



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Dinàmica no lineal de la longevitat cel·lular

Maria del Mar Puigserver Ferrà

Grau de Física

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumna: 43179105D

Treball tutelat per Oreste Piro Perusin
Departament de Física

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Envelliment cel·lular, formacions de colònies, tècniques microfluídica, dinàmica no lineal.

ÍNDEX

I. Síntesi	4
II. Introducció.	5
III. Coleochaete.	8
IV. Disseny experimental.	11
V. Primers resultats i tractament d'imatges.	14
VI. Conclusions i treball futur.	16
Apèndix A. Protocols i mètodes.	17
A.1. Protocol d'emplenament de cel·les.	17
A.2. Selecció del cultiu en sòlid.	18
A.3. Protocol de creació de cel·les.	19
A.4. Protocol de recollida de cèl·lules.	21
A.5. Muntatge del circuit de perfusió.	22
Apèndix B. Programa Matlab.	23
Glossari biologia.	24
Glossari tècnic.	25
Referències.	26

I. SÍNTESI

L'envelliment d'organismes macroscòpics ve caracteritzat, i fins i tot quantificat, per símptomes com són la pèrdua de funcionalitat de diferents òrgans o el deteriorament de teixits. En organismes unicel·lulars aquesta caracterització i quantificació és molt més difícil i confosa, sobretot en aquells organismes unicel·lulars que es reproduïxen exclusivament mitjançant la divisió cel·lular. Alguns trets obvis en aquests darrers organismes per definir l'envelliment cel·lular són, per exemple, la seva capacitat reproductiva o la probabilitat de mort abans de la seva divisió.

Quan la divisió és asimètrica, és relativament fàcil identificar fases juvenils i ancianes en el desenvolupament de cèl·lules individuals, ja que perquè hi hagi divisió, sol ser necessari, per exemple, que la cèl·lula es desenvolupi fins a una mida mínima. Però quan la divisió és simètrica no poden diferenciar-se progenitors i descendència, cosa que ha dut a postular que no té sentit parlar d'envelliment reproductiu en la divisió simètrica, i que existeix immortalitat funcional en aquests organismes.

Tanmateix, estudis relativament recents sobre l'evolució de colònies dels bacteris *Escherichia Coli* (Stewart et al., 2005), que és un model típic de divisió simètrica i de creixement unidireccional, han mostrat que pot associar-se una edat reproductiva a cada cèl·lula individual en correlació amb l'antiguitat generacional del pol més vell heretat per la cèl·lula en la divisió que la va originar, de manera que es té una asimetria en el fet que cada una de les cèl·lules descendents hereta dels seus progenitors un segment de la membrana de diferent grau d'antiguitat. Aquest descobriment demostraria que la immortalitat de la qual s'ha parlat més amunt no existeix.

L'objectiu de la investigació de què forma part aquest treball de Fi de Grau és comprovar si una correlació similar entre la longevitat reproductiva i l'edat dels segments de membrana cel·lular heretats per les cèl·lules, pot establir-se en organismes que tenen un creixement bidireccional, en oposició amb el creixement unidireccional dels *E. Coli*. Amb aquesta finalitat, es proposa estudiar, de manera similar al treball fet amb els *E. Coli*, l'evolució de colònies d'algues coleochaetals, específicament de les *Coleochaete Scutata*, que creixen en una forma aproximadament rectangular i que tenen una divisió, com els *E. Coli*, morfològicament simètrica.

El projecte consta de quatre parts:

1. Disseny experimental d'un dispositiu que permeti fer créixer de manera controlada les colònies de *Coleochaete* i obtenir imatges de les successives etapes de la divisió.
2. Desenvolupament d'algoritmes de processament d'imatges que permetin automatitzar la detecció dels eixos i dels temps de divisió.
3. Desenvolupar un mètode basat en el sistema de Lindenmayer (Sistemes L) per organitzar les cèl·lules segons l'antiguitat genealògica dels quatre segments de la seva membrana.
4. Explorar la possible correlació entre aquesta organització i els temps de divisió observats.

Aquest TFG es centra en progressar en els dos primers punts del projecte.

II. INTRODUCCIÓ

Pareixia acceptat que per poder dir que existeix envelliment cel·lular, és necessari tenir una asimetria morfològica en les divisions, i així diferenciar una fase juvenil d'una anciana. Les cèl·lules en la fase juvenil són més petites o no estan diferenciades i, per tant, han de passar per un període de creixement o diferenciació abans de ser capaces de reproduir-se.

No obstant, es va demostrar (Stewart et al., 2005) que les divisions cel·lulars no tenen per què ser asimètriques morfològicament, sinó que també poden ser-ho fisiològicament, per tant, divisions que en un principi semblen simètriques, no tenen per què ser-ho. Per demostrar això, es va fer un estudi dels bacteris *E. Coli*, que creixen de manera unidimensional en forma de bastó, i es reproduïen dividint-se per la meitat, de tal manera que es crea un pol nou per cada cèl·lula filla (fig. 1.). Així, un dels extrems de la cèl·lula acaba de ser creat en la divisió (pol nou) i l'altre ja existia d'una divisió anterior (pol vell).

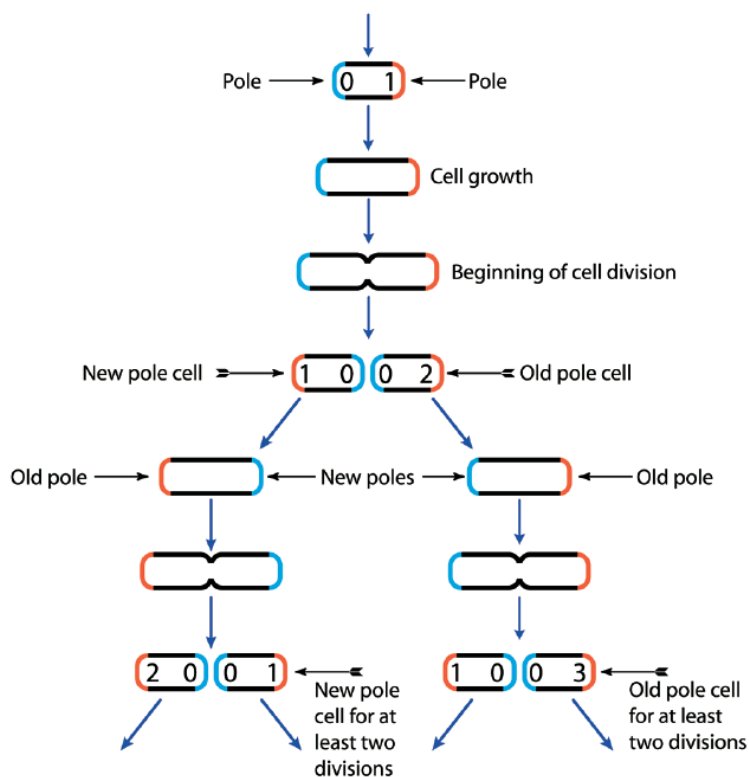


Fig.1. Extreta de (Stewart et al., 2005). Cicle de vida dels *E. Coli*. Durant la divisió de la cèl·lula es formen dos pols nous (extrem blau), els altres finals de les cèl·lules formades venen d'una divisió anterior (extrem vermell). Els nombres dins les cèl·lules indiquen el nombre de divisions que han tingut lloc des que es va crear cada pol.

Se sap que els components de la paret cel·lular són conservats als pols on es formen (de Pedro et al., 1997). Això implica que s'espera que qualsevol constituent de la cèl·lula amb difusió limitada i una vida mitjana llarga s'acumuli al pol vell, de manera que existirà una asimetria fisiològica entre els dos pols.

Si es fa un seguiment individual de les cèl·lules pot assignar-se una edat a cada pol creat en les divisions i, així, a les cèl·lules mateixes. Això és el que es va fer en l'estudi del que es parteix en aquest projecte, observant que el ritme mitjà de creixement de les cèl·lules amb el pol vell és un 2.2% més lent que el de les cèl·lules amb el pol nou. Amb l'anàlisi que feren van demostrar l'absència d'una fase juvenil als *E. Coli* amb dos fets: primer, comparant les dues cèl·lules descendents, es veu que la que té el pol nou és més llarga que la del pol vell (si hi hagués fase juvenil, hauria de ser el contrari), i segon, la cèl·lula amb el pol nou és més propensa a dividir-se més aviat que l'altra.

Llavors, com que no hi ha fase juvenil, hi ha una asimetria funcional entre les dues cèl·lules descendents que és desavantatjosa per la cèl·lula amb el pol vell. També van observar que cada cèl·lula no és només definida per la divisió anterior, sinó també per totes les divisions prèvies (fig.2.).

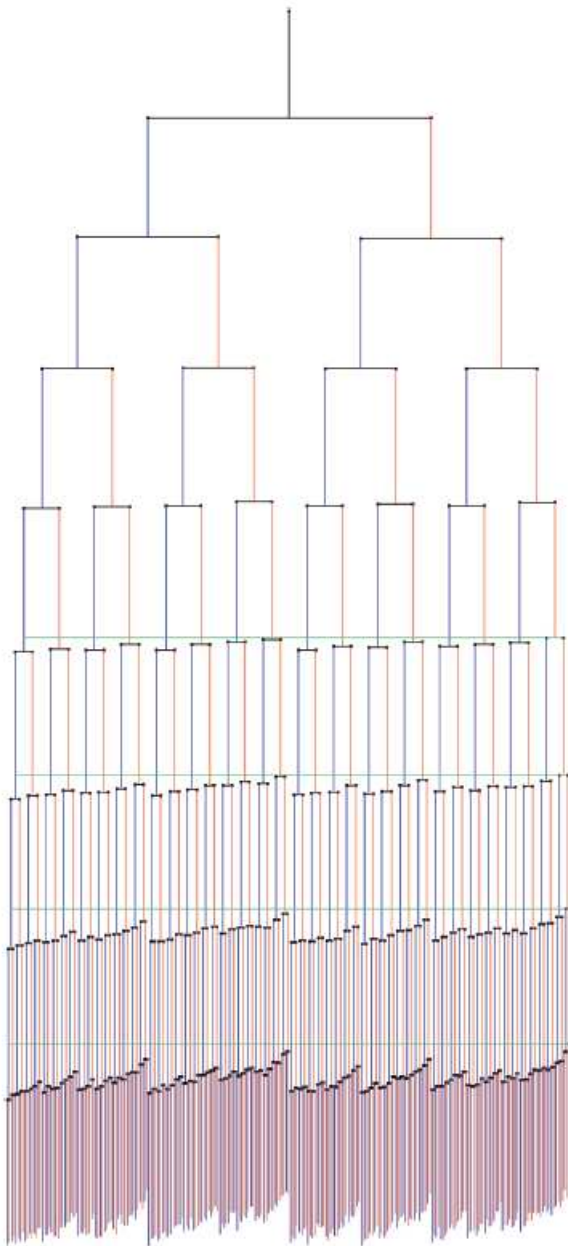


Fig. 2. Extreta de (Stewart et al., 2005). Efecte del pol vell sobre l'índex de creixement dels *E. Coli*. La longitud de les línies que connecten les cèl·lules amb la seva descendència és proporcional a l'índex mitjà de creixement de la cèl·lula. Una línia més llarga indica un major índex de creixement. A cada divisió, la cèl·lula lligada al pol vell es col·loca a la dreta i es mostra de color vermell, mentre que les cèl·lules amb pols nous es mostren en blau i es col·loquen a l'esquerra. La línia verda indica el punt en què la primera cèl·lula es va dividir en les darreres quatre generacions.

Finalment, el que ells van torbar és que el pol vell és un marcador significatiu per múltiples fenotips associats a l'edat com són un decreixement de l'eficiència metabòlica, la producció reduïda de biomassa de descendència i un augment de la probabilitat de mort.

Així, l' *E. Coli*, un organisme amb divisions morfològicament simètriques i sense fase juvenil, és susceptible a l'envelliment. Amb això demostren que no és necessària una fase juvenil perquè existeixi un procés d'envelliment i, en contrast, demostren la presència d'una asimetria fisiològica en els *E. Coli*, que és essencial per el procés d'envelliment.

El projecte de què forma part aquest TFG, pretén fer una passa més en l'estudi sobre envelliment cel·lular en organismes amb divisions morfològicament simètriques, cercant evidències d'envelliment en les *Coleochaete Scutata*, que creixen de manera bidireccional en forma aproximadament rectangular, i es divideixen sobre l'eix més curt del rectangle (fig.3.).

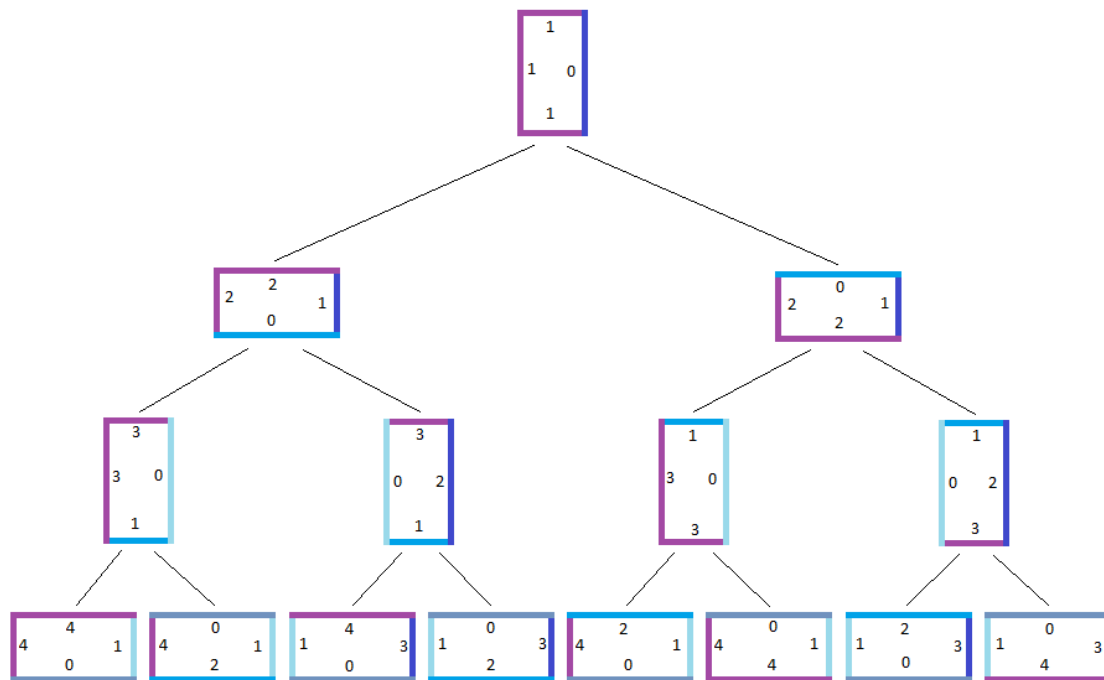


Fig. 3. Esquema del cicle de vida de les *C. Scutata*. Els nombres dins les cèl·lules indiquen el nombre de divisions que han tingut lloc des que es va crear cada paret.

La idea és assignar un índex a cada una de les 4 parets de la cèl·lula i, fent un seguiment continu del creixement de les colònies de *Coleochaete* mitjançant tècniques de microscòpia òptica i fluorescència, veure quina relació hi ha entre l'edat mitja de la cèl·lula, donada per l'edat de cada una de les parets, i el ritme de creixement de l'àrea de la cèl·lula i la velocitat de divisió.

El present treball de final de grau ha tingut per objectius desenvolupar el mètode i els dispositius experimentals per observar el creixement de colònies de *Coleochaete* de manera suficientment automatitzada com per poder registrar els intervals de temps entre divisions i explorar la possible correlació d'aquests amb l'antiguitat generacional dels segments de membrana de cada cèl·lula.

L'organització d'aquesta memòria és la següent: En la secció III es descriu l'organisme a estudiar (*Coleochaete*), incloent detalls sobre els seus mecanismes de reproducció, medi de cultiu, etc. En la secció IV, es descriu el disseny del dispositiu experimental que es vol utilitzar. En la secció V es mostren resultats preliminars obtinguts amb el dispositiu desenvolupat així com algunes imatges processades amb algoritmes desenvolupats durant aquest treball. Finalment, en la secció VI es resumeixen les conclusions i es descriuen les pròximes passes que s'han de realitzar en el context del projecte general en el que s'inscriu en aquest TFG. S'han inclòs dos apèndix (A i B) amb els detalls tècnics del disseny experimental i dels algoritmes de processament d'imatges, així com dos glossaris amb la descripció dels argots de biologia i tècnics.

III. COLEOCHAETE

Les Coleochaetales són una família petita d'espècies d'algues microscòpiques però complexes que es troben en aigua dolça. Les que s'han fet servir en aquest estudi són les *Coleochaete Scutata*, que creixen com a tal·lus discoides pluricel·lulars amb una estructura simple del meristema. Els tal·lus s'adhereixen al substrat, i si es mantenen sense pertorbar poden mantenir una forma circular fins que tenen un diàmetre d'uns quants mil·límetres. Aquesta forma circular és el resultat de seqüències de divisions periclinals i anticlinals.

Per què coleochaete?

El 2009 Dupuy, Mackenzie i Haseloff (Dupuy et al., 2010), van investigar l'ús de *Coleochaete* com un sistema simple per estudiar la morfogènesi de les cèl·lules.

Les algues, en general, tenen un cicle de vida i un hàbitat tals que les fan bones per als estudis científics. En concret, les *Coleochaete* presenten simplicitat morfològica amb divisions limitades a dues dimensions. A més, són relativament fàcils de cultivar i es pot observar cada cèl·lula durant tot el procés de desenvolupament. Amb això és possible visualitzar la geometria i la dinàmica cel·lular durant la morfogènesi de l'organisme i derivar, a partir d'aquí, paràmetres físics per al creixement.

Per obtenir imatges d'alt contrast, és possible marcar les parets cel·lulars amb *propidium iodide* o *calcofluor white* i utilitzar fluorescència microscòpica. Una altra avantatge de les *Coleochaete* és que poden mantenir-se en un cultiu en sòlid, sense ser cuidades, durant llargs períodes de temps, i quan es necessiten, poden posar-se en medi aquós per ser estudiades.

Cal recalcar que la més important de les característiques d'aquestes cèl·lules per a l'estudi, és la manera com es divideixen, ja que fent-ne un anàlisi, pot dur-se l'estudi sobre envelliment cel·lular una passa més endavant, com s'explica a la introducció.

Estructura cel·lular

S'ha observat que les *Coleochaete* tenen diferències morfològiques segons si es cultiven en medi sòlid o en medi líquid (Graham et al., 2012). Les *coleochaete* que creixen en medi aquós formen una colònia en forma de disc pla i les cèl·lules d'aquesta no tenen parets autofluorescents en exposar-se a llum violeta o ultraviolada. Algunes cèl·lules de la colònia tenen un pèl dins una beina (*setae*) amb el que s'enganxen a la superfície on està creixent l'alga, de manera que quedi fixada.

Quan es fa créixer en agar, no hi ha cèl·lules amb aquests pèls, sinó que es formen agrupacions irregulars de moltes cèl·lules individuals, que tenen les parets més gruixudes. A més, les cèl·lules que acaben de dividir-se en aquest medi sovint romanen agregades i envoltades per la mateixa paret cel·lular materna. Poden quedar-se així durant algunes generacions de cèl·lules. Les cèl·lules que creixen en medi sòlid sí que tenen, en major o menor grau, parets cel·lulars autofluorescents en llum ultraviolada o violeta.

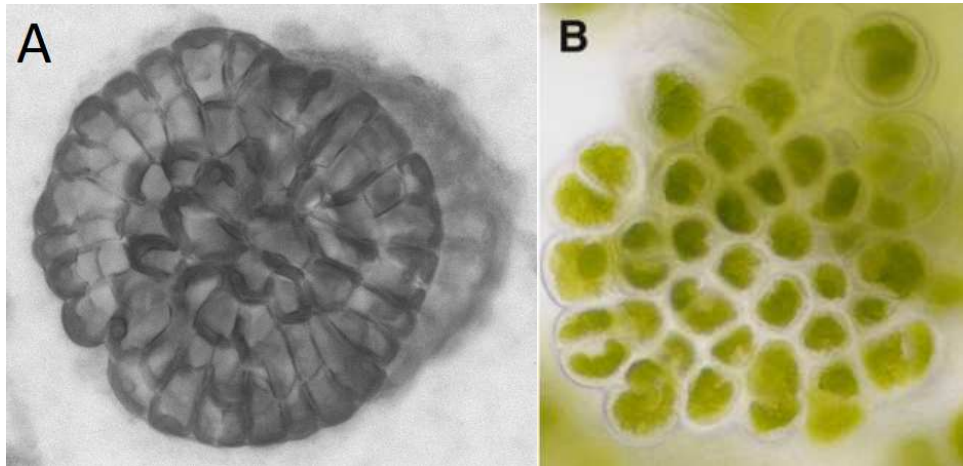


Fig. 4. (A) Colònia crescuda en medi aquós. (B) Extreta de (Graham et al, 2012). Agregacions cel·lulars en medi sòlid.

Reproducció

Quan s'han cultivat les cèl·lules en medi sòlid, i llavors es posen en medi líquid, que és la manera com s'han tractat les cèl·lules en aquest estudi, les *Coleochaete* exhibeixen una reproducció asexual. El procés comença quan algunes espores amb paret cel·lular es diferencien en zoosporangis, cada un dels quals allibera a través d'un porus de la paret una única zoòspora, que no té paret i és biflagel·lada. Les zoòspores naden durant un temps abans de fixar-se en el substrat. Una vegada fixades, comença la formació d'una nova colònia.

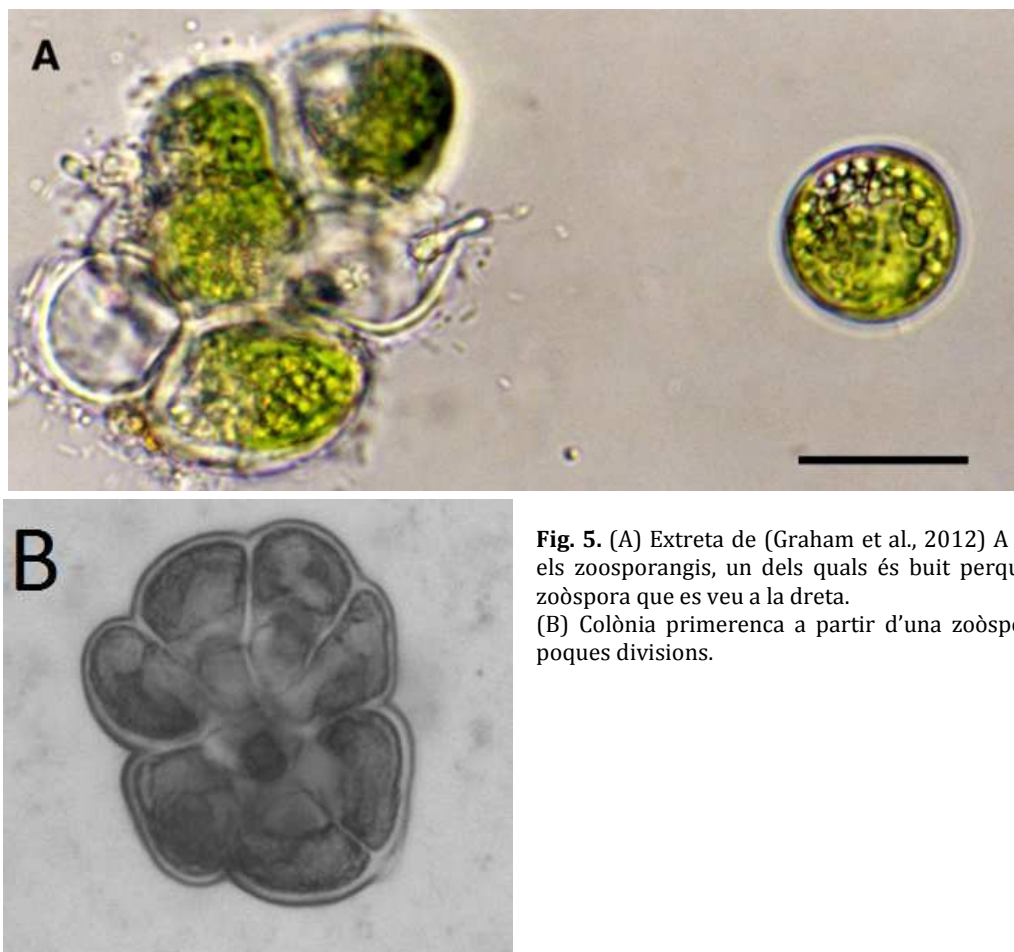


Fig. 5. (A) Extreta de (Graham et al., 2012) A l'esquerra es veuen els zoosporangis, un dels quals és buit perquè ja ha alliberat la zoòspora que es veu a la dreta.
(B) Colònia primerenca a partir d'una zoòspora, després d'unes poques divisions.

Medi de cultiu

Les *Coleochaete* s'han de mantenir en medis de creixement la composició dels quals imiti l'aigua dolça natural.

El medi que hem utilitzat és el Bold Basal Medium (Bischoff and Bold, 1963), que té la següent composició:

NaNO ₃	25 mg
KH ₂ PO ₄	17.5 mg
K ₂ HPO ₄	10 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.5 mg
NaCl	2.5 mg
KOH	3.1 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.498 mg

H ₃ BO ₃	1.142 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.882 mg
MnCl ₂ · 7H ₂ O	0.144 mg
MoO ₃	0.071 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.157 mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.049 mg
Na ₂ EDTA	5 mg
Aigua destil·lada	100 mL

Per tenir medi sòlid, s'han d'afegir 1.2g d'agar a 100 ml de medi líquid.

Els cultius es mantenen en incubadores en cicles de 12h dia/ 12h nit, a una temperatura de 20°C.

IV. DISSENY EXPERIMENTAL

L'objectiu experimental és fer una observació i una presa d'imatges de la formació de colònies a partir d'una sola cèl·lula mare.

Stock de *Coleochaete* en medi sòlid

La primera part, absolutament necessària, és tenir un creixement en medi sòlid de *Coleochaete* (veure apèndix A.1.), ja que quan aquestes es troben en medi sòlid no formen colònies, sinó que romanen en forma d'espores. Aquestes espores començaran a dividir-se una vegada establertes dins un medi líquid adient, de manera que podrà seguir-se la formació de la colònia des del principi.

Per realitzar l'experiment es farà servir el cultiu en sòlid fet el 16 de desembre de 2012, seleccionat després d'una observació de tots els cultius en sòlid de què es disposava (veure apèndix A.2.).

Disseny de cel·les

Per fer una observació del creixement d'una colònia, és necessari tenir cèl·lules individuals i localitzades. Individuals per tal que no interfereixin una amb l'altra a l'hora del creixement, i localitzades per distingir una cèl·lula d'una altra i poder-ne fer el seguiment.

Per l'observació en un lloc gran, com una placa de petri, dificulta el seguiment individual de les cèl·lules i, a més, ja que hi cap un volum més gran de líquid, no és tan fàcil aconseguir una observació bidimensional del creixement de la colònia, ja que aquesta podria créixer en qualsevol direcció de l'espai. Per tot això, és necessari fer un disseny d'una cel·la amb les característiques requerides.

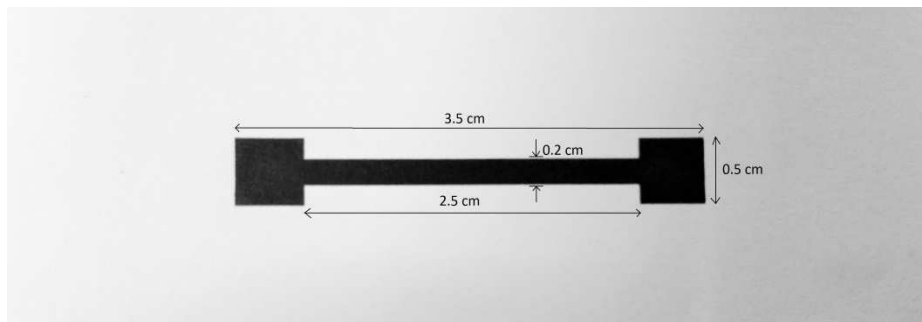


Fig. 6.

Profunditat cel·la $\approx 60 \mu\text{m}$, donada per l'altura de la cinta adhesiva utilitzada. Els quadrats es connectaran amb medi i la zona entre ells serà la zona d'observació.

Les cel·les estan fetes amb PDMS (polydimetilsiloxane) i aferrades sobre un portaobjectes utilitzant plasma fred (veure apèndix A.3.). Es fan amb PDMS ja que aquest material és fàcil d'utilitzar, pot modelar-se com es vulgui i té bones qualitats òptiques. Aquest material és permeable a l'aire, per tant, les cèl·lules podran respirar dins el canal. A més, pot enganxar-se irreversiblement sobre un vidre sense utilitzar un adhesiu, de manera que es podrà treballar amb cel·les que podran ser observades al microscopi.



Fig. 7. Cel·la acabada. Mentre que la cel·la té una altura aproximada de 2 mm, el canal fa 0.06 mm aproximadament.

Una vegada es té la cel·la preparada, s'han de recollir les cèl·lules per ficar-les a dins.

Recollida de cèl·lules

Les cèl·lules es recullen de l'stock en sòlid i es posen en un eppendorf amb medi líquid (veure apèndix A.4.). S'han de recollir cèl·lules suficients per tal que hi hagi una probabilitat alta que entrin al canal. Les cèl·lules, quan es troben en sòlid, estan agrupades i per observar-les millor s'han de separar. Per fer-ho, és suficient agitant l'eppendorf amb un agitador.

Emplenament del canal

Abans d'introduir les cèl·lules al canal, es recull bold amb una xeringa de 1 ml i s'introdueix al canal. La manera de fer-ho és col·locant un luer femella a l'extrem de la xeringa, de manera que s'adapti a l'obertura del canal. S'ha d'introduir el medi al canal amb molta suavitat i precaució, ja que hi ha risc de que es desferri el PDMS del vidre. Una vegada el canal és ple del medi de cultiu de les *Coleochaete*, es recull una mostra de l'eppendorf que s'havia preparat prèviament i s'introdueix al canal, també anant molt alerta.

Després d'això, s'observa el canal al microscopi, amb una lent de 10 augments. S'està cercant tenir un nombre suficientment de cèl·lules individuals per si n'hi ha alguna que es mor abans de començar a crear la colònia. En cas que no entrin cèl·lules al canal o no n'hi hagi suficients, s'ha de tornar a recollir una mostra de l'eppendorf i tornar-la introduir dins el canal.

El procés es repeteix fins a estar satisfets del nombre de cèl·lules observades dins el canal.

Circuit de perfusió

Tot i que la cel·la estigui ben segellada, hi ha evaporació als extrems i al mateix canal degut a la permeabilitat del PDMS. Per tenir les cèl·lules amb tot el medi que necessiten per mantenir-se vives, s'ha de fer un muntatge d'un circuit de nutrició.

El muntatge consisteix simplement a connectar els dos forats del canal amb uns recipients amb bold i crear un petit flux de medi degut a la diferència d'altures entre els dos recipients que el contenen (veure apèndix A.5.).

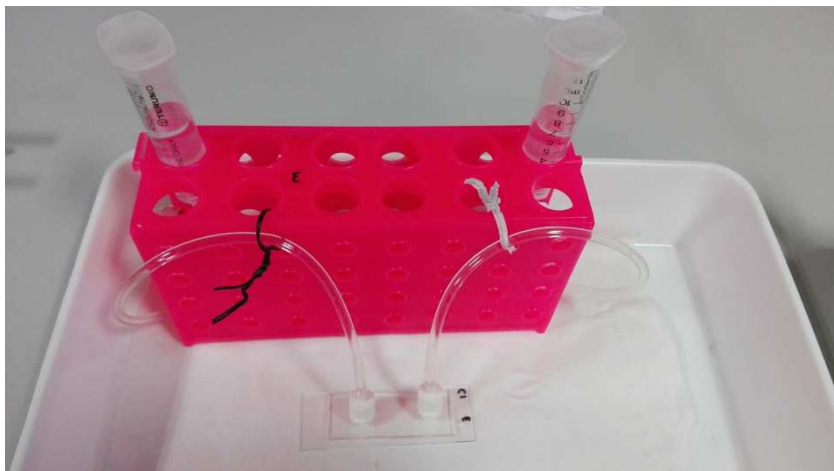


Fig. 8.
Circuit de perfusió.

El flux no ha de ser molt fort perquè sinó podria arrossegar les cèl·lules dificultant-ne el seguiment, ja que abans de començar a dividir-se no estan aferrades al terra del canal. També ha d'evitar-se que quedin bombolles d'aire en el circuit, perquè podrien impedir el pas del medi.

Amb aquest muntatge, pot deixar-se el canal a la incubadora i treure's només per fer les observacions diàries amb el microscopi.

Observació

Amb tot el muntatge fet, només queda observar el creixement de les cèl·lules.

S'han d'agafar imatges de cada cèl·lula cada dia per poder calcular el creixement de la seva àrea. S'agafen imatges sense fluorescència i amb fluorescència, per tenir un millor contrast.

La clorofil·la d'aquestes cèl·lules és autofluorescent, de manera que no és necessari utilitzar cap tint per tenir fluorescència. Les cèl·lules no poden estar més d'uns pocs segons exposades a llum ultraviolada, ja que moren. Per això les imatges fluorescents s'han de prendre ràpidament.

L'observació es fa amb el microscopi invertit *Zeiss Axio Vert A1* equipat amb un llum led de longitud d'ona de 365 nm. S'utilitza una lent de 10 augments. Les imatges en camp clar es fan amb llum transmesa i s'utilitza un filtre de conversió. Les imatges amb fluorescència es fan amb llum reflectida i amb un filtre d'excitació i un de bloqueig. La càmera utilitzada és una Pike F-505C.

S'ha de fer un tractament de les imatges obtingudes per millorar-ne el contrast i poder calcular l'àrea de la cèl·lula a cada pas del seu creixement, per tenir les dades necessàries per fer l'estudi de l'envelliment cel·lular. El tractament d'imatges i càlculs necessaris sobre aquestes es fa amb el programa Matlab.

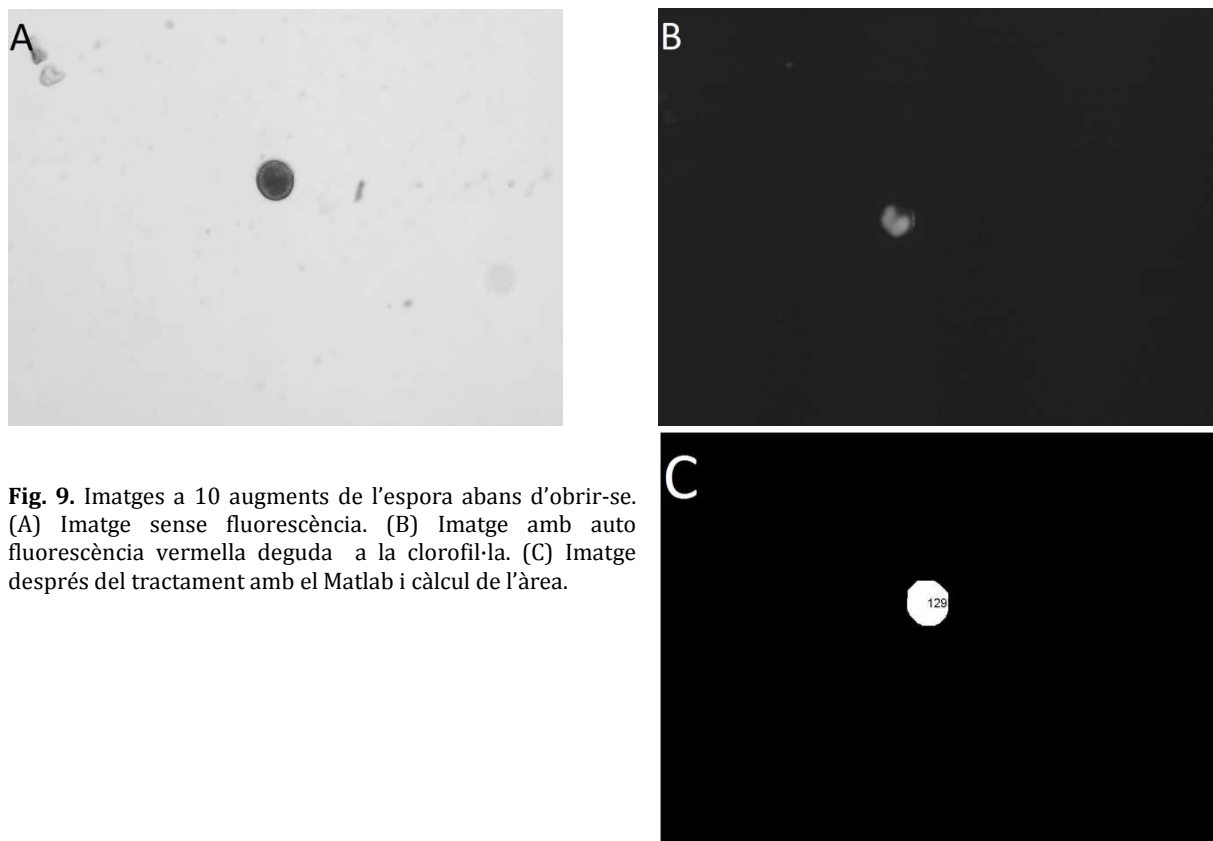


Fig. 9. Imatges a 10 augments de l'espóra abans d'obrir-se. (A) Imatge sense fluorescència. (B) Imatge amb auto fluorescència vermella deguda a la clorofil·la. (C) Imatge després del tractament amb el Matlab i càlcul de l'àrea.

V. PRIMERS RESULTATS I TRACTAMENT D'IMATGES

A continuació es mostren algunes seqüències d'imatges obtingudes amb distintes tècniques així com s'ha anat avançant en el dispositiu experimental.

Les imatges de les figures següents (fig. 10. i fig. 11.) es van prendre dins un canal fet sobre un cobreobjectes, utilitzant H_2O_2 per enganxar el vidre amb el PDMS en lloc del plasma fred, i quan encara no s'havia perfeccionat la tècnica de la fluorescència. Les cèl·lules es van agafar del cultiu en sòlid del 2012 i les imatges es van prendre durant el període d'un mes.

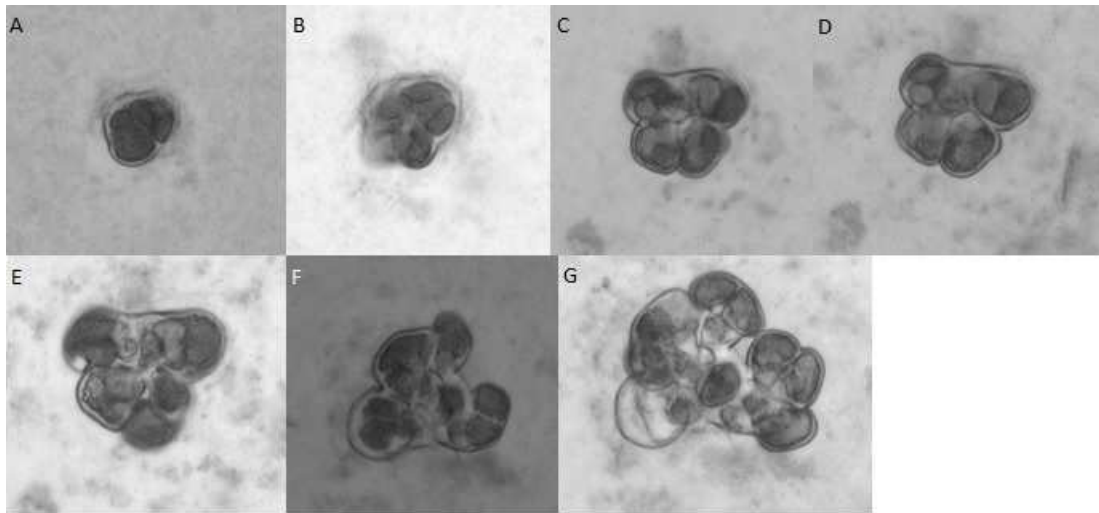


Fig.10. Primeres divisions d'una cèl·lula. Pot veure's que fins a la imatge (D) es divideix bé, però després comença a agafar formes que no són les esperades i, finalment, en les imatges (F) i (G) s'observen regions "buides" que indiquen que s'està morint. Són imatges vistes amb una lent de 10 augments i amb la tècnica de camp clar.

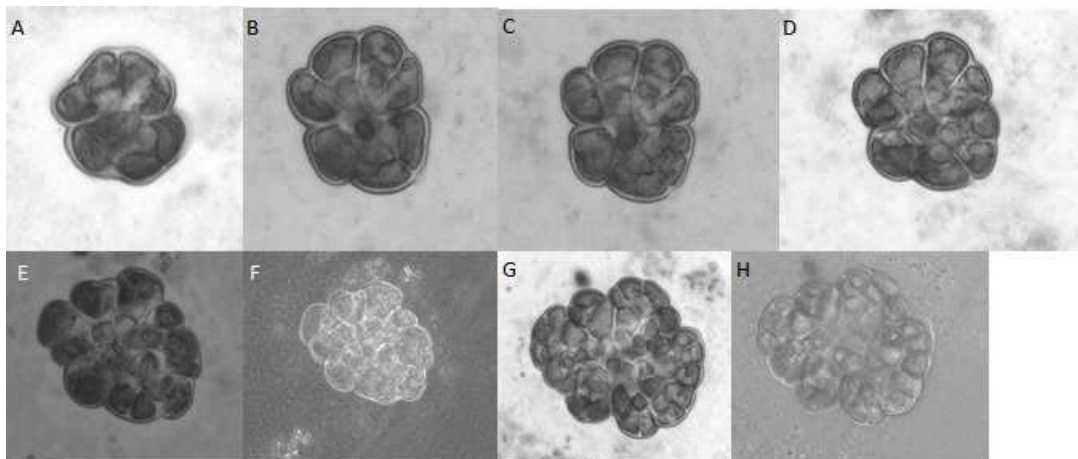


Fig. 11. En les imatges (A),(B),(C),(D),(E),(G) es mostra el creixement d'una colònia. S'observa que agafa una forma aproximadament circular i, en la imatge (G), en les darreres divisions comença a veure's la forma aproximadament rectangular de les cèl·lules. Aquestes imatges estan agafades amb la tècnica de camp clar i una lent de 10 augments. Les imatges (F) i (H) són del mateix dia que les imatges (E) i (G) respectivament, però estan fetes amb tècniques diferents. Les dues estan agafades amb una lent de 40 augments, la (F) utilitzant la tècnica de contrast de fase i la (H) amb camp clar.

Amb aquestes imatges s'observa que no és necessari utilitzar una lent de 40 augments, per tant, els canals poden fer-se sobre portaobjectes, que són més gruixuts que els cobreobjectes i, per tant, més resistents.

Les imatges següents (fig. 12.) són les últimes obtingudes i, per tant, agafades amb el canal i la tècnica descrita al disseny experimental.

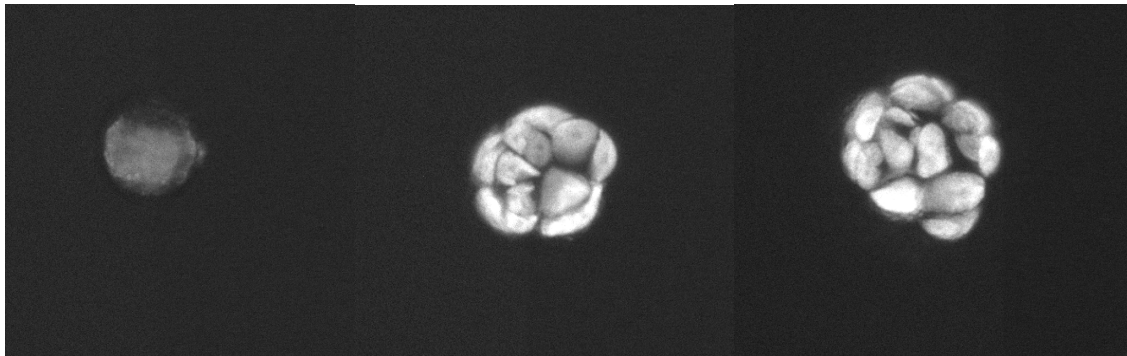


Fig.12. Inici de la formació d'una colònia. Creixement durant 8 dies.

Amb la darrera figura es veu que el contrast obtingut utilitzant la fluorescència és perfecte per poder fer posteriorment el tractament d'imatges, per tant, el disseny experimental desenvolupat és bo. Aquestes imatges amb fluorescència són fetes sense incloure cap tipus de tint, com el *calcofluor white*, ja que amb l'auto fluorescència de les *Coleochaete* és suficient per tenir imatges amb un bon contrast.

No s'han pogut obtenir, fins ara, imatges d'una colònia suficientment gran i plana per poder fer els càlculs de les àrees i treure conclusions, però disposem d'una imatge d'una colònia gran que, tot i que no va créixer plana, permet demostrar que les tècniques de tractament d'imatges són vàlides per a continuar amb l'estudi (fig. 13.).

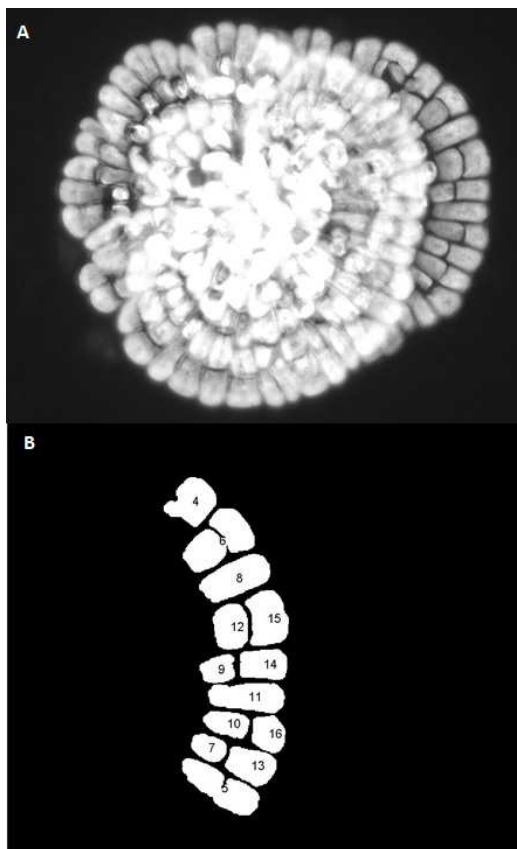


Fig. 13. En la imatge (A) es veu una colònia ja gran, però que no ha crescut plana ja que, probablement, va començar a partir de dues cèl·lules superposades i no només d'una. Tot i això, en les divisions més externes s'observa la forma quasi rectangular de les cèl·lules. A la imatge (B) es veu el tractament de la imatge (A) fet amb el Matlab, on s'ha seleccionat només la part que es veu clara, s'ha assignat un número a cada cèl·lula diferent i s'ha fet el càlcul de l'àrea de cada una (això darrer no es mostra a la imatge).

VI. CONCLUSIONS I TREBALL FUTUR

Primer, cal dir que el dispositiu experimental dissenyat és bo, perquè permet fer un seguiment del creixement de cèl·lules individuals que formaran colònies planes, i agafar-ne imatges amb bona resolució per fer-ne un posterior tractament per treure resultats.

No s'han obtingut bons resultats del creixement d'una colònia fins al moment a causa de que les cèl·lules que s'han fet servir són, com s'ha dit prèviament, d'un cultiu de fa 3 anys, així que tenen un índex de mort molt alt i un índex de creixement i reproducció massa baix, per tant, no serveixen. L'intent que va fer-se el mes de juliol de fer servir les cèl·lules del cultiu fet el novembre de 2014 no va anar bé, ja que els zoosporangis no s'havien acabat de formar i era impossible separar una cèl·lula d'una altra sense fer-les malbé, i tenir cèl·lules unides creixent dins el canal no interessa per aquest projecte. Des del juliol, però, s'han anat fent observacions del cultiu de novembre de 2014, i sembla que d'aquí unes poques setmanes podrà tornar-se intentar separar les cèl·lules i ficar-les dins el canal per fer créixer colònies sanes.

Una vegada s'aconsegueixi tenir una colònia plana creixent dins un canal i, per tant, pugui fer-se'n el seguiment des del principi, podrà procedir-se a fer l'anàlisi d'interès. L'anàlisi que s'ha de fer consisteix en assignar un número a cada cèl·lula, calcular-ne l'àrea i veure com va creixent en funció de la vellesa de cada paret de la cèl·lula. El programa Matlab per realitzar això ja està fet (veure apèndix B), així que només falta anar obtenint imatges i afegint alguna modificació al programa si és necessari.

Quan es tinguin colònies i observacions sobre el creixement de les àrees de cada cèl·lula, també podrà desenvolupar-se un mètode per organitzar el creixement d'aquestes cèl·lules.

L'organització per al nostre propòsit de la genealogia de les cèl·lules *Coleochaete* és més complicada que l'arbre simple del cas unidimensional, ja que en cada cèl·lula poden conviure segments de membrana de diversos graus d'antiguitat generacional. Per això és necessari introduir estratègies més sofisticades per a l'organització.

En aquest projecte es planteja la possibilitat de desenvolupar, amb aquest objectiu, un mètode basat en el sistema de Lindenmayer (Sistemes L). Aquests sistemes van ser introduïts com un formalisme matemàtic per modelar organismes multicel·lulars que formen filaments lineals o en forma de branques (Prusinkiewicz P, 2003). Tot l'organisme es tracta com un conjunt d'unitats discretes, anomenats *mòduls*, la naturalesa dels quals canvia segons l'organisme que es vulgui modelar. Cada *mòdul* es representa per un *símbol* que n'especifica el tipus. A més, un *mòdul* pot caracteritzar-se per un o més paràmetres que, juntament amb el *símbol*, caracteritzen el seu estat.

Els models basats en el sistema L són dinàmics per naturalesa, és a dir, que com a resultat del desenvolupament es veu la forma d'un organisme. El desenvolupament d'una estructura es descriu mitjançant *produccions*, un conjunt de regles que defineix la manera com les variables poden ser reemplaçades combinant constants i altres variables. Els *productes* s'apliquen en paral·lel amb la intenció de plasmar l'evolució temporal simultània de totes les parts de l'organisme que es descriu.

Com a conclusió final pot dir-se que, ja que s'han completat quasi totalment les parts 1 i 2 del projecte (enumerades al resum), s'ha demostrat que els objectius globals del projecte són assolibles.

APÈNDIX A

A.1. Protocol de creació d'stock en sòlid

Material

- Tubs falcon autoclavats
- Puntetes pipeta
- Pipetejador
- Vas de precipitats
- Agar
- Bold
- Aigua destil·lada
- Coleochaete en medi líquid

Procediment

El bold es troba en una concentració de 50x, de manera que s'ha de diluir en aigua per tenir la concentració òptima per al creixement de les cèl·lules. Així, per tenir 100 ml de bold amb la concentració desitjada, es mesclen 2 ml de bold concentrat al 50x i 98 ml d'aigua destil·lada. Una vegada diluït el medi s'ha de mesclar amb 1.5 g d'agar, ja que s'ha de posar a l'1.5% perquè el medi sòlid tingui la consistència que es desitja. Aquesta mescla, ficada dins un vas de precipitats o qualsevol altre recipient de vidre s'ha d'autoclavar durant 40 minuts.

Després d'això, dins una cambra de flux laminar esterilitzada es reparteixen els 100 ml de bold mesclats amb l'agar dins 6 tubs falcon, que s'han de deixar lleugerament inclinats per tal que el medi es reparteixi de manera uniforme dins el tub i que aquest pugui obrir-se i tancar-se sense pertorbar el creixement de les cèl·lules.

Quan s'ha repartit el medi, es recullen 0.5 ml de *Coleochaete* de l'stock en líquid amb una punta de pipeta i es depositen sobre el medi sòlid de manera que no quedi tot en un mateix punt i les cèl·lules puguin assentar-se i tenir nutrients suficient en formar-se les espores. S'han de posar 0.5 ml de *Coleochaete* de l'stock en líquid dins cada tub falcon.

Els tubs s'han de deixar dins la incubadora el temps que sigui necessari per a la formació de les espores i per tenir-ne una quantitat suficient.

A.2. Selecció del cultiu en sòlid

El 15 de gener de 2015 es va fer un comptatge d'espores agafant una mostra de cada cultiu en sòlid per veure quin dels tres que es tenien era millor utilitzar.

Per fer el comptatge es recolliren mostres de cada cultiu per separat amb un anell inoculador de 1 µl, passant l'inoculador suaument per sobre el cultiu i introduint-lo dins un eppendorf amb 1 ml de bold. Aquest procés es repetí 4 vegades per cada cultiu.

Per fer el comptatge es van agafar 20 µl de l'eppendorf cada vegada. En el comptatge es distingia el nombre de cèl·lules individuals i el nombre de grups, ja que el que interessa en el cas de l'experiment a realitzar és tenir cèl·lules individuals.

Aquests són els resultats:

		Cultiu 16/12/2012	Cultiu 9/01/2014	Cultiu 15/11/2014
1	Individuals	5	0	0
	Grups	2	0	0
2	Individuals	4	0	0
	Grups	4	1	0
3	Individuals	2	0	0
	Grups	1	1	0
4	Individuals	4	0	0
	Grups	0	1	0
5	Individuals	0	0	0
	Grups	1	0	0
6	Individuals	0	1	0
	Grups	0	1	0
7	Individuals	5	0	0
	Grups	4	0	0

El 22 de juliol de 2015 va fer-se una altra observació dels diferents cultius en sòlid, aquesta vegada qualitativa, i altra vegada va observar-se que el millor cultiu que podia utilitzar-se és el preparat l'any 2012.

A.3. Protocol de creació de cel·les

· Negatiu

S'enganxa un tros de cinta adhesiva transparent (Scotch Moving and Storage Tape, Cat. No. 3650) d'uns 60 µm de gruix sobre un portaobjectes (Shrirao et al., 2012) i, amb un escalpel, es talla amb la forma que ha de tenir la cel·la. Això és el negatiu de la cel·la. Es desenganxa el negatiu i s'enganxa sobre un altre portaobjectes. No s'utilitza el primer portaobjectes perquè la superfície d'aquest té massa cola de la cinta adhesiva, i és necessari que la superfície estigui tan neta com sigui possible. El portaobjectes amb el negatiu es posa en un recipient.

· PDMS

Material

- Tubs falcon
- Enduridor: Silicone elastomer curing agent
- Base: Silicone elastomer base
- Pal per mesclar
- Cambra de buit
- Negatiu cel·les

Procediment

Per preparar el PDMS s'ha de mesclar el 10% d'agent enduridor amb el 90% de base. Quan s'aconsegueix una mescla homogènia, s'aboca sobre els negatius perquè agafi la forma que ha de tenir el canal. S'ha de preparar mescla suficient perquè quedi una cel·la d'uns 2 mm d'altura. Per llevar les bombolles d'aire, es posa el recipient amb la mescla i el negatiu dins una cambra de buit. Finalment es fica durant 20 minuts al forn a 80°C.

Quan es treu del forn es talla un tros de PDMS amb una superfície una mica menor que el portaobjectes, vigilant que el canal quedi centrat. Això serà la cel·la. S'hi fan dos forats, un a cada quadrat de l'extrem del canal.

· Final

Quan es té la cel·la de PDMS, s'ha d'enganxar sobre un portaobjectes. Utilitzant un portaobjectes només podran observar-se les cèl·lules amb una lent de 10 augments degut al gruix del vidre d'aquest. Aquest augment és suficient per observar el que interessa en aquest treball, de manera que pot treballar-se amb un portaobjectes, que és més pràctic per fer les cel·les que un vidre més prim.

El mètode per enganxar les dues superfícies és una pistola de plasma fred, que ionitza les dues superfícies que es volen aferrar, de manera que quan es posen en contacte queden ben enganxades. La pistola de plasma que s'utilitza és una Piezo Brush PZ2.

Abans d'aplicar el plasma, s'han de fer netes les dues superfícies amb etanol per aconseguir una superfície sense irregularitats i totalment plana. S'ha d'anar amb molta cura perquè al canal no hi quedi gens de brutícia, perquè dificultaria el creixement i l'observació de les cèl·lules.

Una vegada les dues superfícies estan netes, pot procedir-se a ionitzar-les. Per fer-ho, s'ha de passar l'elèctrode sobre les dues superfícies d'unió, a una distància d'uns 0.5 cm aproximadament (Haubert et al., 2006). El temps necessari per ionitzar tota la superfície depèn

de la mida d'aquesta, així com de les condicions atmosfèriques (Haubert et al., 2006). Per comprovar si les superfícies estan preparades per unir-se, pot posar-se una gota d'aigua sobre aquestes, ja que una vegada ionitzada la superfície, es torna hidrofílica. Quan les 2 superfícies d'unió estan ben ionitzades, es posen en contacte i es deixen durant, com a mínim, una hora. Passat aquest temps ja es tindrà el canal preparat per utilitzar-se.

· Detalls tècnics pistola de plasma fred

La tecnologia d'aquesta pistola es basa en una descàrrega elèctrica directa a través d'un transformador piezoelèctric que opera obert. El voltatge baix aplicat es transforma creant un camp elèctric alt que dissocia i ionitza l'aire. S'arriben a densitats electròniques d'entre 10^{14} i 10^{16} m^{-3} . Amb això es produeix un plasma fred de no equilibri.

Informació tècnica

Connexió elèctrica	110-240 V/50-60 Hz 15 V DC
Potència màxima	30 W
Temperatura del plasma	<50 °C
Distància de tractament	5-10 mm

A.4. Protocol de recollida de cèl·lules

Material

- 1 Eppendorf
- Punta de pipeta
- Pipetejador
- Anell inoculador de 1 μ l
- Bold
- Cultiu en sòlid

Procediment

Esterilitzar amb llum ultraviolada tot el material excepte el medi de cultiu i el cultiu durant 10 minuts aproximadament. Tota la recollida es fa dins la cambra de flux laminar.

Utilitzant el pipetejador i la punta de pipeta, es fiquen entre 0.5 i 1 ml de bold dins l'eppendorf. A continuació, es banya l'inoculador introduint-lo dins l'eppendorf i després es passa suaument sobre les espores per recollir-ne algunes. S'introdueix una altra vegada l'inoculador dins l'eppendorf per deixar allà la mostra recollida. Es repeteix el procés 4 o 5 vegades per tenir una quantitat suficient de *coleochaete*.

A.5. Muntatge del circuit de perfusió

Material

- 2 xeringues de 10 ml
- 2 claus de pas
- Tub de plàstic
- Luer mascles i femelles
- Parafilm
- Suport
- Bold
- Xeringa de 1 ml
- Agulla
- Tisores

Procediment

S'esterilitza tot el material, excepte el medi de cultiu, exposant-lo a llum ultraviolada durant 10 minuts aproximadament. Tot el muntatge es fa a la cambra de flux laminar per evitar contaminacions.

Utilitzant la xeringa de 1 ml i connectada a l'agulla, s'emplenen les claus de pas amb bold per evitar que quedin bombolles d'aire. Una vegada és segur que no hi queda aire a dins, es connecta cada clau de pas amb una xeringa de 10 ml, prèviament col·locada al suport. D'aquesta xeringa només s'utilitza el cilindre mil·limetrat, per fer de recipient contenidor del medi.

Es tallen dos trossos del tub de plàstic de la mida desitjada per tal que vagin des de la clau de pas fins a la cel·la. S'ha de tenir en compte que el tub no ha de ser molt rígid per evitar que, en estar connectat amb el canal, faci un esforç tangencial al forat i es separi el PDMS del vidre. Als dos extrems del tub s'hi han de posar els luers perquè pugui connectar-se tant a la clau de pas com al forat del canal. Una vegada units el tub amb la clau de pas i la clau de pas amb la xeringa, s'emplena aquesta darrera amb medi, deixant la clau de pas tancada. S'obre la clau de pas i es deixa que flueixi el medi fins a l'extrem del tub fins que hagi sortit tot l'aire del circuit.

Els extrems superiors de les dues xeringues de 10 ml, s'han de tapar amb parafilm per evitar possibles contaminacions i evaporacions. Abans de tapar-se s'ha de mirar que hi hagi una certa diferència d'altura entre el medi que hi ha a cada xeringa perquè hi hagi flux dins el canal.

Per connectar els tubs amb els extrems del canal, s'ha de fer amb la clau de pas tancada i assegurant-nos que a l'extrem del tub hi ha una gota de medi, per evitar les bombolles d'aire. Una vegada estan connectats els dos tubs als extrems del canal, s'obre el circuit.

APÈNDIX B

Programa Matlab

Per fer el tractament d'imatges fetes amb fluorescència amb el Matlab, s'han de fer servir poques funcions per millorar la imatge.

La primera passa és transformar la imatge d'escala de grisos a blanc i negre. Per fer-ho es fa servir la funció *graythresh*, que computa un nivell global que pot usar-se per convertir a imatges binàries (blanc i negre) utilitzant la funció *im2bw*.

Una vegada s'ha passat la imatge a blanc i negre, s'han de llevar de la imatge els objectes que no interessin analitzar. Per fer-ho es juga amb les funcions *erode* i *dilate*, així com també pot utilitzar-se una funció per eliminar objectes majors o menors que un cert nombre de píxels fent servir la funció *bwareaopen*.

Quan a la imatge només queden les cèl·lules de les que vol treure's informació, s'utilitza la funció *regionprops* per calcular l'àrea i assignar un número a cada cèl·lula.

Amb els càlculs ja fets, només falta dibuixar la imatge amb la informació desitjada i guardar la informació de les àrees en un fitxer extern.

GLOSSARI BIOLOGIA

Diferenciació cel·lular: és el procés mitjançant el qual les cèl·lules d'un llinatge cel·lular concret (el llinatge cel·lular es determina en el moment de la formació de l'embrió) pateixen modificacions en la seva expressió genètica, per adquirir la morfologia i les funcions d'un tipus cel·lular específic i diferent a la resta de tipus cel·lulars de l'organisme.

Divisió cel·lular anticlinal: el pla de divisió forma un angle amb la superfície del cos de la planta.

Divisió cel·lular periclinal: el pla de divisió és paral·lel a la superfície del cos de la planta.

Meristema: un meristema en les plantes verdes o embriòfits, és un teixit biològic constituït per cèl·lules indiferenciades (o poc diferenciades) formant una zona de creixement on tenen lloc les divisions cel·lulars de (mitosi).

Morfogènesi: la morfogènesi inclou la forma dels teixits, dels òrgans i dels organismes complets i les posicions de diversos tipus de cèl·lules especialitzades.

Tal·lus: el tal·lus és un cos vegetatiu no diferenciat en arrel, tija i fulles, i format per teixits poc diferenciats. L'estructura d'un organisme que sembla un tal·lus es diu tal·loide, tal·liforme o tal·losa. Un tal·lus normalment es refereix al cos sencer d'un organisme pluricel·lular i que no es mou, en el qual no hi ha diferenciació dels teixits biològics en òrgans. Encara que els tal·lus no estiguin organitzats en distintes parts com les plantes vasculars que sí que tenen fulles, arrels i tiges, tenen estructures anàlogues equivalents amb funcions similars i estructura macroscòpica, però diferent estructura microscòpica.

GLOSSARI TÈCNIC

- Anell inoculador (Fig. 14. (A)).
- Eppendorf (Fig. 14. (B)).
- Luer femella (Fig. 14. (C)).
- Luer mascle (Fig. 14. (D)).
- Parafilm (Fig. 14. (E)).
- Pipetejador (Fig. 14. (F)).
- Puntetes de pipeta (Fig. 14. (G)).
- Tubs falcon (Fig. 14. (H)).

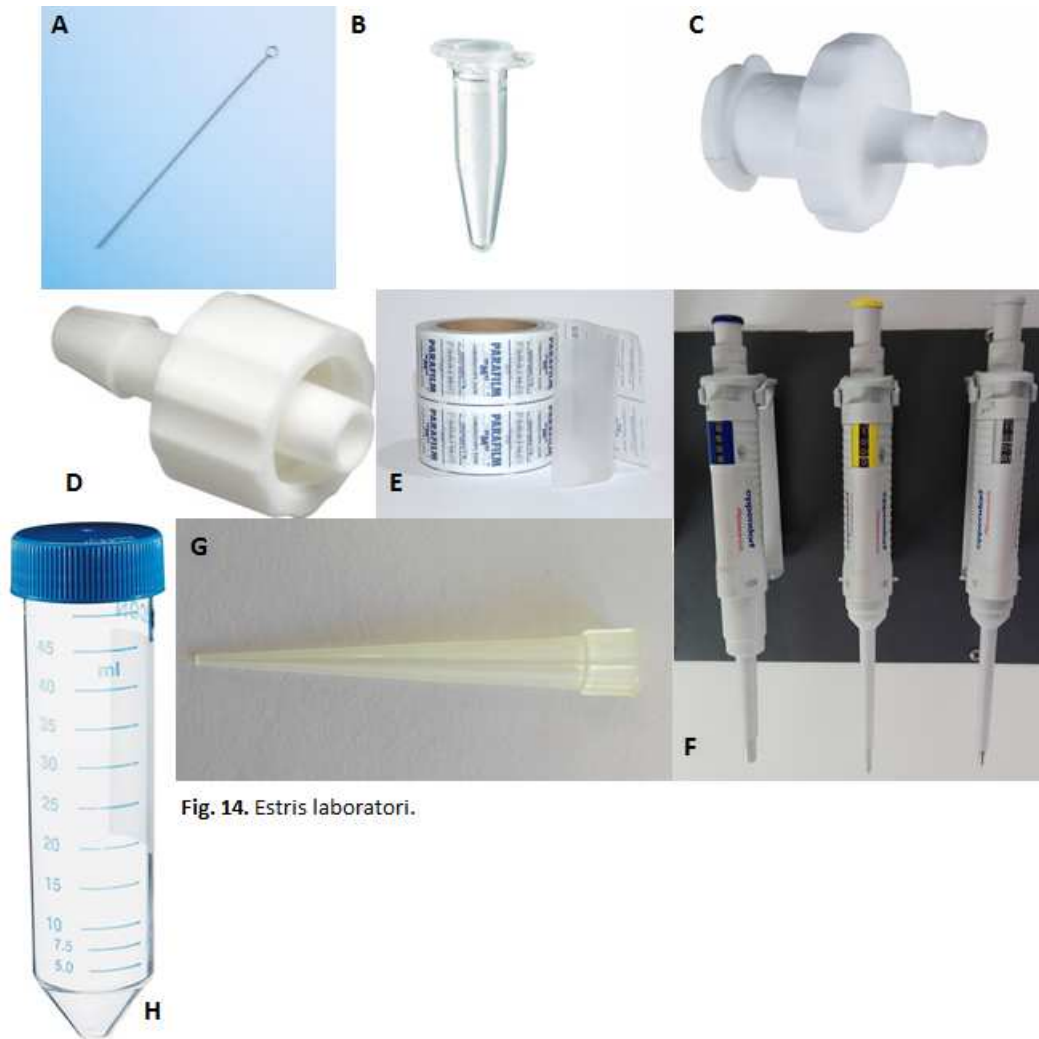


Fig. 14. Estris laboratoris.

REFERÈNCIES

- Bischoff HW, Bold HC (1963) Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Phycological Studies IV, Univ. No. 6318*, Texas, p. 95.
- de Pedro MA, Quintela JC, Holtje JV, Schwartz H (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 2823-2834.
- Dupuy L, Mackenzie J, Haseloff J (2010) Coordination of plant cell division and expansion in a simple morphogenetic System. *PNAS*, vol. 107, no. 6, 2711-2716.
- Graham LE, Arancibia-Avila P, Taylor WA, Strother PK, Cook ME (2012) Aeroterrestrial coleochaete (Streptophyta, Coleochaetales) Models early plant adaptation to land. *American Journal of Botany* 99(1): 130-140.
- Haubert K, Drier T, Beebe D (2006) PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona System. *Lab Chip*, 6, 1548-1549
- Prusinkiewicz P, Introduction to modelin using L-systems; Kaandrop A, Kübler JE (2001) *The Algorithmic Beauty of Sweets, Sponges, and Corals*, Springer, Berlin, 91-93; Prusinkiewicz P, Hanan J, Mech R, *An L-system-based plant modelin Language*, Lecture Notes in Computer Science 1779, Springer, Berlin, 395-410.
- Shrirao AB, Hussian A, Cho CH, Perez-Castillejos R (2012) Adhesive-tape soft lithography for patterning mammalian cells: application to wound-healing assays. *BioTechniques Rapid Dispatches* doi: 102144/000113928, 315-318
- Stewart EJ, Madden R, Paul G, Taddei F (2005) Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* 3(2): e45.

AGRAIMENTS

M'agradaria donar les gràcies al meu tutor, Oreste Piro, per haver estat disposat a ajudar-me en qualsevol cosa i en qualsevol moment, i a Idán Tuval i Ana Barreira per ensenyar-me tot el que era necessari saber per treballar en un laboratori, per guiar-me quan no sabia quin camí tocava seguir en la investigació i, sobretot, per haver-me animat quan semblava que les coses no acabaven de sortir.