

 Facultad de UNER Ingeniería	Doctorado en Ingeniería Facultades de Cs. Agropecuarias; Cs. de la Alimentación e Ingeniería
Carrera: Maestría en Ingeniería Biomédica y Doctorado en Ingeniería Curso de Posgrado: “ <i>Microscopía de fluorescencia cuantitativa y procesamiento de imágenes tridimensionales</i> ” Carga Horaria ¹ : 45 horas Docente/s a cargo: Dra. Valeria Sigot Semestre: 1º Año: 2023	
Modalidad ² : Curso teórico-práctico presencial Carácter ³: Formación específica	
Contenidos Mínimos: Microscopía de fluorescencia Componentes de un microscopio de fluorescencia, sistemas de iluminación y de detección. Concepto de función de dispersión de punto (<i>psf</i> , <i>point spread function</i>) y uso de esferas fluorescentes nanométricas para su determinación experimental. Introducción a tipos de microscopios y técnicas para microscopía 4D. Microscopía de Luz y Electrónica correlativas (CLEM). Fluoróforos orgánicos e inorgánicos, proteínas transgénicas fluorescentes, proteínas foto-convertibles. Sistemas biológicos bajo el microscopio Microscopía óptica de cultivos celulares y modelos animales. Procesos biológicos observables al microscopio, de nano- a micro-escala, ej. de desarrollo embrionario, formación de <i>biofilms</i> bacterianos, interacción ligando-receptor, migración celular. Ventajas del pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como organismo modelo para microscopía de fluorescencia. Criterios y requisitos para la adquisición de imágenes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Procesamiento de imágenes y análisis estadístico Formación y restauración de imágenes en microscopía de fluorescencia multidimensional. Deconvolución digital Introducción al procesamiento digital de imágenes empleando software libre (FIJI). Métodos automáticos de segmentación de fluorescencia, técnicas de flujo óptico para determinar velocidad de desplazamiento y monitoreo de partículas/células. Métodos estadísticos y gráficos para analizar datos numéricos obtenidos a partir de imágenes.	
Programa Analítico de foja: a foja:	
Bibliografía de foja: a foja:	
Aprobado Res. C. D.: Modificado/Anulado/ Res. C. D.: Fecha: Fecha:	
Carece de validez sin la certificación de la Comisión de Posgrado:	

TEORÍA

Unidad I: Microscopía de fluorescencia

Tipos de microscopios y técnicas

Equipamiento. Fuentes de luz y lentes objetivas. Sistema de filtros. Configuración derecha e invertida.

Microscopios de campo amplio, confocal, microscopía multifotónica y de iluminación selectiva de planos para especímenes gruesos. Introducción a técnicas de super-resolución.

Concepto de función de dispersión de punto (point spread function, psf). Resolución lateral y axial. Criterio de Nyquist.

Microscopía de Luz y Electrónica correlativas (CLEM). Concepto, consideraciones y aplicaciones en modelos animales. Ventajas para estudios estructurales a multiescala.

Fluoróforos

Fluoróforos orgánicos e inorgánicos, nanocristales semiconductores, proteínas fluorescentes reporteras estables y fotoconvertibles, ventajas y limitaciones para microscopía *in vivo*. Aplicaciones de proteínas fluorescentes reporteras para estudiar procesos dinámicos a escala celular y subcelular.

Técnicas de microinyección de ADN y ARN para la expresión transitoria de proteínas reporteras.

Adquisición de imágenes

Condiciones experimentales para la adquisición de imágenes *in vitro* e *in vivo*, criterios en base al modelo y proceso biológico a observar. Criterios para la adquisición de imágenes 2D/3D a intervalos (time lapse). Selección de filtros de excitación y emisión, potencia de lámpara, tiempos de exposición, determinación de secciones ópticas e intervalos de tiempo para analizar procesos *in vivo*. Diseño experimental para implementar rutinas de microscopía *in vivo* en montaje completo.

Unidad II: Sistemas biológicos bajo el microscopio

Microscopía óptica de cultivos celulares y modelos animales

Líneas celulares y cultivos primarios eucariotas. Modelos animales invertebrados, teleosteos y mamíferos.

Biopelículas bacterianas. Descripción de procesos a nano- y micro-escala observables al microscopio (transporte vesicular, migración celular, morfogénesis epitelial, desarrollo óseo, interacción ligando-receptor).

Ventajas del pez cebra para microscopía de fluorescencia

El pez cebra como modelo de enfermedades humanas y para estudios de toxicidad ambiental. Legislación y regulación para su uso experimental. Conceptos básicos sobre desarrollo embrionario del pez cebra, nociones de anatomía, morfogénesis epitelial, regeneración de aleta caudal.

Obtención de embriones transgénicos fluorescentes para monitorear procesos *in vivo*. Montaje de embriones para microscopía. Anestesia y eutanasia.

Criterios para mantener el espécimen viable durante la adquisición de imágenes

Características y composición de los medios de incubación para microscopía *in vivo* e *in vitro*, control de pH, temperatura, gases, incubadoras para microscopios invertidos, dispositivos de montaje y orientación de especímenes. Fototoxicidad y fotoblanqueo.

Unidad III: Procesamiento de imágenes y análisis estadístico

Formación y restauración de imágenes de fluorescencia multidimensional. Deconvolución digital. Introducción al procesamiento digital de imágenes empleando software libre (FIJI). Segmentación automática de células en imágenes 3D, análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia y morfología celular en función del tiempo. Adquisición a intervalos, medidas de desplazamiento celular por velocimetría de partículas y comparación con métodos de “tracking” manual.

Métodos estadísticos y gráficos para analizar datos de microscopía en modelos animales.

PRÁCTICA

Trabajo práctico en sala de microscopía

Observación del microscopio de seccionamiento de campo amplio y del microscopio confocal. Descripción del camino óptico de la luz, identificación de los componentes, diferencias entre ambos equipos. Ventajas y limitaciones.

Observación de embriones de pez cebra. Observación de esferas fluorescentes nano y micrométricas.

Identificación de discos de Airy, función de dispersión de punto, límite de resolución.

Procesamiento de imágenes

Instalación del software libre FIJI y de “plug-ins” (provistos por docente responsable)

Se proveerán imágenes a través del acceso a una carpeta en Drive y se realizará:

Segmentación automática de células en imágenes pre y pos-deconvolución.

Obtención de parámetros morfológicos a escala celular y tisular.

Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia 3D a partir de selección de regiones de interés.

Velocimetría de partículas 2D+t: cálculo de velocidad de migración celular a partir de mapas de vectores desplazamiento. Comparación con métodos de tracking manual.

La bibliografía disponible en formato pdf, será suministrada por el docente responsable. Parte de la bibliografía básica está disponible en la biblioteca de FI-UNER

Básica:

1. R. S. Fischer, Y. Wu, P. Kanchanawong, H. Shroff, y C. M. Waterman, «Microscopy in 3D: a biologist's toolbox», *Trends Cell Biol.*, vol. 21, n.o 12, pp. 682-691, dic. 2011.
2. J. C. Waters, «Live-Cell Fluorescence Imaging», en *Methods in Cell Biology*, vol. 81, Elsevier, 2007, pp. 115-140.
3. *Optical Fluorescence Microscopy from the Spectral to the Nano Dimension*. Springer. Diaspro Ed. Diaspro A. (2011).
4. *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy*. CRC Press. Diaspro Ed. Diaspro A. (2010).
5. M. E. Dailey, G. S. Marrs, y D. Kurpius, «Maintaining Live Cells and Tissue Slices in the Imaging Setup», *Cold Spring Harb. Protoc.*, no 4, (2011).
6. L. Godinho, «Live Imaging of Zebrafish Development», *Cold Spring Harb. Protoc.*, no 7, (2011)
7. C. A. Canaria y R. Lansford, «Advanced optical imaging in living embryos», *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n.o 20, pp. 3489-3497, oct. 2010.
8. D. S. Lidke y K. A. Lidke, «Advances in high-resolution imaging - techniques for three-dimensional imaging of cellular structures», *J. Cell Sci.*, vol. 125, n.o 11, pp. 2571-2580, jun. 2012.
9. M. Liebling, «Imaging the Dynamics of Biological Processes via Fast Confocal Microscopy and Image Processing», *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2011, n.o 7, p. pdb.top117-pdb.top117, jul. 2011.

Complementaria

10. E. L. Snapp y P. Lajoie, «Time-Lapse Imaging of Membrane Traffic in Living Cells», *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2011, n.o 11, p. pdb.prot066555-pdb.prot066555, nov. 2011.
11. V. A. Lombardo, A. Sporbert, y S. Abdelilah-Seyfried, «Cell Tracking Using Photoconvertible Proteins During Zebrafish Development», *J. Vis. Exp.*, n.o 67, sep. 2012.
12. Arganda-Carreras, V. Kaynig, J. Schindelin, A. Cardona, y H. S. Seung, «Trainable Weka Segmentation: A Machine Learning Tool for Microscopy Image Segmentation», p. 8, 2014.
13. S. Nowotschin y A.-K. Hadjantonakis, «Photomodulatable fluorescent proteins for imaging cell dynamics and cell fate», *Organogenesis*, vol. 5, n.o 4, pp. 217-226, oct. 2009.
14. L. Schermelleh, R. Heintzmann, y H. Leonhardt, «A guide to super-resolution fluorescence microscopy», *J. Cell Biol.*, vol. 190, n.o 2, pp. 165-175, jul. 2010.
15. M. F. Sampedro, M. F. Izaguirre, y V. Sigot, «E-cadherin expression pattern during zebrafish embryonic epidermis development», *F1000Research*, vol. 7, p. 1489, feb. 2019, doi: 10.12688/f1000research.15932.3.

Objetivos Generales:**Introducir al alumno sobre:**

- uso de animales modelos, cultivos celulares y procesos biológicos observables bajo un microscopio de fluorescencia.
- tipos de microscopios e iluminación (de epifluorescencia, confocal, multifotónico), fotoconversión, variantes de fluoróforos orgánicos e inorgánicos, y proteínas transgénicas fluorescentes.
- condiciones experimentales para el montaje y mantenimiento de la viabilidad de los especímenes o cultivos durante la adquisición de imágenes.

Que el alumno sea capaz de:

- reconocer la potencialidad de los modelos animales y la microscopía *in vivo* para obtener parámetros que describan procesos biológicos dinámicos en tiempo real (ej. de morfogénesis epitelial, migración celular, velocidad de difusión de proteínas, endocitosis) y las aplicaciones en el área biomédica.

A nivel práctico se pretende que el alumno:

- reconozca estadios de desarrollo embrionario en pez cebra, realice el decorionado, anestesiado, montaje para microscopía y descarte (eutanasia) y criterio para el uso de animales de experimentación.
- reconozca las partes del microscopio invertido de seccionamiento Olympus IX83, y pueda adquirir imágenes de esferas fluorescentes, calcular psf experimental y relacionarla con la resolución óptica del sistema.
- pueda procesar las imágenes y extraer información cuantitativa a partir de intensidad de fluorescencia y de la morfología.
- Reconozca la importancia del diseño experimental previo y del análisis estadístico.

Objetivos Particulares Teóricos

Que el alumno:

- reconozca las partes del microscopio y el camino óptico de la luz, interprete las diferencias y ventajas de cada equipo y técnica presentados.
- conozca la instrumentación anexa para el registro de imágenes (cámaras digitales, fuentes de iluminación, incubadoras).
- maneje conceptos básicos de resolución en microscopía óptica de fluorescencia, función de dispersión de punto (psf) y desconvolución digital.
- conozca técnicas básicas de preparación de muestras para microscopía.
- adquiera criterio para elegir la técnica microscópica, el fluoróforo y las condiciones adecuadas de adquisición de imágenes de acuerdo al modelo biológico y al proceso a estudiar *in vivo*.
- compare las distintas fuentes de iluminación y condiciones para la adquisición de imágenes e identifique el fenómeno de fototoxicidad sobre la muestra, fotoblanqueo y fotoconversión de fluoróforos *in vivo*.
- identifique las dimensiones de las muestras y las escalas temporales para el registro del proceso en estudio (desarrollo embrionario, migración celular, tráfico de vesículas).
- conozca métodos estadísticos adecuados para el análisis de los datos obtenidos.

Objetivos Particulares Prácticos

Que el alumno:

- pueda manipular experimentalmente embriones de pez cebra (decorionado bajo la lupa, anestesiado y

montaje completo *in vivo* para microscopio invertido).

- adquiera imágenes de esferas fluorescentes nanométricas y determine una psf experimental.
- adquiera herramientas básicas de procesamiento de imágenes tridimensionales en el tiempo con software libre FIJI. Realice la segmentación de membranas celulares, extracción de información biológica a partir valores de intensidad de fluorescencia (estimación de niveles de expresión de proteína, patrón de distribución) y morfología.

Metodología de Trabajo:

El curso se dictará en clases teóricas y prácticas. Se prevén cinco (5) encuentros semanales totalizando 40 horas de clases presenciales y 5 horas de trabajo no presencial para evaluación final y consultas.

Se realizará un trabajo práctico (TP) en el LAMAE bajo el microscopio para el cual se prevé primero dictar los contenidos teóricos complementados con ejemplos de aplicación.

El TP incluirá la observación de embriones de pez cebra y de esferas de distintos tamaños y emisión de fluorescencia distintivas, utilizando el microscopio invertido de seccionamiento Olympus IX83.

La parte de procesamiento de imágenes se desarrollará con reserva previa en el Aula de Posgrado del CM.

El curso se cerrará con una discusión sobre métodos estadísticos y diseño experimental relacionado a la temática.

La preparación de muestras se realizará en el Bioterio de FI-UNER por la docente responsable, la adquisición de imágenes de microscopía se realizará en el LAMAE en el microscopio invertido de seccionamiento Olympus IX83, en grupos de no más de tres alumnos y bajo la supervisión del docente responsable y del CPA, con reserva previa de turnos a través del Sistema Nacional de Microscopía.

Al finalizar el cursado los participantes deberán hacer un diseño de un experimento de microscopía *in vivo* y la implementación de alguna de las rutinas de procesamiento enseñadas y tendrá carácter de evaluación final.

Equipo docente:

Responsable:

Dra. Valeria Sigot (LAMAE-FI-UNER- IBB-CONICET)

Docentes colaboradores:

Dr. Víctor Hugo Casco (LAMAE-FI-UNER- IBB-CONICET) Microscopía correlativa

Dr. Javier Adur (LAMAE-FI-UNER- IBB-CONICET) (Modelo murino, análisis de criptas de colon, introducción a microscopía multifotónica)

Dra. Carolina Galetto (LAMAE-FI-UNER) (Morfogénesis epitelial)

Lic. María Florencia Sampedro (LAMAE-IBB) (Modelo pez cebra, procesamiento de imágenes de epidermis)

Dr. César González, asistencia en sala de microscopía

Dr. José Biurrún Manresa (CIRINS-FI-UNER-IBB- CONICET) (introducción al diseño experimental y métodos estadísticos)

Conocimientos previos requeridos: manejo de conceptos básicos de fluorescencia y manejo de idioma inglés para discutir la bibliografía

Cantidad de alumnos mínima para el dictado: 4

Cupo máximo: 20

Cronograma del Curso:

Días de encuentros presenciales:

Fecha	Tema	Docente
Lunes 24/04 9 a 17 hs	Unidad I, teoría Visita al Bioterio y sala de microscopía	V Sigot J Adur V́ctor H Casco
Martes 25/04 9 a 17 hs	TP en sala de microscopía Unidad II, teoría	V Sigot MF Sampedro C. Galetto Ćsar Gonźlez
Miércoles 26/04 9 a 17 hs	Unidad III, teoría Unidad III, procesamiento de imágenes	V Sigot MF Sampedro
Jueves 27/04 9- 17 hs	Unidad III, procesamiento de imágenes	V Sigot
Viernes 28/04 9- 17 hs	Diseño experimental y métodos estadísticos Unidad III, procesamiento de imágenes y discusión del trabajo de evaluación	José Biurrun V Sigot

Condiciones de Regularidad y Promoción:

Asistencia al 80 % de las clases de teoría.

Aprobación de trabajo final escrito con al menos 60/100 puntos y que consistirá en el diseño de un experimento de microscopía *in vivo* y la implementación de alguna de las rutinas de procesamiento practicadas.

Infraestructura y equipamiento necesarios:

- Aula de posgrado
- Cañón proyector
- Microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX83 (LAMAE) para el cual se hará la reserva a través del Sistema Nacional de Microscopía.