

Curso Avanzado de Técnicas inmunocitoquímicas para microscopía electrónica. Crio-inmunomarcaciones y su aplicación en CLEM

Fecha del 25 al 30 de septiembre, 2017

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

Organizadores:

Dr. Juan Pablo Petiti, Dra. Alicia I. Torres y Dra. Carolina Leimgruber.

Información importante:

Curso Teórico-práctico destinado a profesionales de las Ciencias Biológicas, Bioquímicas y Médicas como así también a personal CPA de CONICET. Cupo de 10 alumnos. Carga horaria de 45 hs. Lugar: INICSA, Haya de la Torre esquina Enrique Barros, Ciudad Universitaria, Córdoba Capital. Tel: 0351-4333021.

Inscripción:

Fecha límite de inscripción: 8 de Septiembre de 2017. Los postulantes deben tener conocimientos previos de biología celular y vinculación con proyectos de investigación que incluyan microscopía electrónica y/o de fluorescencia. Deben enviar CV resumido y texto explicando el interés por realizar el curso en cual se incluya un resumen del proyecto de investigación. Enviar al docente responsable del curso Dr. Petiti (jpetiti@cmefcm.uncor.edu o juanpetiti@yahoo.com). Se seleccionarán 7 postulantes que provengan de otras ciudades para ser beneficiados con beca del SNM (viaje y viáticos).

Docentes:

Dra. Alicia Torres (INICSA)
Dra. Cristina Maldonado (INICSA)
Dr. Jorge Mukdsi (INICSA)
Dra. Ana De Paul (INICSA)
Dra. Silvina Gutiérrez (INICSA)
Dr. Juan Pablo Petiti (INICSA)

Dr. Amado Quintar (INICSA)
Dra. Carolina Leimgruber (INICSA)
Dra. Liliana Sosa (INICSA)
Dr. Carlos Mas (CIQUIBIC)

Descripción

En los últimos años, investigaciones en áreas biológicas relacionadas al estudio de la expresión, localización y tráfico de proteínas ha permitido comprender los mecanismos moleculares que regulan las principales respuestas biológicas. Para obtener una mejor comprensión de estos mecanismos, es necesario tener un conocimiento detallado de la dinámica intracelular de proteínas siendo la inmunofluorescencia y la inmunomarcación a nivel de microscopía electrónica las herramientas más apropiadas para estos estudios. 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. Actualmente, existe un continuo crecimiento en el desarrollo de nuevas técnicas y equipamientos vinculados a la microscopía de correlación (CLEM), que combina los beneficios de la microscopía de luz con la alta resolución y el detalle ultraestructural de la microscopía electrónica. 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. Conocer los fundamentos y aplicaciones de diferentes técnicas inmunocitoquímicas aplicadas en microscopía electrónica de transmisión.
2. Desarrollar habilidades en toma de decisiones estratégicas sobre las metodologías adecuadas para observar la expresión, localización subcelular e interacción de proteínas en un contexto ultraestructural.
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. Se incentivará el manejo de ultramicrotomos convencionales y crio-ultramicrotomo como así también el manejo de microscopios óptico y electrónico.
5. Identificar proteínas de interés por inmunofluorescencia y correlacionar su localización subcelular 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: *Fundamentos de la microscopía electrónica*. Breve reseña histórica de la microscopía electrónica. Concepto de Resolución. Componentes de un microscopio electrónico. Descripción del Microscopio Electrónico de Transmisión. Interacción haz de electrones–muestra. Nuevas tecnologías en microscopios de transmisión.

UNIDAD 2: *Preparación de muestras biológicas para Microscopía Electrónica de transmisión.* Fijación. Tipos de fijación y muestras. Factores que afectan la fijación: temperatura, duración, Ph, osmolaridad. Tipos de resina: epoxi y metacrilato. Teoría del contraste. Introducción a la ultramicrotomía. Tallado del taco. Obtención de cortes semifinos y finos. Problemas en el corte con el ultramicrotomo.

Práctico:

Demostración de inclusión en LRWhite. Manipulación del ultramicrotomo. Tallado de taco. Obtención de cortes semifinos. Coloración con azul de Toluidina. Observación al microscopio óptico. Retallado para obtener secciones finas.

UNIDAD 3: *Inmunocitoquímica.* Principio 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.

Práctico:

Realización del inmunocitoquímica en secciones de LR-White. Elección de anticuerpo secundario. Manipulación de las grillas. Utilización de controles.

UNIDAD 4: *Fijación en frío y 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. Crioultramicrotomía: tallado, obtención de cortes y montado en grillas. Inmunomarcación y contraste. Inmunofluorescencia: conceptos básicos y sus aplicaciones. Cuantificación.

Práctico:

Protocolo de inclusión para la técnica de Tokuyasu. Manipulación del crioultramicrotomo. Preparación del espécimen, montado y congelación. Pick-up de secciones, coloración y observación al microscopio óptico. Preparación de grillas con Film de Formvar.

UNIDAD 5: *Microscopía de correlación CLEM.* Introducción a CLEM. Tipos de CLEM. CLEM a partir de criosecciones de Tokuyasu. Preparación de la muestra y seccionamiento. Adquisición de imágenes y overlay. Estrategias a considerar en diseños experimentales para utilizar CLEM. Aplicaciones y ejemplos de CLEM.

Práctico:

Realización del inmunocitoquímica en criosecciones. Contratación con uranilo y realización de film de metilcelulosa. Práctica de inmunofluorescencia en cortes semifinos. Observación de las inmunocitoquímicas realizadas en microscopio de fluorescencia y electrónico. Comparación de cada técnica. Interpretación de las imágenes.

Cronograma:

Horario	Temas	Docentes
Día 1	9 - 9 ³⁰ hs	- Bienvenida y charla gral. sobre el curso
	9 ³⁰ - 11 ³⁰ hs	- Exposiciones de los participantes
	11 ³⁰ - 12 hs	Coffee Break
	12 - 13 hs	- Contenido Unidad 1
		Dra. Torres
		Dra. Torres

	13 - 14 hs	Almuerzo	
	14 - 17 hs	- Visita a los laboratorios y organización de los grupos de trabajo - Visita al TEM para identificar células y organelas	Dr. Petiti Dra. Leimgruber Dra. Sosa Dra. Gutierrez
Día 2	9 - 10 ³⁰ hs	- Contenido Unidad 2	Dr. Mukdsi y Dra. De Paul
	10 ³⁰ - 11hs	Coffee Break	
Día 3	11 - 12 hs	- Contenido Unidad 3	Dra. Maldonado
	12 - 13 ³⁰ hs	- Contenido Unidad 3 (continuación)	Dr. Quintar y Dra. Gutierrez
	13 ³⁰ - 14 hs	Almuerzo	
	14 - 17 hs	- Práctico Unidad 2 y 3:	Dra. Leimgruber Tec. Artino Tec. Pereyra Dr. Petiti
Día 3	9 - 10 hs	- Contenido Unidad 4	Dr. Petiti
	10 - 11hs	- Contenido Unidad 4 (continuación)	Dr. Petiti
	11 - 11 ³⁰ hs	Coffee Break	
	11 ³⁰ - 12 ³⁰ hs	- Contenido Unidad 4 (continuación)	Dra. Leimgruber
	12 ³⁰ - 13 ³⁰ hs	Almuerzo	
Día 4	13 ³⁰ - 17 hs	- Práctico de Unidad 4:	Dr. Petiti Dra. Leimgruber Dra. Sosa
	9 - 10 hs	- Contenido Unidad 4 (continuación)	Dr. Mas
	10 - 11hs	- Contenido Unidad 4 (continuación)	Dr. Mas
	11 - 11 ³⁰ hs	Coffee Break	
	11 ³⁰ - 12 ³⁰ hs	- Contenido Unidad 5	Dr. Petiti
	12 ³⁰ - 14 hs	Almuerzo	
Día 5	14 - 17 hs	- Práctico Unidad 4 (continuación)	Dr. Petiti Dra. Leimgruber Dra. Sosa Biotec. Pícech
	9 - 10 hs	- Contenido Unidad 5 (continuación)	Dr. Petiti
	10 - 11 ³⁰ hs	Aplicaciones de las técnicas en proyectos de investigación	Dr. Mukdsi y Dra. Torres
	11 ³⁰ - 12 hs	Coffee Break	
	12 - 13 hs	- Práctico Unidad 5	
	13 - 14 hs	Almuerzo	Dra Leimgruber y Dra. Sosa
	14 - 17 hs	- Práctico Unidad 5 (continuación)	Dra. Maldonado Dra. Gutierrez Dra. De Paul
Día 6	9 - 10 hs	Discusión final y dudas.	
	10 - 11 ³⁰ hs	Como aplicarían los alumnos las técnicas en sus proyectos de investigación	
	11 ³⁰ - 12 hs	Coffee Break	
	12- 13 hs	Examen Final	
	13-14 hs	Cierre del curso	