



Ministerio de  
Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva  
Presidencia de la Nación



Secretaría de Articulación  
Científico Tecnológica  
Ministerio de Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva



SNM  
Sistema Nacional  
de Microscopía



5º CONGRESO  
ARGENTINO DE  
MICROSCOPIA  
SAMIC

## **APLICACIÓN DE LA INMUNOCITOQUÍMICA ULTRAESTRUCTURAL EN MICROSCOPIA 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 – Alicia Torres

### **Información importante:**

Curso Teórico-práctico Pre-congreso en el marco del 5º 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: INICSA (CONICET-UNC) y Centro de Microscopía Electrónica (UNC). Haya de la Torre esquina Enrique Barros, Ciudad Universitaria, Córdoba. Tel: 0351-4333021.

### **Inscripción:**

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. Enviar al docente responsable del curso [aquintar@cmefcm.uncor.edu](mailto:aquintar@cmefcm.uncor.edu). Se seleccionarán 20 postulantes para ser beneficiados con beca del SNM (alojamiento).

### **Docentes:**

Carolina Leimgruber (INICSA, CONICET-UNC)

Juan Pablo Petiti (INICSA, CONICET-UNC)

Amado Quintar (INICSA, CONICET-UNC)



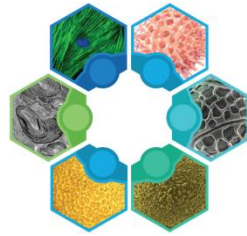
Ministerio de  
Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva  
Presidencia de la Nación



Secretaría de Articulación  
Científico Tecnológica  
Ministerio de Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva



SNM  
Sistema Nacional  
de Microscopía



5º CONGRESO  
ARGENTINO DE  
MICROSCOPIA  
SAMIC

## 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.



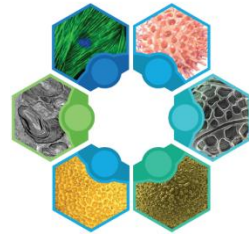
Ministerio de  
Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva  
Presidencia de la Nación



Secretaría de Articulación  
Científico Tecnológica  
Ministerio de Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva



SNM  
Sistema Nacional  
de Microscopía



5º CONGRESO  
ARGENTINO DE  
MICROSCOPIA  
SAMIC

- Promover el entrenamiento práctico en el uso de los equipos necesarios para obtener imágenes de alta resolución en escala micro y nano-métrica.
- Correlacionar la localización subcelular de proteínas (detectadas por inmunofluorescencia) con las estructuras a nivel ultraestructural (CLEM).
- 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.

Práctico:

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

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. Crioultramicrotomía: tallado, obtención de cortes y montado en grillas. Inmunomarcación y contraste.

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 electrónico. Preparación de grillas con Film de Formvar.



Ministerio de  
Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva  
Presidencia de la Nación



Secretaría de Articulación  
Científico Tecnológica  
Ministerio de Ciencia, Tecnología  
e Innovación Productiva



SNM  
Sistema Nacional  
de Microscopía

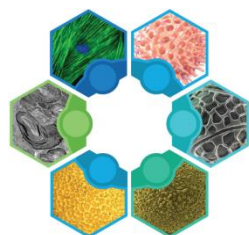


5º CONGRESO  
ARGENTINO DE  
MICROSCOPIA  
SAMIC

UNIDAD 3: **Microscopía 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.

Práctico:

Realización del inmunocitoquímica en criosecciones. Contratación con uranilo y realización de film de metilcelulosa. Interpretación de imágenes.



## 5º CONGRESO ARGENTINO DE MICROSCOPIA SAMIC

### Cronograma:

	Horario	Tema	Docente
<b>DÍA 1</b>	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	Unidad 2	Amado Quintar
	15:30 - 16:00	Coffee Break	
	16:00 - 18:00	Práctico Unidad 1	Carolina Leimgruber Amado Quintar
<b>DÍA 2</b>	9:00 - 10:30	Unidad 3: primera parte	Juan Pablo Petiti
	10:30 - 11:00	Coffee Break	
	11:00 - 12:30	Unidad 3: segunda parte	
	12:30 - 14:00	Almuerzo y discusión de estrategias metodológicas	
	14:00 - 15:20	Practico Unidades 1 y 2	Carolina Leimgruber Amado Quintar
	15:20 - 15:40	Coffee Break	
	15:40 - 17:00	Practico Unidades 2 y 3	Carolina Leimgruber
	17:00 - 18:00	Examen Final y conclusiones del curso	Amado Quintar