



“Introducción a la microscopía confocal”
Curso de Postgrado, Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas
Facultad de Bioquímica y Ciencias biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Organizado por:

- Dr. Andrés Dekanty, Investigador del CONICET. IAL. Profesor Adjunto en la Cátedra de Biología Celular y Molecular. FBCB-UNL.
- Dr. Javier Moreno, Investigador del CONICET. IAL. Jefe de Trabajos Prácticos en la Cátedra de Biología Celular y Molecular. FBCB-UNL.

Docentes invitados:

- Dr. Pablo Hernán Strobl-Mazzulla, Investigador del CONICET. IIB-INTECH. Profesor Adjunto en la Catedra de Biología Molecular. UNSAM.
- Dr. Ramiro Rodríguez, Investigador del CONICET. IBR, Rosario. Profesor en la Catedra de Biología Molecular. UNR.
- Dra. María Gabriela Thomas, Investigadora de CONICET. Instituto Leloir. Profesora Universidad Maimonides.
- Lic. Martina Legris, Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, Instituto Leloir.
- Ing. Fabio Fontanarrosa, Técnico especializado en microscopía confocal. SECEGRIN, CONICET.
- Lic. Lucas Villegas. Representante Leica-Empresa Bio-optic.

Lugar de realización: Centro Científico Tecnológico CONICET Santa Fe (edificio SECEGRIN). Colectora Ruta Nacional N°168 km 0, Paraje el Pozo, Santa Fe.

Fecha de iniciación: 06 de Marzo de 2017.

Modalidad: Curso teórico-práctico INTENSIVO

Duración: 45hs totales (de lunes a viernes)

El curso otorga 3 U.C.A a los alumnos del DCB.

Cupo máximo: 30 alumnos

Fecha límite para la inscripción: 20 de Febrero de 2017.

Objetivo del curso:

El curso cubre conceptos básicos y aplicaciones prácticas de la microscopía confocal espectral aplicadas al estudio de sistemas biológicos. El curso combina sesiones teóricas y prácticas a fin de proporcionar los conocimientos básicos necesarios para una adecuada utilización del microscopio confocal y la formación inicial en técnicas de preparación de muestras para microscopía de fluorescencia. Durante las sesiones prácticas, los alumnos tendrán la posibilidad de preparar y observar muestras y analizar las imágenes y sus resultados.

Perfil de los alumnos a quienes está orientado el curso:

El curso está orientado a estudiantes de posgrado (Doctorado y Maestría), becarios posdoctorales y profesionales o docentes universitarios que vayan a utilizar o estén utilizando un microscopio confocal y deseen adquirir/ampliar sus conocimientos teórico-prácticos sobre el mismo. Además, se considerarán inscripciones de alumnos avanzados de las carreras de Bioquímica y Licenciatura en Biotecnología.

Requisitos de formación previa de los inscriptos.

Para la realización del curso se requieren conocimientos básicos de microscopía. Los interesados deben desempeñarse en un área donde el uso de la microscopía confocal pueda ser una herramienta importante para el trabajo que realiza. El curso está orientado a estudiantes y/o profesionales de las ciencias biológicas. Estudiantes graduados con una formación diferente

serán considerados de acuerdo a sus antecedentes y/o al impacto que el curso supondría para sus actividades de investigación.

Dado que el cupo de alumnos es limitado, se solicita enviar una carta de presentación explicando los beneficios que tendría este curso en su carrera o profesión y un *currículum vitae* actualizado.

En caso de ser necesario efectuar una selección de los inscriptos se le dará prioridad a los alumnos de la carrera de doctorado de la FCB-UNL, continuando por los alumnos de las carreras de doctorado de otras casas de estudio, antecedentes de los aspirantes e importancia del curso para el desarrollo de las actividades de investigación de los mismos.

Resumen del programa analítico del curso:

1. Teorías:

1.1. Fundamentos de la microscopía de fluorescencia y confocal.

Introducción a la microscopía. Breve reseña histórica. Microscopía de fluorescencia. Fluorescencia. Fluoróforos. Sistemas de iluminación. Filtros. Superposición espectros filtros/fluoróforos. Concepto de confocalidad. Microscopio confocal: Fuente de iluminación, interacción de la luz con la muestra, imagen, sistema de detección. Detectores más usados en microscopios confocales. Fotomultiplicador (PMT). Ejemplos de aplicaciones de la microscopía confocal de fluorescencia. Microscopio confocal espectral.

1.2. Sondas fluorescentes

Características importantes de los fluoróforos. Clasificación general de los fluoróforos. Fluoróforos tradicionales: fluoresceína y derivados, rodamina y derivados, fluorocromo BODIPY, fluoróforos de cianina. Proteínas fluorescentes en el visible: propiedades, tipos, aplicaciones. Diseño general de sondas fluorescentes para FRET. Características y aplicaciones de fluoróforos en la detección de proteínas.

1.3. Optimización en la captación de la imagen.

Aspectos básicos de una imagen digital. Funcionamiento de un fotomultiplicador en un microscopio confocal. Manejo del offset y la ganancia. Digitalización de la señal. Resolución. El eje z.

1.4. Estudio in vivo de interacción proteína-proteína

Colocalización: Definición. Fluoróforos para colocalización. Coeficientes de Pearson, Manders. Software de aplicación de algoritmos. FRET: Transferencia de energía por resonancia de Förster. Qué se mide en FRET. Principio y definición de dador y aceptor. Pares de fluoróforos. Configuración del microscopio para la detección del par dador/aceptor correspondiente. Protocolos de adquisición de imágenes para FRET. Aplicaciones de FRET. FRAP: Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo. Definición. Ventajas y limitaciones. Protocolo de adquisición para FRAP. Análisis de los datos. Modelos. Aplicaciones de FRAP.

1.5. Programas de análisis de imágenes de acceso libre (FIJI/ImageJ)

Introducción al uso de ImageJ/FIJI. Procesamiento, edición y análisis de imágenes. Macros, Plugins, Toolkit. Análisis y cuantificación. Colocalización. Algoritmos automáticos de detección de colocalización: algoritmo de Costes. Software de aplicación de algoritmos.

2. Sesiones prácticas:

2.1. Preparación de muestras para fluorescencia (fijada e "in vivo").

Preparación de muestras fijadas para fluorescencia a partir de tejidos vegetales y animales. Uso de anticuerpos primarios y secundarios. Elección de fluoróforos.

2.2. Marcaje de células "in vivo" con proteínas fluorescentes.

Uso de proteínas fluorescentes en la microscopía confocal. Preparación de muestras de origen vegetal y animal. Métodos de fijación compatibles con la fluorescencia.

2.3. Observación de muestras y adquisición de imágenes al microscopio confocal

Optimización de los parámetros de adquisición para obtener imágenes de una muestra biológica. Configuración espectral. Espectros de excitación y emisión de dos fluoróforos. Visualización de preparados. Adquisición y optimización en la captación de una imagen. Adquisición de imágenes para análisis cuantitativo.

2.4. Análisis y cuantificaciones de imágenes

Análisis y procesamiento de imágenes utilizando el programa ImageJ/FIJI. Edición de imágenes crudas propuestas por los docentes. Trabajo sobre imágenes generadas por los alumnos. Ejemplos de tipos de procesamiento de imágenes. Cuantificación. Generación de imágenes 3D.

