UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE MEDICINA ESCUELA DE POSTGRADO



"DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE MANIPULACIÓN Y VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA PARA CARACTERIZAR BIOPELÍCULAS DE P. MIRABILIS"

KARLA NATHALY CHANDÍA GAMBOA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN INFORMÁTICA MÉDICA.

Director de Tesis: Víctor Castañeda Zeman PhD.

Codirector de Tesis: Steffen Härtel PhD.

Con mucho cariño...

A quién llego a iluminar mi mundo

Miel

Agradecimientos

Quisiera reconocer a muchas personas involucradas en este largo proceso de tesis:

A mi madre Sonia y mi padre Ramón por su comprensión y apoyo infinito, porque en aquellos momentos donde no fui capaz de creer en mí, ellos sí lo hicieron. Sin su sostén, sería imposible estar escribiendo estás palabras.

A mi hermano Claudio por su humor implacable y cariño incondicional.

A mi familia materna, mi abuela Nena, mis tías, tíos, primas y primos, por sus palabras de aliento en los oscuros momentos de frustración.

A mi familia paterna, mis abuelos Cori y Juan Emilio, a mis tíos y primas, que siempre han sido un ejemplo de esfuerzo y perseverancia.

A los que siempre están en mi corazón: Santos y Moka y los amigos que este largo camino me regalo: a Nicole por compartir sus conocimientos de microbiología conmigo y por ser la mejor compañera de viaje que pude tener, a Lucas por sus largas conversaciones, gran compromiso y por llegar juntos a nuestro mayor logro como físicos "crear unas pinzas ópticas desde una mesa vacía", a Jorge Toledo por su increíble apañe y porque la pasión que coloca en su trabajo es digna de admiración, a Daniel por nunca permitirme dudar que este proyecto llegaría a puerto y a Jorge Jara por escucharme, aconsejarme y por estar presente cada vez que lo necesite.

Al personal del Laboratorio SCIAN-Lab por su buena disposición para colaborar en este proyecto y responder mis inquietudes y a la Dra. Eugenia Díaz por su apoyo leyendo infinitas veces este escrito y confiar en mi trabajo.

Esta tesis fue parte de los proyectos: FONDECYT 1181823 "5D Image Processing and Physical Models for the Quantification of Cell Migration and Multicellular Architecture with 4-Lens Light Sheet Fluorescence Microscopy" (2018-2021), FONDECYT Iniciación 11170475 "Deep-Learning Based Segmentation for the Analysis of Large Biomedical Imaging" (2017-2020) y se desarrollo en el Instituto de Neurociencia Biomédica BNI, ICM P09-015-F.

Índice

Dedicat	toria	iii
Agradeo	cimientos	iv
Índice		v
Índice d	de Tablas	vii
Índice d	de Figuras	vii
Resume	en	1
Abstrac	rt	3
1.	Introducción	5
1.1.	Contexto clínico	5
1.1.1	Impacto de las infecciones nosocomiales y relevancia de las infecciones de	l tracto
urinario	o (ITU) en este grupo	5
1.1.2	ITU asociadas al uso de CUP	6
1.1.3	Relevancia de P. mirabilis en las ITU	7
1.2	Biopelículas	8
1.2.1	Biopelículas como mecanismo de extensión de la infección (supervivencia)8
1.2.2	Etapas y desarrollo de las Biopelículas	8
1.2.3	Biopelículas de P. mirabilis	10
1.3 Te	écnicas y herramientas actuales de microscopia utilizadas en estudios de biopel	ículas 12
1.3.1 Pi	nzas ópticas	13
1.3.2 M	licroscopio de Fluorescencia Light Sheet (LSFM)	15
1.4. I	Problema/ Oportunidad de Investigación	16
2.	Hipótesis	19
3.	Objetivo general	19
4.	Objetivos Específicos	19
5.	Materiales y Método	20
5.1.	Implementación de protocolos de cultivos y procesamiento de imágenes	20
5.1.1 Di	iseño del Protocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Estático	20
5.1.2 Im	nplementación Protocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Estático	21

	5.1.2.1 Protocolo de cultivo	21
	5.1.2.2 Protocolo de inmunofluorescencia	22
5.1	.2.1 Diseño del Protocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Dinámico	23
5.1	.2.2 ImplementaciónProtocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Dinámico	.25
5.2.1 A	dquisición de imágenes	27
5. 2.2 P	Procesamiento de imágenes	29
5.3.	Diseño e implementación de un sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM de	
cuatro	o objetivos	29
6.	Resultados	33
6.1	Protocolos de cultivo	33
6.2	Procesamiento de imágenes ópticas.	33
6.3	Diseño e implementación de un sistema de pinzas ópticas	37
7.	Discusión	42
8.	Conclusiones	46
9.	Bibliografia	48
10.	Anexo	51

Índice de Tablas

Tabla 1. Concentración de fluoróforos	22
Índice de Figuras	
Figura 1 - Diagrama sobre el desarrollo de una biopelícula en sus cinco etapas	9
Figura 2 - Factores de virulencia en la formación de biopelículas cristalinas	11
Figura 3 - Descripción de la óptica de rayos que genera el gradiente de fuerza	14
Figura 4 - Configuración LSFM de cuatro objetivos	15
Figura 5 - Etapas del protocolo de cultivo y visualización de biopelícula de <i>P.mirabia</i> mediante método estático.	
Figura 6 - Protocolo de cultivo y visualización de biopelícula de <i>P.mirabilis</i> mediante métodinámico	
Figura 7 - Esquema representativo de los parámetros morfológicos escogidos para caracteriz biopelículas de <i>P. mirabilis</i> .	
Figura 8 - Diseño de un sistema de pinzas ópticas acoplados a un LSFM de 2 objetivos	30
Figura 9 - Diseño del sistema de visualización-manipulación de pinzas ópticas acopladas LSFM de cuatro objetivos.	
Figura 10 - Detalle de cúmulos de la biopelícula dentro del tubo FEP	33
Figura 11 - Reconstrucciones 3D.	34
Figura 12 - Superficie colonizada para ambos métodos de cultivo	35
Figura 13 - Volumen de biopelícula para ambos métodos de cultivo	35
Figura 14 - Diseño e implementación del sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM	37

Figura 15 - Fotografia del sistema de pinzas ópticas	38
Figura 16 - Fotografía del sistema de pinzas ópticas	38
Figura 17 -Biopelícula fijada dentro de tubo FEP, sometida a la aplicación de production (t=55 s)	-
Figura 18 -Biopelícula fijada dentro de tubo FEP, sometida a la aplicación de p	oinza óptica
(t=60 s)	39

Resumen

Las infecciones nosocomiales del tracto urinario (ITU) asociadas al uso de catéter urinario permanente (CUP) son las más habituales a nivel mundial, siendo *Proteus mirabilis* uno de los patógenos más frecuentes en este tipo de infecciones. Esta bacteria oportunista, es capaz de causar infecciones graves, llegando en casos extremos a causar la muerte del paciente.

P. mirabilis es una bacteria productora de ureasa, enzima que colabora en la generación de cálculos urinarios infecciosos, siendo la principal causa de incrustaciones en los CUP, obstruyendo el flujo de la orina y favoreciendo que la infección ascienda hacia el riñón, para luego cruzar al torrente sanguíneo. P. mirabilis causa ITUs más agresivas debido a que produce un 30% más de ureasa que otras especies, siendo dicha enzima capaz de hidrolizar 6 a 10 veces más rápido la urea en la orina, lo que acelera el proceso infeccioso.

P. mirabilis es además una bacteria formadora de biopelículas. Las biopelículas son comunidades bacterianas tridimensionales, con características funcionales y estructurales complejas. Debido a estas características, las bacterias en biopelículas han demostrado tener mayor tolerancia a los agentes antibióticos que bacterias planctónicas (de vida libre) de la misma cepa.

El 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), incluyó a todas las especies de *Proteus sp.* en la lista de "patógenos prioritarios" debido al gran incremento en su resistencia antibiótica, razón por la cual resulta indispensable la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para tratar las infecciones producidas por bacterias formadoras de biopelículas altamente resistentes, como es el caso de *P. mirabilis*.

La importancia médica y de salud pública de este patógeno, unida al desarrollo de nuevas tecnologías para el estudio de sistemas microbiológicos, nos motivan a proponer la generación de un sistema experimental controlado que emula las condiciones reales de un catéter urinario ubicado en una vejiga, con el propósito de estudiar las características generales de las biopelículas de *P. mirabilis*, incluyendo la implementación de un sistema de visualización – manipulación en tiempo real, en Microscopía de Fluorescencia *Light Sheet* (LSFM).

Dentro de los principales resultados obtenidos en esta tesis, se encuentra el desarrollo de un sistema experimental que emula las condiciones reales de un catéter urinario ubicado en la vejiga. Para esto, se adaptó el protocolo clásico de cultivo de *P. mirabilis* sobre cubreobjetos, trasladándolo a tubos de etileno propileno fluorado (FEP), los que, además de su forma cilín-

drica, tienen un índice de refracción similar al del agua, lo que permite su observación sin dificultad en sistemas ópticos. Posteriormente, se implementó un sistema estático de cultivo en tubos FEP y un sistema dinámico, siendo este último complementado con el desarrollo de un sistema de flujo capaz de generar un caudal controlado dentro del FEP ubicado en la cámara de captura del LSFM. Este sistema de flujo y las características funcionales del LSFM permitieron obtener filmaciones extensas donde se observó el desarrollo completo de la biopelícula dentro del FEP. La implementación de este sistema dinámico logra simular de manera adecuada el desarrollo de biopelículas en CUP con flujos de orina.

Las imágenes obtenidas permitieron realizar una comparación entre los sistemas de cultivo estático y dinámico mediante la observación de los cambios generados en la biopelícula, bajo ambos métodos. Se pudo determinar que las características morfológicas más relevantes de analizar son la superficie colonizada y el volumen ocupado por la biopelícula en el tubo.

Mediante el análisis de datos fue posible estimar que la maduración completa de la biopelícula se logró un día antes en el método dinámico que en el método estático.

Paralelo a lo anterior, se adaptó un diseño de pinzas ópticas acoplable a la configuración actual del LSFM de cuatro objetivos, con el fin de obtener un sistema completo de visualización y manipulación microscópica en tiempo real.

- Este trabajo de tesis fue presentado en *Make Health Chile, Health Data Science: Conference and Workshops* (junio 2019). También fue divulgado en el programa radial "Aire Fresco", en una entrevista a las investigadoras jóvenes Karla Chandía y Nicole Canales por su investigación conjunta en resistencia a los antibióticos en infecciones urinarias (Radio Duna 89.7 FM, marzo 2020).
- Se adjudicó el proyecto "Capacitaciones en *Biofilm*: una respuesta para superar las bacterias multi resistentes" en conjunto con el Departamento de Microbiología del Institutos de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, del Uruguay (Agencia Chilena de Cooperación Internacional para el Desarrollo, septiembre 2019).

Abstract

Nosocomial urinary tract infections (UTI) associated with the use of indwelling urinary catheter (CUP) are the most common worldwide UTI, with *Proteus mirabilis* being one of the most frequent pathogens in this type of infection. This opportunistic bacterium is capable of causing serious infections, even causing death in extreme cases.

P. mirabilis produces urease, an enzyme that collaborates in the generation of infectious urinary calculi, being the main cause of incrustations in the CUP, obstructing the flow of urine thus favoring the spread of the infection to the kidney and crossing later into the bloodstream. *P. mirabilis* causes more aggressive UTIs because it produces 30% more urease than other species, and its enzyme is capable of hydrolyzing the urea present in the urine 6 to 10 times faster, which accelerates the infectious process.

P. mirabilis is also a biofilm-forming bacterium. Biofilms are three-dimensional bacterial communities with complex functional and structural characteristics. Because of these characteristics, bacteria in biofilms have been shown to be more tolerant to antibiotic agents than planktonic (free-living) bacteria of the same strain.

In 2017, the World Health Organization (WHO) included all species of *Proteus sp.* in the list of "priority pathogens" due to the great increase in their anti-biotic resistance, reason why it is essential to search for new therapeutic targets to treat infections caused by highly resistant biofilm-forming bacteria, such as *P. mirabilis*.

The medical and public health importance of *P. mirabilis*, together with the development of new technologies for the study of microbiological systems, allowed us to propose the generation of a controlled experimental system that emulates the real conditions of a urinary catheter located in the bladder, in order to study the general characteristics of *P. mirabilis* biofilms, including the implementation of a real-time visualization-manipulation system in Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM).

Among the main results obtained in this thesis, is the development of an experimental system that emulates the real conditions of a urinary catheter located in the bladder. For this purpose, the classical protocol for culturing *P. mirabilis* on coverslips was adapted and transferred to fluorinated ethylene propylene (FEP) tubes. These FEP tubes were chosen because of their cylindrical shape and because they have a refractive index similar to that of water, which

allows them to be easily observed in optical systems. Subsequently, a static FEP tube culture system and a dynamic system were implemented, the latter being complemented by the development of a flow system capable of generating a controlled flow within the FEP, located inside the LSFM capture chamber. This flow system and the functional characteristics of the LSFM allowed obtaining extended films where the complete development of the biofilm inside the FEP was observed. The implementation of this dynamic system can adequately simulate the development of biofilms in CUP with urine flows.

The images obtained allowed a comparison between the static and dynamic culture systems by observing the changes generated in the biofilm cultivated under the two methods. Preliminary analysis allowed us to determine that the most relevant morphological characteristics to analyze are the colonized surface and the volume occupied by the biofilm in the tube.

Thanks to the data analysis, it was possible to estimate that the complete maturation of the biofilm (stage 4) was achieved one day earlier in the dynamic method than in the static method.

Parallel to the above, an optical tweezers design was adapted to the current four-objective LSFM configuration, in order to obtain a complete system for real-time microscopic visualization and manipulation.

This thesis was presented at Make Health Chile, Health Data Science: Conference and Workshops (June 2019). It was also presented on the radio program "Aire Fresco", in an interview with young researchers Karla Chandía and Nicole Canales for their joint research on antibiotic resistance in urinary tract infections (Radio Duna 89.7 FM, March 2020).

It was also awarded the project "Capacitaciones en *Biofilm*: una respuesta para superar las bacterias multi resistentes", in conjunction with the Department of Microbiology of the Clemente Estable Biological Research Institute of Uruguay (Chilean Agency for International Development Cooperation, September 2019).

1. Introducción

En esta sección se presentan conceptos generales de los dos temas fundamentales a tratar en este trabajo de tesis. Se aborda inicialmente el contexto clínico en el que se enfoca el trabajo. A continuación, se introducen conceptos de microbiología, así como de las herramientas microscópicas utilizadas en este trabajo.

1.1. Contexto clínico

1.1.1 Impacto de las infecciones nosocomiales y relevancia de las infecciones del tracto urinario (ITU) en este grupo

Se consideran infecciones nosocomiales aquellas que el paciente adquiere durante su permanencia en un centro de atención de salud, las que en su mayoría están relacionadas a procedimientos asistenciales invasivos. Se contempla una ventana de 48 horas luego del ingreso del paciente, para que una infección sea considerada nosocomial, de manera que las infecciones presentes, o en periodo de incubación, al momento del ingreso no pertenecen a este grupo (Pujol & Limón, 2013).

Este tipo de infecciones genera un importante problema de salud pública, con repercusiones económicas y humanas crecientes, las que contribuyen a la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Se sostienen en el tiempo debido a cuatro pilares fundamentales: i) aumento del hacinamiento en centros de atención de salud, ii) declive del sistema autoinmune, iii) surgimiento de nuevas cepas bacterianas y iv) aumento de la resistencia de las cepas ya existentes a los antibióticos actuales.

Se estima que un 8,7% de los pacientes hospitalizados a nivel mundial, presentan este tipo de infecciones, dado que la mayoría de los tratamientos administrados durante la estancia hospitalaria están asociados al suministro de antibióticos (Girard *et al.*, 2012). Durante el periodo de exposición a estos, el surgimiento de cepas bacterianas fármaco-resistentes ocurre mediante mecanismos de transferencia genética. También resultan afectados directamente los microorganismos de la flora bacteriana propia, disminuyendo su tasa de proliferación si presentan sen-

sibilidad al antibiótico administrado, favoreciendo de este modo el crecimiento de las cepas infecciosas resistentes (Girard *et al.*, 2012).

A nivel mundial, las ITU constituyen la patología más común dentro del conjunto de las infecciones nosocomiales, siendo el uso de catéter urinario permanente (en adelante CUP) la causa principal asociada a su desarrollo en prácticamente el 80% de los casos. (Pigrau, 2013). Este patrón se repite a nivel nacional, donde el procedimiento más frecuente asociado a una ITU nosocomial es la instalación del CUP (Otaíza *et al.*, 2017). Estudios realizados en Chile demuestran que el uso de CUP genera un alto costo en salud pública, aumentando un estimado de 12,7 días-camas extras y generando costos casi cuatro veces mayores que los casos que no presentan este tipo de infecciones (Kappes & Riquelme, 2018).

1.1.2 ITU asociadas al uso de CUP

Una ITU se define clínicamente como la presencia y multiplicación de microorganismos en la vía urinaria con invasión hacia los tejidos, pudiendo o no presentar sintomatología. La *Food and Drug Administration* (FDA) recomienda que para que el examen de orina se considere positivo para ITU, este debe arrojar un recuento de 100.000 o más UFC¹/ml de bacterias en orina (Olea *et al.*, 2011; Pigrau, 2013).

El CUP favorece la adquisición de una ITU nosocomial al perturbar los mecanismos defensivos del paciente y facilitar el acceso de patógenos a la vejiga, especialmente durante el procedimiento de inserción de la sonda (sondaje). Los agentes patógenos proceden principalmente de la piel, recto y zona periuretral o de la bolsa recolectora de orina del mismo paciente. Cabe señalar que este procedimiento requiere un importante grado de manipulación, durante la cual pueden incluso llegar a depositarse microorganismos presentes en las manos del personal que lo ejecuta.

Los patógenos que se desarrollan en las vías urinarias, agrupados bajo la denominación de 'uropatógenos', ascienden tanto por vía extra-transluminal (entre el CUP y la mucosa uretral) o intra-luminal (el interior del CUP). Conjuntamente, se debe considerar que la bacteriuria, es decir, el incremento asintomático del número de bacterias en la orina, aumenta proporcionalmente al tiempo del sondaje (Pigrau, 2013).

_

¹ Unidad Formadora de Colonia.

1.1.3 Relevancia de P. mirabilis en las ITU

Es común que alrededor de los CUPs las bacterias formen biopelículas tanto intra y/o extra luminales. Dado ese hecho, los CUPs facilitan la colonización vesical ya que suministran a las bacterias una superficie a la cual adherirse y sobre la cual proliferar.

Especies bacterianas, como *Pseudomona aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* y los géneros *Proteus sp* y *Providencia sp*, generan biopelículas con capacidad para hidrolizar la urea de la orina, pudiendo llegar a producir incrustaciones al aumentar el pH y, en consecuencia, facilitar la precipitación de minerales y la producción de cristales de hidroxiapatita y estruvita. Estas incrustaciones pueden causar la obstrucción del flujo de la orina por el CUP. Actualmente ningún tipo de catéter es capaz de resistir *in vitro* las incrustaciones de biopelículas por *Proteus mirabilis* (Norsworthy & Pearson, 2017).

Aunque *P. mirabilis* es un microorganismo intestinal conocido por cruzar externamente a la uretra, generalmente no causa infecciones urinarias en pacientes con vías urinarias normales y sin obstrucciones. Sin embargo, la presencia de un CUP dentro de la uretra y la vejiga favorece la ascensión de las bacterias hacia el sistema urinario. Para lograr esto, *P. mirabilis* suele emplear la estrategia de *swarming*, donde las bacterias se alargan, se vuelven hiperflageladas y se trasladan como una comunidad coordinada a través de las superficies. En particular, *P. mirabilis* puede generar un gran impacto patogénico, ya que forma grandes grupos intraluminales que pueden extenderse a lo largo de toda la vejiga urinaria. Es importante destacar que estas agrupaciones de patógenos contribuyen a la formación de cálculos. Después de ingresar a la vejiga, *P. mirabilis* puede ascender al riñón, causar la formación de cálculos renales y cruzar hacia el torrente sanguíneo (Norsworthy & Pearson, 2017).

La formación de biopelículas es un proceso complejo que depende de una amplia gama de genes bacterianos. Las diferentes proteínas de superficie de las células bacterianas pueden desempeñar un papel clave en este proceso. En particular, *P. mirabilis* codifica 17 supuestos operones fimbriales, el mayor número encontrado en cualquier especie bacteriana secuenciada hasta el momento. Se ha evaluado la contribución a la infección de algunas de estas estructuras, pero se sabe poco sobre su contribución a la adherencia del catéter y la formación de biopelículas (Scavone *et al.*, 2016).

En febrero del 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó por primera vez una lista con los "patógenos prioritarios" resistentes a antibióticos, en la que se incluyen las 12

familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. El grupo de prioridad lo lideran las bacterias que causan infecciones nosocomiales. Esta lista fue dividida en tres categorías: Prioridad 1 "Crítica", Prioridad 2 "Elevada" y Prioridad 3 "Media". Dentro del primer grupo, consideradas las bacterias "críticas", se encuentra la familia *Enterobacteriaceae*, que incluyen todas las especies de *Proteus* (Tacconelli, 2017).

A nivel nacional, *P. mirabilis* ocupa el quinto lugar de las ITU asociadas al uso de catéter en pacientes sometidos a cirugías en Chile, representando alrededor de un 6,5% de las infecciones totales en estos procedimientos. Mientras que, en procedimientos relacionados a medicina interna y UPC², ocupa el quinto y sexto lugar, respectivamente (Otaíza *et al.*, 2017).

1.2 Biopelículas

1.2.1 Biopelículas como mecanismo de extensión de la infección (supervivencia)

Las biopelículas son complejas formaciones tridimensionales organizadas, con características funcionales y estructurales complejas, formadas por una comunidad de uno o varios tipos de bacterias (generalmente mono-bacterianas) adheridas a una superficie y recubiertas por una sustancia polimérica extracelular (EPS, por sus siglas en inglés) que las protege. El comportamiento bacteriano difiere entre células planctónicas (libres) y biopelículas, siendo estas últimas las que reflejan el comportamiento natural de los procesos infecciosos (Costerton, 1999). Cabe destacar que las bacterias que conforman biopelículas han demostrado tener una mayor tolerancia a los diversos agentes antibióticos, comparado con las bacterias planctónicas de la misma cepa (Verderosa *et al.*, 2019).

1.2.2 Etapas y desarrollo de las Biopelículas

En la formación de las biopelículas se distinguen cinco etapas: 1) Adhesión reversible, 2) Adhesión irreversible, 3) Maduración I, 4) Maduración II y 5) Dispersión, las que se ilustran en la Figura 1. La primera etapa, conocida como "Adhesión reversible", contempla la migración de un pequeño grupo de células planctónicas que se adhieren a una superficie; para que esto suceda las bacterias deben ser capaces de "reconocer" o "reaccionar" a una superficie (o

-

² Unidad de Paciente Critico

interface), lo que logran liberando moléculas de señalización (mediante un mecanismo denominado *quorum sensing*). En la segunda etapa, llamada "Adhesión irreversible", las células ya adheridas a la superficie exudan substancias exopoliméricas (EPS por sus siglas en inglés), es decir, una mezcla de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y polisacáridos, que ayuda a asegurar la biopelícula a la superficie, atrapa nutrientes, proporciona apoyo estructural y protege a la comunidad bacteriana de la respuesta inmune del huésped y de los tratamientos antibióticos. La exudación de EPS da lugar a la agregación celular y formación de la matriz, que conlleva a que el proceso pase a ser irreversible. En la tercera etapa, "Maduración I", se empiezan a desarrollar micro-colonias y la arquitectura de canales de agua. En la siguiente etapa, esto es "Maduración II", la biopelícula termina de madurar alcanzando su mayor densidad celular. Durante este proceso es fundamental el *quorum sensing* para el control de la densidad de la biopelícula y evitar que llegue a un nivel insostenible, debido a que en la última etapa "Dispersión", la biopelícula madura libera células planctónicas que buscan nuevas superficies libres a la cual adherirse, extendiéndose de este modo la infección (Verderosa et al., 2019).

Se ha demostrado que el mecanismo *quorum sensing* es fundamental para la sobrevida de la biopelícula, ya que favorece una respuesta unificada (comportándose como un organismo multicelular), la adaptación a cambios ambientales a nivel externo, la propagación de mutaciones beneficiosas, el acceso de nutrientes y la tolerancia antibiótica a nivel interno (Hannan et al., 2010).

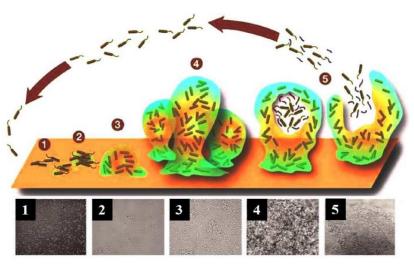


Figura 1 - Diagrama sobre el desarrollo de una biopelícula en sus cinco etapas. Etapa 1: Adhesión reversible; Etapa 2: Adhesión irreversible; Etapa 3: Maduración I, Etapa 4: Maduración II y Etapa 5: Dispersión. Cada una de las etapas esquematizadas se acompaña de una imagen de microscopia óptica (Stoodley et al., 2002).

La composición de la matriz de una biopelícula afectaría fundamentalmente su comportamiento mecánico, el cual además varía si el estudio se realiza en medios bacterianos líquidos o en biopelículas *in vitro* o *in vivo*, siendo estos dos últimos métodos los que proporcionan imágenes más similares a la realidad. Esto pone en evidencia la importante necesidad de estudiar biopelículas en contextos nativos. Otro factor importante es la permeabilidad de la biopelícula, factor que está directamente relacionado con sus propiedades mecánicas, ya que características tales como el tamaño de los poros o la estructura interna de la matriz, perturban directamente el comportamiento permeable y mecánico de cada biopelícula, además de ser específicas para cada especie (Billings *et al.*, 2015).

1.2.3 Biopelículas de P. mirabilis

Las ITU en CUP provocadas por *P. mirabilis* tienen una alta probabilidad de complicaciones debido a la capacidad única de esta bacteria para formar biopelículas cristalinas en las superficies de los catéteres. Lo anterior, en virtud de su biomineralización ureolítica, la que eventualmente provoca bloqueos e incrustaciones dentro de los catéteres, lo que contribuye al desarrollo de infecciones urinarias ascendentes. Las bacterias incrustadas en biopelículas cristalinas se vuelven altamente resistentes, tanto a los antimicrobianos convencionales, así como al sistema inmune del paciente. Al ser *P. mirabilis* refractario al tratamiento antimicrobiano, muchos estudios han buscado enfoques alternativos para erradicar las biopelículas que forman estas bacterias.

Entre los factores de virulencia más destacados de *P. mirabilis* se encuentran: su capacidad de formar biopelículas mediante adhesión, su adquisición de nutrientes, la motilidad de *swar-ming*, el poseer diferentes tipos de fimbrias, ser productora de ureasa así como de polisacárido capsular (CPS) y tener bombas de eflujo (Wasfi *et al.*, 2020). *P. mirabilis* ha sido la bacteria gram-negativa con el mayor número de operones fimbriales identificados mediante la secuenciación de su genoma completo, lo que conlleva a una mayor capacidad de adhesión (Scavone *et al.*, 2016).

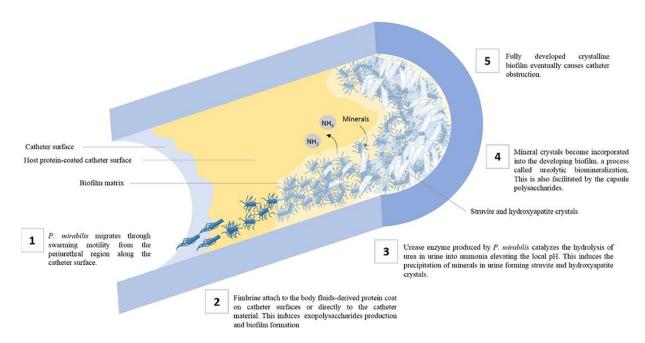


Figura 2 - Factores de virulencia en la formación de biopelículas cristalinas por P. mirabilis en las superficies del catéter (Wasfi et al., 2020).

La principal característica de *P. mirabilis* es su motilidad de *swarming*. La necesidad de una superficie para el desarrollo de la biopelícula provoca la diferenciación de las "células nadadoras" con forma de bacilos cortos en "células *swarmer*", de forma alargada e hiperflageladas, capaces de unirse en comunidades multicelulares. Estas comunidades migran coordinadamente hacia superficies libres cercanas (Stickler & Hughes, 1999), facilitando la infección urinaria ascendente. Cabe señalar en este punto, que ciertas mutaciones en *P. mirabilis* se han relacionado con la capacidad de motilidad de *swarming*, dificultado la colonización en CUP (Jones *et al.*, 2005).

Por otra parte, la capacidad de *P. mirabilis* para diferenciar sus "células nadadoras" en células alargadas y altamente flageladas cuando entra en contacto con una superficie, va acompañada de un aumento sustancial en la producción de ureasa (Fraser *et al.*, 2002). Por lo tanto, su capacidad de motilidad *swarming*, se ve favorecida en un ambiente con flujo constante de orina, acelerando así la producción de biopelículas en los catéteres.

1.3 Técnicas y herramientas actuales de microscopia utilizadas en estudios de biopelículas

Desde el punto de vista molecular, las biopelículas empezaron a ser estudiadas ampliamente a partir de los años 90. Los estudios que se han enfocados en su comportamiento físico son mucho más recientes. Con los últimos avances tecnológicos en el desarrollo de herramientas para manipular objetos micrométricos, tales como pinzas ópticas, pinzas magnéticas, espectroscopia de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés), aspiración de micro-pipetas, reómetro de micro-placas, micro-reología de seguimiento de partículas y dispersión dinámica de la luz (DLS), se ha dado de forma natural y frecuente su uso en el campo de los sistemas biológicos. A través de dichas herramientas es posible describir parámetros físicos, desde el punto de vista de la mecánica de materiales, aplicando fuerzas y estudiando el desplazamiento de sistemas en función de la carga impuesta.

Los materiales biológicos presentan, en general, un comportamiento viscoelástico, ya que, al ejercer fuerza sobre ellos, almacenan una parte de su energía, mientras que disipan otra. Se han descrito parámetros mecánicos como: viscosidad, tiempo de relajación y módulo de Young (parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en la que se aplica la fuerza) para diferentes cepas bacterianas. Sin embargo, el comportamiento bacteriano difiere entre una célula planctónica versus una biopelícula y hasta el momento solamente se han descrito mecánicamente las biopelículas de Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa mediante técnicas de reología y microrreología pasiva (Araújo et al., 2019).

En resumen, diversas técnicas y herramientas de microscopia han sido utilizadas para el estudio de biopelículas de diferentes cepas bacterianas. Entre las herramientas y técnicas más actuales se encuentran: la microscopía de fuerza atómica (AFM), la micro manipulación, el reómetro, el balance de Langmuir y las pinzas ópticas. (Araújo *et al.*, 2019). Estas últimas se describen en detalle a continuación.

1.3.1 Pinzas ópticas

Las pinzas o trampas ópticas son instrumentos que, a partir de un rayo láser altamente enfocado, generan una fuerza atractiva o repulsiva con el propósito de sujetar y/o mover físicamente objetos dieléctricos microscópicos. La fuerza generada por la pinza es del orden del pico-newton y depende del índice de refracción entre la partícula dieléctrica y el medio.

El punto más estrecho del haz enfocado, denominado cintura del haz, contiene un gradiente de campo eléctrico. Las partículas dieléctricas son atraídas a lo largo del gradiente hacia la región del campo eléctrico más fuerte, que es el centro del haz. El haz del láser tiende a aplicar una componente de la fuerza a lo largo de la dirección de propagación, sobre las partículas ya atrapadas. Esto se debe a la conservación del momentum (Figura 3), los fotones que son absorbidos o dispersados por la pequeña partícula dieléctrica aportan momentum a esta.

La fuerza aplicada a la partícula es lineal con respecto a su desplazamiento desde el centro de la trampa, siempre que el desplazamiento sea de pequeña magnitud. De esta manera, una trampa óptica puede ser estudiada como si se tratase de un resorte simple, utilizando la ley de Hooke.

El modelo adecuado del comportamiento de la captura óptica depende del tamaño de la partícula atrapada en relación con la longitud de onda de la luz utilizada para atraparla. Existen dos casos posibles: i) que las dimensiones de la partícula que se pretende atrapar sean mayores que la longitud de onda de luz utilizada, o ii) que las dimensiones de dicha partícula sean menores que dicha longitud de onda para cada uno de estos casos se utiliza un modelo en particular, óptica geométrica (de rayos) y dipolo eléctrico en un campo eléctrico, respectivamente.

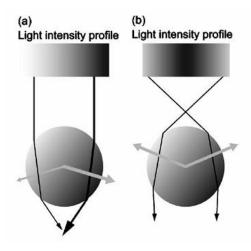


Figura 3 - Descripción de la óptica de rayos que genera el gradiente de fuerza (a) Un bead transparente es iluminado por un rayo de luz paralelo con un gradiente de intensidad creciente de izquierda a derecha, representado por
dos rayos negros de diferente grosor. La refracción de los rayos en el bead cambia el momentum de los fotones,
igual que el cambio en el rayo de entrada y salida. La conservación del momentum está representado por flechas
grises. La fuerza neta del bead está a la derecha, en dirección al gradiente de intensidad y ligeramente hacia abajo.
(b) Para formar una trampa estable, la luz debe ser enfocada, produciendo un gradiente de intensidad tridimensional (Neuman & Block, 2004).

Es necesario recalcar que una consideración importante es la elección del objetivo adecuado del microscopio (sistema de visualización al que se adhiere la pinza óptica). Una trampa
estable requiere que la fuerza de gradiente, que depende de la apertura numérica (NA) del objetivo, sea mayor que la fuerza de dispersión. Los objetivos adecuados suelen tener una NA
entre 1.2 y 1.4. La visualización del plano de muestra generalmente se logra a través de la
iluminación mediante una fuente de luz separada, acoplada en el camino óptico en la dirección
opuesta.

Si bien usualmente las pinzas ópticas son construidas con objetivos de alta apertura numérica (NA), esta elección suele limitar el rango de trabajo axial a un orden de ~ 100 μm y con un campo de visión estrecho, debido a que son objetivos con un alto aumento (~ 100x) lo que limita que solo se puedan estudiar pequeños volúmenes de la muestra. Un enfoque alternativo propuesto por el mismo Ashkin para utilizar objetivos con baja NA es el uso de un láser doble de contra propagación para atrapar muestras oponiendo las fuerzas de dispersión asociadas a cada haz. Este enfoque permite utilizar NA bajas, pero requiere un alto nivel de alineación. (Dasgupta et al., 2012)

1.3.2 Microscopio de Fluorescencia Light Sheet (LSFM)

La LSFM es un tipo de microcopia no destructiva, que utiliza un haz de luz plano (también llamado sábana) para iluminar solo una parte de la muestra (Figura 4a), condición que disminuye el *photobleaching* y la fototoxicidad en la muestra. Es una herramienta muy adecuada para imágenes de alta profundidad dentro de tejidos transparentes o especímenes completos marcados con fluoróforos. Para obtener una imagen tridimensional (3D) completa, se debe realizar un barrido por toda la muestra. La luz de fluorescencia emitida desde la sábana se detecta perpendicularmente con otro objetivo y se almacena en un sensor o cámara sCMOS (Santi, 2011).



Figura 4 - (a) Esquema que ilustra el plano de iluminación sobre la muestra (sábana) generado por el LSFM desde el objetivo de iluminación perpendicular al objetivo de detección; el cual almacena la información en una cámara sCMOS. (b) Configuración LSFM de cuatro objetivos

El laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas (SCIAN-Lab), donde se realizó esta Tesis, cuenta con un LSFM de cuatro objetivos con inmersión en agua, lo que permite generar un ambiente ideal para el estudio de dinámicas celulares. Este tipo de microscopía tiene una alta resolución y velocidad, por lo que es capaz de generar imágenes 3D en tiempo real, con un amplio rango de visualización, el que va desde 0,65 µm hasta 1,3 mm.

1.4. Problema/ Oportunidad de Investigación

Las ITU nosocomiales tienen un gran impacto en los sistemas de salud pública a nivel mundial, como ha sido indicado en el punto 1.1.1. La forma más frecuente de contraer estas infecciones es debido al uso de CUPs, los que pueden ser fabricados con polímeros naturales o sintéticos, siendo los materiales más utilizados el látex siliconizado y la silicona pura. No obstante, independiente de la naturaleza del material de fabricación, aquellas bacterias capaces de adherirse al mismo y generar biopelículas, son las causantes de las ITU más difíciles de tratar debido a que presentan mayor resistencia.

Los mecanismos a través de los cuales los distintos organismos se adhieren a los biomateriales o entre sí, regulan la constitución de biopelículas y son específicos para cada especie bacteriana. Una vez constituidas, las biopelículas son extremadamente resistentes a la acción de los antibióticos y antisépticos, nutriéndose a partir de la orina vesical. Además, como se señala en el punto 1.1.3, las biopelículas están directamente implicadas en la obstrucción de los CUPs en aquellos casos en que la microbiota contiene bacterias productoras de ureasa, como ocurre con *P. mirabilis*.

En este contexto, es de interés estudiar las características físicas y morfológicas de las biopelículas generadas en CUPs, en sus diferentes etapas, con el objetivo de buscar nuevos blancos terapéuticos como una opción alternativa a los tradicionales tratamientos antibióticos actuales donde la resistencia a ellos ha ido en aumento. El entendimiento de la biomecánica de las biopelículas permitiría tener un punto de partida para buscar nuevos blancos terapéuticos.

En el presente trabajo de Tesis se implementó un sistema dinámico con alimentación constante, que permitió observar el crecimiento de la biopelícula en tiempo real, sin necesidad de fijar la muestra, logrando cuantificar sus características morfológicas y registrando el proceso de su desarrollo. Se busca de esta manera, contribuir al estudio del proceso de formación y desarrollo de biopelículas que se generan en CUPs a través de la emulación en laboratorio de estas condiciones, en un ambiente controlado, utilizando una cepa de aislamiento clínico y generando un prototipo de un sistema de visualización y manipulación, para en futuros trabajos avanzar con el entendimiento de la biomecánica.

Se construyó un sistema de visualización y manipulación acoplando a un microscopio LSFM (visualización) unas pinzas ópticas (manipulación), con el fin de disponibilizar una

herramienta tecnológica para en un futuro lograr caracterizar/modelar biomecánicamente las biopelículas producidas en CUP.

Para observar el crecimiento de las biopelículas se optó por la microscopia LSFM como sistema de visualización versus otros microscopios más tradicionales de fluorescencia disponibles para esta investigación, como el confocal, el *spinning disk* o el *cell observer*, debido a las ventajas que este tipo de microscopia presenta para nuestro experimento, entre las que se pueden nombrar:

- La posibilidad de realizar la captura en un tubo, en vez de un portaobjeto. Fundamental para el diseño de un sistema que emula un CUP.
- La factibilidad de montar un sistema dinámico dentro de la cámara de captura del LSFM.
- Para muestras en movimiento, cuya velocidad es desconocida, es necesario contar con una alta frecuencia de escaneo.
- Es adecuado para trabajar con muestras vivas ya que produce menor fototoxicidad y menor *photobleaching* para capturas extendidas en el tiempo.

Para manipular las biopelículas y a futuro poder realizar la caracterización/modelamiento biomecánico de ellas, se optó por pinzas ópticas versus otras herramientas mencionadas en el punto 1.3, debido a:

- La flexibilidad para modificar la rigidez y fuerza producidas por ellas, ajustando la intensidad del láser utilizado.
- El amplio rango de fuerza que es posible generar (desde los femtoNewtons hasta los nanoNewtons, dependiendo del láser utilizado) adecuado para el uso en biología celular y molecular.

Finalmente, es importante mencionar que este trabajo es parte del proyecto FONDE-CYT 1181823 "5D Image Processing and Physical Models for the Quantification of Cell Migration and Multicellular Architecture with 4-Lens Light Sheet Fluorescence Microscopy", donde dos de sus objetivos específicos se encuentran directamente relacionados con esta tesis, indicados a continuación:

CEa | Implementar pinzas ópticas con LSFM de 4 lentes y técnicas de gotas biocompatibles, en combinación con técnicas de procesamiento de imágenes para ejercer y determinar fuerzas durante la microscopía in vivo.

CEd | Aplicar los métodos desarrollados para estudiar la formación y comunicación de biofilms (quorum sensing, vesículas de membrana externa) bajo diferentes condiciones experimentales (antimicrobianos, desinfectantes y la interacción con microorganismos sinérgicos e inhibidores) cultivados en una cámara de flujo 3D con LSFM de 4 lentes in vivo.

2. Hipótesis

La estimación de parámetros morfológicos de una biopelícula de *P. mirabilis*, mediante el procesamiento y análisis de las imágenes capturadas por LSFM, permitirá realizar una caracterización temporal de la evolución de la biopelícula, comparando dos métodos de cultivo diferentes: estático versus dinámico.

3. Objetivo general

Visualizar en tiempo real la formación y evolución de una biopelícula de *P. mirabilis* logrando distinguir sus etapas de formación, realizando una caracterización morfológica y comparando estos resultados con los del método estático de cultivo.

4. Objetivos Específicos

- 4.1. Implementar los protocolos de cultivo: estático y dinámico de *P. mirabilis*, en tubos FEP, para visualizar las etapas de formación de la biopelícula en LSFM.
- 4.2. Evaluar, mediante procesamiento de imágenes, los cambios morfológicos de las biopelículas formadas por *P. mirabilis* en un sistema estático *versus* el sistema dinámico.
 - 4.3. Diseñar un sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM de cuatro objetivos.
- 4.4. Implementar un sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM de cuatro objetivos, validando la herramienta con una muestra control.

5. Materiales y Método

5.1. Implementación de protocolos de cultivos y procesamiento de imágenes.

Se implementaron 2 protocolos de cultivo en tubos FEP (Propileno de Etileno Fluorado) uno para el método estático y otro para el método dinámico. En ambos casos los tubos FEP fueron limpiados y esterilizados según el protocolo implementado (Ver protocolo detallado en Anexo 1).

5.1.1 Diseño del Protocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Estático

La Figura 5 resume el protocolo y la visualización del cultivo de *P. mirabilis* mediante el método estático. La Figura 5(A) presenta un esquema resumen del protocolo de cultivo utilizado en este trabajo. A partir de un *stock* de *P. mirabilis* 2921 de aislamiento clínico, se realizó una siembra (24 horas), un traspaso (24 horas) y un inóculo al 10% (48 horas) a 37°C. A continuación, se prepararon 6 Tubos Falcon con 10 ml de caldo LB y 100 μL del inóculo. En el interior de cada Tubo Falcon se posicionaron 3 capilares FEP de 10 cm de longitud cada uno. Todos los tubos se llevaron a incubación a 37°C. Diariamente, se procedió a fijar con Paraformaldehido (PFA) al 4% los 3 tubos FEP de un Tubo Falcon. Las muestras se limpiaron y se marcaron con los compuestos fluorescentes Ioduro de propidio (IP) y SYTO 9®. En la Figura 5(B) se exhibe un esquema representativo de la disposición del tubo FEP con biopelícula al interior de la cámara de LSFM. El tubo FEP es sostenido en un *holder*, lo que permite ubicarlo en el centro de la cámara, rodeado por los 2 objetivos de iluminación y 2 objetivos de captura. En la Figura 5(C) se presenta una proyección plana del tubo FEP de la biopelícula de 1 día marcada con SYTO 9®, donde ya se distinguen cúmulos de bacterias. En la imagen se utilizó un corrector de colores (LUT) invertido, con el propósito de optimizar la visualización.

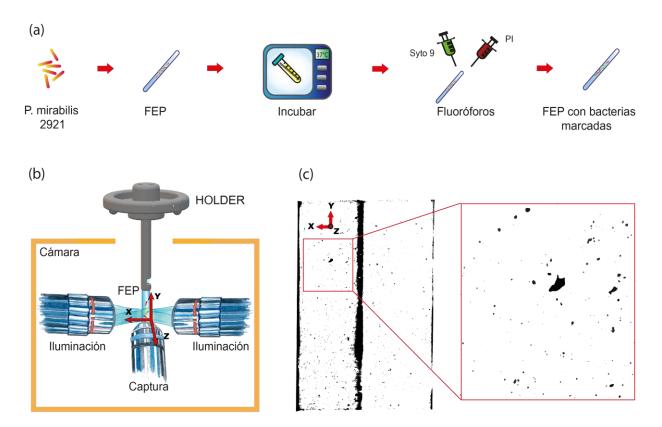


Figura 5 – Diagrama del protocolo de cultivo y visualización de biopelículas de P. mirabilis mediante el Método Estático. (a) Esquema del protocolo de cultivo, donde se utilizó un tubo FEP para cultivar P. mirabilis 2921 marcando la muestra con fluoróforos Syto 9 y PI (Iorudo de Propidio). (b) Esquema de la cámara de captura del LSFM donde se ilumina la muestra con 2 objetivos (eje x) y se realiza la captura con otros 2 objetivos perpendiculares a los de iluminación (eje z), mientras la muestra se dispone en el eje y sostenida por el Holder del microscopio. (c) Proyección plana de la captura de una muestra del día 1 de cultivo. Este procesamiento se realizó para evaluar el crecimiento de la muestra dentro del tubo FEP y también para evaluar la captura obtenida.

5.1.2 Implementación Protocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Estático

5.1.2.1 Protocolo de cultivo

- a. Se cultiva en una placa Petri con agar tripticasa soya (TSA por sus siglas en inglés) una muestra de *P. Mirabilis* 2921 (tomada desde el *stock* mantenido a -80°C) sembrada en estrías y se incuba en estufa a 37° C por 24 horas.
- b. A las 24 horas de incubación, se realiza un traspaso desde el cultivo de la placa a un Tubo Falcon con 50 ml de caldo LB, y se incuba a 37°C, nuevamente por 24 horas.

- c. A partir del traspaso se realiza un inóculo al 10% en un nuevo Tubo Falcon, con 30 ml de caldo LB y se incuba a 37°C por 48 horas.
- d. En 6 Tubos Falcon de 15 ml se agregan 10 ml de caldo LB y con una micropipeta se adicionan 100 μl del inóculo, estimando una concentración de 0,5 McFarland en cada tubo. Posteriormente, se posicionan en su interior 3 tubos FEP previamente limpios y esterilizados según protocolo, y se llevan todas las muestras a estufa a 37°C, retirando un Tubo Falcon diariamente. Como control, se realiza el mismo el procedimiento, pero con un Tubo Falcon con caldo LB libre de inóculo.

5.1.2.2 Protocolo de inmunofluorescencia

 a. Preparar una solución de fluoróforos de acuerdo con la Tabla I, calculada para un volumen final de 250 μl de PBS.

Tabla 1. Concentración de fluoróforos

	Concentración	Concentración	Volumen
Fluoróforo	inicial	final	en 250 μl
Syto9	5 mM	10 μΜ	0.5 μ1
Ioduro de Propidio (IP)	1 mg/ml	5 μg/ml	1.25 μl

- b. Acondicionar una cámara húmeda oscura, cubierta con papel de aluminio y papeles humedecidos con agua destilada. Como base se coloca un trozo de *Parafilm* sobre el papel.
- c. Retirar cada FEP proveniente de los distintos Tubos Falcon a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas posteriores al cultivo.

- d. Con ayuda de una pinza previamente esterilizada, cada FEP se sumerge 3 veces en agua destilada también esterilizada.
- e. Colocar cada tubo sobre el *Parafilm* en la cámara húmeda y agregar con una jeringa de 1 ml, 250 μl de la mezcla de fluoróforos. Tapar e incubar durante 15 minutos.
- f. Con la ayuda de una jeringa lavar con agua destilada estéril cada tubo FEP 3 veces. Luego, fijar con PFA al 4% durante 20 minutos, dentro de la cámara húmeda.
- g. Utilizando una jeringa lavar con agua destilada estéril cada tubo FEP 3 veces. Colocar agua destilada dentro del tubo FEP y sellar los extremos con plastilina.
- h. Reservar los 3 FEP de cada día en un Tubo Falcon cubierto con papel aluminio y conservar a 4 °C.

5.1.2.1 Diseño del Protocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Dinámico

El protocolo y el método de visualización de cultivo de *P. mirabilis* desarrollado e implementado para el cultivo de biopelículas mediante el método dinámico se presenta en la Figura 6.

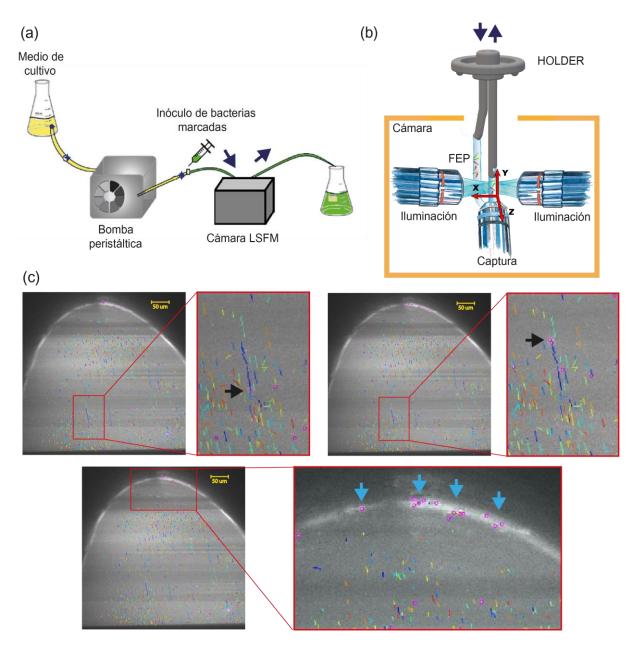


Figura 6 - Diagrama del protocolo de cultivo y visualización de biopelículas de P. mirabilis mediante el Método Dinámico. (a) Esquema del sistema dinámico montado en el microscopio, acoplado a la cámara de captura del LSFM utilizando un sistema de mangueras, controlando el flujo del caldo LB mediante una bomba peristáltica. Se inoculan bacterias de P. mirabilis 2921 con Syto 9 y se introducen al flujo justo antes de pasar por la cámara de muestra del LSFM. (b) Esquema de la cámara de captura del LSFM donde se ilumina la muestra con 2 objetivos (eje x) y se realiza la captura con otros 2 objetivos perpendiculares a los de iluminación (eje z), mientras la muestra se dispone en el eje y sostenida por el Holder del microscopio, el cual se diseñó exclusivamente para este experimento.

En la figura 6A se presenta un esquema del sistema dinámico de cultivo. El flujo es controlado mediante el uso de una bomba peristáltica, con la cual se aplican ciclos de alimentación periódica de caldo LB, que emulan el flujo de orina a través de un catéter. Para sembrar, se adiciona un inóculo con bacterias marcadas con Syto9®, las que fluyen por el sistema formando la biopelícula en el tubo FEP. En la figura 6B se presenta en forma esquemática la disposición del FEP con biopelícula al interior de la cámara de LSFM. A diferencia del cultivo estático, en este caso el tubo FEP se sostiene en su recorrido gracias a un *holder* que permite la entrada y la salida del tubo dentro de la cámara del LSFM. En la figura 6C se muestran imágenes obtenidas desde video *time-lapse* de 2 horas de experimento con flujo constante de caldo LB, sobre el cual se realizó un *tracking* de bacterias planctónicas con marca de Syto9®, logrando obtener los recorridos durante el movimiento (cabezas de flechas negras), y visualizar el inicio del *attachment* bacteriano en la superficie del tubo FEP (cabezas de flechas celestes). Proceso que se realizó para evaluar si el sistema era capaz de visualizar las primeras etapas de desarrollo de la biopelícula, ya que inicialmente se introdujeron bacterias marcadas con Syto9®, pero estás no fueron sometidas a un proceso de fijación como en el método estático.

En el proceso de implementación de ambos protocolos de cultivos en tubos FEP, se utilizó como base los protocolos existentes de cultivos de biopelículas en cubreobjetos (Azeredo *et al.*, 2017) modificándose de acuerdo con los requerimientos que fueron surgiendo a medida que se realizaron las pruebas. El paso final de fijación de las biopelículas antes de observarlas al microscopio no fue contemplado en el método dinámico, con el fin de observar las biopelículas *in vivo*. Es importante destacar en este punto, que para este método en específico fue necesario diseñar e imprimir en 3D un nuevo *holder*, acondicionado a las necesidades del montaje, que requirió de un mayor soporte para el tubo FEP (Figura 6b).

5.1.2.2 Implementación Protocolo de cultivo de Biopelículas para el Método Dinámico

- a. A un frasco Mariotte de apertura baja (previamente esterilizado) adherir en la apertura 15 cm de manguera de silicona.
- b. Por el otro extremo de la manguera colocar una llave de 3 pasos y unir a la manguera que pasa por la bomba peristáltica. Luego, a la salida de la manguera de la bomba peristáltica, colocar una llave de 3 pasos y unir a 15 cm de manguera de silicona. Todo el material debe estar previamente esterilizado.

- c. Limpiar un tubo FEP de aproximadamente 25 cm de longitud, según el protocolo de limpieza.
- d. Utilizando guantes, insertar el tubo FEP en el *holder* adaptado del LSFM (entrada y salida) procurando que quede una curva poco pronunciada y que se ajuste de buena manera a los 4 objetivos del LSFM dentro de la cámara.
- e. Unir la entrada del tubo FEP a la manguera de silicona, adaptando con llaves de 3 pasos y sellar con *Parafilm*.
- f. Unir la salida del tubo FEP a una manguera de silicona que desembocará en un frasco de descarte. Sellar este frasco con *Parafilm*.
- g. Colocar etanol al 70% en el frasco Mariotte y dejarlo fluir por todo el sistema. Mantener la bomba peristáltica con un flujo de 3.7 ml/min.
- h. Colocar 2.5 litros de caldo LB en el frasco Mariotte y dejar que avance por todo el circuito. Luego cerrar la primera llave de paso y en la segunda llave inyectar el inoculo de bacterias con la marca fluorescente.
- i. Dejar reposar el sistema por 1 hora, con el propósito que las bacterias se puedan adherir a una superficie.
- j. Alimentar con caldo LB fluyendo a 3.7 ml/min, durante 1,5 horas y luego dejar reposar el sistema por 1 hora. Repetir este proceso 4 veces.
- k. Repetir los ciclos durante los siguientes 4 días.

5.2.1 Adquisición de las Imágenes

Para cada captura del método estático se obtuvieron 8 archivos, 4 correspondientes a la cámara 1 y 4 correspondientes a la cámara 2. Cada cámara capturo 2 archivos para la marca roja con IP (derecha e izquierda respectivamente) y 2 archivos para la marca verde con Syto9® (derecha e izquierda respectivamente). Sin embargo, para los alcances de esta tesis, solamente se utilizaron los archivos con marca verde, es decir, se procesaron en total 4 archivos (izquierda y derecha de cada cámara) por muestra.

En el método dinámico, se obtuvieron 4 archivos por captura (solo se realizó la marca en verde). Se capturaron ciclos de: 521 slices con un salto de 2 μm por 1 hora con el sistema en reposo (para que las bacterias buscaran la superficie inicialmente), a continuación 521 slices con un salto de 2 μm cada 5 (min) por 1 hora con el sistema en flujo constante, luego 521 slices con un salto de 2 μm por 1 hora con el sistema en reposo, a continuación 521 slices con un salto de 2 μm cada 5 (min) por 1 hora con el sistema en flujo constante y finalmente se dejó el sistema capturando 5 planos por minuto con un salto de 2 μm por 15 horas sin flujo. Este ciclo se repitió por 6 días consecutivos, eliminando diariamente el descarte, cambiando la manguera de salida y agregando más marca.

El *setting* bajo el cual se utilizó el LSFM fue:

- Objetivo de inmersión en agua 10x/0.3 (los 4 iguales)
- Láser 488 nm
- Filtro EGFP/mCherry
- $x = y = 0.65 \, \mu m/pixel$

Se realizó una revisión bibliográfica para definir los parámetros morfológicos más representativos a evaluar durante el desarrollo de biopelículas. Esto se hizo bajo el siguiente criterio: Evaluar las propiedades generales de la biopelícula, y distinguir las diferentes etapas de formación. Esta revisión definió 3 parámetros morfológicos que cumplen estas características: la superficie colonizada, el volumen de la biopelícula y el tamaño de las colonias, sin embargo, solo se lograron evaluar los 2 primeros. Se realizó un análisis preliminar cualitativo de las

imágenes obtenidas mediante el método estático, para evaluar si las bacterias lograban adherirse a la superficie del tubo FEP y evaluar el crecimiento de la biopelícula observada cada día, realizando proyecciones planas usando el *software* Fiji-ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). Esto debido a que para realizar la selección de parámetros morfológicos representativos que caracterizarán las biopelículas formadas en tubos FEP y que, a la vez, permitieran evaluar y comparar los cambios presentados en el desarrollo de la biopelícula entre ambos métodos de cultivo, fue necesario desarrollar experimentos preliminares que permitieran obtener imágenes para testear dichos parámetros. En la figura 7 se representan los parámetros morfológicos definidos para su estudio:

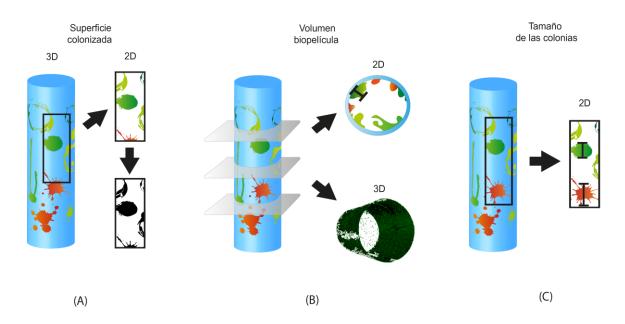


Figura 7 - Esquema representativo de los parámetros morfológicos escogidos para caracterizar biopelículas de P. mirabilis. (A) Superficie colonizada, (B) Volumen biopelícula y (C) Tamaño de las colonias.

La Figura 7 (A) ilustra la superficie colonizada por la biopelícula dentro del tubo FEP (3D), con marca de ambos fluoróforos (verde y rojo, para vivas y muertas, respectivamente). A un costado se ilustra la proyección plana de un segmento del tubo FEP (2D) a color y en blanco / negro, para su segmentación. La Figura 7 (B) ilustra el volumen del cultivo de la biopelícula dentro del tubo FEP, con cortes planos perpendiculares para evaluar el grosor de la biopelícula en distintos puntos (2D). Además, se evalúa el volumen de la biopelícula a partir de la recons-

trucción 3D. La Figura 7 (C) ilustra la detección del tamaño de las colonias bacterianas y la determinación del tamaño promedio de las colonias en el tiempo, en su proyección 2D.

5.2.2 Procesamiento de las Imágenes

Para procesar las imágenes obtenidas del LFSM, fue necesario realizar la fusión de los 4 *stack*, obtenidos en cada captura, con el fin de generar *stack*. 3D. Este proceso se realizó por medio del programa FiJiImageJ con el plugin SPIM Registration. Para más detalle del procedimiento refiérase al Anexo II.

El *plugin SPIM Registration* genera una alta resolución isotrópica a lo largo de los ejes *x*, *y* y *z*, lo que permite generar imágenes 3D. Para obtener esta buena resolución isotrópica es necesario girar la muestra o capturar *stacks* con diferentes ángulos (0°, 90°, 180° y 270°), como es nuestro caso gracias al sistema de 4 objetivos del LSFM.

Para realizar la segmentación de las imágenes ya fusionadas, se utilizó el *plugin 3D Object Counter*, el cual permite segmentar objetos 3D basándose en un umbral de fluorescencia escogido. Este *plugin* cuenta el número de objetos con un valor de fluorescencia superior al umbral establecido y permite medir diferentes parámetros: volumen, superficie, intensidad de fluorescencia, y centro de masas (Bolte & Cordelieres, 2006).

5.3 Diseño e implementación de un sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM de cuatro objetivos.

Para realizar el diseño del sistema de pinzas ópticas acoplado al LSFM se utilizó como base el paper "*Macro-optical trapping for sample confinement in light sheet microscopy*" (Yang *et al.*, 2015), el cual presenta la siguiente configuración ilustrada en la figura 8:

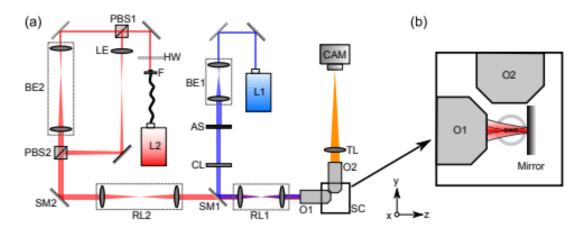


Figura 8 - (a) Configuración óptica, donde el haz rojo corresponde a la ruta de las pinzas ópticas y el haz azul corresponde a la iluminación con un microscopio LSFM. (b) representa el haz de la pinza dentro de la cámara de muestras. Imagen obtenida de (Yang et al., 2015)

Se utilizo la configuración de Yang *et. al* como base de nuestro diseño porque es un sistema de pinzas ópticas de contrapropagación construido con un objetivo de baja apertura numérica (magnificación 10x y NA 0,3) mismas características de los objetivos con los que contamos en el microscopio utilizado en esta tesis LSFM.

Es necesario hacer notar que en el sistema de Yang et. al. se presenta un LSFM de 2 objetivos, uno de iluminación y uno de captura respectivamente. Sin embargo, en nuestro sistema contamos con un LSFM de 4 objetivos, 2 de iluminación (localizados uno frente al otro) y 2 de captura (localizados en forma perpendicular a los de iluminación). Además, nuestro microscopio cuenta con un alternador de láser que deja pasar la luz desde un objetivo mientras apaga su par, evitando de esta manera interferencia. Por lo tanto, no fue posible que el haz de las pinzas ópticas entrara por un objetivo de iluminación, por lo que fue necesario acomodar la configuración para que este entrara a través de uno de los objetivos de captura. Además, se debió ajustar la configuración inicial al espacio disponible dentro de la mesa óptica, para poder conseguir el tamaño adecuado de haz.

Dentro de las consideraciones que se tomaron para el diseño de las pinzas, está la dimensión de *P. mirabilis*. Siendo esta bacteria un bacilo que tiene un largo aproximado de 2 μm, se utilizó un láser de 1.070 nm, trabajando con el modelo de óptica geométrica en pinzas ópticas. La mayoría de las trampas ópticas operan con una intensidad de perfil de haz gaussiano. El cambio de momentum neto, o fuerza, devuelve la partícula al centro de la trampa. El láser de

1.070 nm utilizado es una opción típica para trabajar con muestras biológicas, debido a la baja absorción de dicha longitud de onda, minimizando de esta manera el daño en la muestra.

Luego de diseñar el sistema de pinzas ópticas acoplado al LSFM de cuatro objetivos, se seleccionaron y adquirieron los materiales necesarios para su construcción, considerando: espacio disponible dentro de la mesa óptica, métrica del sistema inicial y láser apto para el sistema biológico a estudiar. Posteriormente se montó y acopló el sistema de pinzas ópticas al LSFM de cuatro objetivos, utilizando el mismo diseño descrito en la figura 9. Fue necesario alinear y calibrar las pinzas en conjunto con el microscopio para poder realizar las capturas.

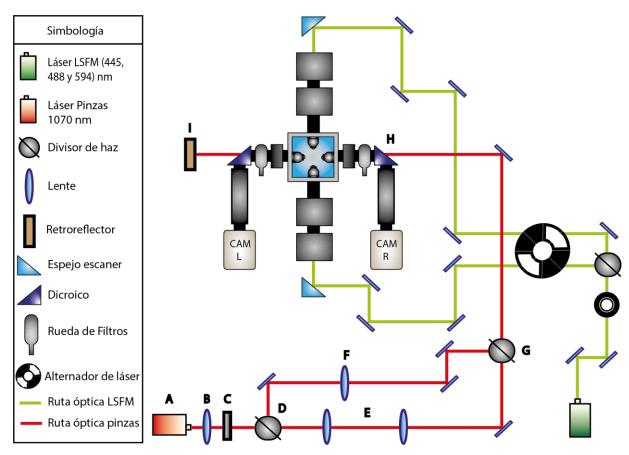


Figura 9 - Diseño del sistema de visualización-manipulación de pinzas ópticas acopladas al Microscopio de Fluorescencia Light Sheet de cuatro objetivos. La ruta del LSFM está representada en color verde y la ruta de las pinzas ópticas esta representa en color rojo, compuesta por las siguientes partes: (A) láser de 1070 nm, (B) lente de 25 mm, (C) placa de media onda, (D) divisor de haz, (E) telescopio, (F) lente de 75 mm, (G) un divisor de haz, (H) dicroico e (I) Retrorreflector.

La ruta óptica del LSFM está representada en color verde y comienza con la fuente de los 3 láser (445, 488 y 594 nm), ubicado en la esquina inferior derecha de la figura (representado por la caja verde), avanza por un sistema de espejos hasta el alternador de láser, que lo separa en 2

haces que lleguen simultáneamente a la rueda de filtro. Está rueda permite que avance un haz mientras apaga el otro (para eliminar la interferencia dentro de la cámara de captura). Ambos haces avanzan por un sistema de espejos, incluyendo espejo de escaneo antes de llegar a los objetivos de iluminación, ubicados uno frente a otro. Para la detección se cuenta con 2 objetivos, ubicados uno al frente del otro y perpendiculares a los objetivos de iluminación, manejados por un sistema de piezoelectricos que les otorgan movilidad, una rueda de filtros y 2 cámaras sCMOS que alojan los datos.

La ruta óptica de las pinzas está representada en color rojo, comienza en la esquina inferior izquierda de la mesa óptica con (A) un láser de 1070 nm, que avanza hasta (B) lente de 25 mm, sigue por (C) una placa de media onda con la que se controla la polarización del haz. Luego en (D) el haz se divide en dos brazos, un brazo avanza por un telescopio (E) expandiéndolo para llenar la apertura trasera el objetivo de iluminación, mientras el otro brazo pasa por (F) un lente de 75 mm modificando la divergencia de este haz, para volver a juntar ambos brazos en (G) el segundo divisor de haz, avanzando hasta llegar a (H) donde entra al dicroico que lo conduce al objetivo de captura dentro de la cámara de muestras. Este haz traspasa la cámara de muestras ingresando al segundo objetivo de captura, hasta llegar a un espejo retrorreflector que lo devuelve por la misma ruta, pero en sentido contrario, terminando de formar la contra propagación de la pinza óptica.

6. Resultados

6.1 Protocolos de cultivo

Para lograr un adecuado desarrollo de la biopelícula y su visualización en el LSFM en ambos métodos de cultivo: estático y dinámico, fue necesario determinar el radio interno de los tubos FEP a utilizar. En un inicio se utilizó un tubo FEP con radio interno de 1.2 mm donde el proceso de cultivo fue de simple implementación, sin embargo, la visualización no fue del todo satisfactoria, ya que, al desarrollarse la biopelícula al interior del tubo, menos luz fue capaz de atravesarlo completamente, razón por la cual resulto dificultoso encontrar puntos de intercepción entre los *stacks* del lado izquierdo y derecho para realizar fusiones de las imágenes obtenidas del microscopio. Este inconveniente fue en aumento con el paso de los días debido al desarrollo del cultivo. En la búsqueda para solucionar el problema anterior, se realizó una segunda prueba con tubos FEP de menor radio (radio interno de 0.8 mm) aquí el protocolo de inmunofluorescencia se vio afectado, ya que resulto muy difícil ingresar fluoróforos y fue necesario utilizar puntas de pipeta GelLoader que se caracterizan por ser largas y delgadas. Con este cambio, la visualización y posterior fusión de imágenes resultó mucho más eficiente.

Respecto al método de cultivo dinámico, una vez montado el sistema se procedió a la captura de imágenes mediante LSFM, sin embargo, se presentaron inconvenientes para mantener la zona de captura debido al movimiento producido por la relajación del material. Como medida compensatoria, se estableció realizar el montaje del sistema con 24 horas de anticipación a la captura y así dar tiempo suficiente al material para su estabilización, sin embargo, este continuó desplazándose durante las capturas debido a la vibración producida por la bomba peristáltica en la manguera. Bajo estas condiciones fueron realizadas las capturas utilizadas.

6.2 Procesamiento de imágenes

Una vez completada la adquisición de imágenes se evaluaron diferentes softwares de procesamiento para fusionar, segmentar y cuantificar los volúmenes provenientes del LSFM, entre ellos IDL (SCIANLab Software), Imaris y FiJi-ImageJ. Presentando los resultados obtenidos en los últimos dos.

Como fue indicado en el capítulo 5: Materiales y Método, se estimaron los parámetros morfológicos: Superficie colonizada y Volumen de la Biopelícula, para las biopelículas obtenidas mediante el método de cultivo estático y el método de cultivo dinámico durante un periodo de 6 días. Se utilizó el *plugin 3D Object Counter* del *software* FiJi - ImageJ para segmentar y estimar estos parámetros y para realizar las reconstrucciones 3D se utilizó el *software* Imaris Bitplane.

En la Figura 10 se observan cúmulos de la biopelícula de *P. mirabilis* dentro de un tubo FEP. Se entiende por cúmulo un conjunto de 2 o más bacterias, las cuales son bacilos con un tamaño aproximado de 2 um.

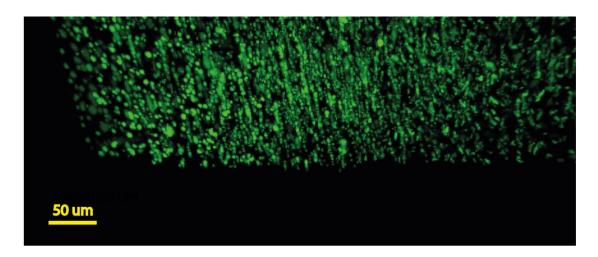


Figura 10 – Detalle cúmulos biopelícula dentro del tubo FEP.

En la Figura 11 se presentan, a modo de ejemplo, las reconstrucciones de los días 1, 3 y 5, para el método estático y el método dinámico de cultivo, respectivamente:

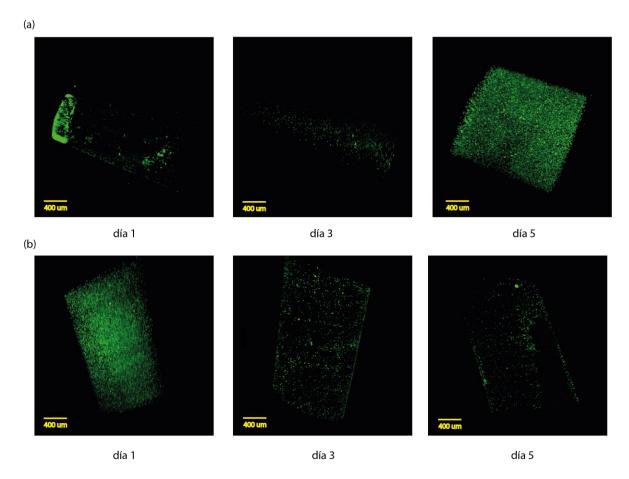


Figura 11 – Reconstrucciones 3D realizadas en Imaris - Bitplane (a) días 1, 3 y 5 del Método de cultivo Estático (b) días 1,3 y 5 del Método de cultivo Dinámico

Por cada día evaluado se seleccionó una imagen para ser procesada y analizada, para calcular los parámetros morfológicos definidos. Esta decisión se tomó debido al alto costo computacional de procesamiento y al tiempo acotado que se disponía para ello. El criterio de la selección de la imagen a procesar se basó en: tener una superficie continua (aproximadamente 2 mm) de tubo sin burbujas y la calidad de la imagen obtenida de acuerdo con juicio experto. Por lo tanto, el n del estudio completo es igual a 1.

La desviación estándar corresponde a la desviación entre los cúmulos observados para la imagen seleccionada, correspondiente al parámetro morfológico analizado.

Las Figuras 12 y 13 presentan los resultados para los parámetros morfológicos analizados. La Figura 12 presenta la superficie colonizada, el color rojo representa el método de cultivo estático y el color azul representa el método de cultivo dinámico, incluyendo la desviación estándar:

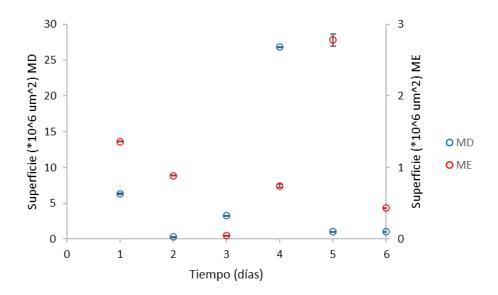


Figura 12 - Superficie colonizada versus tiempo para las biopelículas obtenidas en ambos métodos de cultivo (ME = Método Estático) y MD= Método Dinámico) con n=1.

La Figura 13 presenta el volumen de la biopelícula, el color rojo representa el método de cultivo estático y el color azul representa el método de cultivo dinámico, incluyendo la desviación estándar:

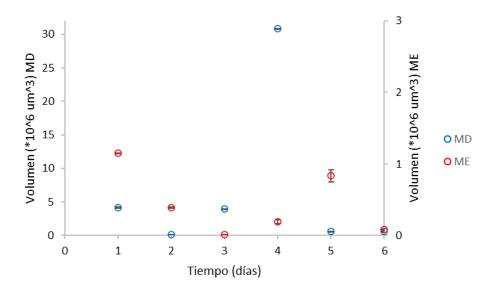


Figura 13 - Volumen de la biopelícula para las biopelículas obtenidas en ambos métodos de cultivo (ME = Método Estático) y MD= Método Dinámico) con n=1

Se observa una semejanza en la tendencia de las curvas de los gráficos de la superficie colonizada y el volumen de la biopelícula para el método estático. Donde el punto máximo de muestra se encuentra en el día 5 para posteriormente comenzar a decaer. Es posible interpretar este cambio en la curva como un cambio de etapas en el desarrollo de la biopelícula, de Maduración II a Dispersión. También se puede ver que la superficie colonizada a lo largo del tiempo es mucho mayor que el volumen generado por la biopelícula, lo cual es concordante con biopelículas desarrolladas en cubreobjetos.

Se observa una similitud en la tendencia de la curva entre los gráficos de superficie colonizada y volumen de la biopelícula para el método dinámico. Donde el punto máximo de formación se encuentra en el día 4 (un día antes que el método estático) para posteriormente comenzar a decaer. Interpretamos este cambio en la curva como un cambio de etapas en el desarrollo de la biopelícula, de Maduración II a Dispersión. También se puede ver que la superficie colonizada a lo largo del tiempo es de un orden similar al del volumen generado por la biopelícula.

De los 3 parámetros morfológicos propuestos, se realizó el análisis sobre los 2 primeros (superficie colonizada y volumen de la biopelícula) mediante procesamiento de imágenes en Fiji-ImageJ. El tercer parámetro "Tamaño de las colonias" no fue posible cuantificarlo en ninguno de los 3 *softwares* presentados, ya que al realizar las reconstrucciones 3D, segmentar y luego intentar identificar las colonias, se constató que estás presentaban diversos grados de solapamiento en los bordes del tubo, no logrando una diferenciación entre la clasificación de colonias y células plantónicas.

6.3 Diseño e implementación de un sistema de pinzas ópticas

A continuación, se presenta en la Figura 14 una comparación entre el diseño del sistema de pinzas ópticas acoplado al microscopio LSFM, basado en el paper "Macro-optical trapping for sample confinement in light sheet microscopy" (Yang et al., 2015) y la implementación lograda. En la Figura 14 (b) solo se marca la ruta de las pinzas ópticas en color rojo y se identifican los diferentes componentes del sistema.

Luego en las Figuras 15 y 16 se presentan fotografías de la implementación logradas desde el plano izquierdo y derecho de la mesa óptica respectivamente.

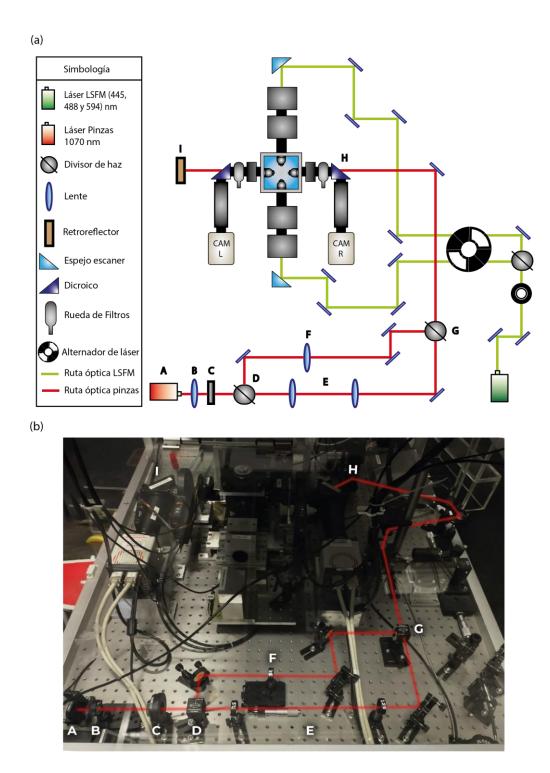


Figura 14 – (a)Diseño del sistema de visualización-manipulación de pinzas ópticas acopladas al Microscopio de Fluorescencia Light Sheet de cuatro objetivos. La ruta del LSFM está representada en color verde y la ruta de las pinzas ópticas esta representa en color rojo, compuesta por las siguientes partes: (A) láser de 1070 nm, (B) lente de 25 mm, (C) placa de media onda, (D) divisor de haz, (E) telescopio, (F) lente de 75 mm, (G) un divisor de haz, (H) dicroico e (I) Retrorreflector. (b) Fotografía del sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM (vista superior).

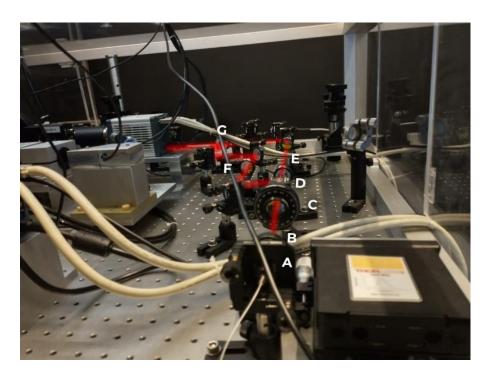


Figura 15 -Fotografía del sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM (inicio de la ruta óptica). La ruta de las pinzas ópticas esta representa en color rojo, se pueden apreciar los siguientes componentes: (A) láser de 1070 nm, (B) lente de 25 mm, (C) placa de media onda, (D) divisor de haz, (E) telescopio, (F) lente de 75 mm, (G) divisor de haz

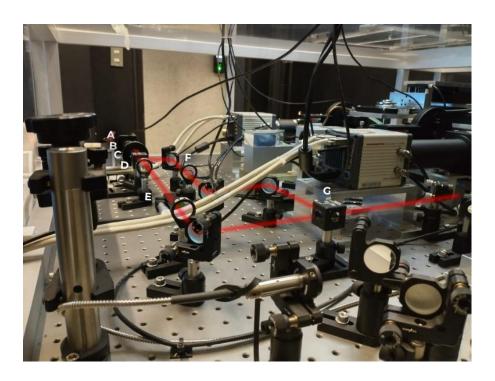


Figura 16 – Fotografía del sistema de pinzas ópticas acopladas al LSFM (combinación del primer y segundo haz). La ruta de las pinzas ópticas esta representa en color rojo, se pueden apreciar los siguientes componentes: (A) láser de 1070 nm, (B) lente de 25 mm, (C) placa de media onda, (D) divisor de haz, (E) telescopio, (F) lente de 75 mm, (G) divisor de haz

Para probar la correcta implementación se realizó una captura de uno de los tubos FEP del método estático, el cual contenía una biopelícula ya formada y fijada con PFA al 4%. Alineando el sistema para que la pinza óptica entrara al FEP con muestra, se movió el haz de la pinza manualmente desde el espejo de entrada a la cámara de muestra y se observó como la muestra comenzaba a moverse siguiendo la trayectoria del haz.

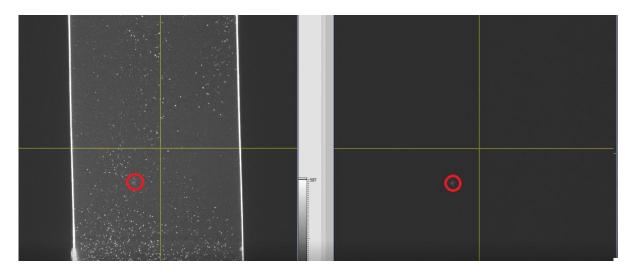


Figura 17 - Biopelícula fijada dentro de tubo FEP, sometida a la aplicación de pinza óptica (t=55 s).

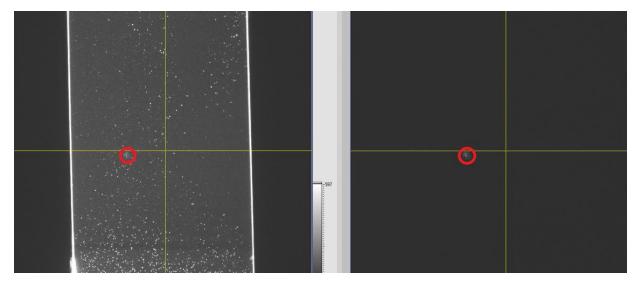


Figura 18 - Biopelícula fijada dentro de tubo FEP, sometida a la aplicación de pinza óptica (t=60 s).

Se puede apreciar en la parte izquierda de la figura 17 y 18 la cámara 1 del LSFM donde se visualiza la muestra con una biopelícula fijada, en la cámara 2 se visualiza solamente el láser de la pinza óptica. Ambas figuras corresponden a un video, donde se mueve la pinza y se aprecia el movimiento generado en la muestra.

7. Discusión

Previo a entrar en el detalle de la discusión es importante mencionar que la hipótesis fue modificada entre el proyecto inicial y el avance de esta tesis. Inicialmente se estimaba realizar varios experimentos para tener un "n" robusto estadísticamente y luego, al implementar el sistema de pinzas ópticas al LSFM realizar con ellas una estimación de la curva biomecánica de una biopelícula de *P. mirabilis* con el fin futuro de buscar nuevos blancos terapéuticos para las infecciones bacterianas, indagando en la búsqueda de tratamientos alternativos que logren romper las biopelículas que estas generan. Sin embargo, la pandemia y las pocas posibilidades de acceder al laboratorio, nos llevó a un replanteamiento de la hipótesis y llegar hasta la implementación de las pinzas ópticas, con el fin que en futuros proyectos se desarrolle esta iniciativa.

Implementación de protocolos de cultivo

En el diseño inicial de los protocolos de cultivo estático y dinámico, se consideró utilizar tubos FEP con radio interno de 1.2 mm, por tener un tamaño suficientemente cómodo para realizar la siembra e inmunofluorescencia de los cultivos, sin embargo, la visualización no fue del todo satisfactoria, ya que, al desarrollarse la biopelícula al interior del tubo, menos luz fue capaz de atravesarlo completamente debido a la difracción y absorción de los fotones del láser en la muestra, razón por la cual resulto dificultoso encontrar puntos de intercepción entre los *stacks* del lado izquierdo y derecho para realizar fusiones de las imágenes obtenidas del microscopio. Este inconveniente fue en aumento con el paso de los días debido al desarrollo del cultivo. Finalmente, luego de varias pruebas, se determinó utilizar tubos FEP de radio interno 0.8 mm, donde la visualización y posterior fusión de imágenes resultó mucho más eficiente.

Una limitante que se presentó en el método dinámico fue la relajación del material del tubo FEP una vez montado en el sistema. A pesar de que el sistema se montó con 24 horas de anticipación a las capturas, este seguía distendiéndose durante el periodo de medición lo que, sumado a la vibración producida por la bomba peristáltica en la manguera, resultó en complicaciones para mantener una misma ubicación dentro de la cámara de captura para el periodo de

experimentación definido. Por lo tanto, no es siempre posible capturar la misma zona dentro de la muestra.

Procesamiento de imágenes

En los gráficos de superficie colonizada (Figura 12) y volumen de la biopelícula (Figura 13) construidos a partir de los datos obtenidos del procesamiento de las imágenes capturadas en ambos protocolos, se puede apreciar mayor superficie colonizada y volumen de la biopelícula para el método de cultivo dinámico que para el método de cultivo estático, aproximadamente un orden de magnitud.

En los gráficos de superficie colonizada y volumen de la biopelícula para ambos métodos de cultivo: estático y dinámico se observa la misma forma en las curvas obtenidas, pero desfasadas en el tiempo y con diferencias en las magnitudes. Se parte de un valor inicial, que luego decae, para luego subir y volver a decaer.

El desarrollo de las biopelículas se divide en 5 etapas y para *P. mirabilis* el ciclo completo de desarrollo se estima entre 5 a 7 días. Para el método de cultivo estático se puede entregar la siguiente interpretación de los gráficos de superficie colonizada y volumen de la biopelícula presentados, la cual puede ser validada en futuros estudios: la etapa I (Adhesión reversible) se presenta en los días 1 y 2 en que la curva decae en un inicio, para posteriormente asentarse en el día 3 período que podría ser asociada a la etapa II (Adhesión irreversible), luego la curva comienza a subir el día 4 pudiendo ser asociada a la etapa III (Maduración I) alcanzando su máximo el día 5 que correspondería a la etapa IV (Maduración II) para luego comenzar a decaer el día 6 interpretándose como la etapa final del ciclo de la biopelícula, etapa V (Dispersión).

Por otro lado para el método dinámico, se puede entregar una primera interpretación de los dos gráficos de superficie colonizada y volumen de la biopelícula a validar en futuros estudios: la etapa I (Adhesión reversible) se presenta en el día 1 en que la curva decae desde el inicio, para posteriormente asentarse en el día 2 que podría ser asociada a la etapa II (Adhesión irreversible) el día 3 la curva comienza a subir siendo asociada a la etapa III (Maduración I) alcanzando su máximo el día 4 que corresponde a la etapa IV (Maduración II) para luego co-

menzar a decaer los días 5 y 6 interpretándose como la etapa final del ciclo de la biopelícula, etapa V (Dispersión).

Se puede identificar que el punto máximo de maduración de la biopelícula fue un día antes para el método dinámico en comparación con el método estático.

Como fue indicado en la sección 6.1 se evaluaron diferentes *softwares* de procesamiento para fusionar, segmentar y cuantificar los volúmenes provenientes del LSFM, entre ellos *IDL* (*SCIANLab Software*), *Imaris* y FiJi-*ImageJ*. Se optó por los *plugins* de FiJi-*ImageJ* descritos en la metodología ya que permitieron una mejor cuantificación que las otras opciones presentadas, siendo posible segmentar las muestras y calcular 2 de los 3 parámetros morfológicos propuestos. El tercer parámetro "Tamaño de las colonias" no fue posible conseguirlo en ninguno de los 3 *softwares* presentados, ya que al realizar las reconstrucciones 3D, segmentar y luego intentar identificar las colonias, se constató que estás presentaban diversos grados de solapamiento en los bordes del tubo. Queda como trabajo futuro, la evaluación de nuevos *plugins* y *software* que permitan calcular este parámetro.

Una consideración importante de tener en cuenta al momento de realizar el procesamiento de las imágenes es el gasto computacional necesario para realizar este tipo de análisis, ya que, debido al extenso tamaño de las muestras, algunas llevaron hasta 4 días de procesamiento para lograr ser segmentadas y obtener resultados. Este fue el motivo por el cual el n = 1 en ambos métodos de cultivo.

Diseño e Implementación del sistema de pinzas ópticas

Respecto al diseño de la pinza óptica acoplada al LSFM, este se debió ir corrigiendo y ajustando a medida que se trabajaba en la implementación, ya que el acotado espacio de trabajo en la mesa óptica dificultaba poder obtener el tamaño de haz necesario para generar la pinza óptica. La alineación de la óptica fue un desafío interesante ya que se requiere calibrar ambos sistemas juntos, las pinzas ópticas junto al microscopio, esto para lograr que las pinzas se encuentren en el mismo plano focal que el microscopio. Para este propósito, fue necesario desarmar toda la cámara de captura del LSFM y volver a armarla pieza por pieza a medida que se avanzaba con la alineación.

Ya que es de interés estudiar la biomecánica de las biopelículas, queda abierto para futuros trabajos el generar una calibración en conjunto que permita establecer el rango de fuerzas de las pinzas ópticas.

8. Conclusiones

En este trabajo de tesis fue posible obtener una caracterización temporal de la biopelícula de *P. mirabilis* para dos parámetros morfológicos y comparando dos métodos de cultivo: estático y dinámico, cumpliendo la hipótesis propuesta.

En relación a los protocolos de cultivo, se concluye que los tubos FEP de 0.8 mm son los suficientemente adecuados para el desarrollo de la biopelícula y la visualización de ella en el microscopio LSFM, requiriendo el uso de puntas de pipetas largas y delgadas para ingresar los fluoróforos necesarios. El protocolo de cultivo para el método estático fue ajustado de acuerdo al conocimiento indicado anteriormente, y el protocolo del método de cultivo dinámico fue desarrollado a partir del anterior. Un segundo aprendizaje obtenido a partir de la implementación del sistema dinámico es la necesidad de cambiar la manguera de descarte y se definió a nivel de protocolo que fuera diariamente, ya que en los primeros intentos está se taponeo antes de completar el periodo de experimentación de 6 días.

Una posible mejora al sistema dinámico consistiría en evaluar y medir diferentes caudales generados por la bomba peristáltica que proporciona presión al sistema en ciclos periódicos. Con el objetivo de mantener un flujo laminar y así no colaborar en el quebrantamiento, ruptura o separación de la biopelícula desde la superficie.

Mediante el procesamiento y análisis de imágenes capturadas por LSFM se lograron estimar 2 parámetros morfológicos para la caracterización de la formación de biopelícula de la bacteria *P. mirabilis*. Particularmente, se compararon dos métodos de cultivo diferentes, estático y dinámico, siendo el método estático similar a la metodología que se ha estado utilizando hasta ahora en la literatura. En cambio, el método dinámico nos permitió observar el comportamiento de las biopelículas de *P. mirabilis* en un medio que se espera sea más semejante al de las bacterias en un CUP.

Respecto del microscopio utilizado para capturar las imágenes analizadas en esta tesis, un parámetro relevante fue la posibilidad de utilizar tubos dentro de la cámara de captura, el cual fue crucial para visualizar el desarrollo de biopelículas en superficies cilíndricas similares a los CUP. Un segundo parámetro considerado fue la velocidad de captura, ya que al no conocer a priori la velocidad del movimiento de las bacterias de *P. mirabilis* y el impacto del caudal en la biopelícula se consideró disponer de un microscopio con alta velocidad de captura. Sin em-

bargo, esto no fue utilizado en el procesamiento inicial presentado, debido al alto costo computacional.

Respecto de las pinzas ópticas, estás se diseñaron en función de acoplarse al microscopio LSFM que está construido en una mesa óptica. Ajustándose al espacio presentado. Se calibraron ambas herramientas en conjunto y se logró realizar una captura inicial de una biopelícula fijada dentro de un tubo FEP, lo que corresponde a un piloto que comprueba la factibilidad de la herramienta y abriendo así nuevas posibilidades para futuras investigaciones.

9. Bibliografía

- Araújo, G. R. de S., Viana, N. B., Gómez, F., Pontes, B., & Frases, S. (2019). The mechanical properties of microbial surfaces and biofilms. *The Cell Surface*, 5, 100028. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2019.100028
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(3), 313-351. https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146
- Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S., & Ribbeck, K. (2015). Material properties of biofilms—A review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics*, 78(3), 036601. https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/3/036601
- Bolte, S., & Cordelieres, F. (2006). *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy—BOLTE 2006—Journal of Microscopy—Wiley Online Library*. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x?casa_token=mDgGXxvjgy8AAAAA%3A03srM13mZfqzJdaRw51yXJXxL0vMIcsg_Vk-gz3L1-feno-oLUGSqd7BKzMRQQloO2pxt5ALJis
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3-4), 217-221; discussion 237-239. https://doi.org/10.1016/s0924-8579(99)00018-7
- Dasgupta, R., Ahlawat, S., Gupta, P. K., Xavier, J., & Joseph, J. (2012). Optical trapping with low numerical aperture objective lens. 2012 Photonics Global Conference (PGC), 1-4. https://doi.org/10.1109/PGC.2012.6458099
- Fraser, G., Claret, L., Furness, R., Gupta, S., & Hughes, C. (2002). Swarming-coupled expression of the Proteus mirabilis hpmBA haemolysin operonaaThe GenBank accession number for the sequence determined in this work is AJ250100. / Microbiology Society. https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-148-7-2191
- Girard, R., Perraud, M., Prüss, A., Savey, A., Tikhomirov, E., Thuriaux, M., & Vanhems, P. (2012). *Prevención de las infecciones nosocomiales*. Organización Mundial de la Salud.
- Hannan, S., Ready, D., Jasni, A., Rogers, M., Pratten, J., & Roberts, A. (2010). *Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms | Pathogens and Disease | Oxford Academic.* https://academic.oup.com/femspd/article/59/3/345/496652?login=false
- Jones, B. V., Mahenthiralingam, E., Sabbuba, N. A., & Stickler, D. J. 2005. (2005). Role of swarming in the formation of crystalline Proteus mirabilis biofilms on urinary catheters. *Journal of Medical Microbiology*, 54(9), 807-813. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46123-0

- Kappes, M. S., & Riquelme, V. (2018). *Urinary Tract Infection: Cost Study: Hospital Topics: Vol 96, No 2.* https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00185868.2017.1406288
- Neuman, K. C., & Block, S. M. (2004). Optical trapping. *The Review of Scientific Instruments*, 75(9), 2787-2809. https://doi.org/10.1063/1.1785844
- Norsworthy, A. N., & Pearson, M. M. (2017). From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of Proteus mirabilis. *Trends in Microbiology*, 25(4), 304-315. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.015
- Olea, M., Vallejos, M., & Contreras, J. L. (2011). *Protocolo de Referencia y Contrarreferencia en Infección Urinaria del Adulto*. Servicio de Salud Metropolitano Norte, Complejo Hospitalaria San José, Unidad de Urología. https://www.ssmn.cl/descargas/protocolos_referencia_contrareferencia/hospital_clinico_san_j ose/urologia/itu_adulto.pdf
- Otaíza, F., Orsini, M., Pohlenz, M., & Tarride, T. (2017). *Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 2017*. Programa control de IAAS Departamento de calidad y seguridad de la atención Ministerio de Salud. https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/informe-vigilancia-2017.pdf
- Pigrau, C. (2013). Infecciones del tracto urinario nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(9), 614-624. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015
- Pujol, M., & Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(2), 108-113. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.001
- Santi, P. A. (2011). Light Sheet Fluorescence Microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59(2), 129-138. https://doi.org/10.1369/0022155410394857
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., HÃf¤rtel, S., & Zunino, P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in Proteus mirabilis biofilm formation. *Pathogens and Disease*, 74(ftw033). https://doi.org/10.1093/femspd/ftw033
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676-682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019
- Stickler, D., & Hughes, G. (1999). Ability of Proteus mirabilis to Swarm over Urethral Catheters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 206-208. https://doi.org/10.1007/s100960050260
- Tacconelli, E. (2017). GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. 7.

Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*, 7. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824

Wasfi, R., Hamed, S. M., Amer, M. A., & Fahmy, L. I. (2020). Proteus mirabilis Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00414

Yang, Z., Piksarv, P., Ferrier, D. E. K., Gunn-Moore, F. J., & Dholakia, K. (2015). Macrooptical trapping for sample confinement in light sheet microscopy. *Biomedical Optics Express*, 6(8), 2778-2785. https://doi.org/10.1364/BOE.6.002778

10. Anexo

I - Limpieza de los tubos FEP

A continuación, se presenta el protocolo de limpieza de los tubos FEP, utilizado para ambos métodos de cultivo.

- a. Se cortan tubos FEP de aproximadamente 10 cm de longitud cada uno, los que se deben dejar por 20 min en agua caliente (90°C) con el propósito que se enderecen.
- b. Lavar cada tubo con agua bidestilada
- c. Colocar los tubos FEP en una solución de NaOH 1M (previamente filtrada, poro de 0,45 um) y luego sonicar por 10 min.
- d. Sumergir en agua bidestilada y sonicar por 5 min.
- e. Colocar en solución de NaOH 0,5M filtrada y luego sonicar durante 10 min
- f. Sumergir en agua bidestilada y sonicar por 5 min.
- g. Enjuagar con Etanol 70% (previamente filtrado, poro de 0,45 um) y sonicar en una segunda solución de Etanol 70% durante 10 min.
- h. Sumergir en agua bidestilada y sonicar por 5 min.
- i. Conservar a 4°C en agua bidestilada hasta su uso. Sellar el Tubo Falcon con *Parafilm*.
- j. Previo a la incubación con bacterias, se deben esterilizar mediante inmersión en Etanol 95% (ON).

Anexo II – Fusión de Imágenes

Los *stack* obtenidos de la captura tienen un tamaño de 2048*2048 pixeles y una profundidad de 16 bit.

Para llevar a cabo la fusión de imágenes, es necesario crear una carpeta desde donde Fiji recoja los datos originales y guarde las fusiones).

1 – Realizar un BIN para cada *stack*, desde: *Image/Transform/Bin* y recuperar los archivos en un tamaño de 1024*1024 pixeles.

2- Renombrar los *stack*:

POS0 = *Stack* cámara 1 izquierda

POS90 = *Stack* cámara 1 derecha

POS180 = *Stack* cámara 2 izquierda

POS270 = Stack cámara 2 derecha

- 3 Se utilizó el *Plugin SPIM Registration/Bead-based registration*
- 4 Se utilizó el *Plugin SPIM Registration/Multiview fusion*
- 5 Luego del *stack* fusionado se modifica la profundidad a 8 bit
- 6 Parametrización del stack según setting del microscopio.