



VEURE MÉS ENLLÀ DEL FET POSSIBLE

MICROSCÒPIA ÒPTICA: EXPANSIÓ I SÚPER-RESOLUCIÓ

Pseudònim: Ataràxia

Curs: 2019-20

**By the help of microscopes,
there is nothing so small, as to
escape our inquiry; hence there
is a new visible world
discovered to the
understanding.**

-Robert Hooke-

AGRAÏMENTS

Per començar m'agradaria agrair a tothom qui s'ha interessat pel meu TdR (Treball de Recerca) i m'ha donat ànims i consells durant el transcurs d'aquest. Específicament agrair a un cert grup de persones, gràcies als quals el treball a resultat tal i com és, aquests són els següents.

Primer de tot vull agrair a la meva família, especialment a la meva mare per donar-me suport emocional i recordar-me constantment de prioritzar el treball i de no rendir-me.

També, a la meva tutora de primer de batxillerat, per orientar-me als inicis del treball, i a la meva tutora de TdR per aconsellar-me i per proporcionar-me un dels llibres dels que he extret més informació pel treball.

Vull donar les gràcies a la Fundació Catalunya La Pedrera per seleccionar-me pel curs de Bojos per la Bioenginyeria 2019, i per tant, a l'IBEC per permetre dur a terme la part pràctica d'aquest treball als seus laboratoris. Finalment, agrair a les investigadores d'aquest centre amb qui he treballat, Maria Aristo i Silvia Pujals.

ABSTRACT

This research paper analyses how optical microscopy techniques work and how they are applied in the research domain, focusing on some of the most recent and innovative methods which are expansion and super-resolution microscopy. To fulfil this objective, we structured our paper into two main chapters. The first section contains a recompilation of all the theoretical research about optical, fluorescence, expansion and super-resolution microscopy. Each of these parts contains an introduction, a generic description of the microscope working, characteristics, different methodologies and sample preparing. Secondly, there is the practice part, in which we formulated three different hypothesis as well as we carried out four lab experiments for a more interactive and first-hand understanding of expansion and super-resolution procedures. The results obtained out of them show the efficiency and protocol difficulty level of expansion and super-resolution microscopy, including a comparison of their imaging of HeLa cells. The study emphasizes the importance of microscopy techniques and choosing the best-suited one depending on different variables, such as the objective of the research, the biological sample that the researcher is willing to investigate and the budget. It also offers a comparison between expansion and super resolution techniques.

Este trabajo de investigación analiza cómo funcionan las técnicas de microscopía óptica y cómo se aplican en el dominio de la investigación, enfatizando algunos de los métodos más recientes e innovadores, los cuales son la microscopía de expansión y de superresolución. Para con este objetivo, estructuramos nuestro proyecto en dos capítulos principales. La primera sección contiene una recopilación de toda la investigación teórica realizada sobre la microscopía óptica, de fluorescencia, de expansión y de superresolución. Cada una de estas partes contiene una introducción, una descripción genérica del funcionamiento del microscopio, características, diferentes metodologías y preparación de muestras. En segundo lugar, está la parte práctica, en la que formulamos tres hipótesis diferentes y llevamos a cabo cuatro experimentos de laboratorio para una comprensión más interactiva y de primera mano de los procedimientos de expansión y de superresolución. Los resultados extraídos de estos muestran la eficacia y el nivel de dificultad del protocolo de expansión y de superresolución, incluida una comparación de sus imágenes de células HeLa. El estudio enfatiza la importancia de las técnicas de microscopía y de la elección de la más adecuada según diferentes variables, como el objetivo de la investigación, la muestra biológica que el investigador está dispuesto a analizar y el presupuesto. También ofrece una comparación final entre las técnicas de expansión y superresolución.

SUMARI

1. INTRODUCCIÓ.....	1
2. PART TEÒRICA	2
2.1 LA MICROSCÒPIA	2
2.1.1 INTRODUCCIÓ	2
2.1.2 HISTÒRIA	2
2.1.3 APLICACIONS	4
2.2 MICROSCÒPIA ÒPTICA	5
2.2.1 INTRODUCCIÓ	5
2.2.2 FUNCIONAMENT.....	5
2.2.3 CARACTERÍSTIQUES	6
2.2.4 TIPUS.....	7
2.2.5 MOSTRES.....	9
2.3 MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA.....	10
2.3.1 INTRODUCCIÓ	11
2.3.2 FUNCIONAMENT.....	11
2.3.3 CARACTERÍSTIQUES	11
2.3.4 MOSTRES.....	12
2.4 MICROSCÒPIA D'EXPANSIÓ	13
2.4.1 INTRODUCCIÓ	13
2.4.2 TIPUS.....	14
2.4.3 MOSTRES.....	15
2.5 MICROSCÒPIA DE SUPER-RESOLUCIÓ	16
2.5.1 INTRODUCCIÓ	16
2.5.2 TIPUS.....	17
2.5.3 FUNCIONAMENT.....	18
2.5.4 MOSTRES.....	19
3. PART PRÀCTICA	20
3.1 OBJECTIUS I HIPÒTESIS EXPERIMENTALS	20
3.2 EXPERIMENTS	20
3.2.1 HARIBO (ExM)	20
3.2.2 CLARA D'OU (ExM)	22
3.2.3 CÈL·LULES HELA (ExM)	26
3.2.4 CÈL·LULES HELA (SRM)	32
4. CONCLUSIONS.....	35
4.1 CONCLUSIONS EXPERIMENTALS	35
4.2 CONCLUSIONS GENERALS	36
BIBLIOGRAFIA.....	38

WEBGRAFIA.....	38
BIBLIOGRAFIA D'IMATGES.....	39

1. INTRODUCCIÓ

El món de la ciència des dels seus inicis que es troba en constant canvi i evolució, per aquest motiu sempre s'ha de continuar aprenent i millorant per mantenir-se actualitzat. La microscòpia no és cap excepció, en canvi es tracta d'un element essencial pel camp de la investigació en ciències de la salut i de la vida. Tot investigador, sense importar el seu nivell de professionalitat, necessita estar familiaritzat amb el material de laboratori, especialment amb les eines que requereixen un cert coneixement i pràctica, com el microscopi. Aquest és un dels motius pel que vaig optar de fer el Treball de Recerca sobre la microscòpia, ja que la recerca biològica és un àmbit que m'interessa i captiva des de que em van regalar el meu primer (i únic pel moment) microscopi. També s'ha de tenir en compte el fet de que l'IBEC junt amb la Fundació de la Pedrera m'oferissin l'oportunitat de treballar amb ells per tal d'aprendre sobre la microscòpia d'expansió i la de super-resolució, unes tècniques completament noves per a mi i molt interessants des del punt de vista científic, ja que aquestes han aconseguit trencar les lleis de la física per tal de poder observar estructures més enllà del que la mateixa llum ens permet veure.

Aquest Treball de Recerca tracta d'un estudi comparatiu de diverses microscòpies òptiques, enfocat especialment en la d'expansió i la de super-resolució. La realització d'aquest treball m'ha permès d'ur a terme un seguit d'objectius com introduir els principis, característiques i aspectes més significatius de la microscòpia per tal de remarcar la seva importància; entendre el funcionament dels microscopis òptics i per tant la física bàsica de la llum; descriure i comparar diferents tècniques i els seus avantatges i desavantatges envers altres, especialment quant a expansió i super-resolució.

El treball consta d'una primera secció, la part teòrica, la qual recull tota la recerca bibliogràfica realitzada sobre la microscòpia òptica general junt amb les tècniques derivades d'aquesta; seguida de la part pràctica, la qual consisteix en un apartat amb els objectius i hipòtesis experimentals, i en quatre experiments per aprofundir i reforçar la comprensió del protocol de la microscòpia d'expansió (emprant un microscopi de fluorescència convencional) i el funcionament del de super-resolució. Finalment, es troba un apartat amb les conclusions finals del treball, on s'hi veuen reflectits els resultats obtinguts de la recerca i de l'experimentació pròpia. Aquesta última secció del treball està dividida en dos subapartats, el primer per corroborar les hipòtesis experimentals plantejades i el segon amb les conclusions generals obtingudes.

2. PART TEÒRICA

2.1 LA MICROSCÒPIA

2.1.1 INTRODUCCIÓ

S'entén per microscòpia la ciència que empra diverses tècniques per tal de veure, distingir, analitzar i estudiar estructures i microorganismes, les mides dels quals es troben fora dels límits de la *resolució* natural de l'ull humà***, ja que aquests a simple vista semblarien inexistents i per tant només poden ser tractats amb l'ajuda de mitjans tecnològics. L'instrument òptic que utilitza aquesta ciència s'anomena microscopi, aquest consta de parts mecàniques i parts òptiques, que ens permet veure, de forma ampliada, mostres a escala micro prèviament preparades i tractades. Fins a l'actualitat, la microscòpia depèn tant de les tècniques per a la preparació de la mostra com del rendiment del mateix microscopi.

2.1.2 HISTÒRIA

Fins que no va ser possible traspasar amb mitjans tecnològics els límits naturals de la visibilitat i no es van tenir a disposició instruments amb conseqüències pràctiques importants, es va recórrer un camí llarg i ple d'interrupcions. Tot i que no va poder passar desapercebut a l'home de l'Antiguitat l'efecte amplificador d'una gota d'aigua damunt d'una fulla (vegeu Figura 2.1.2-1), durant molt de temps no es va utilitzar aquest procediment de visualització per la investigació. No obstant això, aquest fet natural i quotidià és considerant el punt de partida per un desenvolupament tecnològic que avui ens dona accés a la dimensió molecular. En l'Antiguitat

s'utilitzava la refracció*** de la llum a través de les esferes de vidre plenes d'aigua, ja que es poden trobar escrits de l'època amb petites descripcions de detalls d'insectes que en realitat només es podien obtenir amb l'ajuda d'una lupa, encara que no ho esmenti expressament.



Figura 2.1.2-1 Gota d'aigua com a lupa natural

* Distància mínima entre dos punts o angles per tal de poder identificar les seves imatges com dues de separades..

** La resolució natural de l'ull humà permet veure dos objectes a diferents si la distància entre aquests és d'entre 0,3 i 0,1 mil·límetres (mm) aproximadament. Si la distància és menor, llavors òpticament seran vistos com un sol objecte.

*** Canvi trajectòria d'un raig o del front d'una ona quan travessa una superfície que limita dos medis diferents.

Curiosament, el microcosmos, deu el seu descobriment a l'observació de l'univers i els fenòmens celestes. Això és gràcies a que qualsevol telescopi es pot utilitzar -amb diferents distàncies entre les lents i una disposició invertida- com un microscopi. Aquest descobriment s'atribueix al polidor de lents Hans Jansen i el seu fill Zacharias, al voltant de 1610, ja que en un intent de transformar un telescopi van construir el primer microscopi (vegeu Figura 2.1.2-2). Però el concepte de microscopi va ser introduït per l'Accademia dei Lincei, d'on el conegut Galileu en formava part. No obstant, els primers resultats de la microscòpia no van provocar un gran impacte en l'opinió pública i van passar desapercebuts per les autoritats de l'església. Tampoc va ocasionar cap revolució en la física o en la filosofia de la natura. A més, les seves aportacions pràctiques eren considerades nul·les per a la societat

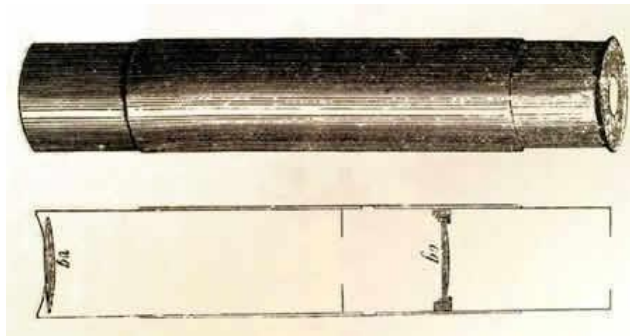


Figura 2.1.2-2 Microscopi de Hans i Zacharias Jansen.
Estructura exterior i lents interiors

A partir d'aquest moment, els microscopis van anar millorant progressivament gràcies a ments brillants com Robert Hooke (1653-1703). Aquest, va ser capaç de construir el seu propi microscopi (vegeu Figura 2.1.2-3) i per això va construir expressament una màquina de tallar lents. Amb els seus instruments va aconseguir cada cop augments* majors, fins a arribar a 170 augments. Totes les seves observacions van ser recopilades detalladament en el que va esdevenir el primer llibre popular sobre la microscòpia, el cèlebre «Micrographia», aparegut a Londres en 1665 (vegeu Figura 2.1.2-4).



Figura 2.1.2-3 Microscopi de Robert Hooke

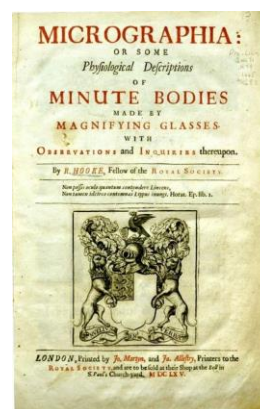


Figura 2.1.2-4 Coberta de la "Micrographia"

* Nombre de cops que la mida real d'un objecte ha sigut augmentada.

Des de 1660 fins a l'actualitat el microscopi òptic ha estat el pilar fonamental en el coneixement de l'invisible. El seu poder de resolució va augmentar amb el pas del temps (amb la millora en la qualitat de les lents) de la mateixa manera que el poder d'ampliació. Tot i l'evolució tècnica del microscopi, la longitud d'ona de la llum es considerava un límit insuperable. L'any 1930 el món microscòpic es va ampliar amb l'aparició del *microscopi electrònic**. L'avantatge principal respecte al microscopi òptic és un augment de 1000 vegades en la magnificació de la mostra observada acompanyat d'una major capacitat de resolució generant una millor definició (vegeu Figura 3.1.2-5). Amb el pas del temps es van anar descobrint nous mètodes d'observació del món microscòpic, de la mateixa manera que nous avenços tecnològics, fent possible l'evolució del microscopi amb la fabricació i comercialització de diferents tipus, com el de fluorescència i el de super-resolució



Figura 2.1.2-5 Mides de les cèl·lules i d'altres estructures, indicant el valor de resolució dels microscopis òptic i electrònic. També, les mesures de longitud que normalment s'utilitzen en microscòpia i les seves equivalències

2.1.3 APLICACIONES

La cèl·lula animal convencional mesura entre 10 i 20 μ m (micròmetres) de diàmetre, per tant, és aproximadament cinc vegades més petita que la menor partícula visible de forma natural. Per això, fins que no es va disposar de bons microscopis òptics a principis del segle XIX, no va descobrir-se que tots els teixits vegetals i animals són agregats de cèl·lules. Partint d'aquest descobriment, postulat com la teoria cel·lular, l'any 1838, va sorgir la biologia cel·lular. Posteriorment, gràcies als avenços i al progrés del camp de la microscòpia, l'home ha sigut capaç de veure diferents mostres amb més detall i resolució i, amb això, efectuar descobriments decisius per la microbiologia i per la medicina.

Així doncs, la microscòpia no només és didàctica, ja que ens permet comprendre i estudiar les estructures i funcions de la naturalesa en l'àmbit del molt petit, sinó que ens permet gaudir de figures peculiars que només es troben en fraccions de mil·límetre.

*Tipus de microscopis els quals visualitzen les mostres gràcies a *un feix d'electrons en comptes de fotons de llum i bobines electromagnètiques en lloc de lents*

2.2 MICROSCÒPIA ÒPTICA

2.2.1 INTRODUCCIÓ

El microscopi òptic es basa en l'ús de lents òptiques i d'un sistema d'il·luminació. Les lents permeten l'augment de la imatge de l'objecte observat. La font d'il·luminació consisteix en l'emissió d'un feix de llum visible per il·luminar estructures cel·lulars i enviar la projecció de la imatge cap al sistema de lents, perquè la imatge sigui augmentada i pugui ser observada a través dels oculars del microscopi òptic. Segons el nombre de lents utilitzades podem classificar el microscopi òptic de la següent manera:

- Microscopis simples o lupes: Aquells que tenen una lent convergent que amplia la imatge de l'objecte.
- Microscopis compostos: Són aquells que, per ampliar la imatge, consten de dos sistemes de lents (objectiu i ocular) que funcionen conjuntament per produir la imatge. La font de llum es projecta sobre la mostra per una tercera lent, anomenada lent del condensador.

Avui dia, el microscopi compost és el que generalment s'utilitza en cursos bàsics de biologia i microbiologia, pel fet que el seu complex de lents permet un augment més gran de la mostra.

2.2.2 FUNCIONAMENT

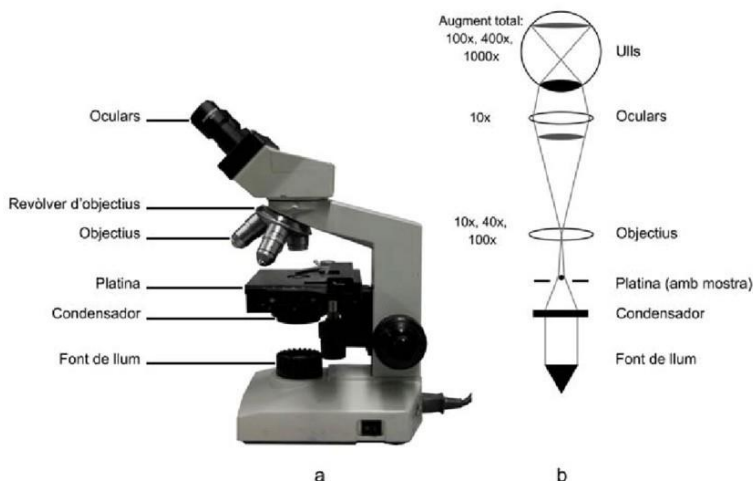


Figura 2.2.2-1 (a) Un microscopi òptic compost. (b) Trajectòria de la llum a través del microscopi compost. A més de l'ocular de 10x, existeixen oculars que proporcionen augments de 15-30x.

En els microscopis òptics compostos actuals, la font de llum és incorporada a la base. El condensador projecta el feix de llum sobre la mostra, que n'absorbeix una part, en refracta una altra i en transmet. La llum transmesa penetra en la lent de l'objectiu, que forma i augmenta la imatge. La lent ocular torna a augmentar la imatge que rep i la projecta cap a la darrera lent de la sèrie, la que hi ha a l'ull de l'observador.

Finalment, l'ull forma una imatge a la retina que percep el cervell (vegeu Figura 2.2.2-1).

2.2.3 CARACTERÍSTIQUES

◆ AUGMENT

Un gran nombre de microscopis òptics compostos tenen diversos objectius, cadascun amb un poder de resolució diferent. Normalment consten d'una lent que augmenta l'objecte 10 vegades (10x), una lent de major magnitud que ho fa 40 vegades (40x), i la lent d'immersió, que augmenta 100 vegades (100x) i té un camp petit d'observació, però proporciona un gran detall (vegeu Figura 2.2.3-1). La majoria de les lents de l'ocular augmenten també 10 vegades la imatge (10x). L'augment total es pot calcular multiplicant els augments que proporcionen els dos sistemes de lents que s'empren.

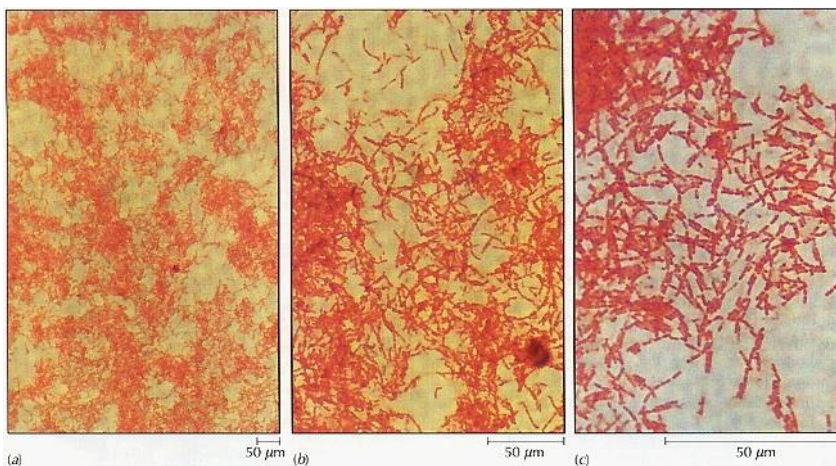


Figura 2.2.3-1 (a) Veiem el mateix camp de *Bacillus subtilis* ampliat amb l'objectiu de baixa resolució en sec (100x), (b) amb el d'alta resolució en sec (400x) i (c) amb oli d'immersió, aquest ajuda a enfocar millor la mostra (1000x). L'augment més gran revela progressivament més detall d'una porció del camp menor.

◆ RESOLUCIÓ

En general, la radiació d'una longitud d'ona determinada no pot utilitzar-se per analitzar estructures de mida inferior a la seva longitud d'ona: això suposa una limitació fonamental per tots els microscopis.

Així doncs, el límit màxim de resolució d'un microscopi òptic convencional està determinat per la longitud d'ona de la llum visible, que va de 0,4 µm (per al violeta) fins a les 0,7 µm (per al vermell llunyà).

El límit de resolució depèn, junt amb la longitud d'ona, de la AN (obertura numèrica)* de les lents del sistema utilitzat.

* Funció de la capacitat de les lents de recollir la llum. Aquest valor en lents no és superior a 1, excepte per les lents d'immersió en oli, en les quals pot arribar a ser d'1,4. Quant més gran és l'obertura numèrica major és la resolució i la brillantor de la imatge. Tanmateix, aquest avantatge s'obté amb distàncies de treball molt curtes i profunditats de camp molt petites.

En cas de tenir les millors condicions possibles, és a dir, llum violeta i obertura numèrica d'1,4, el límit de resolució teòric que es pot obtenir amb el microscopi òptic és sols de 0,2 μm . A la pràctica els bacteris i els mitocondris, que tenen aproximadament 0,5 μm de diàmetre, són, generalment, les estructures més petites que es poden observar amb nitidesa amb el microscopi òptic; els detalls inferiors a aquestes dimensions queden enfosquits pels efectes de la naturalesa ondulatoria de la llum (vegeu Figura 2.2.4-1).

2.2.4 TIPUS

En la microbiologia s'utilitzen diversos tipus de microscopis òptics: de camp clar, contrast de fases, camp fosc, Nomarski i fluorescència.

- *MICROSCÒPIA DE CAMP CLAR*

El microscopi de camp clar és el microscopi òptic estàndard. Aquest, visualitza les mostres gràcies a les diferències de contrast entre elles i el medi que les rodeja (vegeu Figura 2.2.4-2 a). En els laboratoris clínics es prefereix emprar microscopis òptics de camp clar, i la millor manera d'assolir contrast és acolorint les mostres. Amb el temps s'ha aconseguit fabricar microscopis òptics compostos que augmenten el contrast sense haver de tenyir la mostra. Aquests són explicats a continuació.

- *MICROSCÒPIA DE CONTRAST DE FASES*

En un microscopi òptic ordinari, el contrast s'obté perquè els diferents materials absorbeixen diferents quantitats de llum. Però en el microscopi de contrast de fases, el contrast depèn dels diferents índexs de refracció* que hi ha entre els microorganismes i el fons. Les úniques diferències mecàniques entre un microscopi òptic estàndard i un de contrast de fases es troben en l'objectiu i en el condensador, que en aquest cas contenen unes anelles opaques especials. Aquest microscopi es basa en el principi que les ones de llum es mouen a diferents velocitats a través de materials amb diferents índexs de refracció.

Així els raigs de llum que travessen la mostra no estan en la mateixa fase que els que l'envolten. La conseqüència de combinar raigs de llum de diferents fases s'anomena interferència (vegeu Figura 2.2.4-1).

* Nombre definit pel medi, el qual es calcula dividint la velocitat de la llum en el buit entre la velocitat de la llum en el medi material considerat.

L'avantatge més gran d'aquesta microscòpia és que pot emprar-se per estudiar el moviment cel·lular i estructures internes de la cèl·lula sense que es distorsionin per la fixació i la coloració (vegeu punt 2.2.5). El contrast de fases mostra l'interior de la cèl·lula amb gran detall. El seu inconvenient és que la imatge és envoltada per un halo de llum, una conseqüència inevitable quan el contrast es genera per interferència (vegeu Figura 2.2.4-2 b).

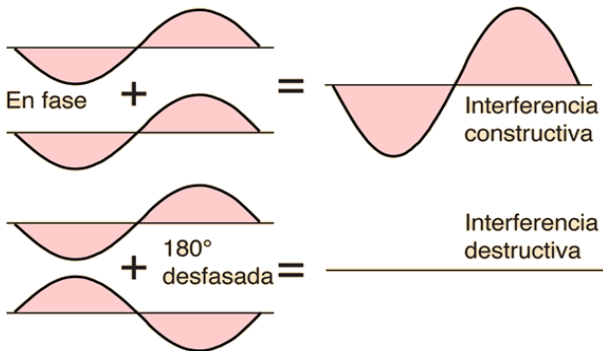


Figura 2.2.4-1 Interferència entre ones lluminoses. Quan dues ones de llum es combinen en fase, l'amplitud de l'ona resultant és més gran i la lluminositat s'incrementa. Dues ones de llum desfasades s'anul·len parcialment l'una a l'altra, produint una ona de menor amplitud o d'amplitud 0, i per consegüent, de menor intensitat lumínica o fosc completa.

- **MICROSCÒPIA DE CAMP FOSC**

El microscopi de camp fosc també permet de veure cèl·lules vives sense tenyir. Opera pel principi de dispersió, que significa que un raig de llum pot canviar la direcció, o dispersar-se, en xocar amb un objecte petit. Un condensador especial amb un disc redirigeix el raig de llum perquè no entri a l'objectiu: els únics raigs de llum que arriben a l'objectiu són els que han estat dispersats en xocar amb la mostra. El resultat és una imatge brillant sobre un fons fosc. Aquest microscopi és molt efectiu per observar estructures externes. Revela menor detall intern de les cèl·lules en comparació a la microscòpia de contrast de fases (vegeu Figura 2.2.4-2 c).

- **MICROSCÒPIA DE NOMARSKI**

Basada en els principis exposats per Georges X. Normarski a la fi de la dècada de 1950, la microscòpia de Nomarski, o de contrast d'interferència diferencial, com la microscòpia de contrast de fases, aprofita els diferents índexs de refracció i produeix contrast per interferència. Aquestes dues tècniques es diferencien en la manera que els raigs d'interferència se separen en el microscopi. Els microscopis de Normarski, en lloc d'anelles opaques, en el mateix lloc tenen un parell de prismes. Les dues formes de dirigir els raigs produeixen diferents tipus d'imatge. La microscòpia de Nomarski produeix una imatge gairebé tridimensional i amb un detall més fi que el contrast de fases (vegeu Figura 2.2.4-2 d). S'empra per distingir microorganismes vius en teixits animals.

- **MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA**

(Vegeu punt 2.3)

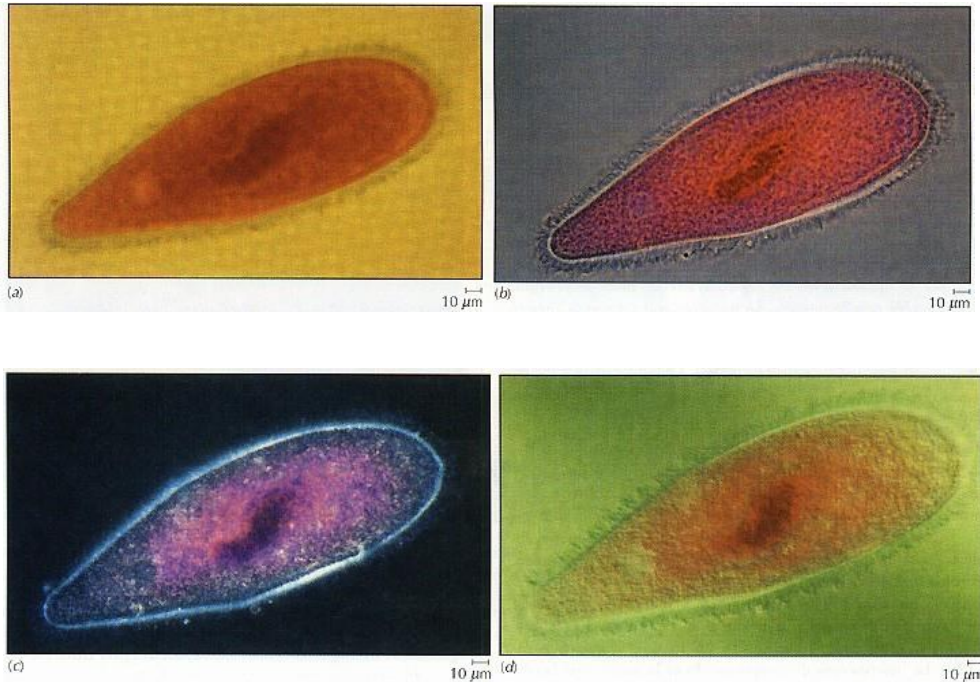


Figura 2.2.4-2 Imatges de *Paramecium* a 1000x, però amb diferents microscopis. (a) La microscòpia de camp clar permet observar la forma i les estructures internes més grans, com el nucli. (b) La imatge de contrast de fases mostra més detall intern, i el característic halo. (c) La microscòpia de camp fosc revela la presència de cilis. (d) La imatge de Nomarsky és gairebé tridimensional.

2.2.5 MOSTRES

Com que molts dels microorganismes tenen poc contrast natural, necessiten una preparació especial abans de ser examinats amb un microscopi òptic ordinari. Tant la preparació com la tinció (coloració) de la mostra són fonamentals per a la qualitat de la imatge. En cas de voler observar microorganismes vius, generalment, no es fa servir el microscopi de camp clar, sinó algun dels altres quatre tipus de microscopis òptics.

- **FIXACIÓ**

La fixació consisteix a matar les cèl·lules de la mostra amb gran rapidesa, permetent així que es mantinguin les propietats fisiològiques i morfològiques de l'organisme. La fixació evita que la mostra es degeneri produint ponts entre les proteïnes i diferents materials del teixit d'aquesta. Hi ha dos tipus de fixadors:

- Físics: calor (en forma de flama) i fred.
- Químics: productes amb una base fixadora (són menys lesius que l'escalfor).

La fixació consta de diversos inconvenients. Pot distorsionar l'aparença de la cèl·lula, fent-la més difícil d'identificar, i tampoc pot estudiar-se'n la mobilitat.

- **TINCIÓ**

Un cop la mostra és fixada, s'aplica el colorant a la preparació i es deixa un cert temps perquè sigui absorbit per la mostra; llavors s'esbandeix el colorant sobrant, en general amb aigua.

Els colorants són tints per augmentar el contrast. Uns quants colorants, anomenats colorants vitals, es poden afegir directament a mostres en fresc per tenyir les cèl·lules vives. Però la majoria de colorants només són efectius si les preparacions han estat prèviament fixades. Moltes tincions són específiques per poder observar determinades estructures, també hi ha de molts tipus:

- Segons el seu origen:
 - Naturals: procedeixen d'animals o vegetals.
 - Artificials: procedeixen del carbó mineral i són les més utilitzades.
- Segons la seva naturalesa:
 - Àcids: tenyeixen estructures bàsiques.
 - Bàsics: tenyeixen estructures àcides.
 - Mordents: fan més intensa la tinció

Hi ha dos tipus de procediments de tinció:

- Tincions simples: només utilitzen un colorant, el qual és bàsic i tenyeix del mateix color totes les cèl·lules que l'absorbeixen.
- Tincions diferencials: es fan servir per distingir tipus de microorganismes (vegeu Figura 2.2.5-1). Normalment consisteixen en dues etapes: una tinció primària (simple), seguida d'una de contrast (s'utilitza un altre tint per tenyir les cèl·lules que no s'han tenyit amb el colorant primari).

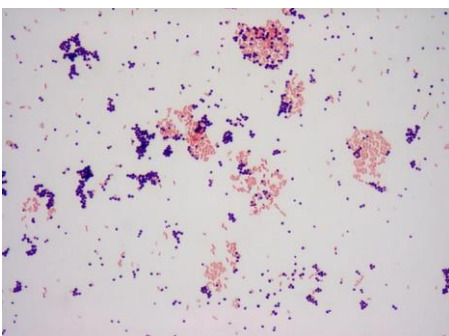


Figura 2.2.5-1 Imatges d'una tinció de Gram. Es tracta d'una tinció diferencial molt important i àmpliament utilitzada en microbiologia. Aquesta permet diferenciar bacteris grampositius (tenyits de color violeta) de gramnegatius (tenyits de color rosat).

2.3 MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

2.3.1 INTRODUCCIÓ

El microscopi de fluorescència és un tipus de microscopi òptic que mostra la imatge de la mostra gràcies al contrast obtingut mitjançant fluorescència. Les molècules fluorescentes absorbeixen la llum d'una determinada longitud d'ona i emeten llum d'una altra longitud d'ona més llarga. Quan els materials fluorescentes són il·luminats per la seva longitud d'ona d'absorció, emeten llum visible que brilla sobre un fons fosc. La intensitat i el color de la llum són propietats característiques de la molècula fluorescent utilitzada, per això, a diferència del contrast de fases i de les tècniques de camp fosc, la fluorescència depèn de les propietats de la mostra, no del microscopi. Malgrat això, aquest tipus de microscopi no és idèntic a l'òptic convencional, sinó que està lleugerament modificat per tal de poder veure correctament la fluorescència.

2.3.2 FUNCIONAMENT

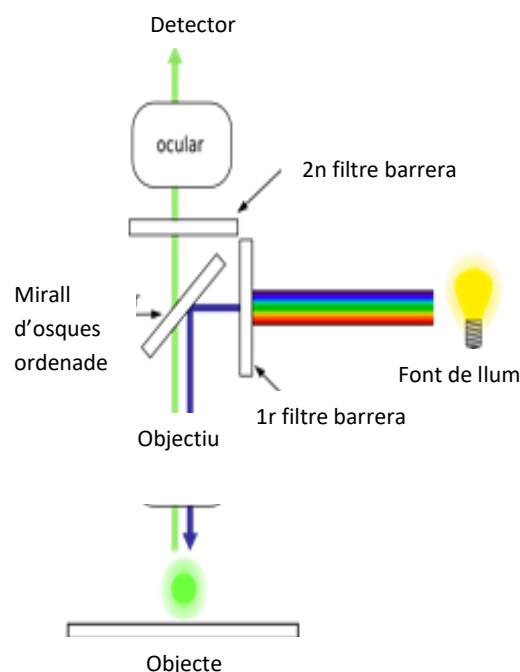
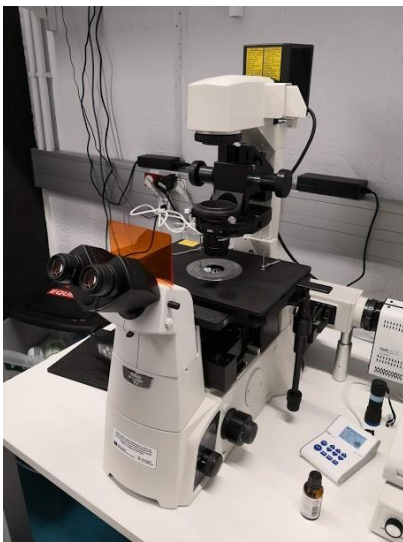


Figura 2.3.2-1 Imatge de: Ataràxia (a) Microscopi de fluorescència estàndard, molt similar estèticament a un microscopi òptic convencional. (b) Sistema òptic d'un microscopi de fluorescència modern.

(a)

(b)

Aquest microscopi es diferencia del convencional pel fet que la llum incident, procedent d'una làmpada potent, travessa dues sèries de filtres; un per interceptar la llum abans que arribi a la mostra i un altre per filtrar la llum obtinguda a partir de la mostra. El primer filtre només permet passar les longituds d'ona que exciten un determinat colorant fluorescent (fluorocrom), mentre que el segon filtre tan sols permet el pas de les ones emeses pel mateix fluorocrom (vegeu Figura 2.3.2-1).

2.3.3 CARACTERÍSTIQUES

Les característiques del microscopi de fluorescència són molt similars a les de l'òptic. L'augment depèn dels objectius que són dels mateixos augments que en l'òptic. Quant a la resolució, segueix dependent de l'obertura numèrica i de la longitud d'ona, però en aquest

cas s'utilitza la longitud de l'ona d'excitació de la partícula fluorescent. Les longituds d'ona que es fan servir habitualment en fluorescència són 647-567-488-405 nanòmetres. Per calcular la resolució es segueix la següent fórmula: $\lambda/2AN$, on λ és la longitud d'ona i AN l'obertura numèrica. Tant l'augment com la AN , es troben indicats en els objectius

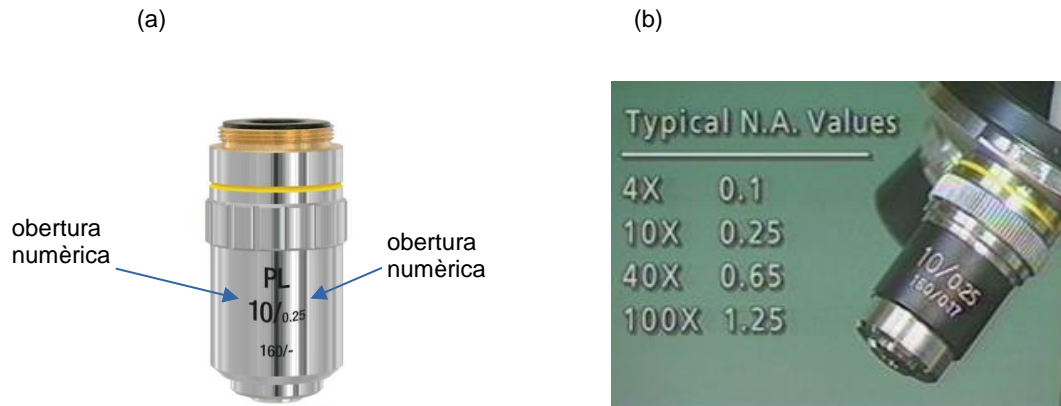


Figura 2.3.3-1 (a) Objectiu de 10x amb obertura numèrica de 0.25. (b) Valors d'obertura numèrica corresponents als augments.

2.3.4 MOSTRES

Perquè una mostra sigui adequada per a la microscòpia de fluorescència, ha de ser fluorescent, si no fos així, només es veuria un fons negre sense res que observar. Hi ha diferents mètodes per fer fluorescent una mostra, però aquests són els principals:

- **Fluorescència primària:** aquesta s'utilitza per a la minoria d'organismes, incloent-hi els bacteris fotosintètics i les algues, ja que són fluorescents per ells mateixos.
- **Fluorescència secundària:** consisteix en la introducció de fluorocroms a l'estructura de la mostra. Aquest és el procediment per a la majoria de les aplicacions biològiques de la microscòpia de fluorescència).
- **Immunofluorescència:** en certs casos és necessari adherir anticossos als fluorocroms (immunotinció), convertint-se en reactius molt específics per la unió d'altres macromolècules.

Es consta d'una gran diversitat de fluorocroms, cadascun amb una afinitat molecular diferent. També, tenen un espectre d'absorció i d'emissió específic que depèn de la composició i estructura dels seus fluorofòrms. La *Fluoresceïna* i la *Rodamina* són exemples de colorants fluorescents comuns en la immunofluorescència.

(a)

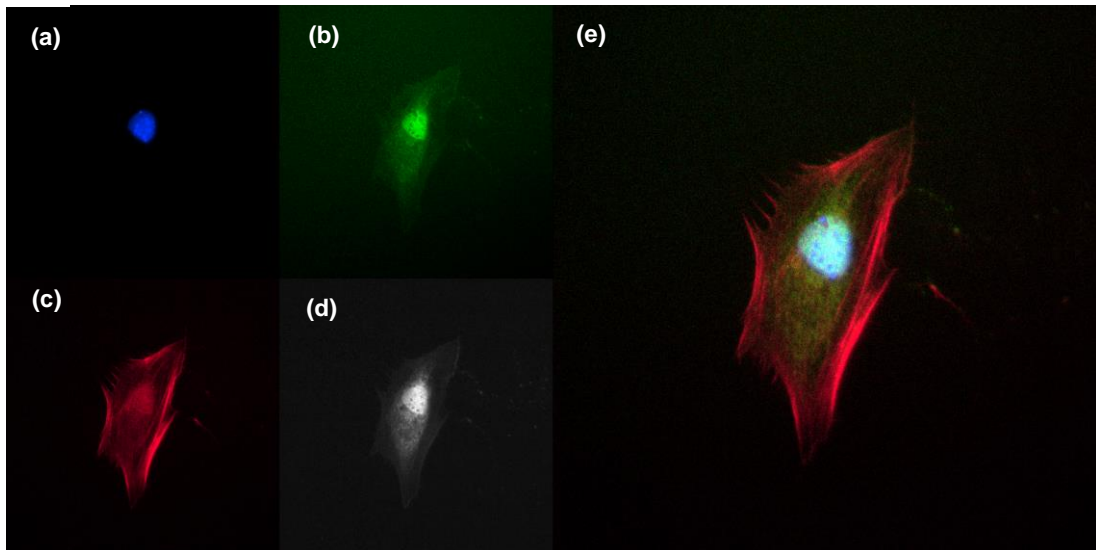


Figura 2.3.4-1 Imatge de: Ataràxia MEF (fibroblast embrionari de ratolí) tractat amb immunofluorescència. (a) Nucli tenyit amb *Hoescht*. (b) YAP (Regulador de la transcripció) tenyit amb anticòs de Ratolí que reconeix YAP, i després, anticòs de cabra que reconeix l'anticòs de ratolí amb un fluorocrom verd. (c) Actina tenyida amb *Fal·loïdina* amb un fluorocrom vermell. (d) Cèl·lula sencera tenyida amb *CellMask*, reactiu comercial de fórmula química desconeguda. (e) Imatge amb tots els filtres utilitzats excepte el d.

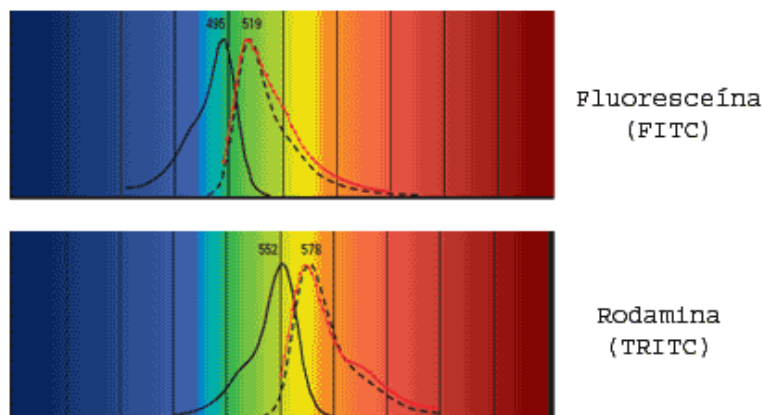


Figura 2.3.4-2 Espectre d'excitació i d'emissió de la *Fluoresceïna* i de la *Rodamina*. La línia negra contínua representa l'espectre d'excitació, la línia negra puntejada mostra l'espectre d'emissió.

2.4 MICROSCÒPIA D'EXPANSIÓ

2.4.1 INTRODUCCIÓ

La ExM (microscòpia d'expansió) és un mètode relativament recent, aquest va ser publicat l'any 2015 per Edward S. Boyden i el seu equip del MIT (Institut Tecnològic de Massachusetts). Un dels majors problemes a la microscòpia són els límits de resolució imposats per la física de la llum. Al llarg dels anys s'han fet nombrosos intents per vèncer aquests límits, però en lloc de millorar la potència i la qualitat del microscopi, La ExM consisteix en l'expansió física de mostres biològiques de manera isotròpica sintetitzant una

xarxa de polímers dins d'aquestes. Un dels avantatges d'aquest mètode és la seva conveniència econòmica, ja que el procés permet als investigadors obtenir imatges de molècules i estructures biològiques de l'escala nano sense requerir equipament immòdic de microscòpia, sinó emprant microscopis convencionals, com l'òptic o el de fluorescència. Per aquest motiu es pot desplegar fàcilment en molts contextos en biologia, neurociències i medicina.

Durant aquests últims anys, la ExM s'ha anat desenvolupant i adaptant amb gran rapidesa fins a arribar a tenir un gran nombre de protocols i mètodes d'expansió amb diferents objectius i requisits. Totes les variants del protocol ExM comparteixen un flux lògic similar, essencial per a l'expansió d'espècies isotròpiques, que conserva la informació biològica fins a escales de longitud nanoscòpica.

La majoria dels protocols ExM amplien un exemplar biològic en uns 100x de volum, o 4,5x en la dimensió lineal; aquest factor està establert per la concentració de reticulants, la reducció de la concentració de reticulació dóna lloc a majors factors d'expansió del gel, però també a una major fragilitat d'aquest.

Un gran avantatge de la ExM és la possibilitat de treballar i visualitzar tant cèl·lules com teixits cel·lulars; això es deu al fet que el producte final consisteix en un ~99% d'aigua i per tant la mostra es torna transparent i facilita la transmissió de llum a través seu. També, aquesta tècnica és compatible amb la visualització de diverses biomolècules, com proteïnes i ARN (àcids ribonucleics).

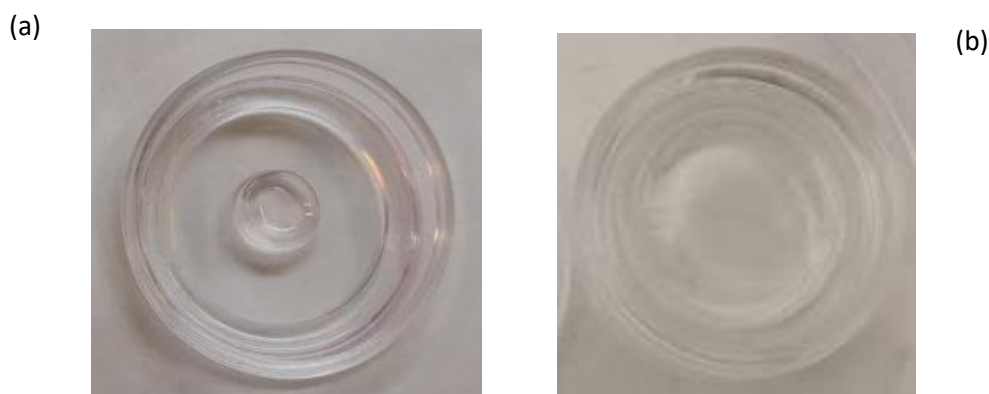


Figura 2.4.1-1 Imatge de: Ataràxia (a) Hidrogel polimeritzat, abans de l'expansió. (b) Hidrogel polimeritzat, després de 24 hores d'expansió.

2.4.2 TIPUS

Amb el pas del temps ha anat sorgint múltiples variacions i millores del mètode d'expansió original, algunes d'aquestes són les següents:

- ProExM: originada l'any 2016, permet l'ús de fluorocroms més utilitzats i comuns, ja que el procediment ExM original en requeria d'especialitzats, normalment amb un preu més elevat.

- iexM: sorgida l'any 2017, tracta de realitzar una segona expansió després de l'original. Això va fer disminuir la resolució òptica a 25 nm i va proporcionar grans quantitats d'espai i separació entre estructures complexes i densament empaquetades que seria difícil d'interpretar d'una altra manera.

X10: publicada a finals del 2018, consta d'una recepta de gel millorada, la qual proporciona una resolució de 25 nm i el preu més econòmic fins al moment

2.4.3 MOSTRES

Com és habitual en la microscòpia, per tal de poder visualitzar les mostres, aquestes han de ser específicament tractades de forma prèvia. Quant a la microscòpia d'expansió, el procés de preparació de la mostra és moderat i amb un nivell de dificultat baix. Depenent del mètode que es vulgui utilitzar es necessita un protocol diferent, però tots tenen certes similituds i coincidències:

- Fixació: un dels desavantatges d'aquesta tècnica és la incompatibilitat amb mostres vives, és a dir, només es pot treballar amb mostres prèviament fixades, tant cèl·lules com teixits. Per fer-ho, hi ha diversos possibles processos, però el més comú és utilitzant 4% de PFA (Paraformaldehid) en PBS (tampó fosfat salí).
- Tinció: en la major part dels casos, les mostres es tenyeixen. Normalment, s'utilitza la immunotinció, amb diversos fluorocroms per poder distingir diferents parts de la mostra amb més facilitat.
- Gelificació: aquest pas és essencial i el diferencia la microscòpia d'expansió de la resta. Consisteix en la formació de l'hidrogel, el qual conté una xarxa de polímers de poliacrilat de sodi (vegeu Figura 2.4.3-1). El polímer s'uneix als ancoratges de la mostra de teixit cada pocs nanòmetres, de manera que es poden separar estructures i molècules quan es produeixi l'expansió. En cas que la mostra sigui un teixit cel·lular, és necessari utilitzar un pregel abans de l'hidrogel per assegurar la penetració correcta d'aquest últim a causa del gruix de la mostra.
- Digestió: s'utilitza proteïnasa K per tal de degradar les proteïnes de la mostra i permetre que aquestes s'expandeixin junt amb el gel.
- Expansió: bàsicament consisteix a afegir aigua a l'hidrogel polimeritzat i per tant provocar la inflor d'aquest i l'ampliació de la mostra mantenint la integritat estructural i les relacions dimensionals d'aquesta.
- L'ordre d'aquests passos pot variar depenent del protocol triat.

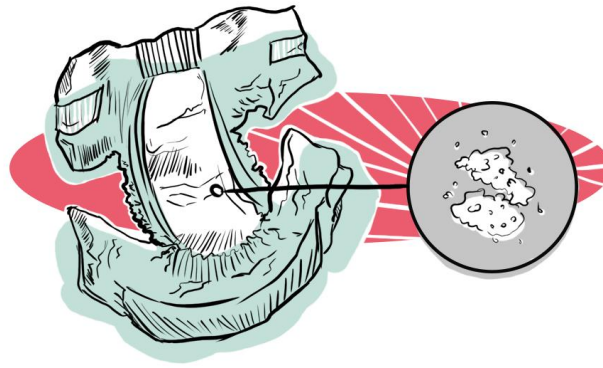


Figura 2.4.3-1 El poliàcrilat de sodi, fonament de la moderna tecnologia de bolquers, és la clau per poder dur a terme la microscòpia d'expansió degut a la seva capacitat d'absorció.

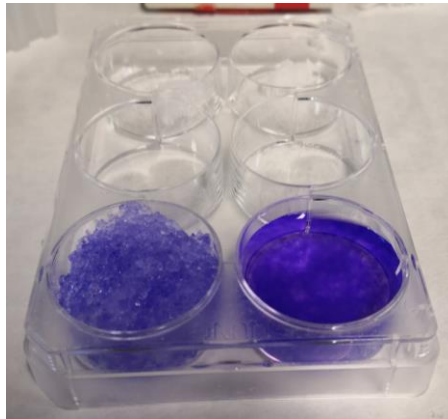


Figura 2.4.3-2 Imatge de: Ataràxia A la dreta hi ha aigua corrent amb colorant sense cap polímer súper-absorbent i a l'esquerra hi ha la mateixa quantitat d'aigua amb colorant, però aquest cop amb poliàcrilat de sodi.

2.5 MICROSCÒPIA DE SUPER-RESOLUCIÓ

2.5.1 INTRODUCCIÓ

La SRM (microscòpia de fluorescència de super-resolució) és una tècnica molt innovadora i útil, la qual supera el límit de difracció, una barrera física que restringeix la resolució òptica a aproximadament 250 nm i que anteriorment es pensava que era impenetrable. Les tècniques SRM funcionen “encenent i apagant” els fluorocroms que conté la mostra de forma seqüencial en el temps, de manera que es poden gravar els senyals consecutivament, permetent així identificar molècules fluorescents massa juntes per ser diferenciades d'altre forma i per tant, aconseguir la imatge d'estructures cel·lulars amb un nivell de detall que abans només era possible emprant microscòpia electrònica. Alhora, les tècniques SRM conserven els

avantatges de la microscòpia òptica pel que fa a la conservació de la mostra, la flexibilitat d'imatges i l'especificitat d'aquestes.

2.5.2 TIPUS

Durant els últims anys, s'han fet grans avenços en aquest tipus de microscòpia, junt amb nombroses noves tècniques i protocols alternatius. Aquestes, es divideixen en dos grups amb metodologies diferents:

- Super-resolució determinista: inclou mètodes que utilitzen efectes no lineals en quan al canvi d'estat fosc i brillant dels fluoroforns. Inclou la tècnica STED (esgotament d'emissions estimulades) i la SIM (microscòpia d'il·luminació estructurada), entre altres.
- Super-resolució estocàstica: consisteix en la utilització de fluorocroms químicament modificats per tal que els que es trobin a una gran proximitat emetin llum en moments diferents. Inclou la STORM (microscòpia de reconstrucció òptica estocàstica) (vegeu Figura 2.5.2-1) junt amb moltes altres tècniques SMLM (microscòpia de localització única de molècules), com la PALM (microscòpia de localització foto activada) i la GSDIM (microscòpia de retorn individual de la molècula d'esgotament de l'estat de terra).

Bàsicament, es diferencien per com són excitats els fluorocroms i per la forma de detectar els fotons emesos. Aquests mètodes han aportat una gran millora quant la magnitud en la resolució espacial en les tres dimensions permetent als usuaris adquirir informació a escala nano mitjançant microscòpia de llum convencional

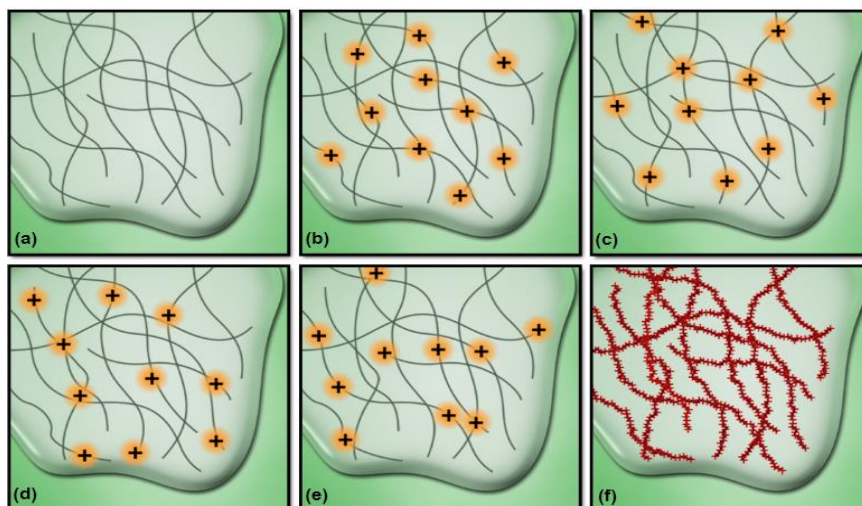


Figura 2.5.2-1 Principi bàsic de la imatge STORM. (a) Il·lustració de microtúbuls en una cèl·lula, etiquetada amb fluorocroms. (b) A causa de l'excitació làser la majoria dels fluoroforns es troben en un estat fosc, a partir del qual els fluoroforns únics poden tornar estocàsticament a un estat emissiu (ressaltat en groc). Les creus negres representen el centre calculat de les emissions de llum dels fluoroforns. (c-e) Els emissors únics es registren en un gran nombre de fotogrames. (f) Finalment, es fa una reconstrucció de totes les imatges aconseguides anteriorment i així veure l'estructura amb el microscopi.

2.5.3 FUNCIONAMENT

A causa de l'aplicació de fluorocroms per a la tinció de la mostra, es requereix la utilització del microscopi de fluorescència, però amb certes modificacions i complements especialitzats. Els microscopis de super-resolució són molt específics, i tot i tenir característiques semblants, pateixen diverses variacions, principalment la càmera, depenent de la tècnica SRM que es vulgui realitzar. Una de les similituds que tenen i probablement una de les més representatives, es troba en la font de llum, ja que aquesta consisteix en un làser d'excitació super-potent, aquest s'inclina, automàticament o de forma manual, fins a aconseguir l'angle idoni per a la visualització de la mostra, l'angle varia depenent del mètode SRM

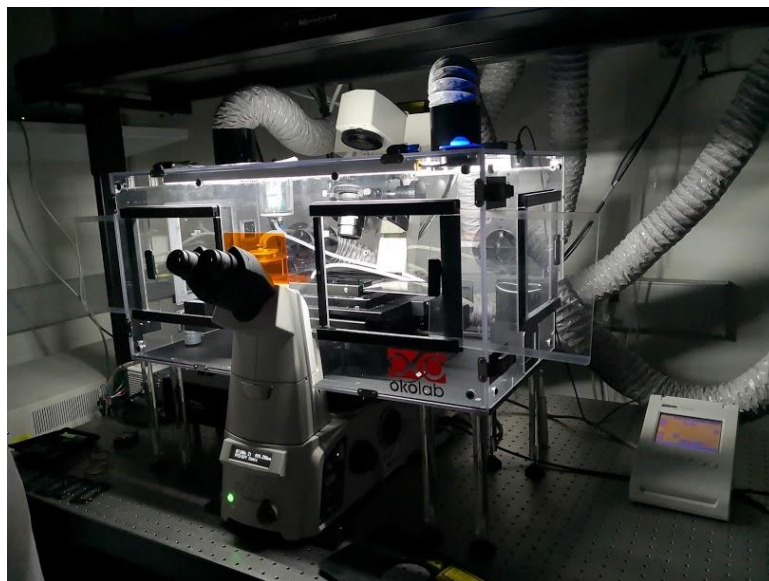


Figura 2.5.3-1 Imatge de: Ataràxia Microscopi de super-resolució STORM.

A part del microscopi en si, un element essencial per aquesta microscòpia és la instal·lació d'un *software* especial per la tècnica de super-resolució. La necessitat de la seva obtenció és deguda al fet que s'encarrega de localitzar els punts de fluorescència normal i els transforma per fer una imatge de super-resolució (vegeu Figura 2.5.3-2). També, administra un gran ventall d'opcions i possibilitats quant a la previsualització d'imatge, com per exemple, alineació del làser, intensitat de color, canvi de filtre, imatge amb punts o de forma gaussiana, opció 3D, presa de vídeo o imatge, entre moltes altres. Per això, és habitual situar un sistema informàtic al costat o a la mateixa sala del mateix microscopi.

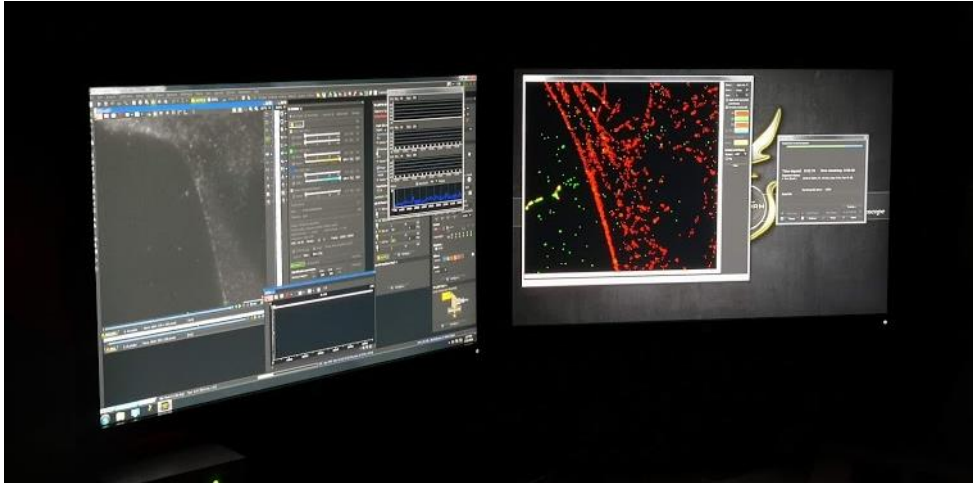


Figura 2.5.3-2 Imatge de: Ataràxia Software N-STORM. A l'esquerra previsualització monocromàtica d'actina amb fluorescència estàndard i a la dreta imatge convertida a SRM.

2.5.4 MOSTRES

Com s'ha comentat anteriorment, en super-resolució les mostres són necessàriament tenyides amb fluorocroms per poder ser interpretades pel microscopi un cop excitats.

Als inicis d'aquest tipus de microscòpia, els fluorocroms que s'utilitzaven eren únicament comercialitzats per realitzar els seus protocols, el qual incrementava el seu cost. Amb l'aportació de noves metodologies, actualment s'empren pigments fluorescents comuns i utilitzats en microscòpia de fluorescència regular.

Tant el procés de fixació (no necessari en tots els casos) com el de tinció cel·lular són els estàndards en fluorescència. Tot i això, la selecció del fixatiu òptim per a la mostra, és primordial. També, com en totes les microscòpies, però especialment en super-resolució, qualsevol variació del protocol (temperatura, protocol de rentatge...) té conseqüències en la qualitat d'imatge.

La variant més representativa en la preparació de mostres per SRM, és la possible modificació química dels fluorocroms, depenent de la tècnica que es vulgui realitzar

3. PART PRÀCTICA

3.1 OBJECTIUS I HIPÒTESIS EXPERIMENTALS

L'objectiu principal d'aquesta part del treball, tracta d'entendre el funcionament i la metodologia d'unes de les tècniques més recents i innovadores del camp de la microscòpia, finalitzant amb la comparació d'aquestes. En aquest cas es va treballar amb microscòpia d'expansió i amb microscòpia de super-resolució.

Partint d'aquest objectiu, s'han formulat les següents hipòtesis:

1. La recent incorporació de la ExM en el camp d'investigació i per tant la seva necessitat d'increment d'experimentació i desenvolupament, comporta certa inestabilitat i problemàtica al protocol d'aquesta tècnica.
2. Possible deformació de la mostra a l'utilitzar el mètode d'expansió, i per tant, obtenció de resultats equívocs o discutibles.
3. Major resolució i precisió als resultats de la SRM que de la ExM.

Per tal de corroborar les hipòtesis plantejades i per assolir l'objectiu proposat s'han dut a terme diversos experiments. S'ha començat per experiments senzills i de fàcil comprensió per tal d'entendre el concepte general de la *ExM* de forma simplificada. Posteriorment s'han dissenyat experiments que mostren el funcionament i la metodologia de les dues tècniques.

Aquests experiments s'han dissenyat i realitzat amb l'ajuda del grup de "nanoscopy for nanomedicine" de l'IBEC (Institut de Bioenginyeria de Catalunya).

3.2 EXPERIMENTS

3.2.1 HARIBO (*ExM*)

- Objectiu:

Comprendre el concepte d'"expansió" observant el factor de creixement en ossets de gominola.

- Materials:

- ◆ Ossets *Haribo*
- ◆ Quadricula (0.8 × 0.8 cm)
- ◆ Recipient de vidre (Ex: cristal·litzador)

- ◆ Aigua Milli-Q (aigua ultra filtrada)
- ◆ Placa de Petri
- ◆ Incubadora

- Procediment:

- Se situen els ossets *Haribo* en un recipient suficientment ample, com per exemple un cristal·litzador i sota la base d'aquest es col·loca una quadrícula de quadrats 0,8 × 0,8 cm (necessari per saber amb precisió el factor de creixement final). A continuació s'afegeix aigua Milli-Q fins a cobrir els ossets amb totalitat (vegeu Figura 3.2.1-1).

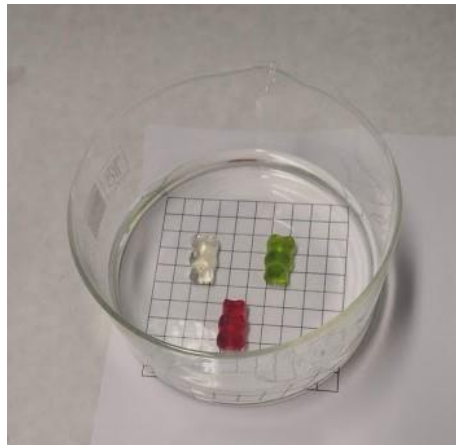


Figura 3.2.1-1

Imatge de : Ataràxia

- Posar-ho en una incubadora a 4°C, ja que a temperatura ambient es dissolen.
- Afegir aigua Milli-Q a mesura que els ossets la van absorbint, de manera que els cobreixi en tot moment.
- Deixar-ho reposar el temps desitjat.

- Resultats:

Figura 3.2.1-2

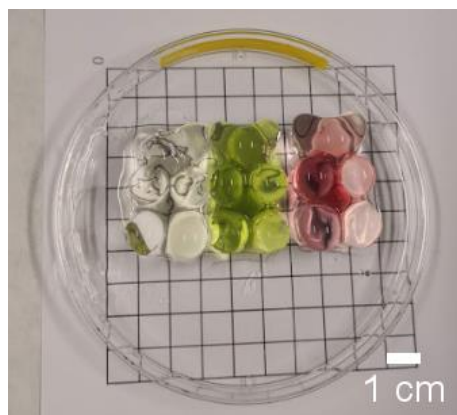
Imatge de : Ataràxia



Temps: 0 hores

Figura 3.2.1-3

Imatge de : Ataràxia



Temps: 24 hores

- Factor de creixement *Haribo* (= 159%):

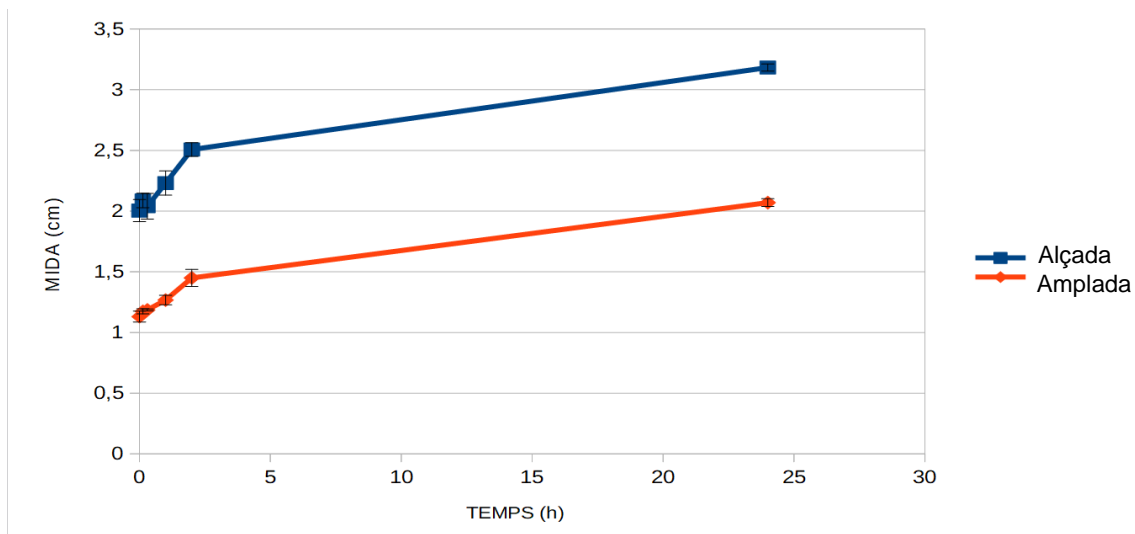


Figura 3.2.1-4
Imatge de : Ataràxia

Conclusions:

Com es pot veure a la Figura 3.2.1-4 la mida inicial dels ossets, tant en alçada com en amplada, augmenta un 59% després de 24 hores submergits en aigua Milli-Q. Aquest fet ocorre a causa de la capacitat del gel de polímer d'atrapar aigua dins la seva estructura polimèrica, fet responsable que l'estructura hagi crescut i estigui més hidratada.

Aquest fenomen mostra una gran semblança entre l'estructura dels *Haribo* i la de l'hidrogel polimeritzat que s'utilitza en el mètode d'expansió convencional

3.2.2 CLARA D'OU (ExM)

- Objectiu:

Entrar en context emprant el tractament d'expansió de teixits en clara d'ou, bullit prèviament.

- Materials:

- Clara d'ou bullit
- Bisturí
- Placa de cultiu cel·lular
- Micropipetes i puntes corresponents
- Gel
- Caixa de poliestirè expandit
- Placa de Petri
- Tubs eppendorf
- Vortex

Productes químics i reactius:

- Solució fixadora

4% PFA

1x PBS

- Solució pregel

Component	Quantitat (mL)
Acrilat de sodi	0,96
Acilamida	0,21
N,N'-Metilbisacrilamida	0,32
Clorur de sodi	1,7
PBS	0,43
Aigua Milli-Q	0,38
Total	4

Figura 3.2.2-1

- Solució acceleradora

10% TEMED (N, N, N', N' – Tetrametiletilè-diamina)

- Solució iniciadora

10% APS (Adenosina 5'-fosfosulfat)

- Buffer de digestió

50 mM Tris (tris (hidroximetil) aminometà) pH 8.0

1 mM EDTA (àcid tetraacètic etilendiamina)

0,5% Triton X-100

- Proteïna K (1:100)

- Procediment:

Per començar, es talla amb la forma desitjada part de la clara d'un ou bullit. S'ha de tenir en compte la mida de la mostra, és recomanable que el seu gruix sigui de 5 mm aproximadament (vegeu figura 3.2.2-2)

Figura 3.2.2-2
Imatge de :Ataràxia

- El següent pas és la fixació, per fer-la en aquest cas s'utilitza PFA 4%. Un cop introduït, es deixa reposar una nit a 4°C en una incubadora.
- Un cop es té la mostra fixada, es treu el fixador amb una micropipeta i es fan tres rentats amb PBS utilitzant una punta nova en cada un per assegurar que no queda fixador.
- Seguidament, es prepara la solució del pregel seguint el protocol (vegeu Figura 3.2.2-1). Un cop feta, s'aboca tota la solució amb l'ajuda d'una micropipeta p1000 (equival a 1000 µL) fent quatre pipetejades.
- Es deixa reposar durant una nit a temperatura ambient.
- Es retira el pregel del pouet. A continuació es fa la solució gelificant, la qual consisteix en la barreja de 4 mL de solució de pregel, 240 µL de solució acceleradora i finalment 240 µL de solució iniciadora. Les solucions necessiten passar pel vòrtex per assegurar una barreja completa. És necessari fer la barreja en gel (que dipositem dins d'una caixa de poliestirè expandit) i que la solució iniciadora sigui l'última en ser afegida, ja que la seva funció és iniciar el procés de gelificació.
- Ràpidament s'aboca la solució gelificant a les mostres per evitar una gelificació prematura.
- Es deixa reposar a 37°C fins que gelifiqui completament (~3 hores).

Un cop polimeritzat amb l'ajuda d'un bisturí s'extreuen les mostres del gel, deixant una capa fina de gel al seu voltant, i es situen a pouets individuals d'una placa de cultiu cel·lular, perquè tinguin espai suficient per l'expansió

- S'aboca a les mostres el buffer de digestió junt amb la Proteïnasa K (vegeu Figura 3.2.2-3) per digerir les proteïnes de l'ou i permetre a les mostres expandir-se amb el gel. Es deixa una nit a temperatura ambient.

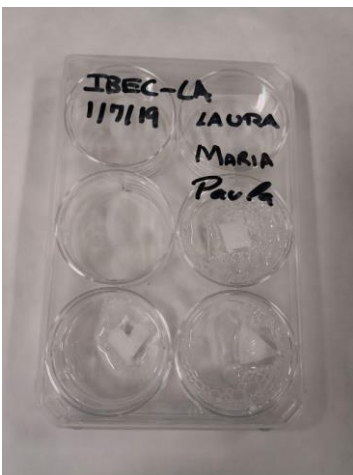


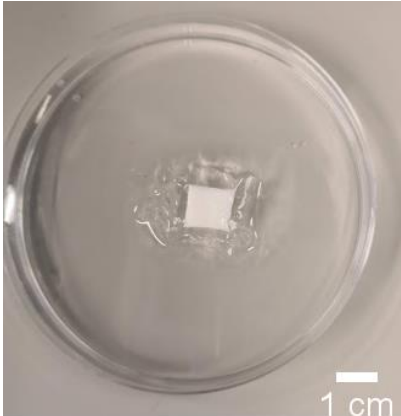
Figura 3.2.2-3
Imatge de : Ataràxia

- Retirar el buffer de digestió amb una micropipeta i fer tres rentats amb aigua Milli-Q per treure tots els possibles residus restants, sempre amb extrema cura de no danyar el gel amb la pipeta. Si el procediment es fa correctament, les mostres comencen a expandir-se durant els rentats amb Milli-Q.

Es traspassen les mostres a plaques de Petri, es retira l'aigua Milli-Q i finalment es deixen reposar mentre s'expandeixen

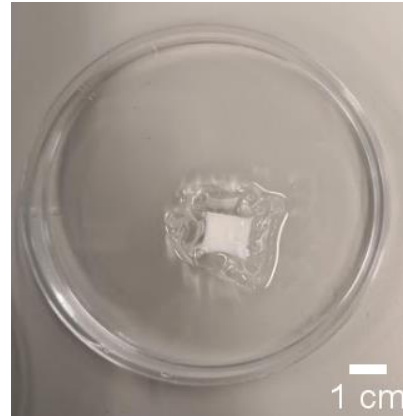
Resultats:

Figura 3.2.2-4
Imatge de : Ataràxia



Temps: 0 hores

Figura 3.2.2-5
Imatge de : Ataràxia



Temps: 2 hores

- Conclusions:

Per culpa d'alguna variant desconeguda, l'experiment no ha resultat conclusiu, ja que la mostra no s'ha expandit com era d'esperar (vegeu Figura 3.2.2-4 i 3.2.2-5). Aquest fet possiblement ha sigut degut al fet que la Proteïnasa K, responsable de trencar les proteïnes de l'ou i permetre que s'obrin i separin amb el gel quan s'expandeixi, no ha penetrat en la mostra correctament o a causa del possible mal estat d'aquesta. També entra dins les possibilitats que hi hagi algun error en el protocol de l'experiment.

Independentment de l'experiment fallit, s'han pogut observar certes deformacions en les mostres al llarg del procés de gelificació (vegeu Figura 3.2.2-6 i 3.2.2-7), un dels presumptes desavantatges del mètode d'expansió.

Figura 3.2.2-6
Imatge de : Ataràxia



Temps: 0 hores

Figura 3.2.2-7
Imatge de : Ataràxia



Temps: 2 hores

3.2.3 CÈL·LULES HELA (ExM)

- Objectiu:

Aprendre a seguir el tractament d'expansió de mono capes de cèl·lules en cèl·lules HeLa*.

- Materials:

- Cèl·lules HeLa
- Microscopi de fluorescència
- Flascó per cultius cel·lulars
- Motlle PDMS
- Micropipetes i puntes corresponents
- Gel
- Caixa de poliestirè expandit
- Microscopi òptic
- Cambra Neubauer
- Cobreobjectes
- Comptador de cèl·lules manual
- Tubs eppendorf
- Vortex

- Productes químics i reactius:

- Medi de cultiu
- Tripsina
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- Triton X-100
- BSA (albúmina de sèrum boví)
- Faloidina-Alexa 488 (*stock 6,6 μM*)
- Hoechst 33258

* Cèl·lules epitelials humanes cancerígenes. Són utilitzades globalment a la investigació gràcies a la seva afinitat per ser cultivades.

- Solució fixadora

4% PFA

1x PBS

- Solució de monòmers

Component	Quantitat (mL)
Acrilat de sodi	0,48
Acrilamida	0,1
N,N'-Metilbisacrilamida	0,16
Clorur de sodi	0,85
PBS	0,21
Aigua Milli-Q	0,19
Total	2

Figura 3.2.3-1

- Solució acceleradora

10% TEMED

- Solució iniciadora

10% APS

- Buffer de digestió

50 mM Tris pH 8.0

1 mM EDTA

0,5% Triton X-100

- Proteïna K (1:100)

-Procediment:

- *Tenir en compte que aquest procediment s'ha de dur a terme en un laboratori de nivell dos i en una cambra esterilitzada.*
 - Es deixa durant una nit un flascó per cultius cel·lulars amb cèl·lules HeLa en medi de cultiu a 37°C .
 - L'endemà es treu el medi de cultiu amb l'ajuda d'una micropipeta i sense danyar les cèl·lules que es troben aferrades al flasc de cultius. Seguidament es fa un rentat amb PBS (5 mL). Un cop no es té cap residu de medi, s'afegeix 1 mL de tripsina i es deixa la mostra a 37°C durant tres minuts.

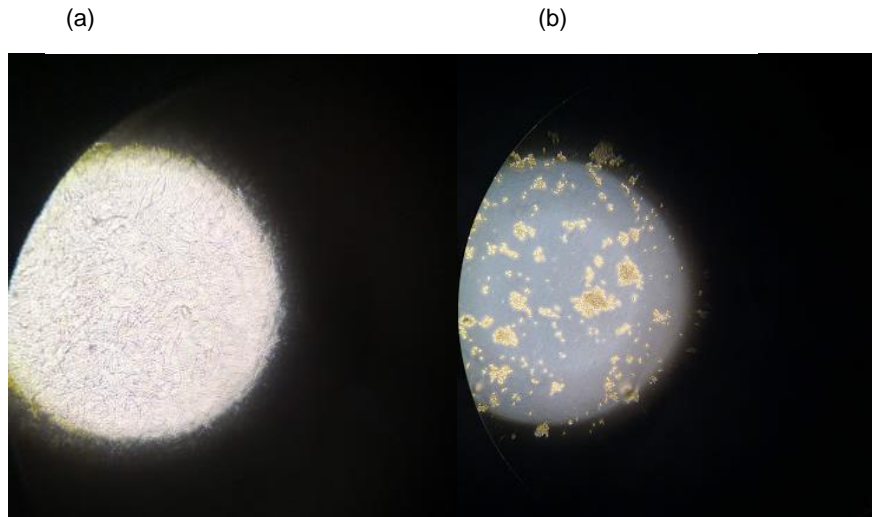


Figura 3.2.3-2 Imatge de : Ataràxia (a) Cèl·lules HeLa adherides al flascó de cultius cel·lulars. (b) Cèl·lules HeLa després d'afegir tripsina i per tan en moviment.

- S'afegeixen 8 mL de DMEM per tal d'inhibir la tripsina.
- Per tal de saber quina quantitat específica de mostra necessitem, primer, amb l'ajuda d'una micropipeta, es posen 10 μL de la dilució a la Cambra Neubauer, la part central de la qual s'ha tapat prèviament amb un cobreobjectes (vegeu Figura 3.2.3-3).

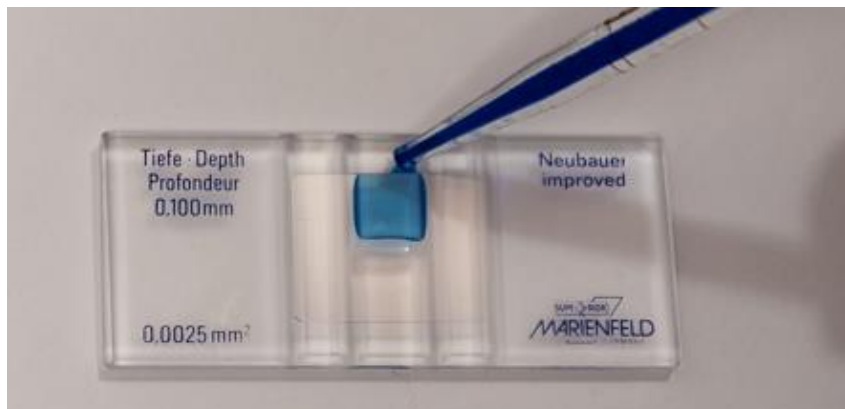


Figura 3.2.3-3

- Segon, amb un microscopi òptic es compten les cèl·lules que hi ha a les quadricules de la Cambra Neubauer (vegeu Figura 3.2.3-4). Un cop comptades (en aquest cas 752 cèl·lules) s'utilitza la següent fórmula matemàtica per tal de saber concentració de cèl·lules per mil·lilitre.

$$\text{Concentració} = \frac{\text{cèl·lules comptades}}{0,1 \mu\text{L} \times n^{\circ} \text{ de quadrats}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}}$$

- Sabent la concentració (en aquest cas 940000 cèl·lules per mil·lilitre) la quantitat de cèl·lules que es necessita per l'hidrogel Scaffold (en aquest cas 42000 cèl·lules), es fa una regla de tres i es calcula la quantitat necessària de mostra en mil·lilitres, la qual finalment es converteix a microlitres (en aquest cas 94,68 μ L).

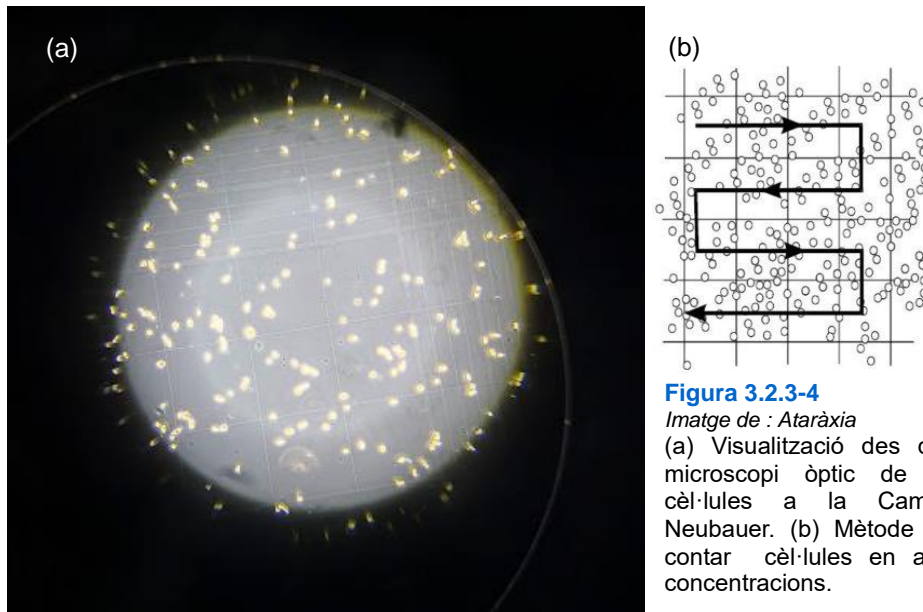


Figura 3.2.3-4

Imatge de : Ataràxia

(a) Visualització des d'un microscopi òptic de les cèl·lules a la Cambra Neubauer. (b) Mètode per contar cèl·lules en altes concentracions.

- Amb l'ajuda d'una micropipeta, s'introdueixen els 94,68 μ L de medi al centre del motlle de silicona i es posa a 37°C a l'incubador 24 hores perquè s'enganxin a la placa.
- S'aspira el medi que hi ha al motlle i s'afegeix PBS.
- Es retira el PBS i s'afegeix PFA 4% durant 15 minuts.
- Es treu el PBS amb una micropipeta p1000 vigilant de no tocar el fons.
- S'afegeixen 200 μ L de Triton X-100 al 0,1% durant 10 minuts per tal de permeabilitzar les cèl·lules. Passat el temps necessari aquest es retira amb una micropipeta p200 i es fan quatre rentats amb PBS (200 μ L per rentat) deixant un minut de marge entre ells.
- Es retira el PBS i s'afegeix BSA 1% durant 20 minuts.
- Després, es retira el BSA 1% i s'apliquen 200 μ L de faloidina-Alexa 488 diluït en PBS durant 30 minuts a les fosques (tapar amb paper d'alumini).

- Passat el temps s'aspira el líquid amb una micropipeta amb cura i es fan tres rentats amb PBS (200 μ L per rentat) deixant dos minuts de marge entre ells.
- Es retira amb l'ajuda d'una micropipeta i es fan tres rentats amb PBS (400 μ L per rentat) deixant dos minuts de marge entre ells.
- Després de l'últim rentat es deixen les mostres amb 200 μ L de PBS.
- Un cop feta la fixació i tinció de les cèl·lules, es prepara la solució gelificant, aquesta consisteix en la barreja de 2 mL de solució de monòmers (vegeu Figura 3.2.3-1), 120 μ L de solució acceleradora i finalment 120 μ L de solució iniciadora. Les solucions necessiten passar pel vòrtex per assegurar una barreja completa. És necessari fer la barreja en gel (que dipositem dins d'una caixa de poliestirè expandit) i que la solució iniciadora sigui l'última en ser afegida, ja que la seva funció és iniciar el procés de gelificació.
- Ràpidament s'aboca la solució gelificant a les mostres per evitar una gelificació prematura.
- Es deixa reposar a 37°C fins que gelifiqui completament (~3 hores).

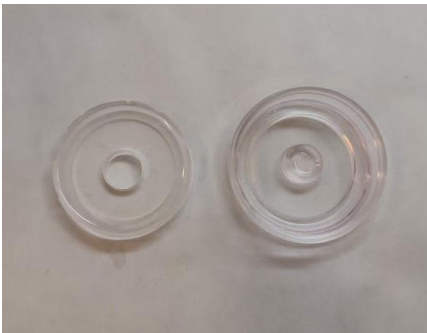


Figura 3.2.3-5

Imatge de : Ataràxia

- Quan està completament polimeritzat, amb cura, es treu el motlle PDMS deixant tan sols el gel fet i amb forma (vegeu Figura 3.2.3-5).
- S'aboca a la mostra el buffer de digestió junt amb la Proteïnasa K i es deixa actuar durant una nit a temperatura ambient.

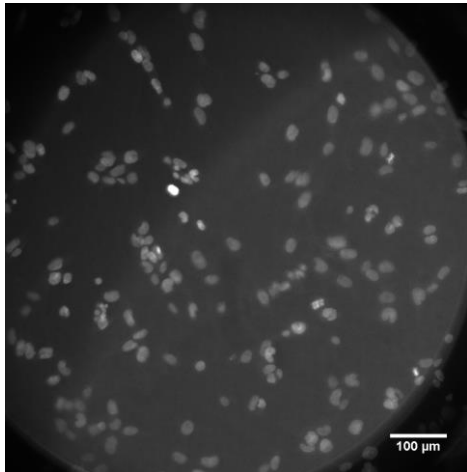
- Es retira el buffer de digestió amb una micropipeta. Per tal que el gel es pugui expandir, es separa de la superfície on es troba.
- Seguidament, fer tres rentats amb aigua Milli-Q per treure tots els possibles residus restants, sempre amb extrema cura de no danyar el gel amb la pipeta. Si el procediment es fa correctament, les mostres comencen a expandir-se durant els rentats amb Milli-Q.

- Resultats:

- *Nuclis cèl·lules HeLa (20x)*

Figura 3.2.3-6

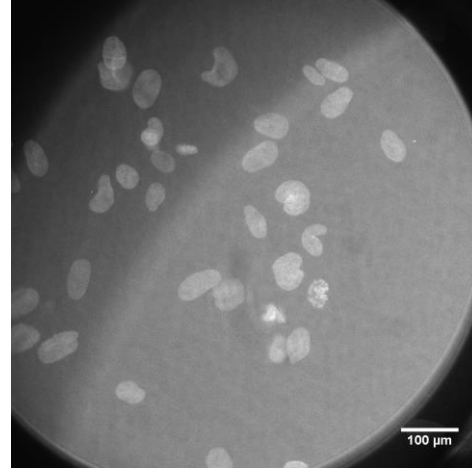
Imatge de : Ataràxia



Temps: 0 hores

Figura 3.2.3-7

Imatge de : Ataràxia

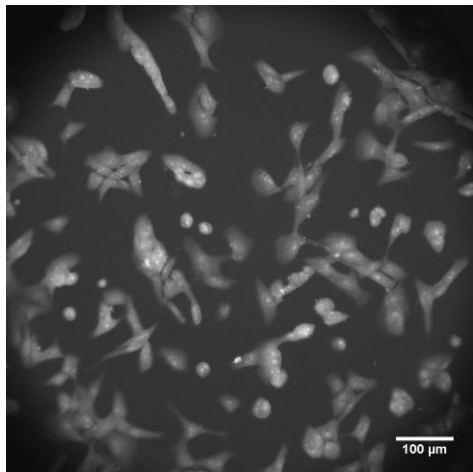


Temps: 24 hores

➤ *Cèl·lules HeLa (20x)*

Figura 3.2.3-8

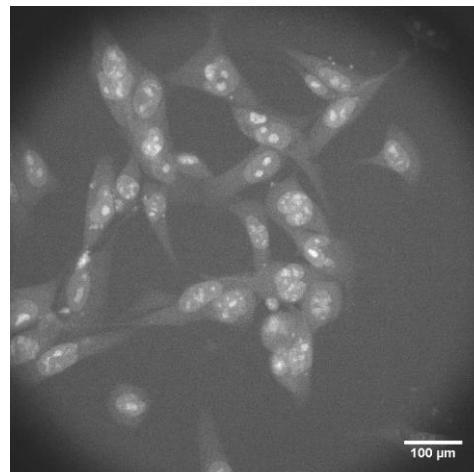
Imatge de : Ataràxia



Temps: 0 hores

Figura 3.2.3-9

Imatge de : Ataràxia



Temps: 24 hores

- Factor de creixement *HeLa* (= 319%):

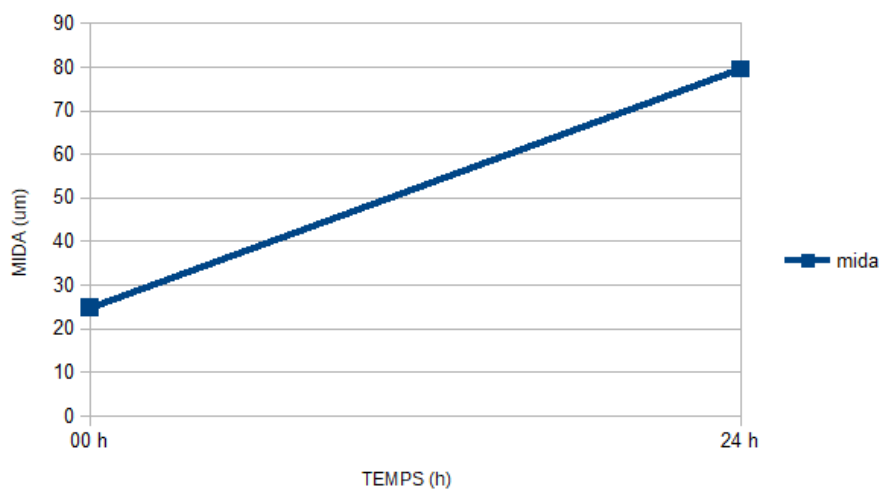


Figura 3.2.3-10

Imatge de : Ataràxia

- Conclusions:

Com es pot veure a la Figura 3.2-10 la mida inicial de les cèl·lules HeLa augmenta un 219% després de 24 hores submergides en aigua Milli-Q. També podem observar com l'expansió que pateix la mostra comporta una degradació de la qualitat d'imatge, i per tant aporta certa dificultat a un possible estudi d'aquesta (vegeu Figura 3.2-8 i 3.2-9). Això també comporta incompatibilitat entre el mètode d'expansió original i el de super-resolució, ja que tot i ser possible la unió de les dues tècniques, els resultats no serien nítids ni representatius. El nucli de les cèl·lules és un orgànul molt representatiu en quant el mètode d'expansió gràcies al fet que el tipus de fluorocrom que s'utilitza per tenyir-lo, té afinitat per tota l'estructura el que implica una tinció més homogènia (vegeu Figura 3.2-6 i 3.2-7).

3.2.4 CÈL·LULES HELA (SRM)**- Objectiu:**

Aprendre a seguir el protocol de SRM en cèl·lules HeLa, i per tant, el funcionament del microscopi de super-resolució i el seu propi software.

- Materials:

Cèl·lules Hela

Microscopi de super-resolució

Flascó per cultius cel·lulars

Sistema de cambra de cultiu sobre portaobjectes Lab-Tek

Micropipetes i puntes corresponents

Gel

Caixa de poliestirè expandit

Microscopi òptic

Cambra Neubauer

Cobreobjectes

Comptador de cèl·lules manual

Tubs eppendorf

Vortex

- Productes químics i reactius

- Medi de cultiu
- Tripsina
- DMEM
- Triton X-100
- BSA
- Faloidina-Alexa 488 (*stock* 6,6 μM)
- Hoechst 33258
- Solució fixadora

4% PFA

1x PBS

→ *Buffer oxy* (oxidoreducció)

100 μL Lactato 60%

310 μL PBS pH 8,42

50 μL MEA (Cysteamina)

15 μL Oxydasa

-Procediment:

- S'utilitzen les cèl·lules HeLa ja cultivades i comptades de l'experiment anterior, però en aquest cas pel sistema de cambra de cultiu sobre portaobjectes Lab-Tek es necessiten 30000 cèl·lules i per tant 31,92 μL de mostra a cada peuet (vegeu Figura 3.2.4-1).

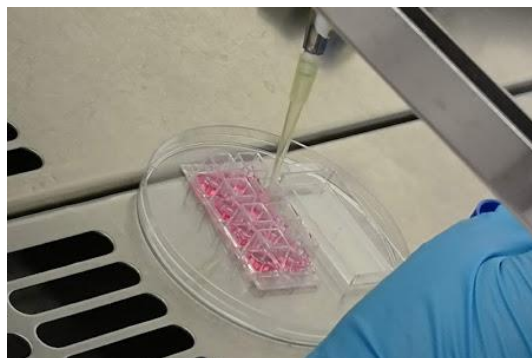


Figura 3.2.4-1
Imatge de : Ataràxia

- Se segueix el protocol de fixació i tinció cel·lular explicat detalladament a l'experiment d'expansió de cèl·lules HeLa.
- Un cop feta la fixació i tinció de les cèl·lules, s'afegeix el buffer oxy directament sobre les

cèl·lules. Seguidament, ja poden ser observades al microscopi de super-resolució

- Resultats: :

➤ *Actina* cèl·lules HeLa (100x) STORM

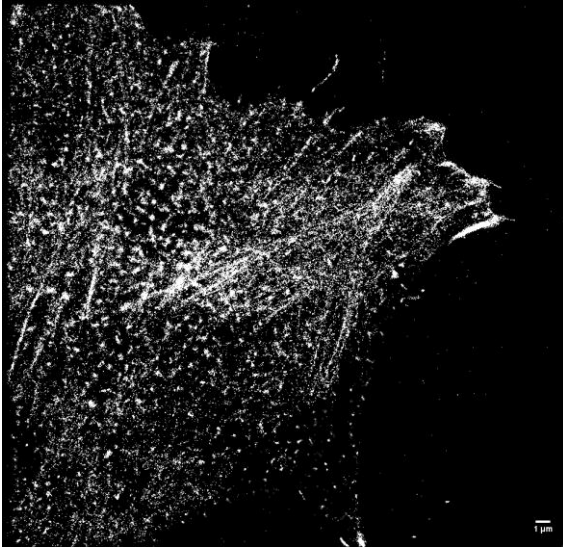


Figura 3.2.4-3
Imatge de : Ataràxia

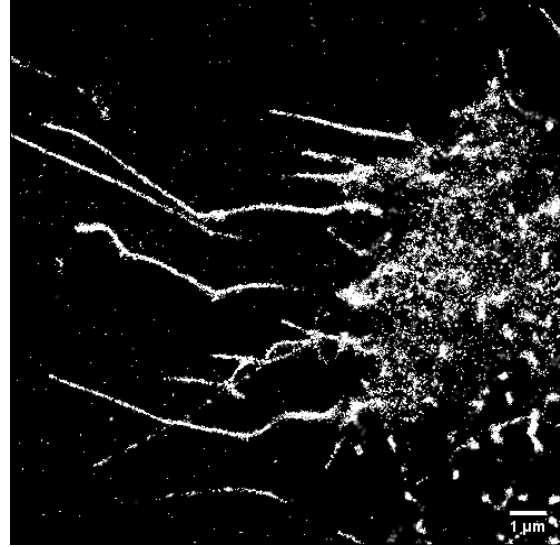


Figura 3.2.4-2
Imatge de : Ataràxia

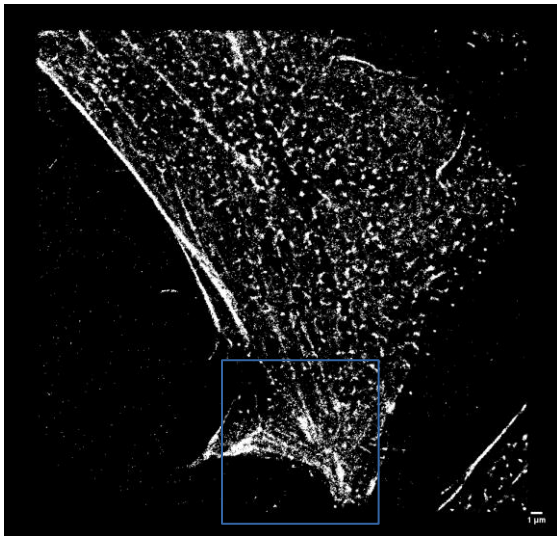


Figura 3.2.4-4
Imatge de : Ataràxia

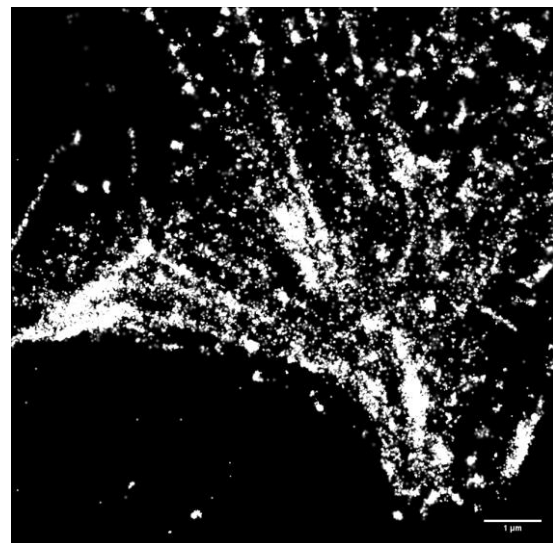


Figura 3.2.4-5
Imatge de : Ataràxia

-Conclusions

Aquesta tècnica, com bé indica el seu nom, permet observar i fotografiar estructures amb una gran resolució, com es pot comprovar a l'actina anterior, ja que es poden veure les estructures formades per les proteïnes amb una gran definició i detall. També es pot observar la gran quantitat de fluorocroms que formen la imatge gràcies al seu parpelleig aïllat i aleatori, el qual permet una major definició de l'estructura. Quant al nucli de les cèl·lules, es va poder comprovar com el parpelleig no era l'idoni i per tant els resultats d'aquest orgànul, utilitzant SRM, no són els desitjats.

4. CONCLUSIONS

Gràcies als resultats obtinguts dels experiments realitzats i amb l'ajuda de la part teòrica per aprofundir l'enteniment del funcionament de les diverses microscòpies, he pogut arribar a un seguit de conclusions.

4.1 CONCLUSIONS EXPERIMENTALS

Les següents conclusions, responen a les hipòtesis plantejades a l'inici de la part pràctica del treball.

- Hipòtesi 1. ➡ Correcta
- Hipòtesi 2. ➡ Correcta
- Hipòtesi 3. ➡ Correcta

Hipòtesi 1. *La recent incorporació de la ExM en el camp d'investigació i per tant la seva necessitat d'increment d'experimentació i desenvolupament, comporta certa inestabilitat i problemàtica al protocol d'aquesta tècnica.*

- Tot i estar en contínua millora, la ExM segueix tenint certs punts febles. Després de seguir rigorosament un protocol d'expansió tradicional per a teixits, es va poder comprovar com tot i el baix nivell de dificultat d'utilització i del seu protocol, el marge d'error és ampli i comporta una mitja d'experiments erronis alta en comparació amb altres tècniques com la SRM.

Hipòtesi 2. *Possible deformació de la mostra a l'utilitzar el mètode d'expansió, i per tant, obtenció de resultats equívocs o discutibles.*

- Encara i significar un mal us del protocol de la ExM, l'aparició d'esquerdes, distorsions o deformacions a les mostres en el procés d'expansió és una situació poc habitual, però no nul·la. Tot i l'obtenció de resultats erronis en l'experiment d'expansió de teixit (punt 4.2.2), es van poder observar significants deformacions especialment en una de les tres mostres utilitzades. En el cas d'expansió de mono capes cel·lulars (punt 4.2.3), aquestes deformacions apareixen en menys freqüència, això no treu el fet d'una possible obtenció de distorsions morfològiques a les cèl·lules després de ser expandides. Per aquest motiu recomanem-ho realitzar la tècnica en diverses rèpliques de la mostra, i per tant, incrementar les possibilitats d'obtenció de resultats conclusius.

Hipòtesi 3. *Major resolució i precisió als resultats de la SRM que de la ExM.*

- Com s'ha pogut comprovar, en una mateixa situació, és a dir, emprant el mateix tipus de mostra amb les dues microscòpies (cèl·lules HeLa) (punt 4.2.3 i 4.2.4), el nivell de detall d'imatge obtingut amb SRM (STORM) ha resultat ser més elevat que amb ExM, especialment quant al citosquelet o estructures filamentoses, ja que tot i poder observar perfectament i amb gran resolució l'actina de les cèl·lules d'expansió, la excessiva separació dels fluorocroms d'aquestes influeixen negativament en la qualitat d'imatge i als resultats obtinguts.

4.2 CONCLUSIONS GENERALS

Gràcies al millor enteniment i coneixement de les diverses microscòpies òptiques actuals obtinguts al llarg del treball, s'ha realitzat les següents conclusions comparatives.

1. Tant la microscòpia d'expansió com la de super-resolució, són extraordinàriament útils en la investigació biològica i mèdica gràcies a la seva gran capacitat d'imatge a l'escala nanomètrica en comparació amb els altres mètodes òptics més tradicionals i limitats per la física de la llum.
2. En cas de voler fer un estudi sobre algun òrganul filamentós, la ExM no és la tècnica a escollir, però la SRM pot donar molta informació sobre l'estructura a estudiar. Contràriament, quant al nucli cel·lular, els fluorocroms emprats a ExM tenen una gran afinitat per l'òrganul com a conjunt i per tant és una molt bona opció a considerar.
3. En comparació dels mètodes SRM, ExM ofereix diversos avantatges tècnics, com per exemple la possibilitat d'observar mostres fixades més gruixudes com teixits cel·lulars amb una resolució molt semblant a la de SRM, també la seva alta velocitat d'imatge, la facilitat d'utilització i el seu baix cost. També té inconvenients significants com la incompatibilitat amb les mostres vives, la fragilitat de l'hidrogel, la possible aparició de deformacions al llarg del procés d'expansió i per tant la necessitat de fer revisions morfològiques.
4. La SRM consta de grans avantatges envers altres microscòpies òptiques. Principalment la seva gran capacitat de resolució, la possibilitat d'observar estructures i partícules tenyides amb diferents fluorocroms en una mateixa imatge; l'opció de fer una visualització en tres dimensions; la seva compatibilitat amb mostres tant fixades com vives; i l'accés a detalls cel·lulars mai vists anteriorment utilitzant cap altre tipus de microscòpia. També pateix desavantatges com la lentitud d'adquisició d'imatge d'alguns dels seus mètodes, com el STORM, a causa de que s'analitza cèl·lula a cèl·lula i no com a conjunt com en el cas d'expansió; l'alt cost de l'equipament necessari que prèvia el seu

ús a un gran nombre d'individus i centres de recerca; la inadaptabilitat amb les mostres de cert gruix com en cas dels teixits i la necessitat de coneixements avançats per poder dur a terme aquesta microscòpia tant en termes de protocol com de previsualització d'imatge.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, Bruce, et al. *Biologia molecular de la cèl·lula*. 2a ed. Barcelona: Edicions Omega, 1994. ISBN 84-282-0927-8

INGRAHAM, John L. ; INGRAHAM, Catherine A. *Introducció a la microbiologia*. Barcelona: Editorial Reverté, 1999. (Col·lecció scriptorium). ISBN 84-291-1864-0

KREMER, Bruno P. *Manual de microscopia*. 2a ed. Barcelona: Ediciones Omega, 2012. ISBN 978-84-282-1570-1

MADIGAN, Michael T, et al. *Brock: Biología de los microorganismos*. 12a ed. Madrid: Pearson Educación, 2009. ISBN 978-84-7829-097-0

SCHERMELLEH, Lothar, et al. "Super-resolution microscopy demystified". A: *Nature Cell Biology*, 2 de gener 2019, vol. 21, p. 72-84.

WASSIE, Asmamaw T. ; ZHAO, Yongxin ; BOYDEN, Edward S. "Expansion microscopy: principles and uses in biological research". A: *Nature Methods*, 20 de decembre 2018, vol. 16, p. 33-41.

WEBGRAFIA

ANDERSON, Evan. *Swell! Expansion Microscopy* [en línia]. Washington: University of Washington, 2 maig , 2019. < <http://greymattersjournal.com/swell-expansion-microscopy/> >. [Consulta: 10 ag. 2019]

CHEN, Fei ; TILLBERG, Paul W. ; BOYDEN, Edward S. *Expansion microscopy* [en línia]. Washington D.C: Science, 30 gen., 2015. < <https://science.sciencemag.org/content/347/6221/543> >. [Consulta: 10 ag. 2019]

HUANG, Bo ; BATES, Mark ; ZHUANG, Xiaowei. *Super resolution fluorescence microscopy* [en línia]. Bethesda: US National library of Medicine, National Institutes of Health, 9 març 2010 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835776/>>. [Consulta: 2 set. 2019]

LANFRANCONI, Mariana. *Historia de la microscopia* [en línia]. Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata. < <http://www.etpcb.com.ar/DocumentosDconsulta/OPTICA/optica/Historia%20de%20la%20Microscopia.pdf> >. [Consulta: 10 maig 2019]

Manual de microscopia [en línia]: *historia, descripción y uso del microscopio óptico*. < <https://pagina.jccm.es/museociencias/otras%20actividades%20web/material%20cnr%20web/manual%20de%20microscopia.pdf> >. [Consulta: 2 juny 2019]

MONTELEONE, Melisa. *Fluorescencia* [en línia]. Buenos Aires: 2017. < <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504634347.pdf> >. [Consulta: 1 set. 2019]

Nikon microscopy U. *Single-Molecule Super-Resolution Imaging* [en línia]. Tokio: Nikon < <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/single-molecule-super-resolution-imaging> >. [Consulta: 2 set. 2019]

RODRÍGUEZ, Francisco. *El microscopio óptico* [en línia]. < <https://www.franrzm.com/el-microscopio-optico/> >. [Consulta: 2 juny 2019]

Universitat d'Alacant. *Microscopía de fluorescencia y epifluorescencia* [en línia]. Alacant: Universitat d'Alacant. < <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/microscopia-optica-y-laser-confocal-2a-ed/tema-5.pdf> >. [Consulta: 16 juny 2019]

BIBLIOGRAFIA D'IMATGES

Figura 2.1.2-1

< <http://www.artifexbalear.org/lupas.htm> >

Figura 2.1.2-2

<<http://www.guachipedia.com/archives/2-microscopio-de-hans-y-zacarias-janssen-1590>>

Figura 2.1.2-3

<<http://www.museudavida.fiocruz.br/index.php/uma-visita-ao-microcosmo#.XXzLlygzbIV>>

Figura 2.1.2-4

<<https://ebooks.adelaide.edu.au/h/hooke/robert/micrographia/frontmatter2.html>>

Figura 2.1.2-5

<<http://www.biologia.arizona.edu/cell/tutor/cells/cells2.html>>

Figura 2.2.2-1

<https://www.researchgate.net/figure/Figura-33-Parts-dun-microscopi-optic-compost-a-i-la-trajectoria-de-la-llum-a-traves_fig4_48718793>

Figura 2.2.3-1

<http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/56/cap304.htm>

Figura 2.2.4-1

<<https://sites.google.com/site/mundodelafisicafisica/fenomenos-ondulatorios/interferencia>>

Figura 2.2.4-2

<http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/56/cap307.htm>

Figura 2.2.5-1

<<https://cienciatoday.com/tincion-de-gram/>>

Figura 2.3.2-1

<https://www.researchgate.net/figure/Optical-set-up-of-a-standard-widefield-fluorescence-microscope-as-used-in-the-study-The_fig1_325566722>

Figura 2.3.3-1

<<https://www.optics-pro.com/for-microscopes/bresser-plan-achromatic-10x-objective/p,13679>>

<<https://www.microscopeworld.com/t-na.aspx>>

Figura 2.3.4-2

<<https://www.bioindicacion.com/blog/que-es-microscopio-fluorescencia/>>

Figura 2.4.3-1

<<http://greymattersjournal.com/swell-expansion-microscopy/>>

Figura 2.5.2-1

<<https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/single-molecule-super-resolution-imaging>>

