó con aire.
- r. Finalmente la oblea se colocó en una caja Petri, para pasar a la adición de PDMS (Figura 17).



**Figura 17. Oblea de silicio con el diseño de los microchips
(300 μm de ancho x 100 μm de profundidad).**

NOTA 1: El spin coater debe estar colocado en una superficie plana, de modo que quede alineado antes de colocar la oblea y la resina, e iniciar el programa.

NOTA 2: Encender la lámpara de UV 30 min antes de su uso.

NOTA 3: Es necesario usar lentes protectores durante el manejo de lámpara UV.

NOTA 4: Se debe limpiar el spin coater una vez terminado su uso con papel sin pelusas, humedecido con revelador, cuidando que el líquido no caiga en la salida del vacío.

3.9 Fabricación de microchips con Polidimetilsiloxano (PDMS).

- a. Para realizar el llenado de los moldes, se pesaron 20 g de PDMS y se adicionaron 1.6 g de agente curante (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning). El polímero, se mezcló durante 10 min hasta que la composición fuera uniforme.
- b. Posteriormente, la mezcla de PDMS y agente curante, fue vertida sobre el molde con la oblea de silicio, para obtener réplicas con un grosor de 4 mm.
- c. Luego, se colocó el molde dentro de un desecador (durante 20 min), conectándolo al vacío para eliminar las burbujas formadas durante el vertido de la mezcla en el molde.
- d. Para acelerar el proceso de polimerización, el molde preparado con los diseños de los microchips, se dejó dentro de un horno (Prolab, DHP-9032, México) a 70°C durante 24 horas.
- e. Una vez que se observó que la consistencia del PDMS fue firme, se cortaron los microchips obtenidos con ayuda de un bisturí (Figura 18).

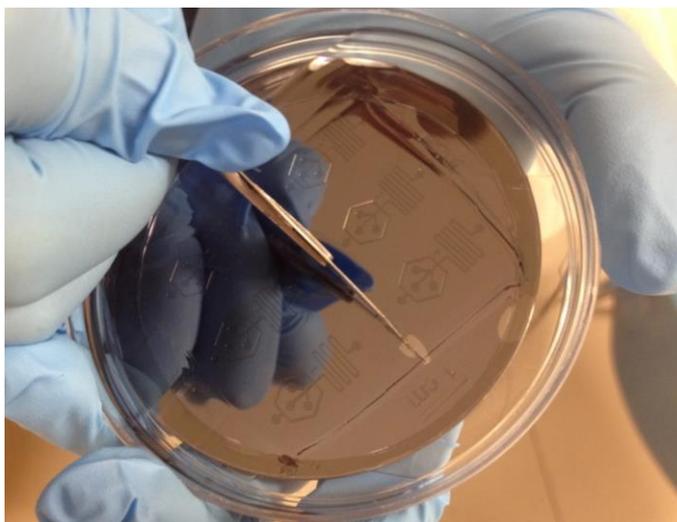


Figura 18. Cortado de los microchips de PDMS con ayuda de un bisturí.

- f. Finalmente y antes de pasar al proceso de pegado del microchip, se debe verificar que los microchips obtenidos no presenten obstrucciones en los microcanales que puedan impedir su correcto funcionamiento. Una vez que se cortaron y revisaron, se procedió a perforar las entradas y la salida para los líquidos con un horador de 0.75 mm de diámetro.

NOTA 1: Durante el proceso de elaboración de microchips, se debe tener cuidado de que las réplicas tengan contacto con pelusas que puedan bloquear los microcanales.

3.9.1 Proceso de pegado del microchip con el portaobjetos para la obtención de microcanales cerrados.

Durante el proceso de pegado del microchip, es necesario verificar que los portaobjetos empleados se encuentren perfectamente limpios y libres de pelusas, las cuales podrían bloquear los microcanales.

Se debe considerar además, que una exposición demasiado prolongada de los microchips en el plasma, provoca que el PDMS se vuelva quebradizo. Así mismo, la superficie del microchip y también la del portaobjetos, debe activarse por efecto del plasma de manera correcta para que la adherencia sea regular.

- a. Se lavaron los portaobjetos necesarios para el pegado de los microchips obtenidos con agua y jabón, tallándolos suavemente con los dedos de la mano para evitar que los portaobjetos se rayaran.
- b. Los portaobjetos se secaron con aire comprimido y una vez que no tenían gotas de agua, se verificó que estuvieran perfectamente limpios. Si durante éste paso se llegaban a observar manchas en el portaobjetos, se realizaba nuevamente el proceso de lavado y secado.
- c. Una vez secos y limpios, los portaobjetos se introdujeron en el horno a 70 °C durante 1 hora para eliminar por completo toda la humedad.
- d. Después, se sacaron los portaobjetos del horno y los microchips. Éstos se colocaron en una superficie limpia para realizar el proceso de pegado. Se hizo incidir la descarga de plasma con el equipo Laboratory Corona Tretaer (BD-20AC, Electro-Technic Products) durante 1 min en el portaobjetos y 15 segundos en el microchip. (Figuras 19 y 20).



Figura 19. Descarga de plasma en el microchip para su pegado.



Figura 20. Descarga de plasma en el portaobjetos para el pegado del microchip.

- e. Luego, se colocó el microchip sobre el portaobjetos, de modo que el diseño de los canales quedara en contacto con la superficie de vidrio del portaobjetos. Se hizo una ligera presión con los dedos para evitar que hubieran burbujas de aire entre el PDMS y el vidrio.

- f. Finalmente, los microchips se dejaron durante 24 horas dentro del horno a 70°C para ayudar al proceso de pegado (Figura 21).

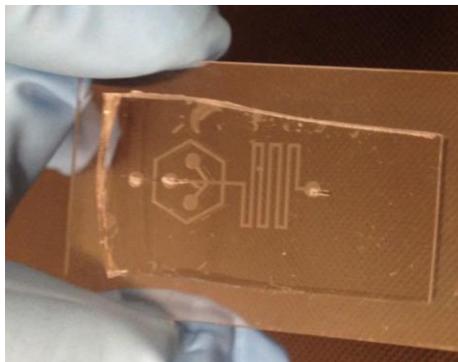


Figura 21. Microchip de 300 μm de ancho x 100 μm de profundidad pegado en un portaobjetos para obtener los microcanales cerrados.

3.10 Experimentos en portaobjetos con células vivas en NaCl al 0.85% y células muertas incubadas en isopropanol al 70%.

Para realizar las pruebas en portaobjetos con células vivas resuspendidas en NaCl al 0.85% y células muertas tratadas con isopropanol al 70%, se realizó el lavado del cultivo overnight como se indica en la sección 3.4, con la diferencia de que después del paso a de la sección 3.4 se realizó lo siguiente:

- a. Se eliminó el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 0.120 ml de NaCl al 0.85% con ayuda de una micropipeta.
- b. Se prepararon dos tubos con 1.5 mL de NaCl al 0,85 % (para bacterias vivas) o 1.5 mL de isopropanol al 70 % (para las bacterias muertas). A cada uno se le añadieron 60 μL de la suspensión de células.
- c. Se incubaron las dos muestras a temperatura ambiente durante 0.5 a 2 horas con agitación lenta (Roto Shake Genie, Scientific Industries, E. U. A).

Después de la incubación, se sigue el protocolo de lavados a partir del paso “b” de la sección 3.4.

3.11 Ensayos de células en presencia de Ampicilina.

Para los ensayos de células con Ampicilina, se realizó el lavado del cultivo de células como se indica en la sección 3.4. Luego de lavar las células y realizar la tinción (proceso optimizado) de acuerdo a las secciones 3.4 y 3.5 se hizo lo que se describe a continuación:

- a. Se prepararon muestras en microtubos de 1 mL con cultivo a una $OD_{670\text{ nm}} = 0.04$ y a cada uno se le adicionó Ampicilina para obtener la concentración deseada para el ensayo realizado (500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$).
- b. Posteriormente se realizaron las observaciones en el microscopio de fluorescencia.

NOTA 1.: La Ampicilina utilizada, corresponde a una solución stock de 100 mg/mL previamente preparada y conservada a -20°C .

3.12 Ensayos de células en presencia de Kanamicina.

Para los ensayos de células con Kanamicina, se realizó el lavado del cultivo de células como se indica en la sección 3.4 y la posterior tinción descrita en la sección 3.5. A continuación, se prepararon muestras en microtubos de 1 mL con cultivo a una $OD_{670\text{ nm}} = 0.04$ y a cada uno se le adicionó Kanamicina para obtener una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente se realizaron las observaciones en el microscopio de fluorescencia.

NOTA 1.: La Kanamicina utilizada, corresponde a una solución stock de 100 mg/mL previamente preparada.

3.13 Experimentos de viabilidad celular en microchips a flujo de agua 0 $\mu\text{L/hr}$ en ausencia de la fase orgánica.

En el caso de los experimentos flujo de agua 0 $\mu\text{L/hr}$ en ausencia de la fase orgánica, se inyectó en los microchips el cultivo celular ($\text{OD}_{670\text{nm}} = 0.04$) en ausencia o presencia de ampicilina previamente lavado y teñido para su posterior observación en el microscopio de fluorescencia.

En éste caso se usó un microchip por cada muestra preparada, de modo que se tuvieron tubos con células de *E. coli* vivas, teñidas con las concentraciones finales de Syto9 y yoduro de propidio que se muestran a continuación:

C_{Syto9} (mM)	C_{PI} (mM)	$C_{\text{Syto9}}/C_{\text{PI}}$
0.01	0.06	1:6
1.34×10^{-3}	0.06	1:45
6.68×10^{-4}	0.06	1:90

En otros ensayos, de los que se hablará en el siguiente capítulo, se inyectaron al microchip células vivas de *E. coli* resuspendidas en NaCl al 0.85% y células en presencia de ampicilina (500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$).

Finalmente se realizaron las observaciones en el microscopio de fluorescencia y la toma de videos cada hora, por 6 horas.

3.14 Experimentos de viabilidad celular en microchips formando microgotas.

Para realizar los ensayos en microchips, fue necesario el uso de bombas (Syringe Pumps, New Era, E.U.) y de jeringas de plástico de 1.0 mL (326716, Becton Dickinson, México) que dispensaran la fase acuosa y la fase orgánica dentro del microchip. En los ensayos se emplearon los flujos de fase acuosa y orgánica siguientes:

Fase orgánica (Aceite mineral con Span 80 al 1.8% m/m)	Fase acuosa (Cultivo lavado y teñido de células de <i>E. coli</i> a una $OD_{670\text{ nm}}=0.04$)
15 $\mu\text{L/hr}$	1 $\mu\text{L/hr}$

Posteriormente se realizaron las observaciones en el microscopio de fluorescencia, tomando un video cada hora de las microgotas formadas vistas con los filtros de 475 nm y 560 nm. En la Figura 22. Se muestra el arreglo final de los ensayos en microchips con la formación de microgotas.

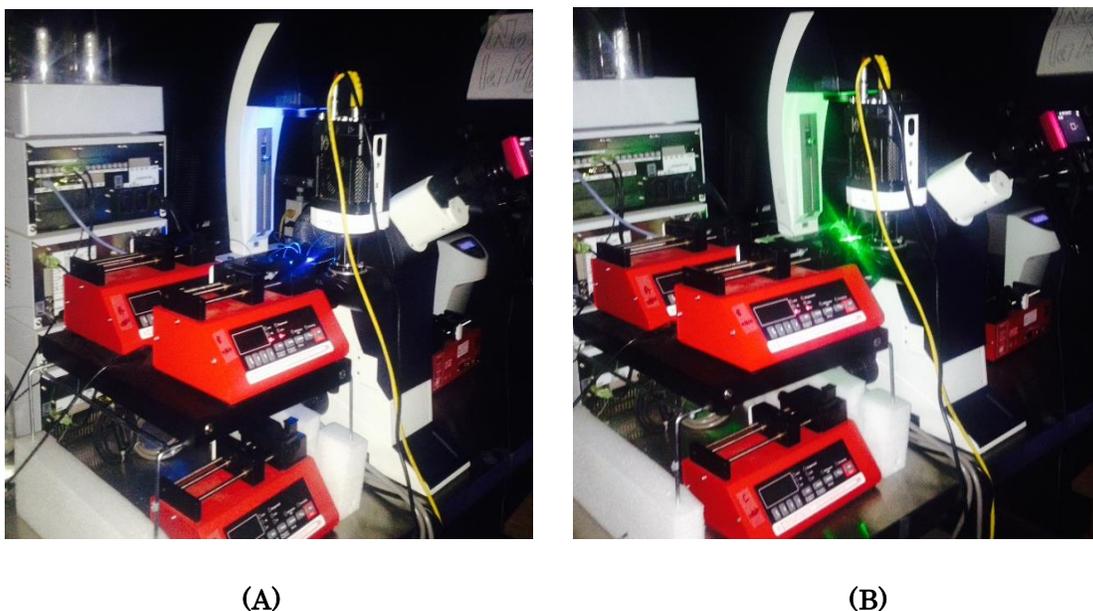


Figura 22. Arreglo experimental del microchips colocado en el microscopio de fluorescencia (DMI3000 B, Leica Microsystems, Alemania). Se muestra en (A) el microchip en el microscopio con el filtro para la luz para una $\lambda_{\text{ext}}= 475\text{ nm}$ y en (B) se usó el filtro para luz de $\lambda_{\text{ext}}= 560\text{ nm}$.

Para realizar el análisis de los videos, se tomaron secciones de cada uno, de modo que se tenían 6 fotos de las células. Tres fotos corresponden a las microgotas con células vistas con el filtro de 475 nm y las otras tres imágenes corresponden a las células dentro de la microgota vistas con el filtro de 560 nm.

Las imágenes resultantes se analizaron de acuerdo al procedimiento de la sección 3.15, usando del programa ImageJ.

3.15 Uso del programa ImageJ para el conteo de células vivas y muertas.

Mediante el uso del programa ImageJ, se puede realizar un conteo de células mediante dos técnicas distintas. La primera es un conteo automatizado que consta del análisis por medio de técnicas de segmentación y aplicación de filtros a las imágenes obtenidas a partir de los videos o de las fotos tomadas con la cámara digital. El segundo método, es mediante el conteo manual de las células, haciendo uso de un marcador, el cual evita que se cometan errores al momento de establecer el número de células observadas en la imagen.

Para el análisis de los resultados experimentales, en ésta tesis, se usó el primer método (aplicación de filtros). Éste es un método automático para el conteo de células, el cual facilita y hace más rápido el análisis de las imágenes.

Los pasos que se siguieron para el conteo automatizado de las células bacterianas se detallan a continuación:

- a. La imagen a analizar se arrastró hacia el programa (Figura 23):

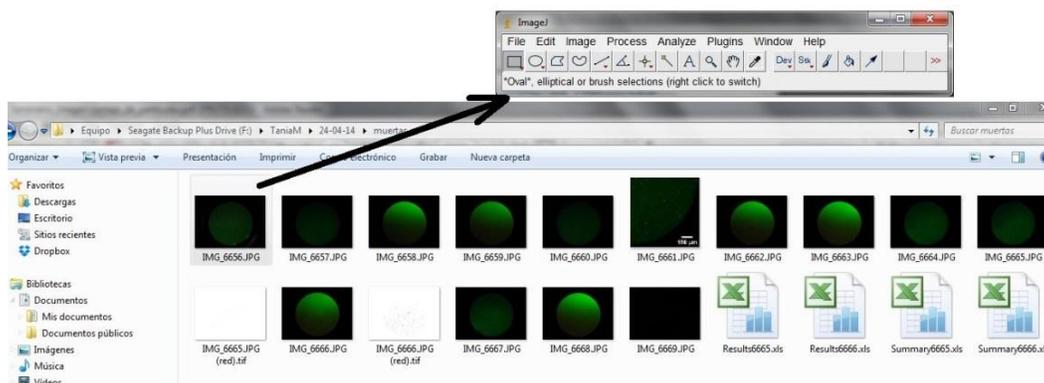


Figura 23. Ejemplo del arrastre de una imagen de células muertas vistas con el filtro de 488 nm hacia el menú del programa ImageJ.

- b. Se separó la imagen en canales, seleccionando en el menú “Image”, después se hizo click en “Color” y después en “Split Channels” (Figura 24):

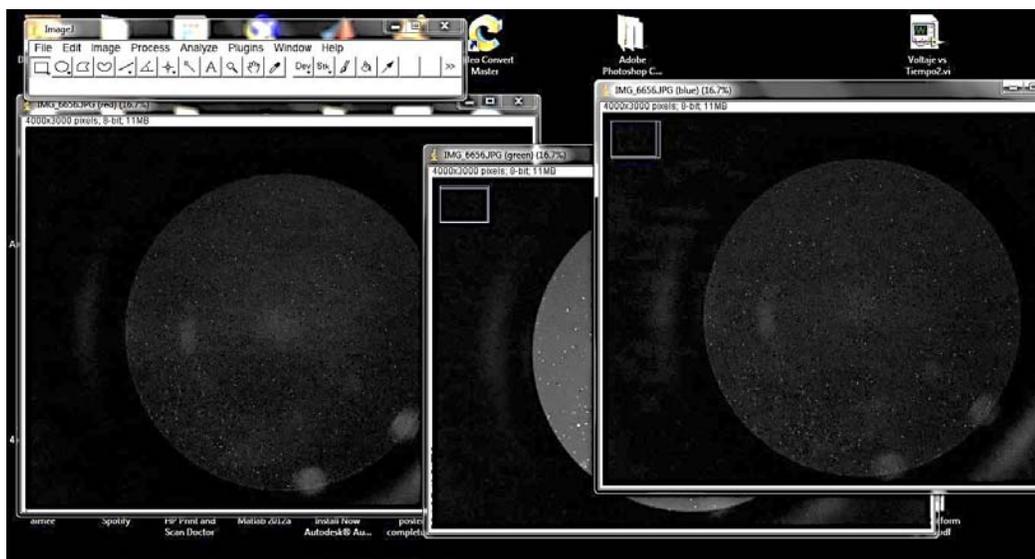


Figura 24. Separación de los canales en rojo, verde y azul de la imagen de células muertas vistas con el filtro de 488 nm.

- c. El paso siguiente fue la elección del canal verde (Green)
- d. Posterior a eso, se selecciona en el menú “Image”, “Adjust” y “Threshold” (Figura 25). En este paso las células de la imagen quedarán marcadas de color rojo. Al elegir la opción “Apply”, se eliminará el fondo y se obtendrá una imagen binaria (Figura 26).

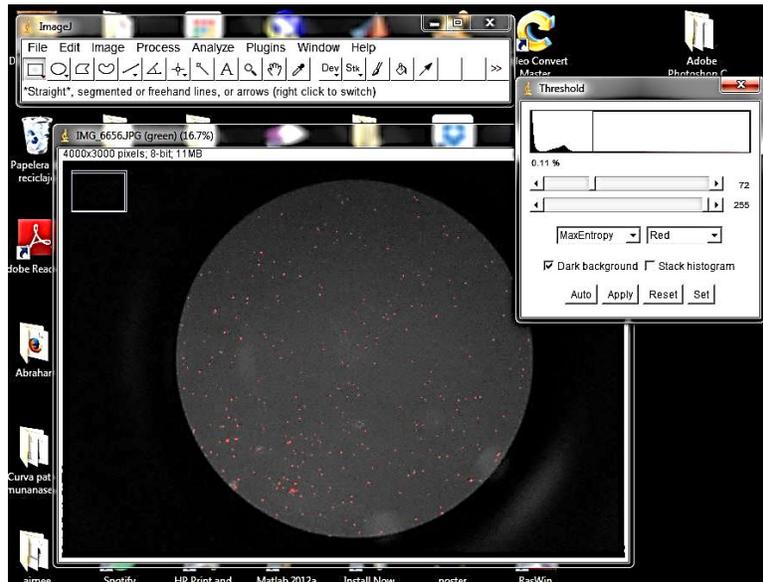


Figura 25. Selección automática de las células usando un marcador rojo.

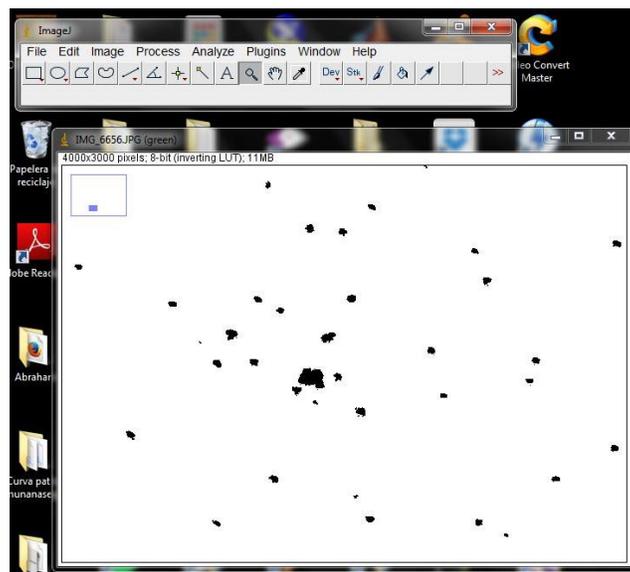


Figura 26. Menú seleccionado para la obtención de una imagen binaria a partir de canal verde

- e. Después para rellenar los posibles huecos en los puntos correspondientes a las células, se usa la opción “Process”, “Binary” y luego se selecciona “Fill Holes”.
- f. Y para separar las células que se encuentran muy juntas, se eligió la opción “Process”, “Binary” y luego “Watershed”.
- g. Luego, para seleccionar los parámetros a medir, se hizo click en la opción “Analyze” y “Set Measurements”. En éste caso las condiciones de medida seleccionadas son “Area” y “Shape Descriptions” para restringir por tamaño y forma a los puntos negros. Además de ello, se seleccionó “Display Label” que sirvió como guía para distinguir la imagen medida por su nombre (Figura 27).

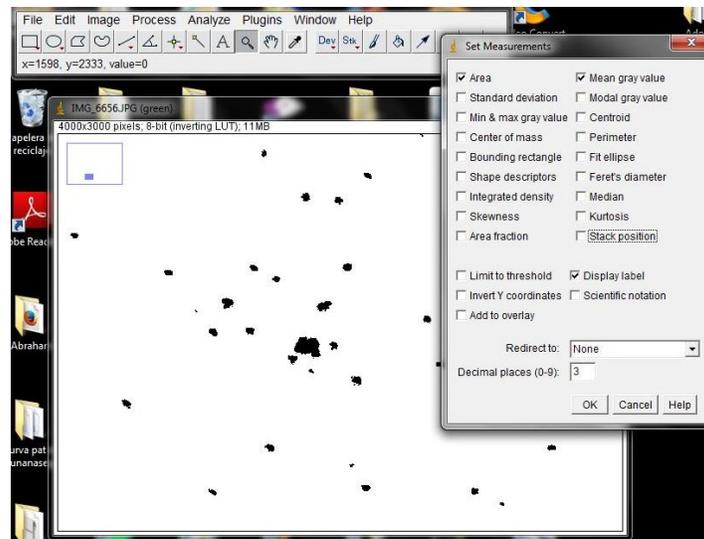


Figura 27. Selección de los parámetros a medir “Set Measurements”.

- h. Para iniciar el conteo de las células, se abrió la aplicación “Analyze”, “Analyze Particles”, seleccionando las condiciones para: restringir el tamaño entre 3 y 300 píxeles (valores mayores o menores a ese rango, corresponden a pelusas o a orillas muy iluminadas en los canales por efecto de la extracción del Syto9 hacia la fase orgánica o hacia el PDMS de los microchips) (Figura 28). En éste caso no se hace ninguna restricción en la circularidad, también se seleccionaron las opciones para borrar los resultados cuando se calculen nuevos y que se mostrara la sumatoria (Figura 29).

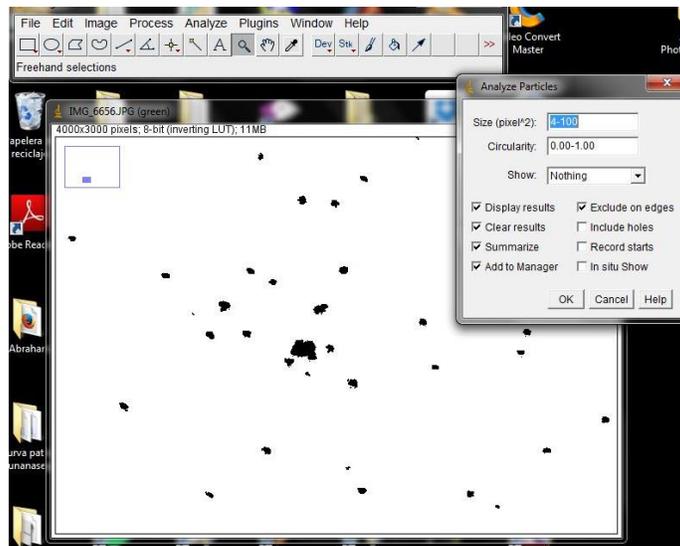


Figura 28. Selección de los parámetros previos al conteo de células (tamaño, circularidad y sumatoria).

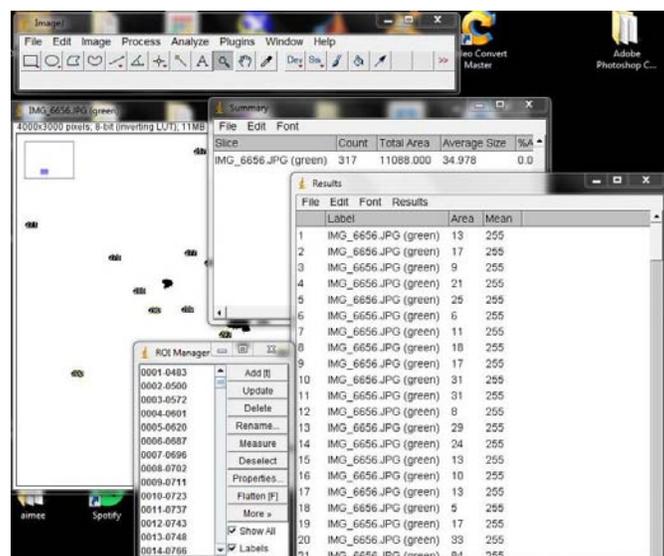


Figura 29. Resultados obtenidos del conteo de células presente en la imagen binaria.

- i. Los archivos obtenidos se pueden guardar como “.xls”.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de desarrollar ensayos para detectar y cuantificar células viables dentro de microchips. Se realizaron una serie de experimentos, los cuales serán descritos a continuación.

Durante éstos ensayos, inicialmente se preparó y se dejó crecer un cultivo de células de *E. coli* *BL21(DE3)* durante 16 hr. Éste cultivo posteriormente se lavó con NaCl al 0.85% m/v y finalmente se tiñó con el kit LIVE/DEAD BacLight L7012, el cual consta de dos agentes intercalantes (Syto9 y yoduro de propidio). Finalmente se realizaron observaciones en el microscopio de fluorescencia usando dos filtros; el filtro para observar células que en teoría debían estar vivas (de color verde) 475 nm y células muertas (de color rojo) a 560 nm.

Inicialmente se definieron una serie de variables: la densidad óptica de trabajo para conocer el número de células presentes en las muestras que se iban a emplear en cada ensayo, la concentración de tintas óptima para los ensayos y en el caso del control de células muertas tratadas con isopropanol al 70% se definió el tiempo de incubación.

Todos los experimentos de los que se hablará a continuación, tienen como objetivo final la obtención de un método para distinguir y cuantificar células vivas y muertas, cuando éstas se ven afectadas por la presencia de un antibiótico (ampicilina y kanamicina), haciendo uso de los microchips con ayuda de un microscopio de fluorescencia.

4.1 Experimentos para definir la densidad óptica de trabajo.

Para determinar la densidad óptica a la cual se iba a trabajar con los cultivos, se realizaron una serie de experimentos tiñendo cultivos celulares (de células vivas y células tratadas con isopropanol al 70%) a diferentes densidades ópticas. En ésta sección, se muestran los gráficos correspondientes al número de células observadas en el campo visual a diferentes densidades ópticas a 670 nm ($OD_{670nm} = 0.001, 0.02, 0.04$ y 0.58). Para éstos experimentos se usaron las concentraciones de Syto9 y yoduro de propidio proporcionadas por el fabricante ($C_{\text{Syto9}} = 0.005$ mM y $C_{\text{PI}} = 0.03$ mM).

A partir de los cultivos teñidos; se realizaron observaciones en el microscopio usando los dos filtros (para células verdes y rojas) y colocando una gota de 2.5 μL de muestra en un portaobjetos. Después, se tomaron fotos de los cultivos y se usó el programa ImageJ para contar las células observadas con ambos filtros. Con éstos resultados se realizaron los gráficos de la Figura 30 que muestran el número de células observadas en función de la $\text{OD}_{670\text{ nm}}$.

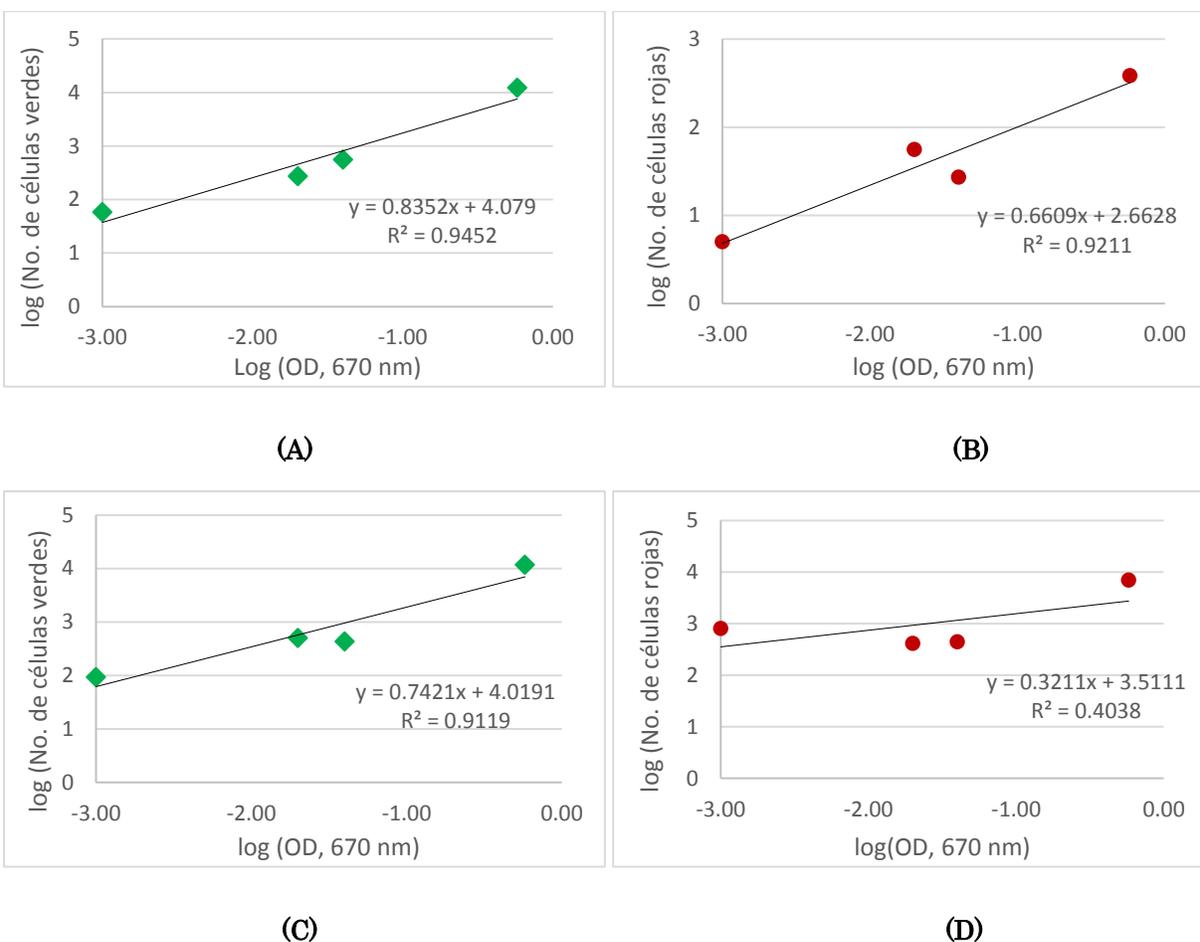


Figura 30. (A) Número de células observadas a diferentes $\text{OD}_{670\text{ nm}}$ para células vivas con el filtro de 475 nm y (B) con el filtro de 560 nm. (C) Número de células observadas a diferentes $\text{OD}_{670\text{ nm}}$ para células tratadas con isopropanol al 70% por 2 horas (muertas) con el filtro de 475 nm y (D) con el filtro de 560 nm.

En la Figura 30, se observa que conforme se incrementa la densidad óptica, el número de células observadas en el campo visual con el microscópico es mayor.

Por último, se muestran dos imágenes con el fin de ilustrar cómo es que se observan las células en el campo visual al variar la $\text{OD}_{670\text{ nm}}$ (Figura 31). Cuando se tienen densidades ópticas altas, el

número de células es tan grande que en la fotografía se ven demasiado cercanas entre sí. Tanto es así, que el programa empleado (Image J) no las contabiliza con tanta precisión como cuando se tienen densidades ópticas bajas.

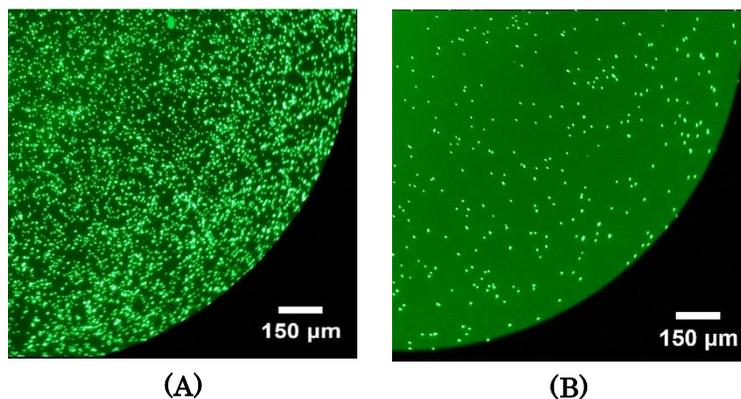


Figura 31. Cultivo de células vivas vistas con el filtro para 475 nm. En la imagen (A) se observan un cultivo de células con una OD de 0.58 y en la imagen (B) se observa un cultivo de células con una OD de 0.04. Objetivo empleado: 20X.

Por lo anterior, se definió que una $OD_{670\text{nm}}$ de 0.04 era ideal para realizar los experimentos, pues el número de células observado en el campo visual es pequeño (de 100 a 200 células), lo que facilita su cuantificación.

4.2 Determinación del tiempo de incubación de células de *E. coli* con isopropanol al 70%.

Con la finalidad de determinar el tiempo necesario para dañar la membrana de las células de *E. coli* con isopropanol al 70%, se incubaron cultivos de células vivas ($OD_{670\text{nm}}$ de 0.04.) con este disolvente por tiempos de 30, 45, 60 y 120 min. Transcurridos estos tiempos, se realizaron diluciones (1:10, 1:100 y 1:1 000) de los cultivos y se sembraron 100 µL de cada dilución en platos Petri con medio LB. De igual modo se sembraron diluciones (1:10, 1:100 y 1:1 000) de una muestra control de células vivas resuspendidas en NaCl al 0.85%.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las unidades formadoras de colonia por mililitro de suspensión celular (CFU/mL) en función del tiempo (Figura 32).

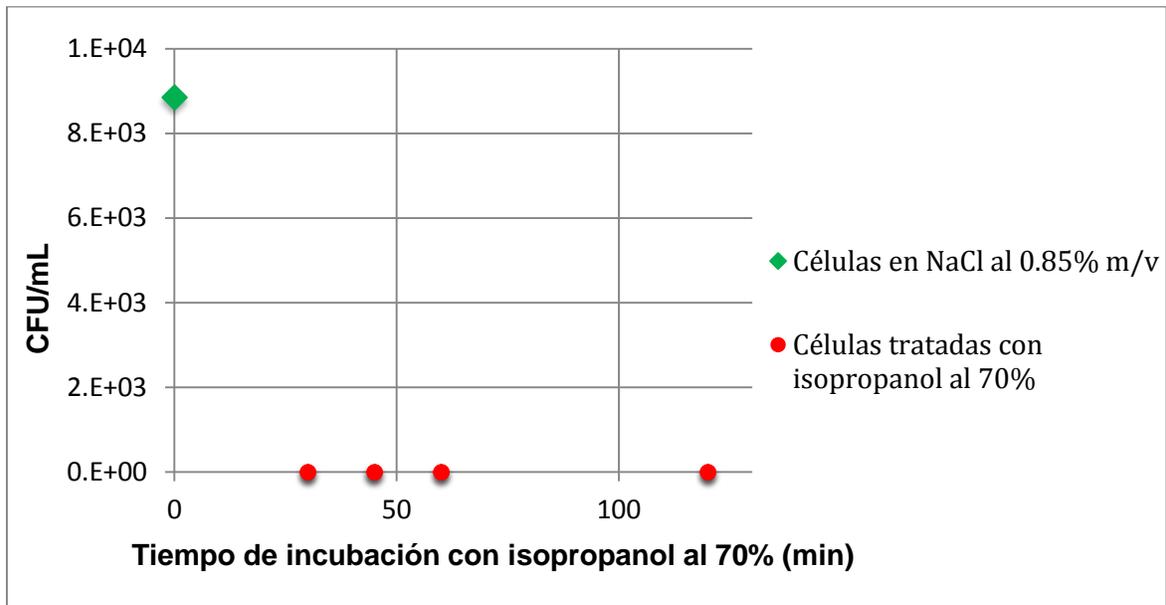


Figura 32. Resultados obtenidos de la siembra en cajas Petri (dilución 1:10) de un cultivo de células de *E. coli*, a una $OD_{670\text{ nm}} = 0.04$ incubadas a distintos tiempos con una disolución de isopropanol al 70%.

En el gráfico anterior (Figura 32) se observa desde los 30 min de incubación de las células con isopropanol al 70% ya no hubo crecimiento de colonias. Por lo tanto, es posible concluir que 30 min son suficientes para matar a las células de *E. coli* presentes en el cultivo ($OD_{670\text{ nm}} = 0.04$).

En la Figura 33, se muestran las fotos tomadas de los cultivos de células tratadas con isopropanol al 70% durante 30, 45, 60 y 120 min, así como un control de células vivas.

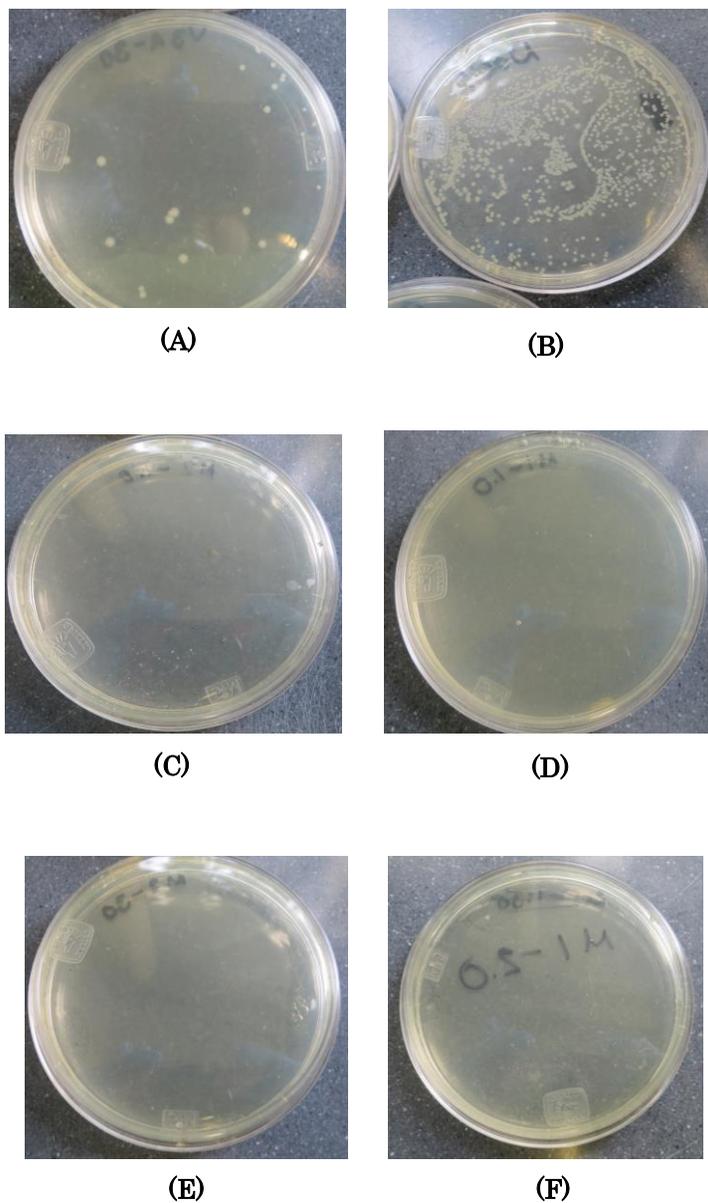


Figura 33. (A, B) Cultivo de células de *E. coli* vivas (control); se tomaron 100 μ L de las diluciones 1:10 000 000 y 1:100 000 respectivamente (C a F) Cultivo de células incubadas con isopropanol al 70% por 30, 45, 60 y 120 min respectivamente.

De modo que 30 min es el tiempo que se usó para todos los experimentos presentados de aquí en adelante para el control de células “muertas” tratadas con isopropanol al 70%.

4.3 Experimentos de viabilidad celular siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante del kit LIVE/DEAD kit BacLight L7012.

Se realizaron inicialmente experimentos para identificar células vivas y muertas tiñéndolas con Syto9 y yoduro de propidio siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit Live/Dead BacLight ²².

Para realizar estos experimentos, se utilizaron dos sets de filtros ópticos de microscopía de fluorescencia, los cuales permiten el paso de luz a distintas longitudes de onda. El filtro de excitación de luz azul ($\lambda = 475$ nm), es un filtro que sirve para inducir fluorescencia en las células que tienen su ADN intercalado con la tinta Syto9 y el filtro de excitación de luz verde ($\lambda = 560$ nm), induce la fluorescencia de células que tienen intercalado el yoduro de propidio en su ADN.

Las células intercaladas con Syto9 se identifican como células vivas, pues su membrana celular es permeable a las moléculas de éste compuesto que es de carácter hidrofóbico. El Syto9 se intercala en el ADN emitiendo fluorescencia de color verde. Por otro lado, las células que tendrán intercaladas en su ADN moléculas de yoduro de propidio, serán aquellas que tengan su membrana celular rota o comprometida. El yoduro de propidio, al ser un compuesto iónico, no puede traspasar la membrana intacta de células vivas, pero cuando la membrana celular se rompe puede intercalarse con el ADN, desplazando a las moléculas de Syto9 presentes. De éste modo, la intercalación de yoduro de propidio se da únicamente en células muertas. El yoduro de propidio se intercala en el ADN emitiendo fluorescencia de color rojo.

A continuación se presentan una serie de imágenes tomadas al realizar la tinción de células de un cultivo *E. coli* BL21(DE3) con el kit LIVE/DEAD L7012 BacLight de viabilidad de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante (Figura 34).

El cultivo celular se dividió en dos partes a manera de tener dos tubos con aproximadamente la misma cantidad de células. El primero contenía células vivas resuspendidas en NaCl al 0.85% y la segunda muestra contenía células muertas, las cuales fueron obtenidas al ser incubadas con isopropanol al 70% durante 30 min.

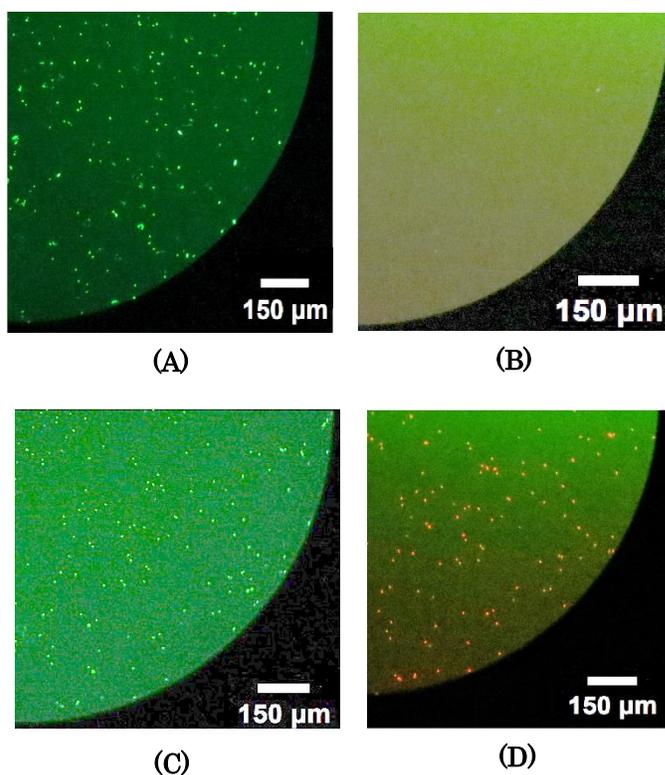


Figura 34. Comparación entre un cultivo de células vivas (A, B) y uno de muertas (C, D). Las células de las fotos A y C están vistas con el filtro para $\lambda_{\text{excitación}} = 475 \text{ nm}$, mientras que las células de las fotos B y D están vistas con el filtro para $\lambda_{\text{excitación}} = 560 \text{ nm}$.

Realizando la tinción de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante, la concentración de Syto9 final es 0.005 mM, mientras que la de yoduro de propidio es 0.030 mM (Relación de concentraciones de tintes 1:6). En la Figura 34, se observan fotos del cultivo de células vivas vistas con el filtro para $\lambda = 475 \text{ nm}$ (A) y con el filtro para $\lambda = 560 \text{ nm}$ (B). En la foto (A) se observan células con fluorescencia verde como era de esperarse debido al Syto9, mientras que en la foto B, también como era de esperarse, prácticamente no se observan células rojas (solamente cuatro) lo que indica que en su gran mayoría no tienen su membrana celular comprometida.

De igual modo en la Figura 34 se muestran las fotos de células muertas (tratadas con isopropanol al 70%) usando los mismos filtros mencionados anteriormente en (C) y (D) respectivamente. En el caso de las células muertas se observó fluorescencia de células rojas (D) como podría esperarse, pero también se observó fluorescencia de células verdes (C) lo cual resultó inesperado. Haciendo un análisis más detallado, se puede ver que una gran cantidad de las células rojas están también teñidas

de color verde. Como ejemplo, en la Figura 35, se muestran los acercamientos de las fotos (C) y (D) de la Figura 34.

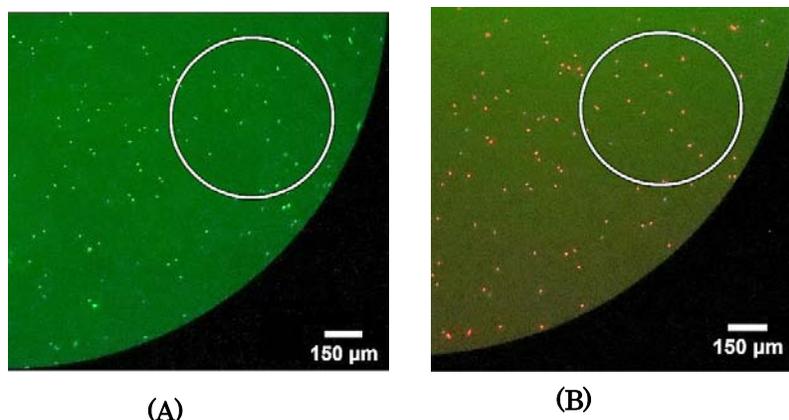


Figura 35. Acercamiento de las fotos C y D de la Figura 34 de las células tratadas con isopropanol al 70% durante 30 minutos y observadas con los filtros para 475 nm y 560 nm respectivamente. Se señalan zonas donde las células observadas de color verde (filtro para 475 nm), también se ven en color rojo (filtro para 560 nm).

Una explicación para éstos resultados, es que el yoduro de propidio necesita desplazar al Syto9 para intercalarse en el ADN de las células con membrana comprometida. De modo que, al usar el Syto9 a una concentración final de 0.005 mM y el yoduro de propidio a una concentración final de 0.03 mM (relación de concentraciones 1:6), las moléculas de yoduro de propidio no son suficientes para desplazar a todas las moléculas de Syto9 en el ADN y ambas se encuentran en el ADN de las células con membrana comprometida.

Otra explicación al hecho de que se observen las células de color verde y rojo simultáneamente, podría ser que como una molécula de yoduro de propidio se intercala por cada 4 o 5 pares de bases en el ADN; los demás espacios disponibles para la intercalación podrían ser ocupados por el Syto9²⁷. De modo que, se tienen al Syto9 y al yoduro de propidio intercalados al mismo tiempo.

Para reconfirmar que las células de *E. coli* realmente se estaban muriendo cuando eran tratadas con isopropanol al 70% (incubación por 30 min), se realizó una siembra de las muestras teñidas en cajas Petri con LB-agar. El resultado fue que no creció ninguna colonia (Figura 36).

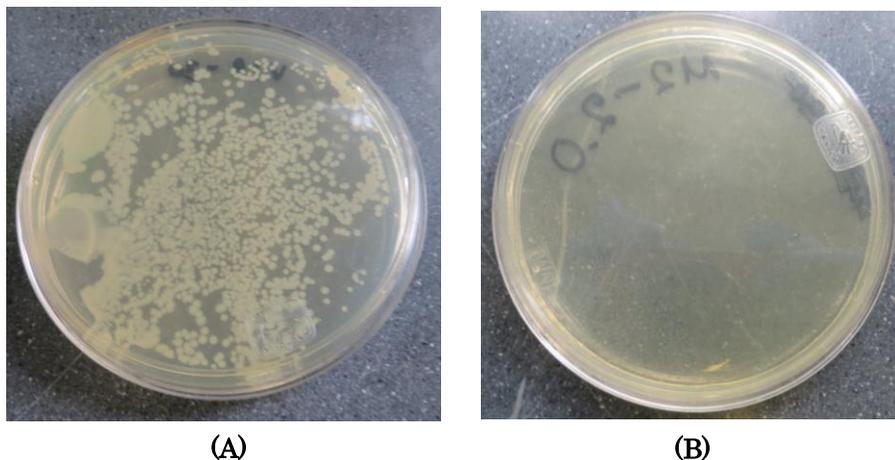


Figura 36. Siembra de las muestras de cultivo tratadas de acuerdo al protocolo del fabricante (a partir de un cultivo de 16 horas). En (A) se presentan las colonias formadas a partir de una muestra de 100 μ L de un cultivo de células vivas resuspendidas en NaCl al 0.85%. En (B) se tomó una alícuota de 100 μ L del cultivo de células incubadas con isopropanol al 70%, en la imagen se observa que no hubo formación de colonias. En ambos casos las diluciones son 1:100 000.

Por ello, se llegó a la conclusión de que hay células muertas teñidas tanto de Syto9 (color verde) como de yoduro de propidio (color rojo).

Para realizar los experimentos de viabilidad celular dentro de microchips, se propuso optimizar antes el proceso de tinción cambiando la concentración de Syto9. Como primera opción para tener un menor número de moléculas de Syto9 intercaladas en el ADN de las células con su membrana comprometida y que el yoduro de propidio pudiera ocupar éstos sitios con más rapidez, se decidió disminuir la concentración de Syto9 y no aumentar la de yoduro de propidio. Las razones para esto fueron: la toxicidad de los compuestos para el ambiente y el elevado costo que tiene el Syto9 en relación con el yoduro de propidio.

En la sección 4.4 se describen los ensayos realizados para la optimización de las tintas y los resultados obtenidos.

4.4 Optimización de la concentración de los agentes intercalantes de ADN (Syto9 y yoduro de propidio).

Como se mencionó en la sección 4.3, el Syto9 no era totalmente desplazado por el yoduro de propidio en las células tratadas con isopropanol al 70%, por lo que era posible observar células muertas teñidas de ambos agentes intercalantes (células de color verde y rojo simultáneamente). Es por ello que se realizaron experimentos en los que se varió la concentración de Syto9, manteniendo constante la concentración final de yoduro de propidio (Tabla 1). Estas pruebas se realizaron considerando la metodología de lavados y posterior tinción mostrada en la sección 3.5. Al final se tomó una alícuota de 2.5 μL del cultivo teñido y se colocó en un portaobjetos para su observación en el microscopio de fluorescencia.

Es importante mencionar que a partir de éstos experimentos se usó el doble del volumen de Syto9 y yoduro de propidio propuesto por el fabricante, de modo que se tomaron 3.0 μL de cada tinta por mL de cultivo, lo que finalmente no altera la relación de concentraciones de 1:6 obtenida con el método del fabricante.

Tabla 1. Concentraciones finales usadas de Syto9 y yoduro de propidio en 0.5 mL de cultivo de *E. coli* previamente lavado”.

C_{Syto9} (mM)	C_{PI} (mM)	$C_{\text{Syto9}}/C_{\text{PI}}$
0.01	0.06	1:6
2.51×10^{-3}	0.06	1:24
1.34×10^{-3}	0.06	1:45
6.68×10^{-4}	0.06	1:90

Cabe mencionar en éste punto que, al igual que en los demás experimentos que se realizaron en portaobjetos y de los cuales se hablará más adelante, la alícuota que se toma puede ser la causa en la variación del número de células presentes. Pues aunque los experimentos se realizaron a la misma $\text{OD}_{670 \text{ nm}}$, siempre existe la posibilidad de que en la alícuota tomada se estén llevando más o menos células del cultivo preparado.

Por tal motivo, se decidió hacer un gráfico normalizado de los resultados. Ésta normalización, se realizó considerando que el número de células verdes (teñidas con Syt9) representa el total de células

observadas con ayuda del microscopio de fluorescencia en la alícuota (2.5 μ L) colocada en un portaobjetos. A continuación se presentan los resultados obtenidos de la normalización, que permiten ver de manera más clara la relación de células observadas (Figura 37).

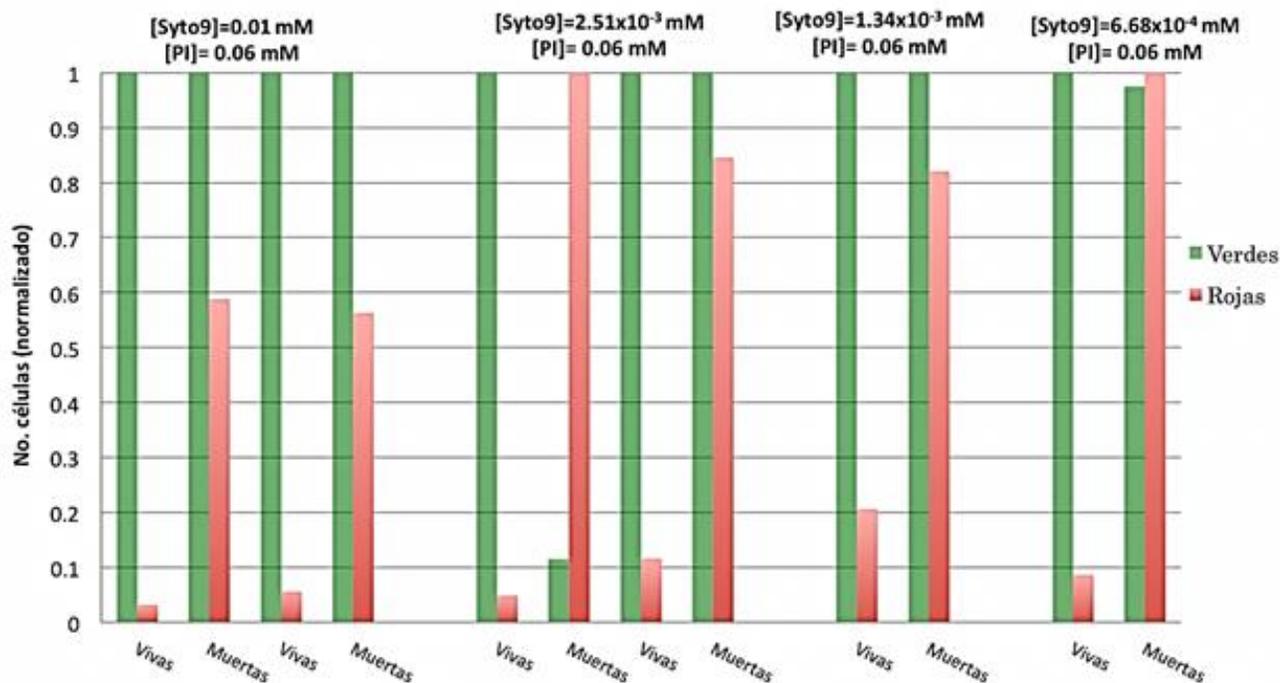


Figura 37. Número de células normalizado a diferentes concentraciones de Syto9. Los experimentos con las concentraciones de Syto9 de 0.01 mM y 2.51×10^{-3} mM se hicieron por duplicado.

Los primeros 4 resultados de la gráfica corresponden a la relación de concentraciones de Syto9 y PI recomendada por el fabricante del kit LIVE/DEAD. Podemos notar que cuando la concentración de Syto9 es 0.01 mM y la de PI es 0.06 mM (relación de concentraciones 1:6), solamente un 56% o 58% de células se tiñeron de rojo cuando los cultivos fueron tratados con isopropanol al 70% por 30 min, aun cuando el 100% de estas células no son viables, pues como ya se demostró en la sección 4.2, éstas no crecen al sembrarlas en cajas Petri.

Con una concentración de Syto9 de 2.51×10^{-3} mM (relación de tintes 1:24) en un primer experimento se observó una tendencia ideal, pues las células vivas se visualizaron bien en color verde y hay pocas rojas que podrían estar muertas, mientras que en el cultivo de muertas se observa que hay muchas células rojas y pocas verdes. Desafortunadamente, al repetir este experimento (Relación de

concentraciones 1:24), se observó que en el cultivo de células muertas (tratadas con isopropanol al 70%), el número de células verdes se mantiene al 100%. Aun así se observan un gran número de células rojas (un 80% del número de células verdes), por lo cual se probaron otras concentraciones menores de Syto9.

Cuando se usó la concentración de Syto9 de 1.34×10^{-3} mM y de PI de 0.06 mM (relación de concentraciones 1:45) el porcentaje de células rojas en el cultivo tratado con isopropanol al 70% fue del 82%, el cual es mayor al porcentaje observado cuando se usó la concentración de Syto9 recomendada por el fabricante del kit (0.01 mM).

Se puede notar también que el porcentaje de células rojas tratadas con isopropanol al 70% cuando la relación de concentraciones es 1:45 (porcentaje de células rojas de 82%) es ligeramente menor al porcentaje de células rojas tratadas con isopropanol al 70% cuando se hizo la repetición del experimento usando la relación de concentraciones de 1:24 (porcentaje de células rojas de 84%). Ya que al disminuir la concentración de Syto9 de 2.51×10^{-3} mM a 1.34×10^{-3} mM, no se observó un incremento considerable en el número de células rojas en el cultivo de células tratadas con isopropanol al 70%, se realizó una prueba más, pero ahora usando una concentración de Syto9 más baja (6.68×10^{-4} mM).

También en la Figura 37 se ve, que el número de células rojas observadas en un cultivo de células muertas se incrementa considerablemente cuando la concentración de Syto9 se disminuyó a 6.68×10^{-4} mM (relación de concentración de tintes 1:90). De manera que se vuelve ligeramente mayor el número de células rojas observadas que el número de células verdes. Esto hace suponer que el yoduro de propidio se ha intercalado en ADN en una proporción mayor a la de Syto9.

Debido ello, el protocolo de tinción de células de *E. coli* se llevó a cabo usando la concentración de Syto9 de 6.68×10^{-4} mM y la concentración de yoduro de propidio fijada de 0.06 mM (relación de concentración de tintes 1:90).

Ya no se consideraron ensayos a concentraciones menores de Syto9, debido a que al usar concentraciones más bajas de Syto9, se notó que el número de células verdes detectadas en los cultivos con células vivas disminuía notablemente.

Con éstos resultados se eligió que en todos los experimentos siguientes, la concentración de Syto9 debía ser de 6.68×10^{-4} mM y la concentración de yoduro de propidio de 0.06 mM, o sea cuando la relación de concentraciones de Syto9 y yoduro de propidio fuera de 1:90.

4.5 Fabricación y Caracterización del microchip.

Para realizar la formación de microgotas, se diseñó un microchip que cuenta con una zona donde la fase dispersa (flujo de agua) se intersecta con dos corrientes de fase continua (aceite mineral con Span 80). El diseño del microchip con dos corrientes de aceite, permite la formación de gotas uniformes y estables²⁴, las cuáles servirán para encapsular a las células de *E. coli* (Figura 38).

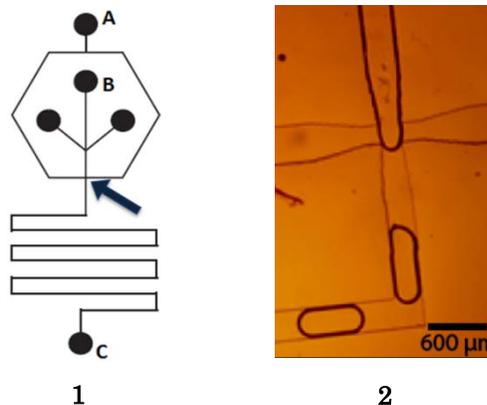


Figura 38. 1. Diseño del microchip 300 μm de ancho x 100 μm de profundidad para la formación de microgotas. Se muestra en: A) entrada de aceite, B) entrada de agua y C) salida. La flecha indica la zona donde se forman las microgotas.

2. Zona de intersección de aceite y agua para la formación de microgotas vista con el microscopio (Objetivo 10x).

Para caracterizar los microchips empleados en ésta tesis, se utilizó una cámara Phantom (Phantom Micro M-110, Ametek, E. U. A.). Con ésta cámara, se tomaron fotos del microcanal haciendo un corte como se muestra en la Figura 39:

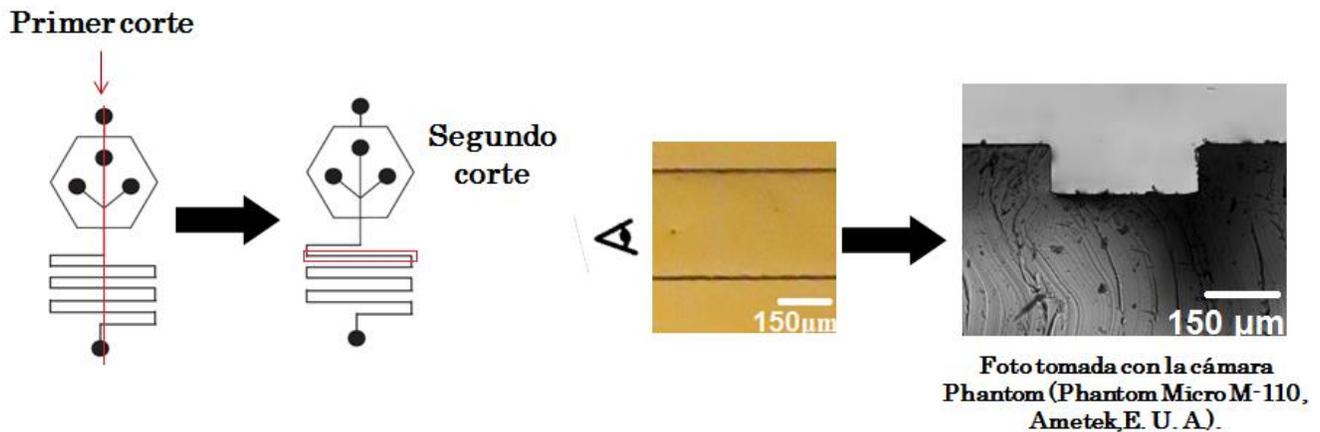


Figura 39. Diagrama del proceso de corte del microchip para su caracterización. Se muestran los cortes realizados en la primera sección del microcanal para medir el ancho y la profundidad (Objetivo 20x).

Así mismo, se tomó una foto con el objetivo de 20x de una retícula microscópica (PYSER-SGI, Reino Unido) de 5 mm y se hizo una calibración con el programa PixellINK u Scope (Figura 40).

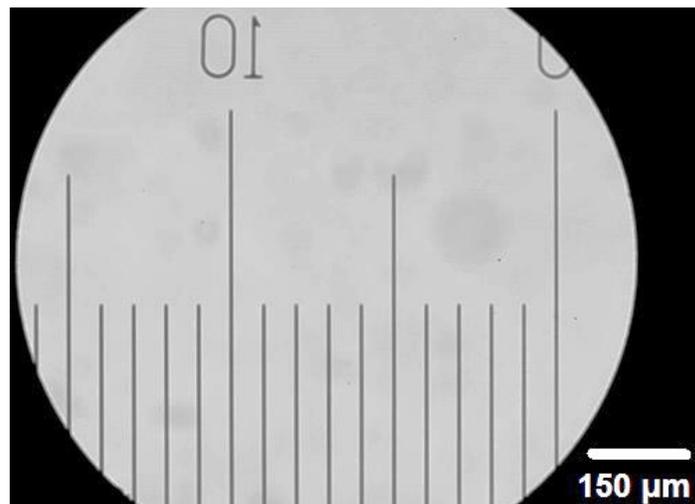


Figura 40. Foto tomada con la cámara Phantom de la retícula microscópica (5 mm) empleada para la caracterización de los microchips (Objetivo 20x).

A continuación se muestran en las Figuras 41 y 42 los resultados obtenidos del ancho y de la profundidad de los microcanales a partir de la calibración con la retícula de 5 mm.

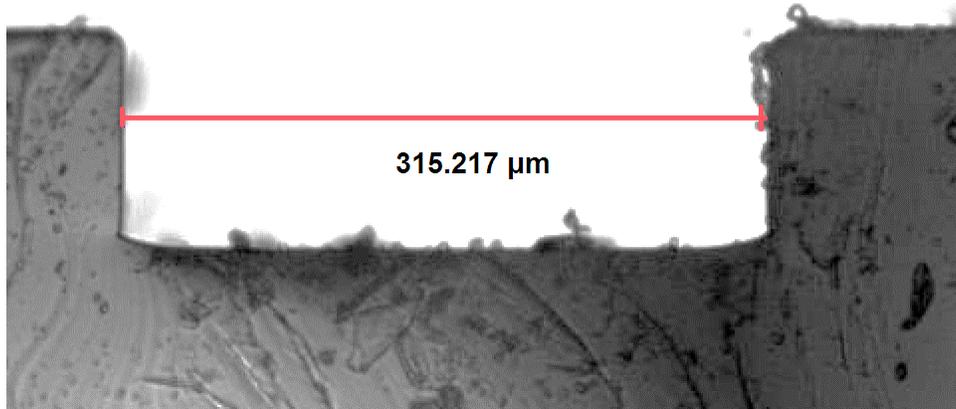


Figura 41. Determinación de la medida del ancho de los microcanales del microchip.

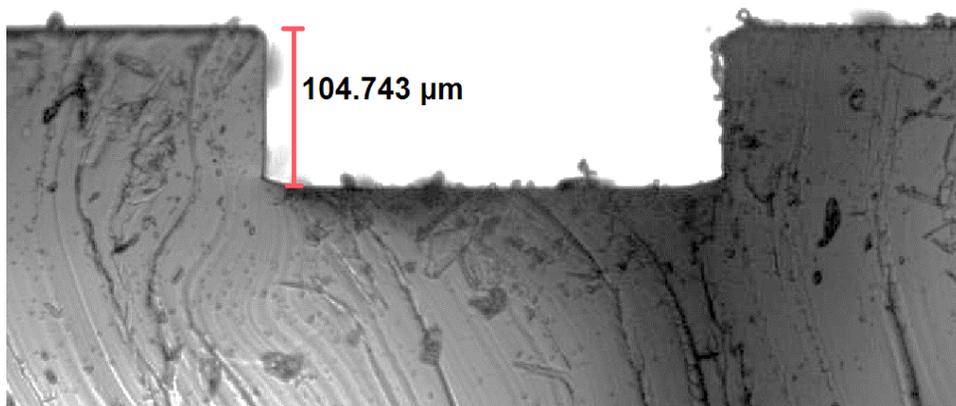


Figura 42. Determinación de la medida de la profundidad de los microcanales del microchip.

Se obtuvo que el ancho real de los microcanales es de 315.217 μm , que es un 5.07% mayor al valor esperado de 300 μm ; y se encontró que la profundidad de los microcanales es de 104.743 μm que es 4.74% mayor al valor esperado de 100 μm , de acuerdo con la Figura 16, presentada en la sección 3.8 de la metodología. La variación en los resultados podría deberse al tiempo de exposición de la oblea a la luz UV con la máscara (proceso de fotolitografía suave descrito en 3.8); ya que de acuerdo con trabajos realizados anteriormente ²⁴, se ha encontrado que la sobreexposición a la luz produce microchips con microcanales más anchos.

4.6 Cuantificación de células viables en función del tiempo dentro de microchips de 300 μm de ancho a flujo de agua 0 $\mu\text{L/hr}$ en ausencia de la fase orgánica.

Con el fin de obtener el número de células vivas en 28.1 nL de un cultivo de *E. coli* a una $\text{OD}_{670\text{nm}} = 0.04$, se realizó una prueba control sin formación de microgotas. Ésta prueba control permite observar si el número de células vivas permanece constante a lo largo del tiempo.

El propósito de hacer un control con células vivas es asegurarse de que las células no pierden fluorescencia a lo largo del tiempo y que el cambio en el número de éstas se debe únicamente al efecto del antibiótico adicionado (como en el caso de las pruebas con ampicilina que se presentarán en secciones posteriores).

Para realizar el análisis de células viables presentes en el cultivo de *E. coli*, se llevó a cabo la toma de fotos usando los dos filtros en la sección del canal del microchip marcada con un recuadro rojo en la Figura 43.

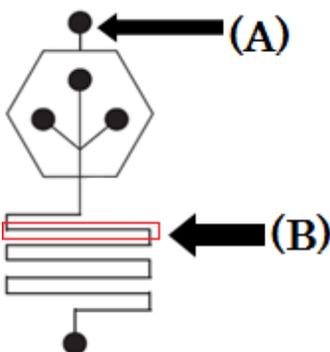


Figura 43. Diseño del microchip (300 μm de ancho X 100 μm de profundidad). En (A) se señala la entrada por la cual se inyectó la muestra de cultivo. En (B) se señala la sección del microcanal donde se tomaron las fotos.

En éste caso, así como en todos los ensayos siguientes y como ya se mencionó en la sección 4.4, la concentración de Syto9 empleada fue de 6.68×10^{-4} mM y la concentración de yoduro de propidio fue de 0.06 mM (relación de concentraciones 1:90).

En la Figura 44 se muestran los resultados obtenidos tomando fotos en la sección del microcanal señalada en la Figura 43 del microchip al tiempo cero y después de 2 horas y 30 minutos.

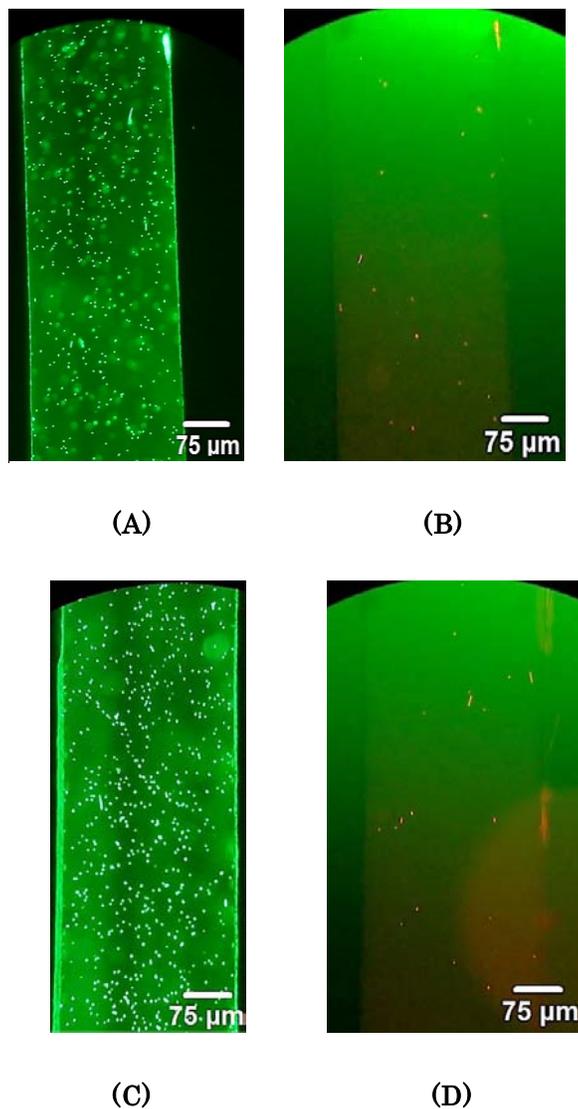


Figura 44. Fotos de células vivas de *E. coli* observadas con los filtros para 475 nm (células verdes) y con el filtro para 560 nm (células rojas) en función del tiempo. (A) y (B) corresponden al inicio del experimento ($t=0$ min) y (C) y (D) corresponden al tiempo final del experimento ($t=150$ min)

En la figura anterior (Figura 44), se observa que el número de células a lo largo del tiempo no varía significativamente. Se puede notar que durante las 2 horas y 30 minutos del experimento, el número de células se mantuvo en un intervalo de 110-113 en el caso de células vistas con el filtro para 475 nm y de 15-16 células para el caso de las observadas con el filtro para 560 nm. En la Sección 4.7 y con los resultados de la Figura 45, se valida nuevamente que tanto células verdes y rojas

permanecen constantes en el tiempo, y también se ve que el número de verdes es muy superior al de rojas.

4.7 Viabilidad celular en microchips a flujo de agua 0 $\mu\text{L/hr}$ en ausencia de la fase orgánica.

Para observar el efecto de la ampicilina dentro de los microchips, se realizaron experimentos sin formación de microgotas. En éstos ensayos se inyectaron en microchips muestras de células de *E. coli* ($\text{OD}_{670 \text{ nm}} = 0.04$) en presencia de distintas concentraciones de ampicilina (500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$). Así mismo, se inyectó en un microchip más, una muestra de cultivo sin ampicilina como control de células vivas.

Se tomaron fotos de cada microchip cada 30 minutos durante 270 minutos. En todos los casos el cultivo dentro de los microchips fue observado con los dos filtros (475 nm y 560 nm). Posteriormente se analizaron las fotos con el programa ImageJ para determinar el número de células observadas en la primera sección del microcanal del microchip.

A partir de los datos obtenidos del análisis con el programa ImageJ; se obtuvieron los gráficos del número de células observadas en función del tiempo para todas las muestras preparadas. En todos los gráficos que se obtuvieron, el tiempo inicial representa el tiempo al cual se tomó la primera foto, es decir 15 min después de la adición de ampicilina a las muestras.

Para el caso del cultivo resuspendido en NaCl al 0.85% (control de células vivas), se observó que tanto el número de células verdes como el número de células rojas no presentó altas variaciones a lo largo del ensayo (Figura 45).

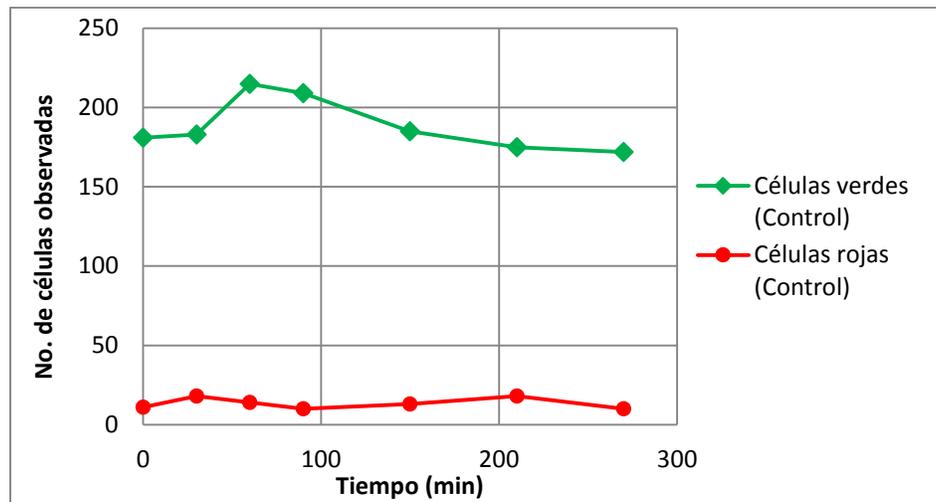


Figura 45. Número de células observadas (verdes y rojas) en función del tiempo de un cultivo de células de *E. coli* vivas (en ausencia de ampicilina) resuspendidas en NaCl al 0.85%.

Es probable que las células rojas presentes (muertas), pudieran haber sufrido daño en su membrana durante el proceso de lavado. Pero como se muestra en las Figuras 46 y 47, el número de células rojas (muertas) se incrementa conforme pasa el tiempo cuando el cultivo se encontró en presencia de ampicilina.

En la Figura 46, se muestra el gráfico de la variación del número de células (verdes y rojas) para el cultivo de células en presencia de ampicilina a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$.

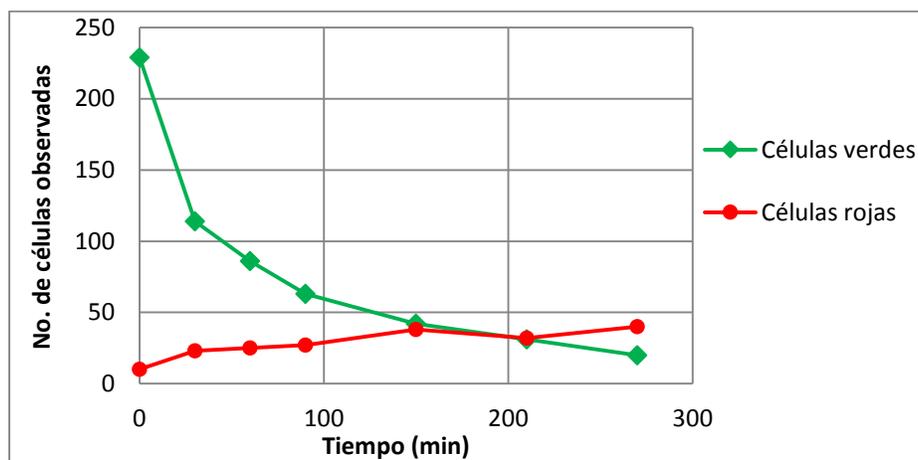


Figura 46. Número de células observadas (verdes y rojas) en función del tiempo para el cultivo de células en presencia de ampicilina 500 $\mu\text{g/mL}$.

Se puede observar en la Figura 46 la rápida disminución del número de células verdes cuando se tiene el cultivo en presencia de ampicilina a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en especial durante los primeros 30 min donde el número de células verdes pasa de 229 a 114 células y a los 270 min baja hasta 20 células. A su vez, el número de células rojas (muertas) se incrementa de 10 a 40 células.

Es notable que la disminución de células verdes no corresponde a un aumento equiparable de células rojas como se esperaría. Una posible explicación que se tiene para éste resultado es que quizá algunas células se estén rompiendo completamente de su membrana antes de que el yoduro de propidio se intercale en el ADN.

En el caso del cultivo de células en presencia de ampicilina a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 47), la disminución del número de células verdes durante los primeros 30 min es lenta; pasando de las 356 a las 327 células. En éste caso la disminución es lenta al principio, pero a los 270 min llegaron a observarse solamente 38 células; lo que implica una disminución del 89%. En el caso del número de células rojas; se observa un incremento lento de las 28 a las 54 células.

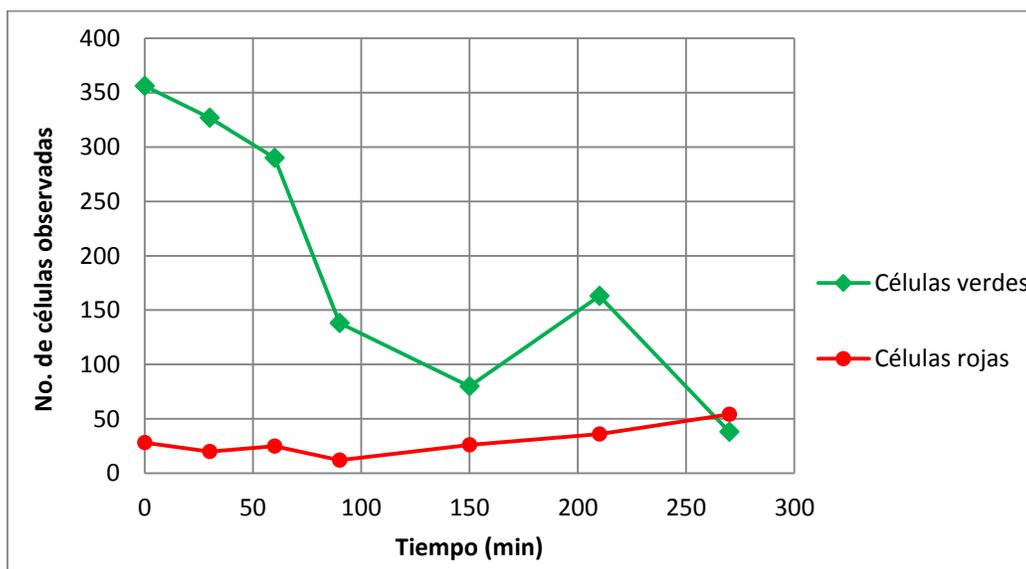


Figura 47. Número de células observadas (verdes y rojas) en función del tiempo para el cultivo de células en presencia de ampicilina 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina en el cultivo de células de *E. coli* (Figura 48), la disminución de células verdes durante los primeros 30 min también es lenta aunque ligeramente más rápida que la

disminución de células con ampicilina a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto podría deberse a la variación en el número de células que se puede presentar durante la preparación de las muestras.

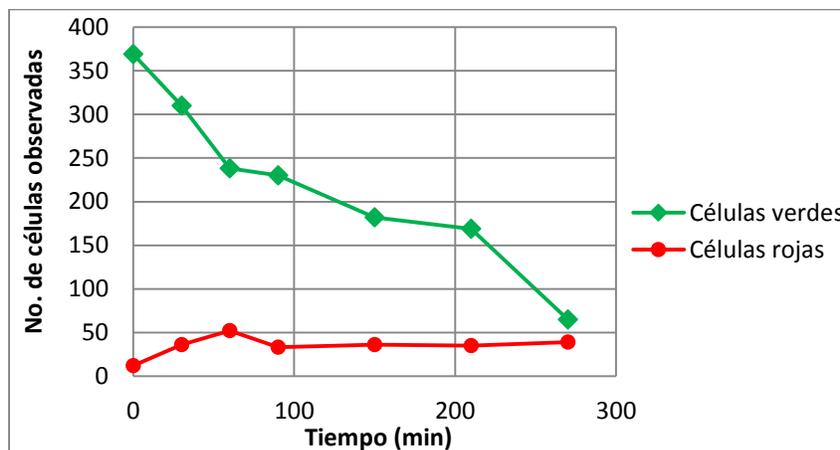


Figura 48. Número de células observadas (verdes y rojas) en función del tiempo para el cultivo de células en presencia de ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En la Figura 48, se observa que el número de células verdes durante los primeros 60 min pasa de las 369 a las 238 células y disminuye hasta las 65 células a los 270 min. El número de células rojas también incrementa, pero lentamente de las 12 a las 39 células a lo largo del tiempo (270 min).

Finalmente se realizó una prueba más, pero ahora el cultivo de células estaba en presencia de ampicilina con concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 49).

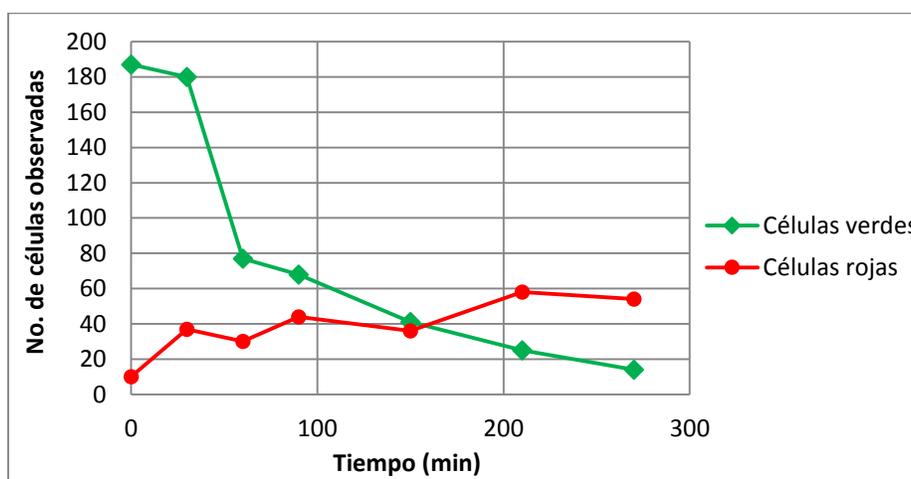


Figura 49. Número de células observadas (verdes y rojas) en función del tiempo para el cultivo de células en presencia de ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En éste caso la disminución en el número de células verdes durante los primeros 30 min es más lenta que en los casos anteriores con concentraciones mayores de ampicilina, pues se observa durante esos minutos que pasa de las 187 a las 180 células.

De manera simultánea, el número de rojas pasa de 10 a 54 células durante los 270 min que duró el ensayo.

Con el objeto de comparar los resultados obtenidos, se calculó el porcentaje de células observadas para el cultivo control y aquellos con ampicilina. El cálculo se realizó considerando como el 100% el número de células verdes o rojas vistas al inicio de las observaciones en el microscopio ($t=0$ min) (Figura 50). En el gráfico, el porcentaje de células en NaCl al 0.85% m/v sin ampicilina, aunque incrementa durante la primera hora, disminuye ligeramente y luego se mantiene entre el 115% y el 95%.

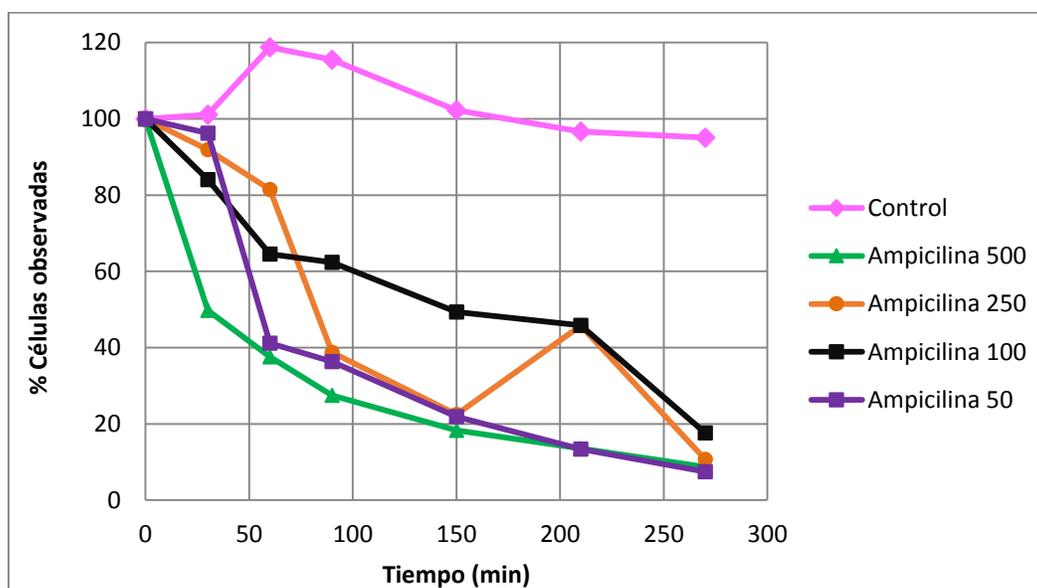


Figura 50. Porcentaje de células observadas de color verde en función del tiempo (min) para las muestras de cultivo de *E. coli* en NaCl al 0.85% m/v sin ampicilina (control) y con 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL de ampicilina.

En todos los casos donde a las muestras de cultivo se les adicionó ampicilina, se observa una disminución notable del número de células verdes con respecto al cultivo sin ampicilina (control de células vivas). Además se ve que al usar una alta concentración de ampicilina (500 µg/mL), el porcentaje de células observadas cae más rápidamente durante los primeros 90 min que cuando se usan concentraciones de 100 y 250 µg/mL.

Del mismo modo, se obtuvo un gráfico del porcentaje de células rojas en cada muestra preparada (Figura 51). En éste caso, el porcentaje de células rojas en los cultivos con ampicilina va variando a lo largo del tiempo, pero aun así tiende a incrementar conforme pasa el tiempo. Se observa además, que el porcentaje de células rojas en el caso del cultivo sin ampicilina (control) no tiene un incremento significativo en comparación con las otras muestras.

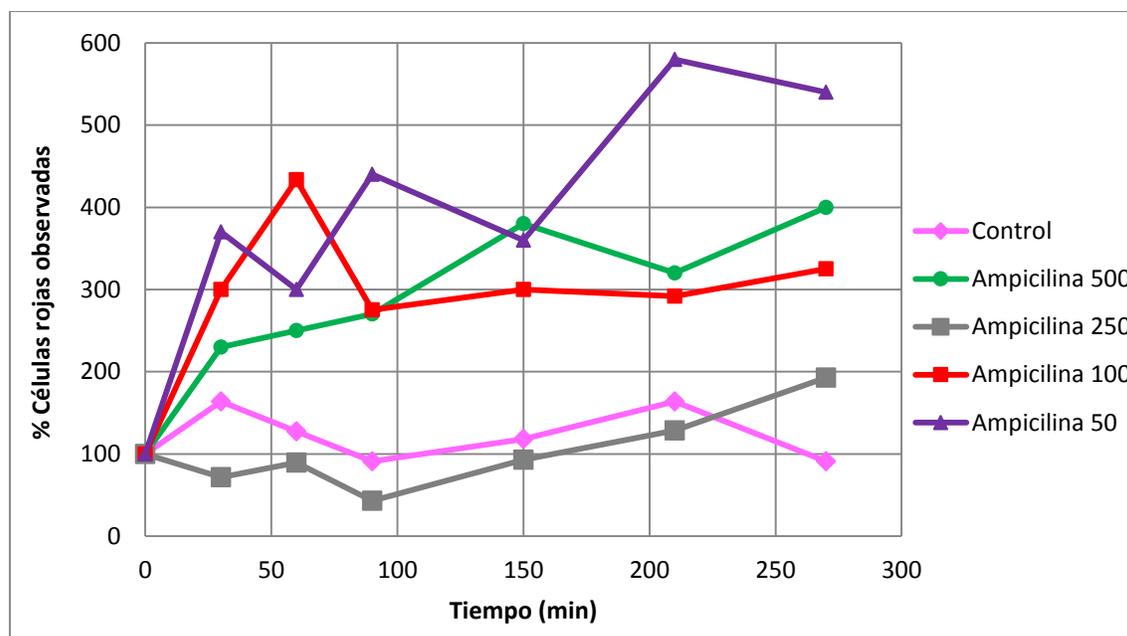


Figura 51. Porcentaje de células observadas de color rojo en función del tiempo (min) para las muestras de cultivo de *E. coli* sin ampicilina (control) y con 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL de ampicilina.

En el caso del cultivo control (sin ampicilina), se observan variaciones en el número de células verdes, pues a veces se presentan incrementos. Éstos incrementos podrían deberse al tiempo en que tarda el Syto9 en atravesar la membrana celular e intercalarse en el ADN. Es decir que conforme pasa el tiempo algunas células que antes no tenían al Syto9 intercalado en su ADN en los primeros minutos, se pueden ver en los minutos posteriores debido a que el Syto9 ya pasó por el proceso de atravesar la membrana celular e intercalarse en el ADN.

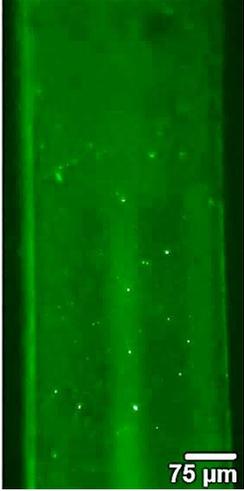
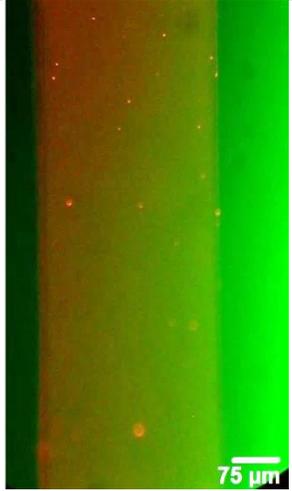
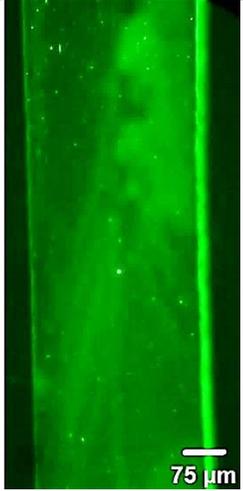
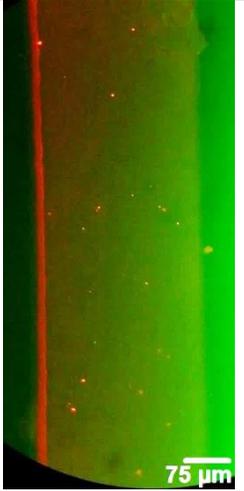
En los casos donde se usó ampicilina, el número de células rojas, nunca llega a ser igual al número de células verdes que se tenían al inicio. Esto podría atribuirse al efecto de la ampicilina sobre la membrana celular. Pues al ir pasando el tiempo la membrana celular se va dañando cada vez más, lo que podría resultar en un rompimiento total de la célula de modo que se libera el ADN contenido

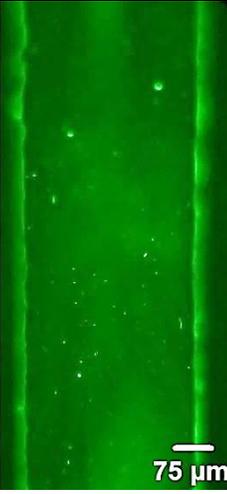
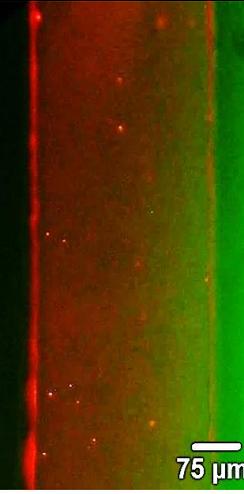
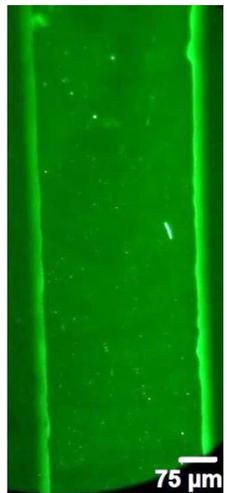
y por tanto la fluorescencia ya no está concentrada en un punto, evitando que se observen las células o bien el ADN se rompe y ya no hay intercalación de las tintas.

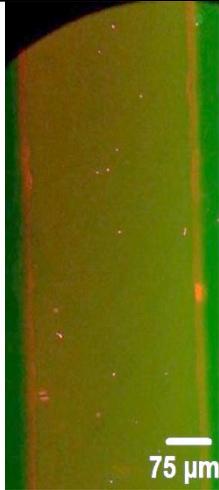
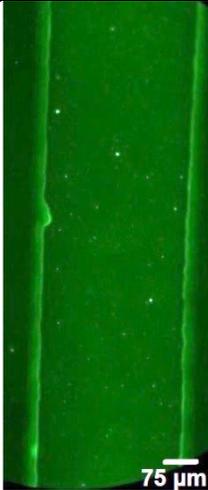
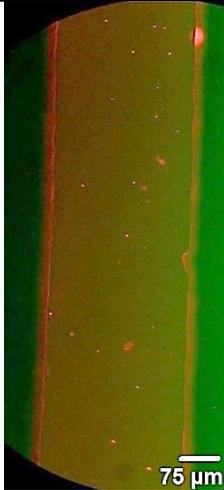
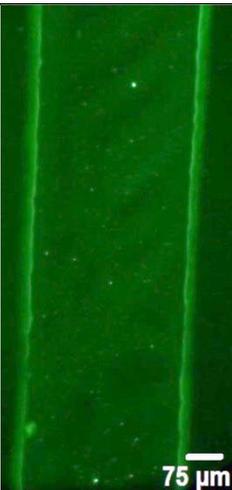
Otras variaciones podrían deberse a que durante la toma de fotos, se mueve el microchip de lugar. Esto puede causar que cuando se toma la foto en la primera sección del microcanal no sea exactamente el mismo sitio. Pues como con el objetivo de 20x no se ve la totalidad de la primera sección del microcanal, el microchip podría estar desplazado ligeramente hacia la derecha o hacia la izquierda; ocasionando que se tome la foto de células que estaban en otro sitio de esa misma sección del microcanal.

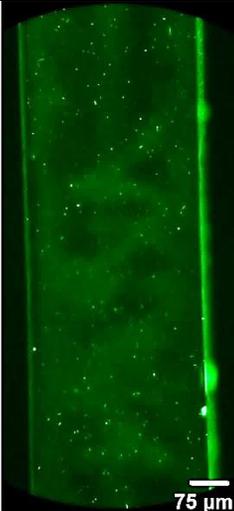
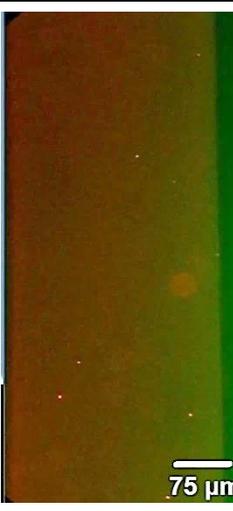
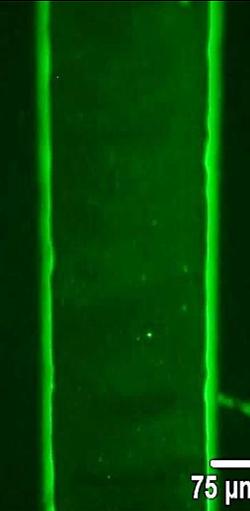
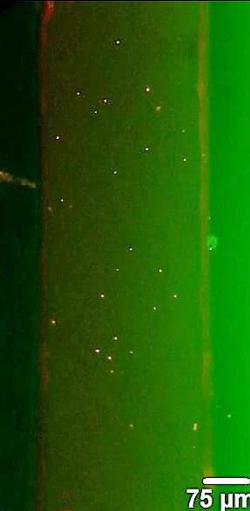
En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la toma de fotos del cultivo de células vivas (control en NaCl al 0.85% m/v) comparado con el cultivo de células en presencia de ampicilina (500 µg/mL). Estas fotos se presentan como ejemplo para ilustrar la disminución en el número de células verdes, y el incremento en células rojas a lo largo del tiempo para el cultivo con ampicilina.

Tabla 2. Células vivas (control) y células en presencia de ampicilina (500 μ g/mL) observadas con los filtros para 475 nm y 560 nm en función del tiempo.

Tiempo (min)	Control de células vivas		Células en presencia de ampicilina (500 μ g/mL)	
	Filtro para células verdes	Filtro para células rojas	Filtro para células verdes	Filtro para células rojas
0	 <p>No. de células observadas = 181</p>	 <p>No. de células observadas = 11</p>	 <p>No. de células observadas = 229</p>	 <p>No. de células observadas = 10</p>
30	 <p>No. de células observadas = 183</p>	 <p>No. de células observadas = 18</p>	 <p>No. de células observadas = 114</p>	 <p>No. de células observadas = 23</p>

<p>60</p>	 <p>No. de células observadas = 215</p>	 <p>No. de células observadas = 14</p>	 <p>No. de células observadas = 86</p>	 <p>No. de células observadas = 25</p>
<p>90</p>	 <p>No. de células observadas = 209</p>	 <p>No. de células observadas = 10</p>	 <p>No. de células observadas = 63</p>	 <p>No. de células observadas = 27</p>

<p>150</p>	 <p>No. de células observadas = 185</p>	 <p>No. de células observadas = 13</p>	 <p>No. de células observadas = 42</p>	 <p>No. de células observadas = 38</p>
<p>210</p>	 <p>No. de células observadas = 175</p>	 <p>No. de células observadas = 18</p>	 <p>No. de células observadas = 31</p>	 <p>No. de células observadas = 32</p>

270	 <p data-bbox="298 758 532 842">No. de células observadas = 172</p>	 <p data-bbox="596 758 829 842">No. de células observadas = 10</p>	 <p data-bbox="899 758 1149 842">No. de células observadas = 20</p>	 <p data-bbox="1203 758 1453 842">No. de células observadas = 40</p>
-----	--	---	---	---

Con éstos resultados, se pudo ver que la ampicilina puede dañar la membrana celular de las células de *E. coli* y que es posible realizar un estudio de viabilidad celular en microchips. Pero como se mencionó en la introducción, uno de los objetivos de ésta tesis fue encapsular células bacterianas en microgotas formadas dentro de los microchips. Por lo que, en las secciones siguientes de éste capítulo, se presentan los pasos realizados para llegar a la realización de ensayos de viabilidad celular mediante la formación de microgotas.

La finalidad de usar microgotas en los ensayos, es que a futuro, se podrían encapsular células para probar distintos antibióticos al mismo tiempo y en un solo microchip (añadiendo las entradas necesarias al mismo).

4.8 Efecto en la estabilidad y fluorescencia de las microgotas formadas en los microchips debido al cambio en la concentración de surfactante (Span 80) presente en el aceite mineral.

Con la finalidad de determinar la concentración de Span 80 que debía contener el aceite mineral, se realizaron pruebas en los microchips formando microgotas y se observó la estabilidad de las microgotas durante el recorrido por todo el microcanal.

A continuación se muestran dos imágenes comparativas de la formación y estabilidad de las gotas formadas mediante el uso de aceite mineral con 0.1% m/m y 1.8% m/m de Span 80, respectivamente (Figura 52).

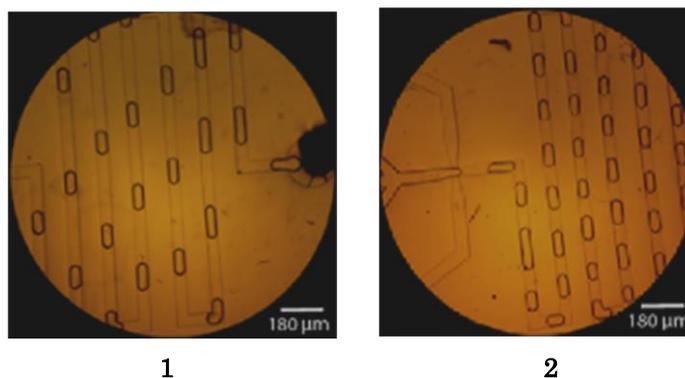


Figura 52. 1. Formación de las microgotas usando aceite mineral con Span 80 al 0.1% m/m. 2. Formación de microgotas usando aceite mineral con Span 80 al 1.8% m/m (Objetivo 10x). En ambos casos, se usó un flujo de aceite de 15 µl/hr y de agua 1 µl/hr.

En ambos casos, se observa que las gotas formadas son bastante estables durante el recorrido por todo el microchip, por lo que la variación en la concentración de Span 80 presente en el aceite mineral no afectaba su estabilidad.

Después, se hicieron experimentos con un cultivo de células vivas teñidas con Syto9 y yoduro de propidio. Se observó que al usar una concentración de 0.1% m/m de Span 80, el Syto9 pasaba a la fase orgánica lo que provocaba un incremento de fluorescencia al avanzar hacia la salida del microchip. Con 1.8% m/m de Span 80 el Syto9 se extraía menos hacia la fase orgánica, de modo que

se logró disminuir el ruido de fondo producido por la fluorescencia con el Syto9 en los microcanales. Esto facilita la visualización de las células dentro de las microgotas (Figura 53).

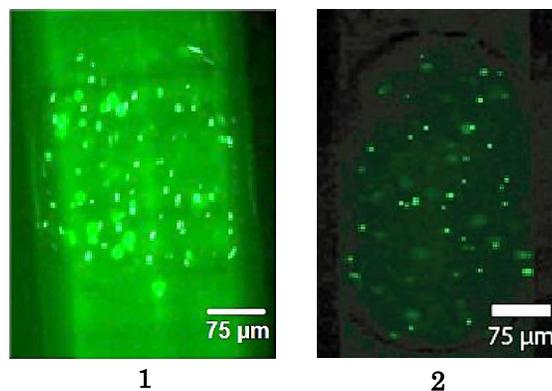


Figura 53. 1. Formación de las microgotas con células vivas usando aceite mineral al 0.1% m/m Span 80. 2. Formación de microgotas con células vivas usando aceite mineral al 1.8% m/m de Span 80 (Objetivo 20x). Flujo de aceite: 15 $\mu\text{l/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{l/hr}$.

Se vio también que, como el Syto9 es un compuesto que no tiene carga, presenta afinidad por el PDMS y por la fase orgánica. Por lo que, se observó que al ir avanzando hacia el final del microcanal, había una mayor fluorescencia producida por el Syto9 al extraerse hacia la fase orgánica. Esto fue importante para definir la zona donde se realizaría la toma de fotos y videos; pues era más fácil observar las microgotas en la primera sección del microcanal que al final del recorrido por el microchip (Figura 54).

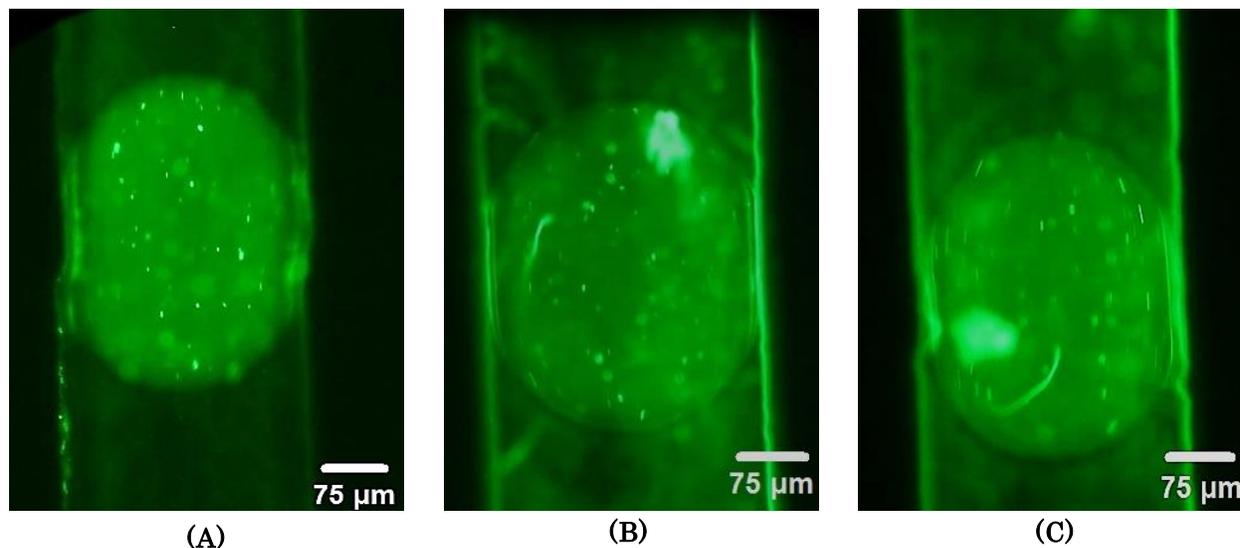


Figura 54. Incremento de la fluorescencia conforme se avanza hacia el final del microcanal. (A) Al inicio del microchip (primera sección), (B) mitad del microchip, (C) última sección (cerca del final del microchip).

Es por ello, que se eligió la primera sección del microchip (señalada en la Figura 43 de la sección 4.6) como zona para tomar fotos y videos de los experimentos. Además de que se reduce el error debido a la extracción del Syto9 hacia la fase orgánica.

Con éstas observaciones se concluyó que la concentración de Span 80 en el aceite debía ser de 1.8% m/m y que las fotos o los videos que se capturaran durante los ensayos se debían realizar en la primer sección del canal como en el caso de los experimentos de viabilidad celular presentados en secciones anteriores. Así mismo se vio que cuando el flujo de aceite es de 15 $\mu\text{L/hr}$ y el de agua de 1 $\mu\text{L/hr}$; las microgotas se desplazan lentamente y es posible tomarles fotos y/o videos con mejor detalle.

4.9 Formación de microgotas en microchips usando células resuspendidas en NaCl al 0.85% m/v.

Una vez optimizada la concentración de Syto9 y de yoduro de propidio, se realizaron pruebas en los microchips, los cuales permiten la formación de microgotas con la respectiva visualización de las células contenidas dentro de ellas.

Inicialmente, se realizaron pruebas con un cultivo de células de *E. coli* vivas, resuspendidas en NaCl al 0.85% m/v. Durante estos experimentos, se observó que las primeras gotas que se formaron, no contenían células. Al agitar el cultivo de células dentro de la jeringa, finalmente salieron microgotas con células (Figura 55). Éste fenómeno podría deberse a que las células no se mantienen suspendidas en la disolución de NaCl al 0.85% m/v, por lo que después de cierto tiempo comienzan a asentarse en el fondo de la jeringa, dificultando su salida hacia el microchip.

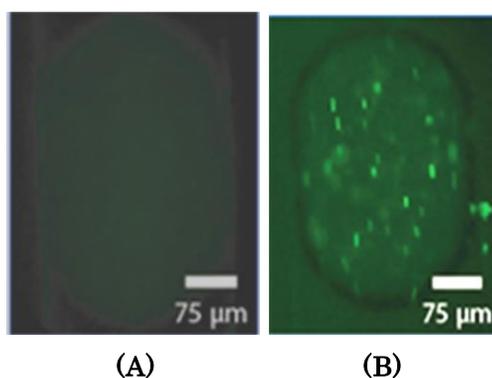


Figura 55. Foto de células vivas vistas con el filtro 475 nm. En (A), se muestra la foto de una microgota al comenzar el experimento. En (B), se muestra la foto de una microgota después de agitar la jeringa. Flujo de aceite: 15 µl/hr, flujo de agua: 1 µl/hr

Para resolver éste problema, se adicionó Percoll (Concentración final de 18.4% v/v) al cultivo de células en NaCl al 0.85% m/v para mantenerlas resuspendidas durante un periodo de tiempo mayor. El Percoll es una solución isosmótica, no tóxica para las células, formada por partículas de sílice coloidales de 15 a 30 nm de diámetro recubiertas con polivinilpirrolidina (PVP).

4.10 Experimentos en microchips de 300 μm para seleccionar el medio en el cual se resuspenderían las células para los ensayos donde se formaron microgotas.

Se hicieron pruebas con un cultivo de células vivas dentro de microchips de 300 μm mediante la formación de microgotas para determinar cuál medio se usaría para mantener a las células resuspendidas dentro de las microgotas el mayor tiempo posible. Para ello, se emplearon tres medios distintos: el NaCl al 0.85% m/v, el Percoll al 18.4% v/v y el glicerol al 38.1 % m/v. En estos casos, también se usó con la concentración de tintas previamente optimizada.

Durante los experimentos, se observó que el Percoll aumentaba la fluorescencia de la gota, lo que se reflejaba en un incremento del ruido de fondo, dificultando la visibilidad de las células, sobre todo en las células teñidas con yoduro de propidio y observadas con el filtro para 560 nm (células rojas).

En la Figura 56, se muestran fotos tomadas con los filtros para 475 nm y 560 nm respectivamente, usando un cultivo de células vivas resuspendidas en NaCl al 0.85 % m/v y Percoll al 18.4% v/v.

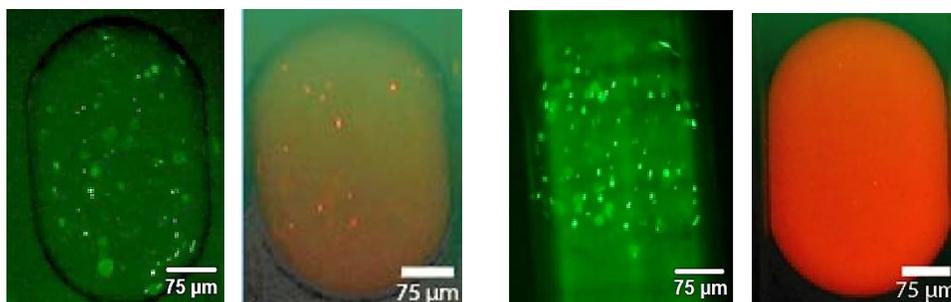


Figura 56. Fotos de pruebas comparativas de un cultivo de células de *E. coli* vivas vistas con los filtros para 475 nm y 560 nm. A la izquierda se observan las células resuspendidas en NaCl al 0.85% m/v y del lado derecho se muestran las células resuspendidas en Percoll al 18.4% v/v. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{l/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{l/hr}$

El incremento en la fluorescencia de la microgota cuando se usa Percoll al 18.2 v/v, podría deberse a que la polivinilpirrolidina (PVP) (Figura 57) posee una estructura formada por vinilpirrolidonas. Ésta estructura podría interaccionar con el Syto9 y con el yoduro de propidio, resultando en la fuerte emisión de fluorescencia en las microgotas.

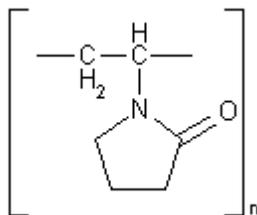


Figura 57. Estructura de la polivinilpirrolidina (PVP), presente en el Percoll.

Ya que el Percoll dificulta la visibilidad de las células al incrementar la fluorescencia de la gota, se decidió usar otro compuesto para resuspender el cultivo celular. Como una de las opciones reportadas se propuso el uso de glicerol al 38.1% m/v.

El glicerol puede ayudar a resuspender las células y debido a que no absorbe a longitudes de onda donde absorben el Syto9 (475 nm), el yoduro de propidio (560 nm) y tampoco a la longitud de onda para determinar la OD del cultivo (670 nm), se propuso como alternativa para resuspender a las células durante el desarrollo de los experimentos ²⁸.

La concentración de glicerol de 38.1% m/v fue elegida ya que una solución al 38.1% m/v de glicerol tiene una densidad igual a la densidad de las células de *E. coli* ($\rho_{E. coli}=1.1 \text{ g/cm}^3$) ²⁹.

A continuación se muestran fotos comparativas en las que se destacan las diferencias observadas al usar glicerol al 38.1% m/v en lugar de Percoll (Figura 58).

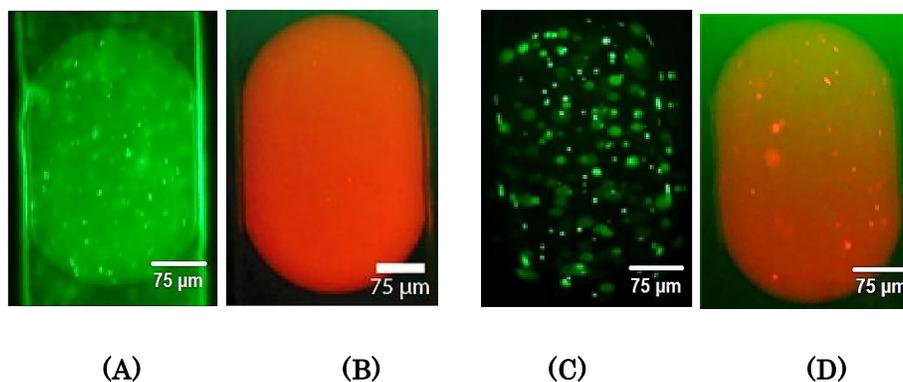


Figura 58. Fotos de pruebas comparativas de un cultivo de células de *E. coli* vivas vistas con los filtros para 475 nm y 560 nm. En (A, B) observan las células resuspendidas en Percoll al 18.4 % v/v y en (C, D) se muestran las células resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{l/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{l/hr}$

Al cambiar el medio en el cual se mantienen suspendidas las células, se observó la disminución del ruido de fondo en las células vistas con el filtro para 560 nm; mientras que cuando se observaron con el filtro para 475 nm, el ruido de fondo en las gotas desapareció por completo.

Debido a que el glicerol, a diferencia del Percoll no tiene un anillo en su estructura; se evita la posible interacción con el Syto9 y con el yoduro de propidio que ocasionan el fenómeno de fluorescencia (Figura 59).

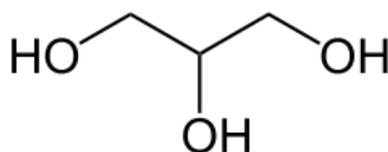


Figura 59. Estructura del glicerol

El uso de glicerol al 38.1% m/v resolvió el problema que se ocasionaba debido al incremento de fluorescencia en el fondo por el uso de Percoll al 18.4% v/v, por lo que la visualización de las células con la cámara (Canon SX260HS) fue mejor.

4.11 Pruebas en portaobjetos con células de *E. coli* vivas a $OD_{670\text{ nm}}$ 0.1 y 0.04 resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v, al 50% y NaCl al 0.85%.

Para determinar el efecto del medio en el que se resuspendieron las células de *E. coli* que fueron observadas en el microscopio (Microscopio invertido DM1300B, Leica Microsystems, Alemania); se realizaron pruebas a dos diferentes densidades ópticas ($OD_{670\text{ nm}}=0.1$ y $OD_{670\text{ nm}}=0.04$). Para ello, se usaron tres medios distintos para resuspender cada muestra del cultivo.

El proceso consistió en la preparación de muestras de células resuspendidas en: glicerol al 38.1% m/v, glicerol al 50% m/v y de NaCl al 0.85%. Después de teñir las células con las concentraciones de Syto9 y yoduro de propidio optimizadas ($C_{\text{Syto9}}=6.68 \times 10^{-4}$ mM y $C_{\text{PI}}=0.06$ mM); se colocaron en portaobjetos gotas de 2.5 μL por cada muestra.

Luego, se tomaron fotos de cada cultivo de células vivas usando los dos filtros (células verdes $\lambda_{\text{ext}}= 475$ nm y células rojas $\lambda_{\text{ext}}= 560$ nm). Los datos obtenidos se graficaron para su análisis (Figura 60).

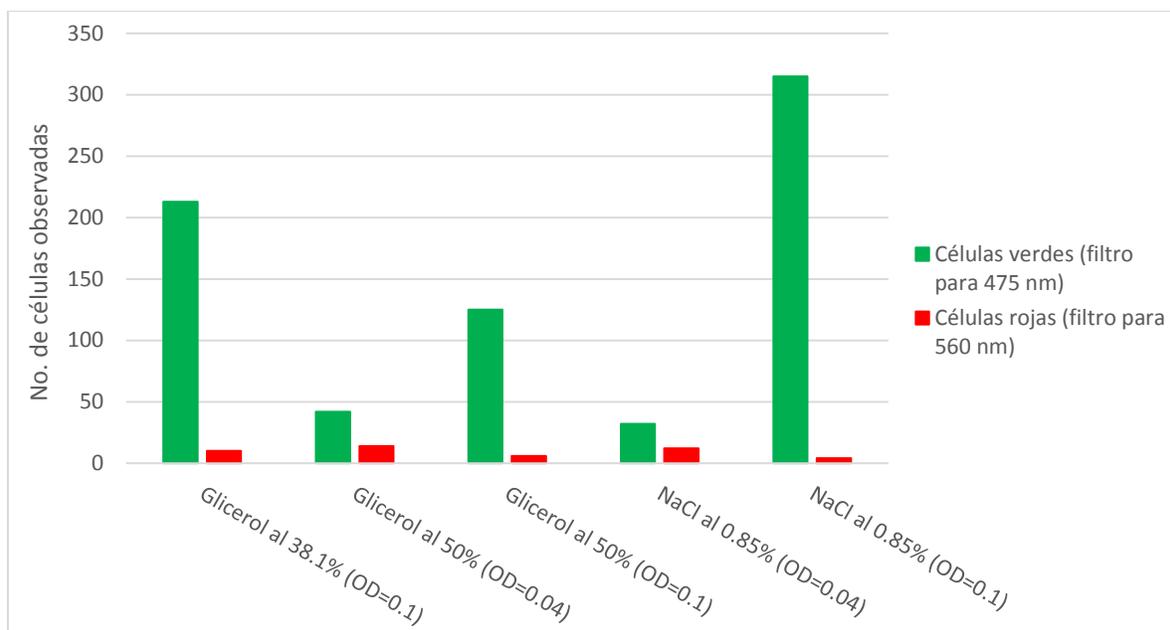


Figura 60. Variación del número de células observadas con los filtros para 475 nm (células verdes) y 560 nm (células rojas) en función del medio en el cual se resuspendieron y de la OD_{670 nm}.

Es posible notar que la presencia de glicerol podría afectar la viabilidad de las células, pues conforme se incrementa la concentración de 38.1% m/v a 50% m/v el número de células visibles disminuye. En el caso en que se usó NaCl al 0.85% como medio para resuspender las células, se observa un mayor número de células de *E. coli* vivas respecto a la muestra con glicerol cuando se tiene la misma OD_{670 nm}. También se puede ver que cuando la OD es menor; el efecto que tiene el medio sobre el número de células observadas también es menor que cuando se tiene una OD alta.

Por lo que, con éstos resultados, se llegó a la conclusión de que aun cuando el NaCl al 0.85% es un medio que no afecta la viabilidad de las células; no se puede usar en los experimentos en los que se formarán las microgotas. Esto se debe a que, como se observó en la sección 4.9, las células se asientan en la jeringa antes de salir al microchip. En lugar de usar NaCl al 0.85%, se usará para los experimentos en microchips donde se encapsularán las células bacterianas en microgotas el glicerol a una concentración de 38.1% m/v.

Otra posibilidad de la variación en el número de células observadas podría deberse a la alícuota tomada (como se mencionó en la sección 4.5). Esta explicación se basa en el hecho de que, en los 2.5 μL tomados, podrían haberse tomado más o menos células, pues se debe tener en cuenta que aun cuando se mezclaba la muestra antes de tomar la alícuota, el NaCl al 0.85% no era tan efectivo para resuspender a las células de modo que éstas se asentaban más rápido en el fondo del microtubo que cuando se usó Percoll o glicerol.

4.12 Experimentos en microchips de 300 μm con un cultivo de células vivas (resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v).

Para tener un control positivo, se preparó un cultivo de 16 horas el cual se lavó con NaCl al 0.85%, luego se resuspendió en una disolución de glicerol al 38.1% m/v para tener una $\text{OD}_{670\text{nm}}$ de 0.04. Finalmente se realizaron pruebas dentro del microchip de 300 μm encapsulando las bacterias en microgotas con ayuda del aceite mineral con Span 80 al 1.8% m/m.

Las células se observaron con los dos filtros y se tomaron videos con la Cámara Canon cada 5 o 10 min durante 1 hr. Con los resultados del análisis de fotos capturadas de los videos grabados, se realizó el conteo de las células observadas dentro de las microgotas. Una vez obtenidos estos datos se realizó un análisis del número de células presentes en función del área de la microgota.

4.12.1 Análisis del número de células presentes por área relativa de la microgota.

Para determinar las variaciones en el número de células presentes en las microgotas formadas, se hizo el análisis del número de células en función del área de la microgota. Estos análisis se realizaron debido a que cuando se trabaja a flujos muy bajos de agua y aceite en un microchip, las microgotas pueden variar más en tamaño que cuando se usan flujos altos de agua y aceite ²⁴.

Durante el seguimiento de microgotas que contenían a las células de *E. coli* a una $\text{OD}_{670\text{nm}}=0.04$ resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v, se usaron los flujos habituales de aceite (15 $\mu\text{L/hr}$) y agua (1 $\mu\text{L/hr}$).

En las Figuras 61 y 62, se muestran los gráficos obtenidos de los resultados del análisis de las fotos con el programa ImageJ.

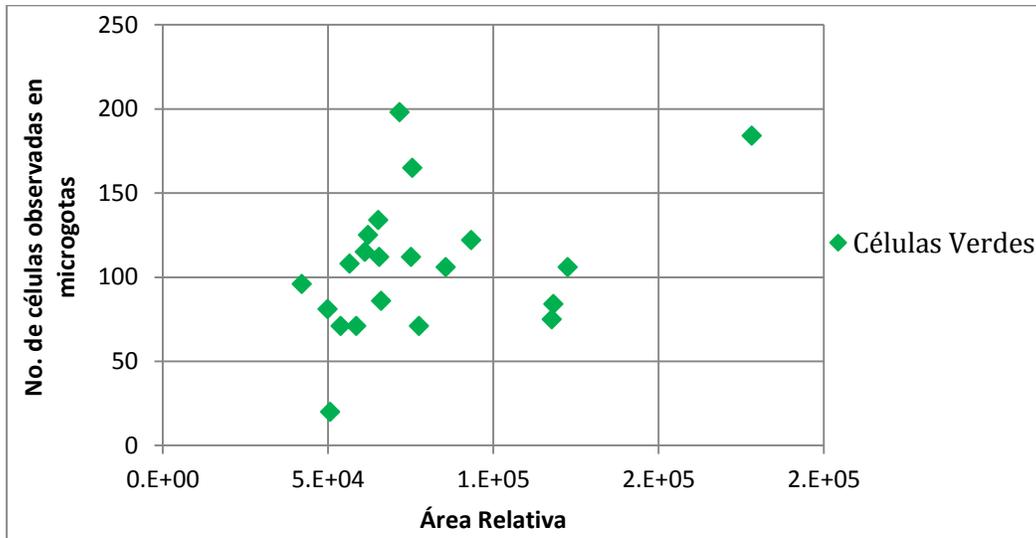


Figura 61. No. de células vivas de *E. coli* ($OD_{670nm}=0.04$) observadas considerando el área de las microgotas formadas (filtro para 475 nm). NOTA: El área relativa se determina en el programa ImageJ considerando los pixeles presentes en la foto de la microgota. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L/hr}$.

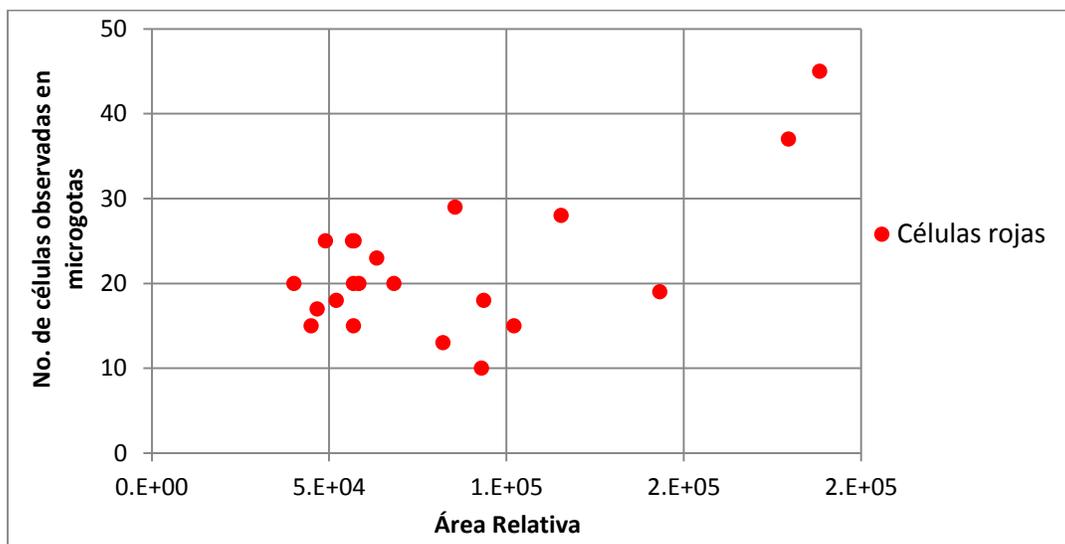


Figura 62. No. de células rojas detectadas en un cultivo de células vivas de *E. coli* ($OD_{670nm}=0.04$) considerando el área de las microgotas formadas (filtro para 560 nm). Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L/hr}$

Como se observa en las Figuras 61, el número de células se mantiene en un intervalo de 50 a 200 células en un área de 5×10^4 y 2×10^5 unidades arbitrarias, en el caso de las células vistas con el filtro para 475 nm (verdes). En el caso de la Figura 62, las células vistas con el filtro para 560 nm (rojas), se observa que el número se mantiene entre las 10 y las 45 células en un área de 5×10^4 y 2×10^5 unidades de arbitrarias. Esto es consistente con los resultados presentados en la sección 4.11, donde el número de células cuando se usó glicerol al 38.1% fue de 213 células verdes y 10 células rojas (valores que caen dentro del intervalo del número de células observadas en la Figura 60).

Éstos resultados indican que existe una variación en el número de células presentes en cada microgota y aunque se mantiene en un intervalo; explica el por qué en los experimentos posteriores se observan incrementos o disminuciones del número de células a lo largo de los ensayos. Sin embargo como también se verá en las secciones siguientes, hubo una tendencia hacia la disminución del número de células verdes y el incremento del número de células rojas cuando los cultivos se trataron con ampicilina. Además, éstos cambios son significativos en comparación con los cambios observados en los cultivos de células vivas sin antibióticos (control positivo).

4.13 Experimentos en microchips de 300 μm con un cultivo de células tratadas con isopropanol al 70%.

Para tener un control negativo, se preparó un cultivo de 16 horas el cual se lavó con NaCl al 0.85% m/v y se dejó incubar durante 30 min en isopropanol al 70% para la obtención de células con su membrana comprometida.

Después de los 30 min de incubación, se lavaron las células para eliminar el isopropanol y se resuspendieron en una disolución de glicerol al 38.1% m/v ($\text{OD}_{670\text{nm}}$ de 0.04). Finalmente se realizaron pruebas dentro del microchip de 300 μm .

Con los resultados obtenidos del análisis de fotos capturadas, se realizó el conteo de las células observadas dentro de las microgotas con el programa ImageJ. Una vez obtenidos estos datos, se realizó un análisis del número de células presentes en función del área de la microgota al igual que en la sección 4.12.

4.13.1 Análisis del número de células tratadas con isopropanol al 70% presentes por área relativa de la microgota.

Con el programa ImageJ, se calculó el área de las microgotas observadas manteniendo los flujos de aceite y agua constantes (flujo de aceite 15 $\mu\text{L/hr}$ y flujo de agua 1 $\mu\text{L/hr}$). A continuación se muestran los resultados obtenidos en forma gráfica del número de células observadas en función del Área relativa (Figura 63 y 64).

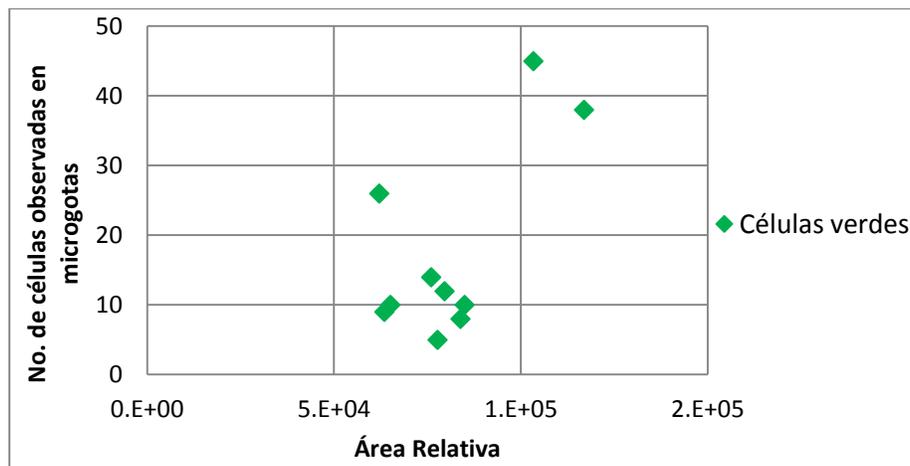


Figura 63. Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) tratadas con isopropanol al 70% vistas con el filtro para 475 nm en función del área relativa. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L/hr}$.

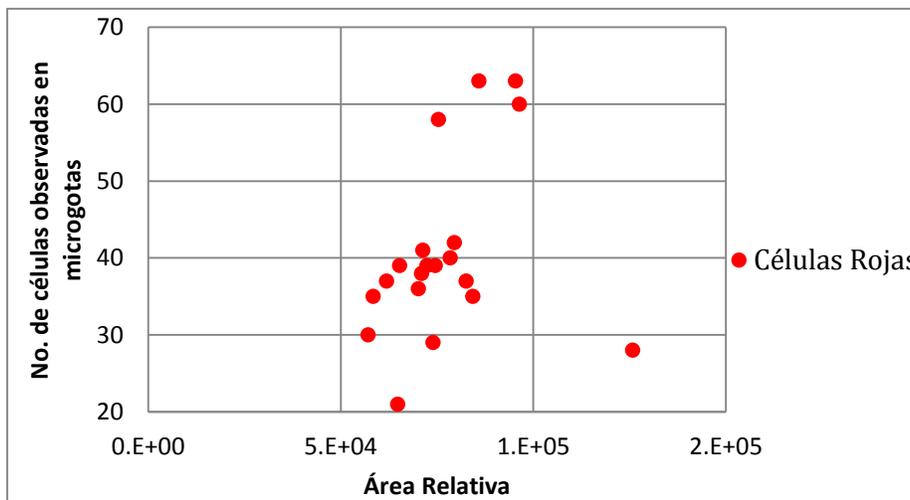


Figura 64. Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) tratadas con isopropanol al 70% vistas con el filtro para 560 nm en función del área relativa. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L/hr}$

Como se observa en el gráfico anterior, el número de células vistas con el filtro para 475 nm (verdes) se mantiene en un intervalo entre las 5 y las 38 células, mientras que el área relativa varía de los 6.2×10^4 y 1.16×10^5 unidades arbitrarias. Por otro lado, el número de células vistas con el filtro para 560 nm (rojas) se mantiene en un intervalo de 21 a 63 células y un área relativa entre 5.7×10^4 y 1.2×10^5 u.a. Esto es indicativo de que el número de células por gota, aunque presenta algunas variaciones, se mantiene más o menos homogéneo durante el experimento.

4.14 Viabilidad celular en microchips con un cultivo en presencia de ampicilina (500 µg/ml).

Después de haber realizados éstas pruebas control y ver que el número de células se mantiene en un intervalo a lo largo del tiempo, se realizaron experimentos con ampicilina para observar los efectos que tienen éste antimicrobiano en las células de *E. coli*.

Se preparó un cultivo de células vivas, las cuales se lavaron y se resuspendieron en una solución de glicerol al 38.1% m/v. Posterior a la tinción, se adicionó ampicilina de modo que la concentración final de ésta fue de 500 µg/mL. En seguida se hicieron pruebas en un microchip, siguiendo tres microgotas (observadas con los filtros de 475 nm y 560 nm) cada hora, por alrededor de 3 horas. De cada video se analizaron distintas microgotas para observar la variación en el número de células vistas en ambos filtros a lo largo del tiempo (Figura 65).

Para todos los experimentos con ampicilina; el tiempo inicial ($t = 0$ min) se considera como el tiempo al cual se inició la formación de las microgotas. La formación de las microgotas se produjo 15 min después de la adición de ampicilina en el cultivo de *E. coli*.

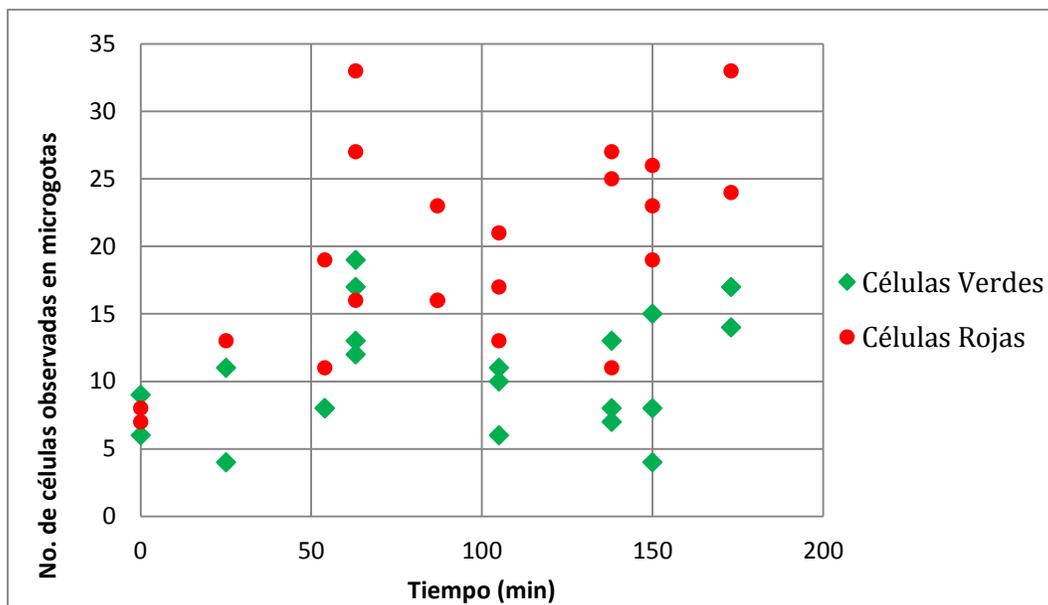


Figura 65. Experimento 1: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) dentro de las microgotas en presencia de Ampicilina ($500\ \mu\text{g/mL}$) en función del tiempo. Flujo de aceite: $15\ \mu\text{L/hr}$, flujo de agua: $1\ \mu\text{L/hr}$

En éste caso el número de células rojas ($560\ \text{nm}$) se incrementó conforme pasó el tiempo, y el número de células verdes ($475\ \text{nm}$) también se incrementó pero en menor grado. Debido a que la ampicilina comienza a hacer efecto 2 horas después de su adición³⁰, se incrementó el tiempo de observación con la finalidad de observar un cambio más significativo.

Para facilitar la visualización de los resultados, se calculó el número promedio de células vistas con ambos filtros y los resultados se muestran en la Figura 66. En esta figura se facilita la visualización en el incremento del número de células rojas en función del tiempo y también un ligero incremento en el número de células vistas con el filtro para $475\ \text{nm}$ (verde).

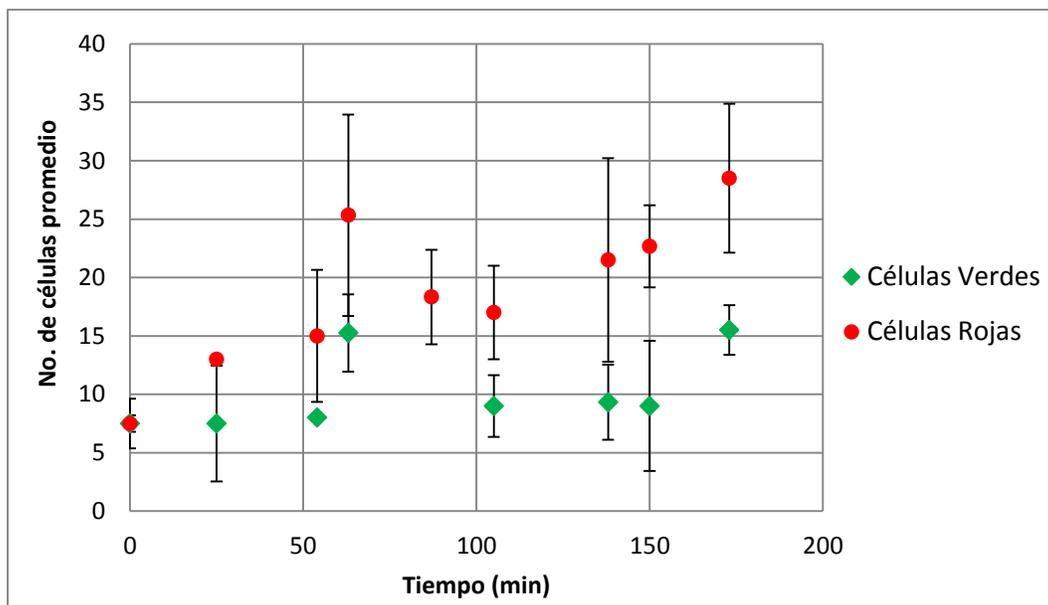


Figura 66. Experimento 1: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) promedio dentro de las microgotas en presencia de Ampicilina ($500\text{ }\mu\text{g/mL}$) vs tiempo. Flujo de aceite: $15\text{ }\mu\text{L/hr}$, flujo de agua: $1\text{ }\mu\text{L/hr}$.

Se realizaron más pruebas, pero ahora se incrementó el tiempo de los ensayos para ver si había una tendencia más clara del incremento del número de células muertas (rojas) y ver si las células vivas (verdes) disminuían más adelante.

4.15 Incremento del tiempo de los experimentos en microchips con un cultivo de células con ampicilina ($500\text{ }\mu\text{g/mL}$).

Debido a que los resultados anteriores se observó una tendencia clara del incremento de células rojas de un cultivo de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) en presencia de ampicilina ($500\text{ }\mu\text{g/mL}$), se repitió el procedimiento experimental (usando la concentración de Syto9 $6.68 \times 10^{-4}\text{ mM}$ y yoduro de propidio de 0.06 mM , es decir la concentración optimizada), pero ahora se incrementó el tiempo del ensayo.

La Figura 67 muestra los resultados obtenidos de un ensayo en un microchip de 300 μm con un cultivo de células en presencia de ampicilina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v. En éste caso el experimento tuvo una duración de 5 horas.

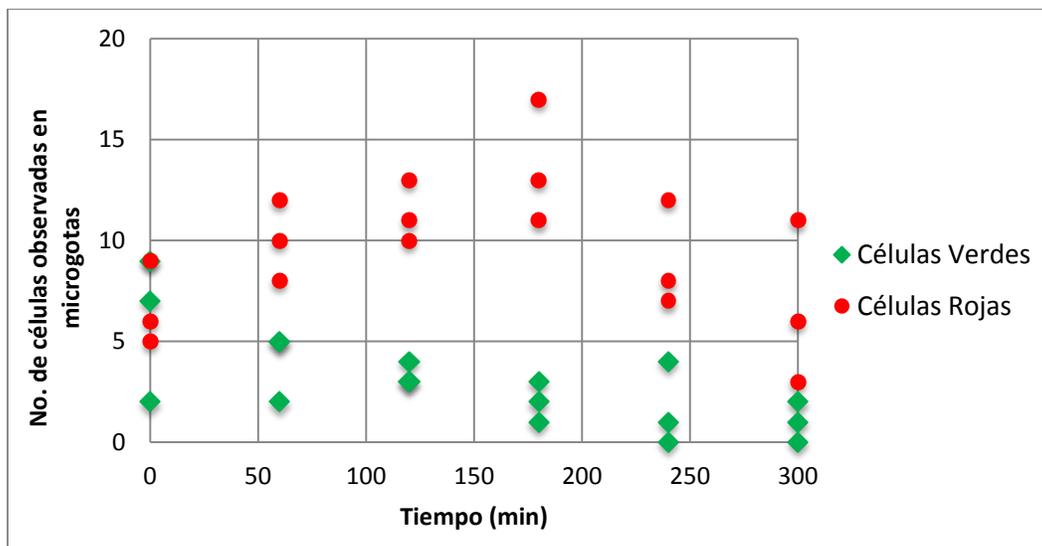


Figura 67. Experimento 2: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) dentro de las microgotas en presencia de Ampicilina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vs tiempo. Se muestran las células vistas con ambos filtros (verdes con 475 nm y rojas con 560 nm. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L}/\text{hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L}/\text{hr}$

Del gráfico (Figura 67) anterior se tomaron los puntos correspondientes a cada tiempo y se promediaron para realizar un gráfico del número de células promedio en función del tiempo (Figura 68).

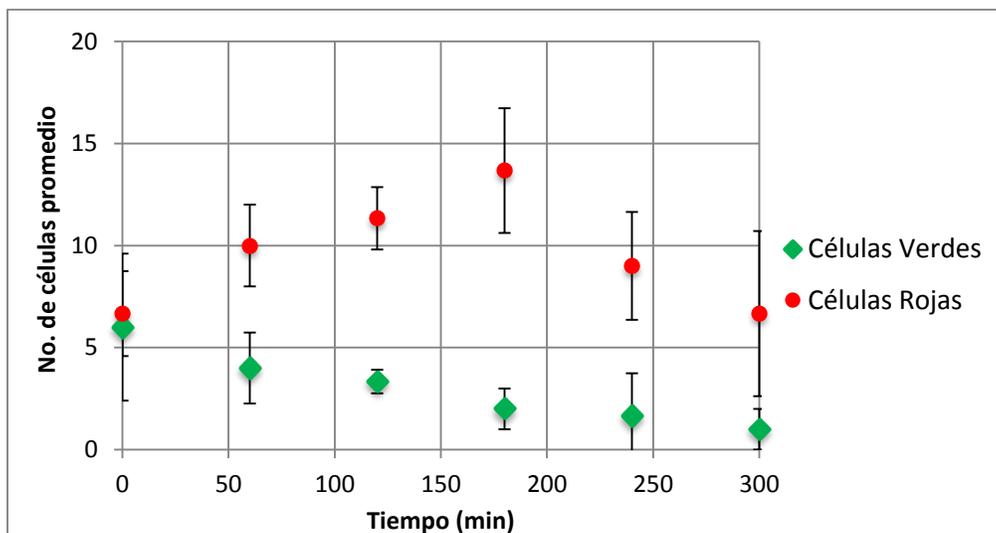


Figura 68. Experimento 2: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}} = 0.04$) promedio en presencia de Ampicilina ($500\ \mu\text{g/mL}$) vs tiempo. Se muestran las células vistas con ambos filtros (verdes con $475\ \text{nm}$ y rojas con $560\ \text{nm}$). Flujo de aceite: $15\ \mu\text{L/hr}$, flujo de agua: $1\ \mu\text{L/hr}$.

En éste gráfico (Figura 68) se muestra que el número de células rojas se incrementa hacia los 180 min y después disminuye hacia los 300 min del ensayo. De igual modo se observaron las células con el filtro para $475\ \text{nm}$ (verdes) y el promedio muestra que el número de células disminuye por efecto de la ampicilina.

Después se realizó otra prueba de células en presencia de ampicilina ($500\ \mu\text{g/ml}$) durante 5 horas y 30 minutos (Figura 69), observándose una tendencia similar al experimento anterior (Figura 68) en el número de células observadas con los filtros de $475\ \text{nm}$ y $560\ \text{nm}$.

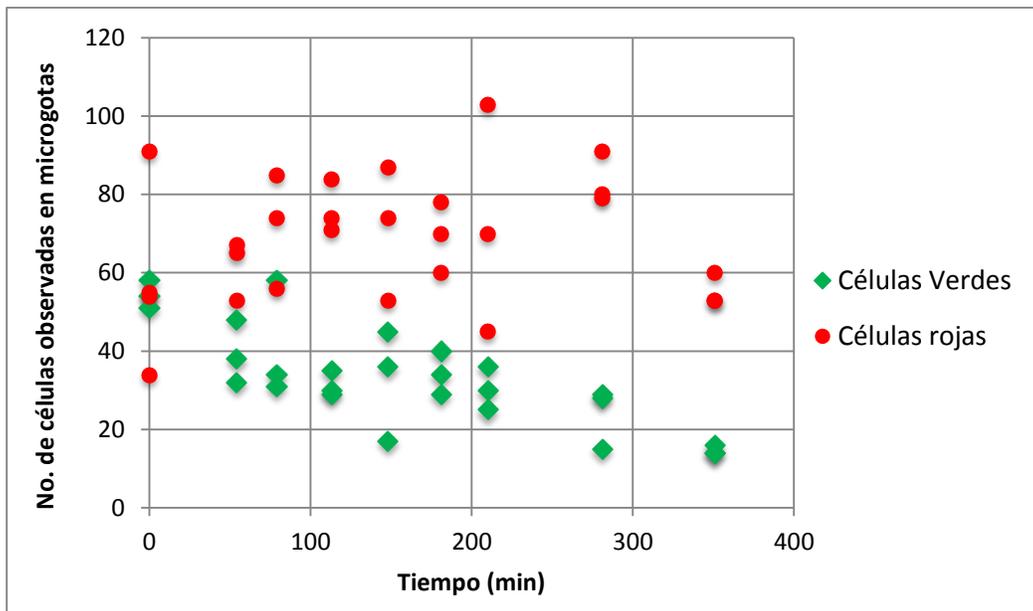


Figura 69. Experimento 3: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) dentro de las microgotas en presencia de Ampicilina (500 $\mu\text{g/mL}$) vs tiempo. Se muestran las células vistas con ambos filtros (verdes con 475 nm y rojas con 560 nm). Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L/hr}$.

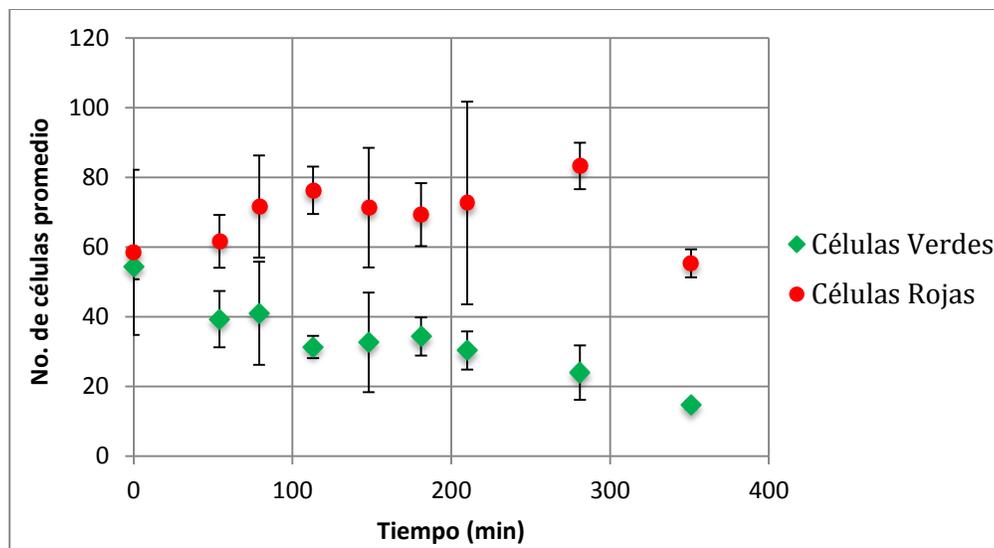


Figura 70. Experimento 3: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) promedio en presencia de Ampicilina (500 $\mu\text{g/mL}$) vs tiempo. Se muestran las células vistas con ambos filtros (verdes con 475 nm y rojas con 560 nm). Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L/hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L/hr}$

El experimento 3, es una repetición del experimento 2, pero ahora se hizo una observación más ($t= 351$ min) y muestra una vez más una disminución de células verdes (filtro para 475 nm) y el incremento de células rojas (filtro para 560 nm) en función del tiempo por efecto de la ampicilina.

En el experimento 4, es otra repetición del experimento 2, pero ahora el tiempo al cual se tomaron las últimas fotos fue de 360 min (Figura 71). De igual forma, se promediaron los tres puntos obtenidos a cada tiempo (Figura 72), de modo que se observa que el número de células rojas comienza a decaer después de 180 min (3 hr), mientras que en el experimento 3 (Figura 70) se ve que el número de células disminuye ligeramente a los 113 min pero se incrementa nuevamente a los 281 min y finalmente vuelve a disminuir.

En ambos casos se puede notar el efecto de la ampicilina durante los 100 primeros minutos de los experimentos, pues el número de células rojas se incrementa. Como se mencionó anteriormente es posible que a tiempos muy altos el número de células rojas disminuya debido a que la pared celular se daña por completo, e inclusive el ADN podría ser afectado de modo que el yoduro de propidio ya no se encontraría intercalado en el ADN.

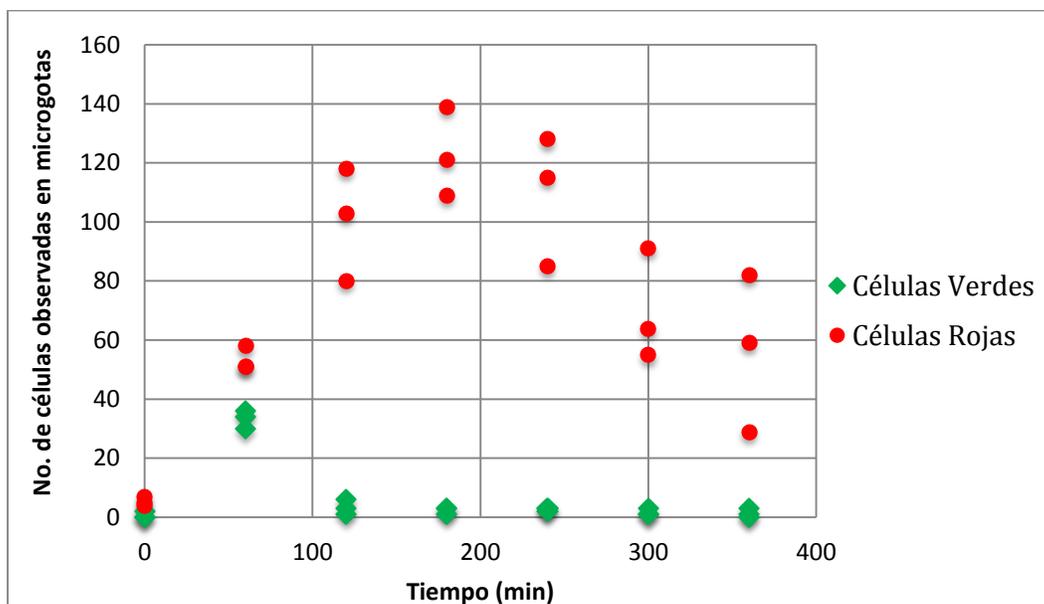


Figura 71. Experimento 4: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}}=0.04$) dentro de las microgotas en presencia de Ampicilina ($500\ \mu\text{g/mL}$) vs tiempo. Se muestran las células vistas con ambos filtros (verdes con 475 nm y rojas con 560 nm). Flujo de aceite: $15\ \mu\text{L/hr}$, flujo de agua: $1\ \mu\text{L/hr}$

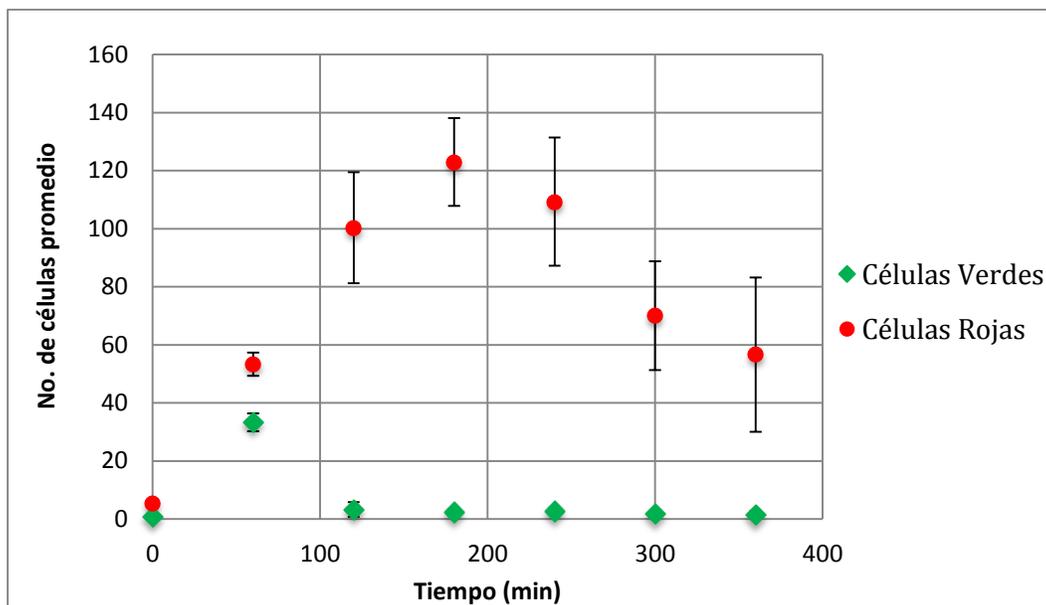


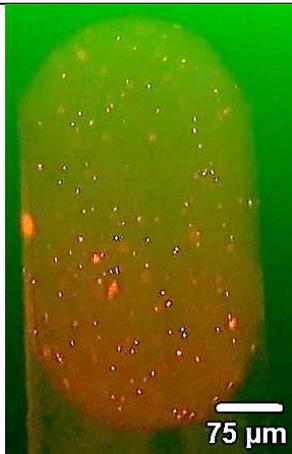
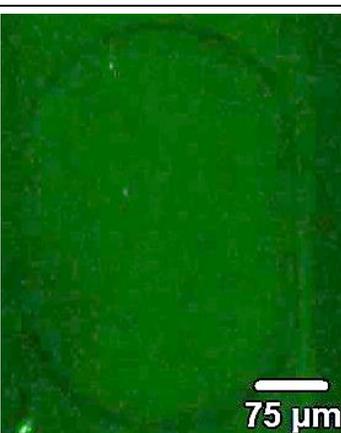
Figura 72. Experimento 4: Número de células de *E. coli* ($OD_{670\text{ nm}} = 0.04$) promedio en presencia de Ampicilina ($500\ \mu\text{g/mL}$) vs tiempo. Se muestran las células vistas con ambos filtros (verdes con $475\ \text{nm}$ y rojas con $560\ \text{nm}$). Flujo de aceite: $15\ \mu\text{L/hr}$, flujo de agua: $1\ \mu\text{L/hr}$

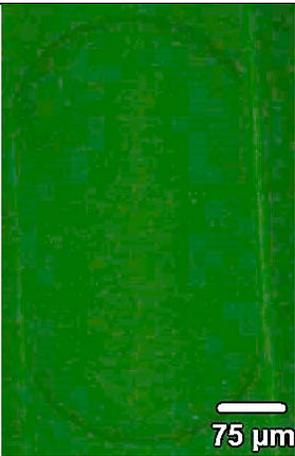
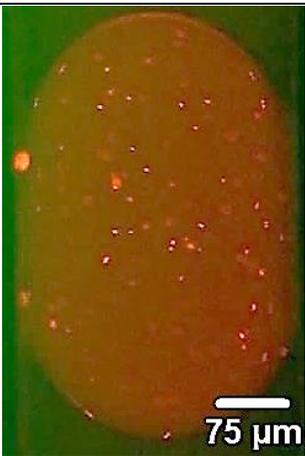
La serie de gráficos, muestran que es posible detectar el efecto antimicrobiano de la ampicilina sobre células individuales de *E. coli* mediante el método propuesto.

A continuación, la Tabla 3 muestra una serie de imágenes tomadas de microgotas a cada tiempo para observar el efecto del incremento en el número de células rojas y la respectiva disminución del número de células verdes.

Tabla 3. Fotos de microgotas con células en presencia de ampicilina ($500 \mu\text{g/ml}$) observadas con los filtros para 475 nm y 560 nm en función del tiempo.

Tiempo (min)	Células en presencia de ampicilina ($500 \mu\text{g/ml}$)	
	Filtro para células verdes	Filtro para células rojas
0	 <p>No. de células observadas = 0</p>	 <p>No. de células observadas = 7</p>
60	 <p>No. de células observadas= 36</p>	 <p>No. de células observadas = 58</p>

<p>120</p>	 <p>No. de células observadas = 6</p>	 <p>No. de células observadas = 103</p>
<p>180</p>	 <p>No. de células observadas = 3</p>	 <p>No. de células observadas = 121</p>
<p>240</p>	 <p>No. de células observadas = 2</p>	 <p>No. de células observadas = 115</p>

<p>300</p>	 <p>No. de células observadas = 1</p>	 <p>No. de células observadas = 64</p>
<p>360</p>	 <p>No. de células observadas = 0</p>	 <p>No. de células observadas = 59</p>

4.16 Viabilidad celular en microchips con un cultivo en presencia de kanamicina (125 µg/mL).

Se realizó el tratamiento de células de *E. coli* de acuerdo con el protocolo propuesto con anterioridad, de modo que se obtuvo un cultivo resuspendido en glicerol al 38.1% m/v a una OD_{670 nm} de 0.04 teñido con Syto9 y yoduro de propidio. Seguido de la tinción se realizó la adición de kanamicina (125 µg/mL) al cultivo y se introdujo la muestra dentro de un microchip de 300 µm.

Dentro del microchip se realizó la formación de microgotas, de igual manera que en los experimentos con ampicilina (500 µg/mL). Se hizo el seguimiento de tres microgotas (observadas con los filtros de 475 nm y 560 nm) cada hora, con la finalidad de observar el cambio en el número de células muertas (rojas) y en el número de células vivas (verdes).

El grafico siguiente (Figura 73) muestra el número de células observadas en cada microgota durante 3 horas, vistas con los filtros de 475 nm y 560 nm del cultivo de células de *E. coli* en presencia de kanamicina (125 µg/mL).

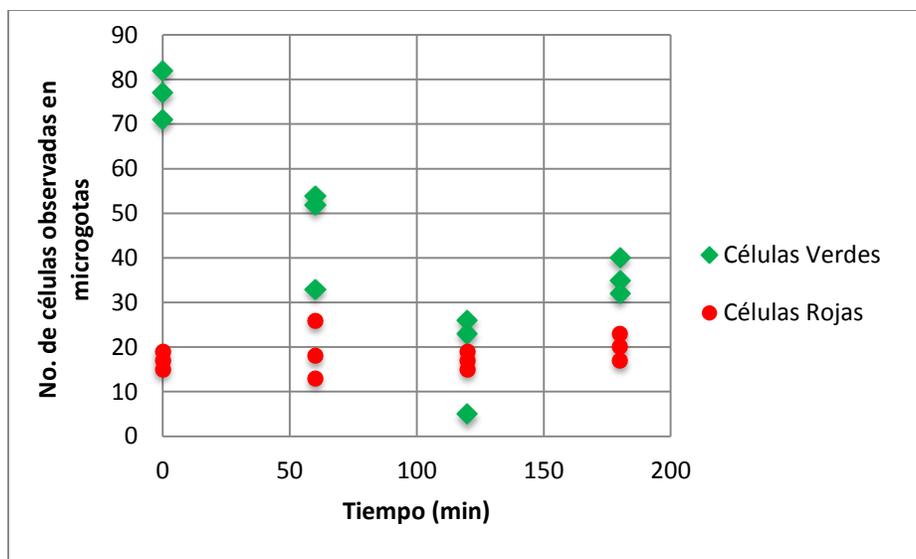


Figura 73. Experimento 5: Gráfico del número de células de *E. coli* en presencia de kanamicina (125 µg/mL) observadas durante 3 horas. Las observaciones se realizaron con los filtros de 475 nm (células verdes) y 560 nm (células rojas). Flujo de aceite: 15 µL/hr, flujo de agua: 1 µL/hr

A partir de los resultados mostrados en la Figura 73, se obtuvo la Figura 74 promediando los puntos correspondientes al número de células presentes en las tres microgotas tomadas durante cada hora.

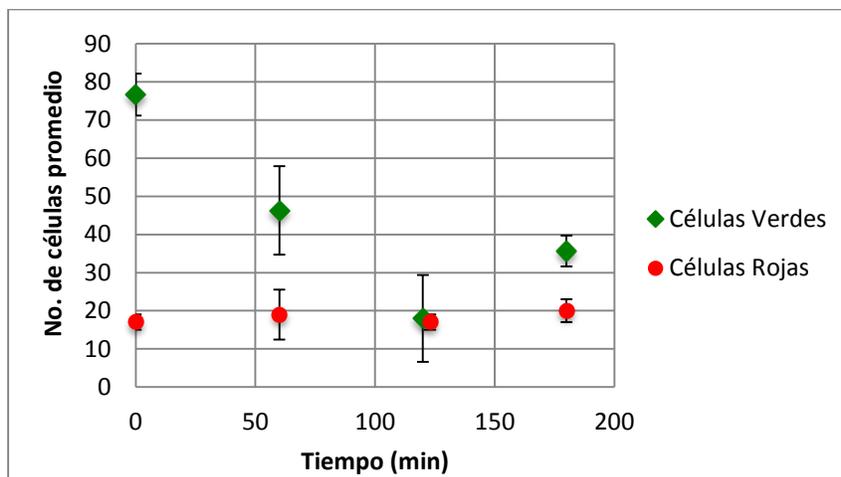


Figura 74. Experimento 5: Número de células promedio de *E. coli* en presencia de kanamicina (125 µg/mL) observadas durante 3 horas. Las observaciones se realizaron con los filtros de 475 nm (células verdes) y 560 nm (células rojas).

En éste gráfico se observa con mayor claridad, la disminución del número de células vistas con el filtro para 475 nm (verdes) conforme pasa el tiempo. Se ve que el número de células verdes disminuye de 77 a 47 células en promedio después de 60 min.

Los resultados obtenidos en éste experimento, no muestran el efecto de la kanamicina sobre el número de células muertas (rojas), pues su número no se incrementa notablemente a lo largo de todo el experimento (5)(Figura 74). Una explicación a éste hecho podría ser que, debido a la forma en la que actúa la kanamicina sobre las células de *E. coli*. La kanamicina es un antibiótico que afecta la subunidad 30S de los ribosomas, provocando errores durante la traducción del ARN de modo que hay una terminación temprana en la síntesis proteica.

Debido a que la kanamicina no inhibe el crecimiento de la pared celular ¹⁷, podría ser que un incremento en el número de células a 560 nm (rojas) conforme pase el tiempo no se observe.

A manera de corroborar éstos resultados, se realizó el experimento 6 a las mismas condiciones. En éste caso, además se observó el cultivo al día siguiente con la finalidad de determinar qué sucedía a

tiempos mayores a las 3 horas. En la Figura 75 muestra el número de células vistas con ambos filtros dentro de las microgotas en función del tiempo.

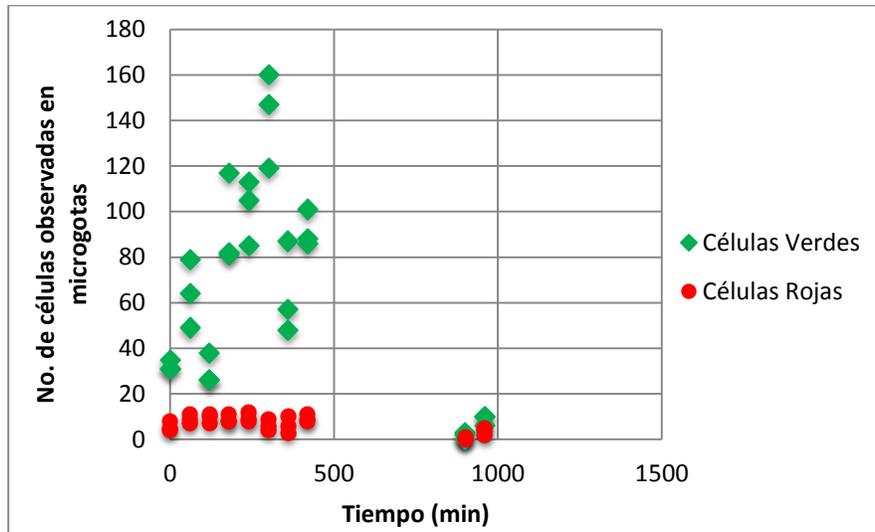


Figura 75. Experimento 6: Número de células de *E. coli* en presencia de kanamicina (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) observadas con los filtros de 475 nm (verdes) y 560 nm (rojas) en función del tiempo. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L}/\text{hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L}/\text{hr}$

También de la Figura 75 se calculó el promedio de células en las tres microgotas para cada una de las horas (Figura 76).

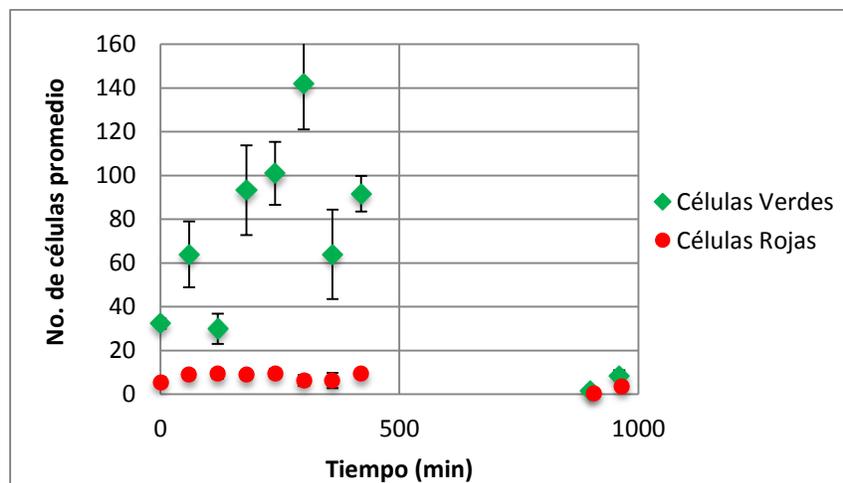


Figura 76. Experimento 6: Número de células de *E. coli* promedio en presencia de kanamicina (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vistas con los filtros de 475 nm y 560 nm en función del tiempo.

El experimento 6 muestra con claridad que el número de células rojas no cambia en un cultivo de células de *E. coli* en presencia de kanamicina (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se puede notar también, que el número de células verdes presenta un comportamiento contrario al visto en la Figura 74, pues el número de células verdes aumenta en un principio y luego disminuye.

4.17 Viabilidad celular en microchips con un cultivo en presencia de kanamicina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resuspendidas en glicerol al 38.1% m/v.

Para confirmar lo que se observó en experimentos anteriores, se hizo una prueba más, pero ahora se incrementó la concentración de kanamicina. La Figura 77 muestra los resultados obtenidos al realizar pruebas con un cultivo de células de *E. coli* en presencia de kanamicina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

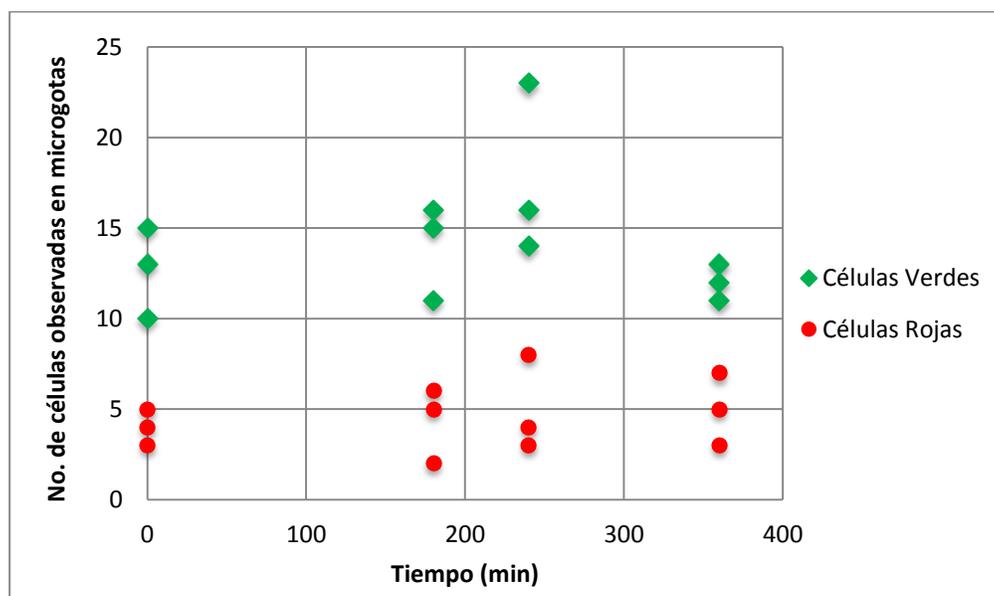


Figura 77. Experimento 7: Número de células de *E. coli* en presencia de kanamicina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vistas con los filtros de 475 nm y 560 nm en función del tiempo. Flujo de aceite: 15 $\mu\text{L}/\text{hr}$, flujo de agua: 1 $\mu\text{L}/\text{hr}$

Al igual que en los caso anteriores, se promedió el número de células observadas a cada tiempo. La Figura 78 muestra éstos resultados.

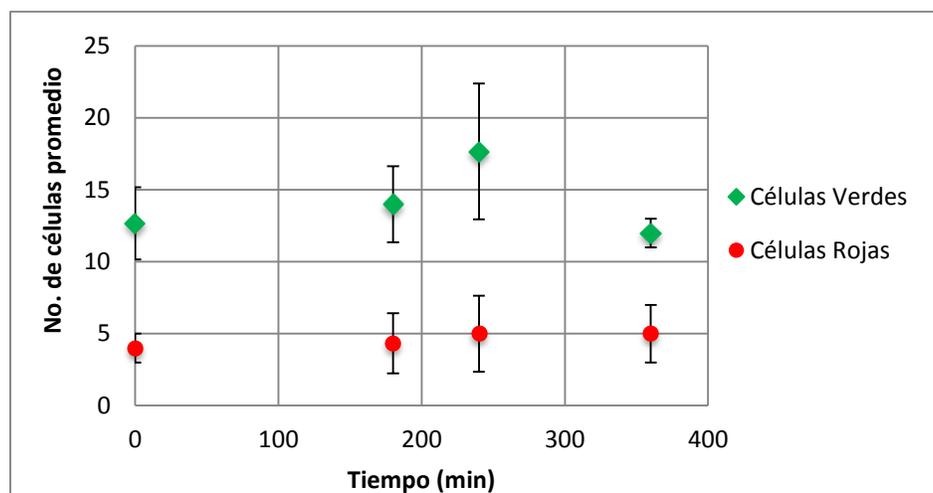


Figura 78. Experimento 7: Número de células de *E. coli* promedio en presencia de kanamicina (500 µg/mL) vistas con los filtros de 475 nm y 560 nm en función del tiempo.

La Figura 78, confirma que el número de células observadas con el filtro para 560 nm (células rojas) permanece casi constante a lo largo del tiempo. Se puede notar además que, el número de células vistas con el filtro para 475 nm (células verdes) presenta comportamientos distintos en todos los experimentos con kanamicina.

La variación presente en todos los gráficos para el caso de las células observadas con el filtro para 475 nm (células verdes), podría deberse a la dilución del Syto9 en DMSO. Ésta dilución afecta en la capacidad de fluorescencia de la molécula cuando está intercalada en el ADN. Pues de acuerdo con algunos comentarios del fabricante presentes en el protocolo de tinción original, si el Syto9 se diluye demasiado con DMSO la capacidad de fluorescencia puede ser afectada.

Otra observación realizada durante todos los ensayos llevados a cabo, es que cuando el Syto9 diluido se guardaba por mucho tiempo en el congelador, éste perdía su capacidad de fluorescencia, por lo que era necesario preparar una nueva dilución cada vez que se hacía un ensayo nuevo.

5 CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un método de lavado y tinción de células que permitió realizar experimentos de viabilidad celular dentro de microchips de microfluídica. El método de tinción se optimizó a partir del protocolo original del kit LIVE/DEAD BacLight; ya que como se observó, el Syto9 a concentración de 0.01 mM, no era desplazado del ADN de las células con su membrana comprometida.

Se concluyó que una concentración de Syto9 de 6.68×10^{-4} mM y una concentración de yoduro de propidio 0.06 mM (relación de concentraciones 1:90) es óptima para realizar la cuantificación y detección de células viables.

Se hicieron ensayos en los que se tiñeron muestras de un cultivo de *E. coli* y que permitieron determinar que a una OD_{670 nm} de 0.04, el número de células era fácilmente cuantificable con el programa ImageJ, pues las células se podían observar más separadas unas de otras; evitando errores al momento del conteo automatizado.

Fue posible fabricar microchips de PDMS con microcanales con un ancho de 315.217 μm de ancho y 104.743 μm de profundidad útiles para realizar ensayos de viabilidad celular y que posteriormente se emplearon para encapsular células bacterianas mediante la formación de microgotas.

Al realizar experimentos de viabilidad celular dentro de microgotas, se observó que a flujos bajos las microgotas varían de tamaño y que éstas presentan variaciones en el número de células bacterianas. Aun así se observa en las pruebas control (detección de células vivas en función del tiempo) que el número de células no aumenta o disminuye significativamente.

Con el método desarrollado para la detección y cuantificación de células viables por microscopia de fluorescencia a flujo de agua de 0 $\mu\text{L/hr}$ (en ausencia de aceite) y con los microchips empleados, se logró seguir la cinética antibacterial de la ampicilina a distintas concentraciones (500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$). En estos experimentos se observó una tendencia donde el número de células verdes disminuye, mientras que el número de células rojas aumenta. Sin embargo, éstas últimas nunca llegan a igualar el número inicial de células verdes.

Al realizar los experimentos dentro de microchips formando microgotas en presencia de ampicilina a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, se observa que el número de células verdes disminuye, mientras que el número de células rojas se incrementa, pero después, entre los 180 min y 260 min, comienza a decaer. Posiblemente esto se deba a que la membrana celular se rompe por completo liberando el ADN contenido.

En cuanto a los ensayos con kanamicina (125 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$), no fue posible encontrar una tendencia de la disminución del número de células verdes y/o el incremento de células rojas.

6 TRABAJO A FUTURO.

A partir de los experimentos descritos en ésta tesis, se podrá justificar el uso de microchips de microfluídica para realizar ensayos rápidos para el descubrimiento de compuestos que presenten propiedades antimicrobianas.

Uno de los objetivos a futuro es unificar el método de tinción optimizado con el método propuesto por Romero García²⁵ para la detección de células viables por medio de fluorescencia inducida por láser. Este método permitiría el tratamiento de una mayor cantidad de datos, además de que eliminarían las variaciones en el tamaño de las microgotas que se generaron por el uso de flujos bajos.

En el laboratorio 309 de Biofísicoquímica se pretende acoplar el microchip desarrollado en el presente trabajo a un HPLC que permita la detección automática de nuevos antimicrobianos; y con ello facilitar y agilizar el trabajo en el laboratorio.

7 LITERATURA CITADA

1. Mike May. Time for teamwork. *Nature* Vol **509**, 84-85 (2014).
2. Organización Mundial de la Salud. Estadísticas sanitarias mundiales. 1-15 (2014). en <<http://www.who.int>>
3. Biggerstaff, J. P. *et al.* New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol. Cell. Probes* **20**, 141-6 (2006).
4. García Rodríguez, J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiol. Clin.* 1-54 (2000).
5. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368-373 (2006).
6. Song, H., Chen, D. L. & Ismagilov, R. F. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 7336-7356 (2006).
7. Beebe, D. J., Mensing, G. a & Walker, G. M. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 261-286 (2002).
8. Lapizco Encinas, B. . Aplicaciones de Microfluídica en Bioseparaciones. *Rev. Mex. Ing. Química* **7**, 205-214 (2012).
9. Yager, P. *et al.* Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* **442**, 412-418 (2006).
10. Bolufer, P. El auge de la microfluídica. *Farmaespaña Ind.* **08**, 1-4 (2008).
11. Fair, R. B. *Digital microfluidics: Is a true lab-on-a-chip possible?* *Microfluid. Nanofluidics* **3**, (2007).
12. Wong, I. & Ho, C. M. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluid. Nanofluidics* **7**, 291-306 (2009).
13. Calderón Lumbreras, J. C. Diseño, construcción y funcionamiento de microchips, aplicados a

- microfluidos a través de dos métodos de microfabricación. (2012).
14. Penichet, C. P. Procesamiento e interpretación de imágenes en micro-flujos bacterianos. (2009).
 15. Fernández, R. Microfluidos: Nuevas Fronteras. *Rev. Cuba. Física* **28**, 60-67 (2011).
 16. McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R. & Chiu, D. T. Review - Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Electrophoresis* **21**, 27-40 (2000).
 17. Godbey, W. T. *Microbial Killing: An Introd. to Biotechnol.* (Elsevier Ltd., 2014). doi:10.1016/B978-1-907568-28-2.00006-X
 18. Barer, M. R. & Harwood, C. R. Bacterial Viability and Culturability. *Adv. Microb. Physiol.* **41**, 94-102 (1999).
 19. Stocks, S. M. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytom. Part A* **61**, 189-195 (2004).
 20. Jones, K. H. & Senft, J. A. An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *J. Histochem. Cytochem.* (1985). doi:10.1177/33.1.2578146
 21. Wilks, S. A., Azevedo, N. F., Vieira, M. J. & Keevil, C. W. Validation of SYTO 9 / Propidium Iodide Uptake for Rapid Detection of Viable but Noncultivable *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* **58**, 56-62 (2009).
 22. Molecular Probes. *LIVE / DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kits.* (2004).
 23. Shrivastava, S., Bera, T. & Roy, A. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* **22**5103, 1-9 (2007).
 24. Vazquez Sanchez, B. Implementación de un sistema láser para detección continua de fluorescencia dentro de microgotas. (2012).
 25. Romero García, A. Viabilidad de células de *E. coli* BL21 dentro de microgotas en microchips por medio de fluorescencia inducida por láser. (2014).

-
26. Micro Chem. *SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist Processing Guidelines for: SU-8 2000.5, SU-8 2002, SU-8 2005, SU-8 2007, SU-8 2010 and SU-8 2015.* (2015).
 27. Molecular Probes. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain. 99-101 (1999).
 28. Zotta, T., Guidone, a., Tremonte, P., Parente, E. & Ricciardi, a. A comparison of fluorescent stains for the assessment of viability and metabolic activity of lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 919-927 (2012).
 29. Novak, I., Asadinezhad, A. & Nova, I. A Physicochemical Approach to Render Antibacterial Surfaces on Plasma-Treated Medical-Grade PVC : Irgasan Coating. *Plasma Process. Polym.* **7**, (2010).
 30. Lawrence, K. & Anthony, M. The Effects of Ampicillin on the Growth of Escherichia coli. 27695 (2013).

8 ANEXO.

8.1 Determinación del número de unidades formadoras de colonias por mililitro de un cultivo de *E. coli* (preparado a partir de un cultivo incubado por 16 hr), por el método de macrodilución.

Con la finalidad de tener un valor experimental del número de colonias presentes a diferentes $OD_{600\text{ nm}}$. Se realizaron experimentos mediante el método de macrodilución, sembrando una alícuota de 100 μL de diluciones de cultivos de *E. coli*. Con los resultados presentados en éste apartado, se pretende comparar el número de células viables y no viables observadas en el microchips con el número de colonias que crecen en cajas Petri.

Se realizaron tres experimentos, los cuales consistieron en la preparación de cultivos en medio líquido incubados por 16 horas de *E. coli BL21(DE3)*. A partir de dichos cultivos se tomaba una alícuota para preparar un cultivo "fresco", esto con el fin de disminuir el número de células que podrían encontrarse muertas dentro del cultivo incubado por 16 horas.

Una vez que se determinó la densidad óptica del cultivo "fresco", se realizaron una serie de diluciones (1:100, 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000, 1:10 000 000), tomando en cuenta el valor teórico reportado de 2×10^9 CFU/mL (donde CFU son las unidades formadoras de colonias) para una densidad óptica (OD) de 1.0 a 600 nm²³. Luego, se tomaron alícuotas de 100 μL de las diluciones (1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000, 1:10 000 000) y se dejaron crecer en cajas Petri con agar.

Finalmente se determinó el número de CFU/mL obtenidos a partir de la cuenta de las colonias realizadas en cada caja Petri. A partir de los números correspondientes de cada experimento, fue posible obtener una gráfica con el valor promedio (Figura 79).

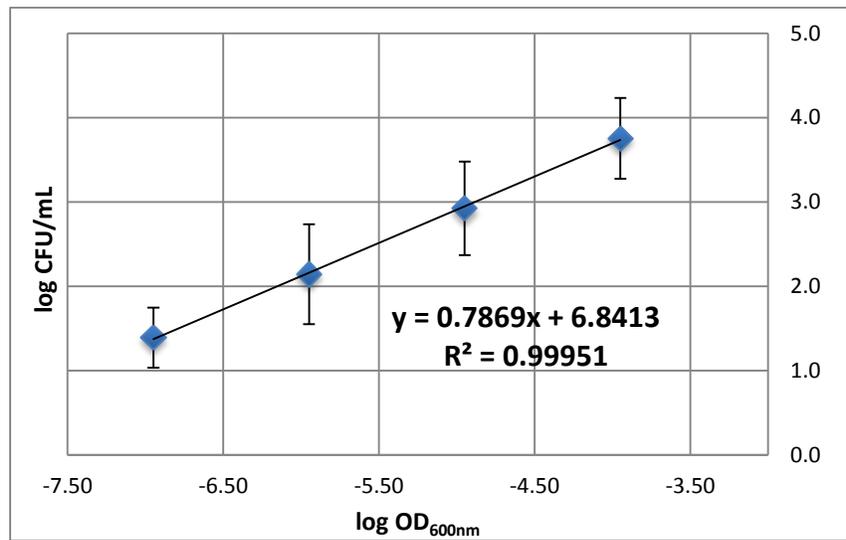


Figura 79. Promedio de los experimentos realizados para obtener el valor de CFU/mL para una $OD_{670nm} = 1.0$. Se muestra el log de CFU/mL vs log OD_{600nm} obtenidos a partir de las colonias que crecieron en cajas Petri de un cultivo de células vivas de *E. coli* (diluciones 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000, 1:10 000 000).

Con éstos resultados fue posible obtener un valor experimental de 3.03×10^6 CFU/mL para una OD_{600nm} de 1.0, mediante la extrapolación de la recta.