



5° CONGRESO
ARGENTINO DE
MICROSCOPIA
SAMIC

I N I C S A

Aplicación de la inmunocitoquímica ultraestructural en microscopía de correlación (CLEM)

14 y 15 de mayo de 2018

Centro de Microscopía Electrónica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSACONICET), Universidad Nacional de Córdoba.

Organizadores:

Amado Quintar

Información importante:

Curso Teórico-práctico Pre-congreso en el marco del 5° Congreso Argentino de Microscopía SAMIC 2018, destinado a profesionales de las Ciencias Biomédicas como así también a personal CPA de CONICET. Cupo de 20 alumnos. Carga horaria de 16 hs.

Lugar: Hotel del Lago, La Falda.

Inscripción:

Los postulantes deben enviar CV resumido y texto explicando el interés por realizar el curso. Enviar al docente responsable del curso (aquintar@cmefcm.uncor.edu). Se seleccionarán 20 postulantes, de los cuales 18 serán beneficiados con beca del SNM, que incluye alojamiento y comida para los días del curso.

Docentes:

Carolina Leimgruber (INICSA, CONICET-UNC)

Juan Pablo Petiti (INICSA, CONICET-UNC)

Amado Quintar (INICSA, CONICET-UNC)

Descripción

Los avances en el estudio relacionado a la localización y tráfico de proteínas dentro de la célula han permitido comprender los mecanismos moleculares que regulan las principales respuestas biológicas a diversos estímulos. Parte de esos avances se han logrado mediante la implementación de metodologías como la inmunofluorescencia y la inmunomarcación a nivel de microscopía electrónica, lo que permitió una mejor comprensión y un conocimiento detallado de la dinámica intracelular. Si bien la microscopía de luz ofrece un screening rápido de grandes áreas y la detección simultánea de múltiples antígenos en células vivas, la microscopía electrónica provee la única referencia del espacio donde todos los objetos, inmunomarcados o no, pueden ser visualizados en alta resolución. La microscopía de correlación óptica y electrónica (CLEM) combina la microscopía electrónica con la de fluorescencia. Se trata de una técnica potente por su capacidad de combinar información estructural y funcional. Sin embargo, la complejidad de su procedimiento ha limitado su aplicación a gran escala. Actualmente, existe un continuo crecimiento en el desarrollo de nuevas técnicas y equipamientos vinculados a CLEM. Además de las técnicas convencionales de marcación a nivel ultraestructural, el desarrollo de diferentes metodologías de crio-inmuno microscopía electrónica han permitido obtener una mayor sensibilidad para la detección de diferentes antígenos simultáneamente en cortes ultrafinos preparados a partir de células y tejidos.

Objetivos

1. Desarrollar habilidades en toma de decisiones estratégicas sobre las metodologías adecuadas para observar la localización subcelular e interacción de proteínas en un contexto ultraestructural.
2. Conocer los fundamentos y aplicaciones de diferentes técnicas inmunocitoquímicas aplicadas en microscopía electrónica de transmisión.
3. Adquirir destrezas prácticas en el procesamiento de muestras biológicas para optimizar la preservación antigénica. Se desarrollará en profundidad la técnica de Tokuyasu para crio-inmunomicroscopía electrónica.
4. Promover el entrenamiento práctico en el uso de los equipos necesarios para obtener imágenes de alta resolución en escala micro y nano-métrica.
5. Correlacionar la localización subcelular de proteínas (detectadas por inmunofluorescencia) con las estructuras a nivel ultraestructural (CLEM).
6. Brindar un espacio para la interrelación de diferentes centros de investigaciones del país a los fines de fomentar el desarrollo de la microscopía de avanzada.

Contenidos

UNIDAD 1: *Inmunocitoquímica*. Principios de la reacción antígeno-anticuerpo. Criterios para la realización de una inmunocitoquímica para MET: especificidad y afinidad del anticuerpo,

accesibilidad, antigenicidad y preservación de la ultraestructura. Tipos y usos de controles. Problemas en la inmunocitoquímica. Sensibilidad de la marcación. Tipos de inmunomarcación: Pre y post-embedding. Doble inmunocitoquímica.

UNIDAD 2: ***El frío como método de fijación y/o soporte para cortes finos y ultrafinos. Técnica de Tokuyasu.*** Fijación de la muestra con técnicas de alta presión y baja temperatura (High Pressure Freezing), inclusión de muestras a baja temperatura (Freeze Substitution). Técnica de Tokuyasu y sus aplicaciones. Crioprotección y medio de inclusión: sucrosa y gelatina. Montado en soportes (pin) y congelación. Crioultramicrotómia: tallado, obtención de cortes y montado en grillas. Inmunomarcación y contraste.

UNIDAD 3: ***Microscopia de correlación CLEM, reconstrucción 3D y análisis de imágenes.*** Introducción a CLEM. Tipos de CLEM. CLEM a partir de criosecciones de Tokuyasu. Preparación de la muestra y seccionamiento. Estrategias a considerar en diseños experimentales para utilizar CLEM. Adquisición de imágenes, overlay y reconstrucción volumétrica. Aplicaciones y ejemplos.

Cronograma:

	Horario	Tema	Docente
DÍA 1	9:00 - 10:30	Bienvenida. Presentación de los estudiantes y docentes. Unidad 1: primera parte	Carolina Leimgruber Juan Pablo Petiti Amado Quintar
	10:30 - 11:00	Coffee Break	
	11:00 - 12:30	Unidad 1: segunda parte	Amado Quintar
	12:30 - 14:00	Almuerzo y discusión de estrategias metodológicas	
	14:00 - 15:30	Práctico	Amado Quintar
	15:30 - 16:00	Coffee Break	
	16:00 - 18:00	Práctico	Carolina Leimgruber Amado Quintar
DÍA 2	9:00 - 10:30	Unidad 2: primera parte	Juan Pablo Petiti
	10:30 - 11:00	Coffee Break	
	11:00 - 12:30	Unidad 2: segunda parte	Carolina Leimgruber Amado Quintar
	12:30 - 14:00	Almuerzo y discusión de estrategias metodológicas	
	14:00 - 15:20	Unidad 3	Juan Pablo Petiti
	15:20 - 15:40	Coffee Break	
	15:40 - 17:00	Interpretación de imágenes	Amado Quintar Carolina Leimgruber
	17:00 - 18:00	Examen Final y conclusiones del curso	Amado Quintar