

## “Curso Avanzado de Microscopía Confocal de Barrido Láser”

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET-UNR)

Rosario, Santa Fe, Argentina - 9 al 13 de Octubre de 2017

### ORGANIZADORES Y PLANTEL DOCENTE:

El curso estará coordinado por los Dres. Ramiro Rodríguez y Lía Pietrasanta. El cuerpo docente estará integrado de la siguiente manera:

Dra. Lía Pietrasanta (CMA, FCEN-UBA).  
Dr. Ramiro Rodríguez (IBR, CONICET-UNR; FBioy F y CEI, UNR)  
Dra. Lorena Sigaut (CMA, FCEN-UBA).  
Dra. Catalina von Bilderling (IFIBA, CONICET-UBA).  
Tec. Rodrigo Vena (IBR, CONICET-UNR)  
Dr. Enrique Morales (IBR, CONICET-UNR)

### DESCRIPCIÓN:

La actividad programada propone fomentar el uso de técnicas avanzadas de Microscopía Confocal de Barrido Láser (LSCM). Consiste en un curso avanzado con un número reducido de estudiantes de amplia representación geográfica que permita una intensa actividad práctica y que cubra técnicas modernas de microscopía funcional para la adquisición y el procesamiento de imágenes. El objetivo del curso es dar a conocer los conceptos y fundamentos en los que se sustentan una serie de técnicas avanzadas de LSCM, y de esta manera capacitar a usuarios con conocimiento previo en aspectos básicos de LSCM en el manejo y la aplicación adecuada de dichas técnicas. El curso será dictado de forma intensiva en una semana con una carga horaria total de 45 horas. Se trata de un curso teórico-práctico que combina clases teóricas, una extensa actividad práctica frente a los equipos en grupos reducidos que garanticen la operación por parte de los alumnos y, finalmente, sesiones de procesado informático de las imágenes adquiridas.

### RESUMEN de los CONTENIDOS:

1. *Contenidos teóricos*
  - 1.1. Conceptos fundamentales de Microscopía Confocal de Barrido Láser.
  - 1.2. Colocalización cuantitativa.
  - 1.3. Transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET).
  - 1.4. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP).
  - 1.5. Espectroscopía por correlación de fluorescencia (FCS).
2. *Contenidos prácticos*



- 2.1. Adquisición, procesamiento y análisis de datos en experimentos de FRET y de FCS.
- 2.2. Análisis y procesamiento de imágenes: experimentos de colocación de fluoróforos, deconvolución espectral, de FRAP.

#### **BECAS**

Se cuenta con financiación por parte del Sistema Nacional de Microscopía (MinCyT) para otorgar becas completas de inscripción, traslado desde y hacia ciudad de origen y alojamiento a los 12 alumnos seleccionados.

#### **INSCRIPCIÓN:**

Enviar un email antes del 4 de Septiembre de 2017 a [cursomicroscopia@ibr-conicet.gov.ar](mailto:cursomicroscopia@ibr-conicet.gov.ar) con el apellido del postulante en el asunto del correo adjuntando un CV resumido de no más de 5 páginas y los documentos mencionados en los requisitos. Las solicitudes que no cumplan con estos requisitos no serán tenidas en cuenta.

#### **REQUISITOS:**

1. Ser estudiante de doctorado o estar realizando un posdoctorado en la materia.
2. Enviar una carta de recomendación de no más de una carilla con el aval del director del postulante.
3. Enviar una carta de intención de no más de una carilla con detalles de las aplicaciones experimentales concretas por las que necesita hacer el curso y la disponibilidad concreta de equipamiento para hacer los experimentos luego del curso en su lugar de trabajo.
4. Tener aprobado algún curso básico de LSCM y/o publicaciones o presentaciones a congresos que demuestren y acrediten tener conocimientos básicos de LSCM.

# **CURSO AVANZADO DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER**

## **Responsables docentes:**

Dr. Ramiro Rodriguez y la Dra. Lía Pietrasanta

## **Docentes:**

Dra. Lía Pietrasanta, IFIBA (CONICET-UBA) y CMA (FCEN-UBA)

Dr. Ramiro Rodriguez (IBR, CONICET-UNR; FBioyF y CEI, UNR)

Dra. Lorena Sigaut, IFIBA (CONICET-UBA)

Dra. Catalina von Bilderling, IFIBA (CONICET-UBA)

Tec. Rodrigo Vena (IBR, CONICET-UNR)

Dr. Enrique Morales (IBR, CONICET-UNR)

## **1. *Fundamentación***

La microscopía confocal de fluorescencia es una de las herramientas principales para el estudio de moléculas en células. En el curso se discutirán aspectos teóricos y prácticos de técnicas avanzadas en el estudio de biomoléculas por microscopía confocal de fluorescencia.

## **2. *Contenidos teóricos***

### **2.1. Conceptos fundamentales de Microscopía Confocal de Barrido Laser**

Conceptos fundamentales de microscopía óptica: interferencia, difracción, profundidad de campo, fuentes de luz y detectores, sondas para el marcado y la preparación de muestras. Principios básicos de la microscopía confocal. Resolución axial y lateral. Imagen. Evaluación de los parámetros para la adquisición de imágenes. Microscopio confocal LSM880: funcionamiento, técnicas disponibles y aplicaciones en biología celular.

### **2.2. Colocalización cuantitativa**

Colocalización cuantitativa. Definición. Colocalización vs interacción. Fluoróforos para colocalización. Detección de colocalización. Colocalización cuantitativa: coeficientes de Pearson, Manders,  $m_1$  y  $m_2$ . Definición de píxeles colocalizantes. Algoritmos automáticos de detección de colocalización: algoritmo de Costes, algoritmo de Villalba. Software de aplicación de algoritmos. Aplicaciones de colocalización. Deconvolución espectral.

### **2.3. Transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET)**

Colocalización vs interacción. Principio y definición de dador y aceptor. Pre-requisitos para FRET. Eficiencia de FRET. Qué se mide en FRET. Pares de fluoróforos para FRET. FRET para Ratio Imaging: ventajas y limitaciones. FRET por fotoblanqueo del aceptor: ventajas y limitaciones. Configuración del microscopio para la detección del par dador/aceptor correspondiente. Evaluación del sangrado y la excitación directa del aceptor. Protocolos de adquisición de imágenes para FRET. Aplicaciones de FRET.

### **2.4. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP)**

Definición. Ventajas y limitaciones. Protocolo de adquisición para FRAP. Consideraciones:

ruido de fondo, fotoblanqueo por adquisición. Corrección por fotoblanqueo por adquisición. Análisis de los datos. Modelos. Aplicaciones de FRAP.

## **2.5. Espectroscopía por correlación de fluorescencia (FCS)**

Origen de las fluctuaciones de la fluorescencia. Adquisición de secuencias temporales. Cálculo de auto-correlaciones. Determinación de tiempos característicos. Consideración de modelos teóricos para el ajuste de los datos. Análisis e interpretación de curvas de auto-correlación. Aplicaciones de FCS.

## **3. Contenidos prácticos**

3.1. Adquisición, procesamiento y análisis de datos en experimentos de FRET y de FCS

3.2. Análisis y procesamiento de imágenes: experimentos de colocación de fluoróforos, deconvolución espectral, de FRAP.

**Horas totales del curso: 45 hs**

## **4. Bibliografía:**

1. Wilson and Sheppard C. J. R.. *Theory and practice of scanning optical microscopy*. Academic Press (1984). Pawley J. B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed). Springer (2006).
2. Elizabeth A. Jares-Erijman and Thomas M. Jovin, *Reflections on FRET imaging: Formalism, probes, and implementation*. In T. W. J. Gadella, editor, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 33, Burlington: Academic Press, 2009, pp.475-517. ISBN: 978-0-08-054958-3 © Copyright 2009 Elsevier B.V. Academic Press.
3. Hernan E. Grecco, Philippe Bastians. *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*, Second Edition. Edited By Robert D. Goldman, Feinberg School of Medicine Northwestern University; Jason R. Swedlow, The University of Dundee; David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG. *Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching*. *Biophys J*. 2004 Jun; 86(6):3473-95.
5. P. Schwille, E. Haustein *Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications* (2006), doi:10.1002/lpor.200910041