

**Carrera:** Maestría en Ingeniería Biomédica y Doctorado en Ingeniería

**Curso de Posgrado:** *Microscopía de fluorescencia in vivo y procesamiento de imágenes tridimensionales*

**Carga Horaria**<sup>1</sup>: 90 horas

**Docente/s a cargo:** Dra. Valeria Sigot

**Semestre:** 1º

**Año:** 2022

**Modalidad**<sup>2</sup>: Curso teórico-práctico

**Carácter**<sup>3</sup>: Formación específica

Contenidos Mínimos:

**Sistemas biológicos bajo el microscopio:**

Microscopía óptica de cultivos celulares y organismos modelos animales. Criterios y requisitos para la adquisición de imágenes *in vivo* e *in vitro*. Ventajas del pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para microscopía de fluorescencia. Conceptos básicos sobre desarrollo embrionario del pez cebra y morfogénesis epitelial.

Especímenes gruesos, ventajas y limitaciones para adquisición de imágenes *in vivo*. Modelo murino para el análisis de criptas de colon. Monitoreo de bacterias

Procesos biológicos observables al microscopio, de nano- a micro-escala, ej. de desarrollo embrionario, formación de *biofilms* bacterianos, interacción ligando-receptor, migración celular.

**Microscopía de fluorescencia:**

Componentes de un microscopio de fluorescencia, sistemas de iluminación y de detección.

Concepto de función de dispersión de punto (psf, point spread function) y uso de esferas fluorescentes nanométricas para su determinación experimental.

Introducción a tipos de microscopios y técnicas para microscopía 4D. Cámaras de montaje y orientación de embriones.

Fluoróforos orgánicos e inorgánicos, proteínas transgénicas fluorescentes, proteínas foto-convertibles. Incubación con marcadores fluorescentes y técnicas de microinyección de ADN y ARN. Aplicaciones para monitoreo de partículas y células.

Diseño experimental y consideraciones para implementar rutinas de microscopía *in vivo* en montaje completo.

**Procesamiento de imágenes y análisis estadístico:**


Formación y restauración de imágenes en microscopía de fluorescencia multidimensional. Desconvolución digital

Introducción al procesamiento digital de imágenes empleando software libre (FIJI). Métodos automáticos de segmentación y monitoreo de partículas/células.

Métodos estadísticos y gráficos para analizar datos de microscopía.

Programa Analítico de foja: a foja:

Bibliografía de foja: a foja:

<b>Aprobado Res. C. D.:</b>	<b>Modificado/Anulado/ Res. C. D.:</b>
<b>Fecha:</b>	<b>Fecha:</b>
<b>Carece de validez sin la certificación de la Comisión de Posgrado:</b>	
	<b>PROGRAMA ANALÍTICO</b>

<p><b><u>Unidad I: Microscopía de fluorescencia</u></b></p> <p><b>Tipos de microscopios y técnicas</b>  Equipamiento. Fuentes de luz y lentes objetivas. Sistema de Filtros. Configuración derecha e invertida. Microscopios de campo amplio, confocal. Microscopía multifotón 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.</p> <p><b>Fluoróforos</b>  Fluoróforos orgánicos e inorgánicos, nanocristales semiconductores, proteínas fluorescentes reporteras estables y fotoconvertibles, ventajas y limitaciones para microscopía <i>in vivo</i>. Aplicaciones de proteínas foto-convertibles para estudiar migración celular y monitoreo de nanopartículas en tiempo real. Técnicas de FRAP y FRET.  Autofluorescencia. Biosensores.</p> <p><b>Adquisición de imágenes</b>  Condiciones experimentales para la adquisición de imágenes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, 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, binning, determinación de secciones ópticas e intervalos de tiempo para analizar la epidermis embrionaria de pez cebra y monitorear bacterias en solución y en <i>biofilms</i>.  Resolución espacial y temporal. Criterio de Nyquist.</p> <p><b><u>Unidad II: Sistemas biológicos bajo el microscopio</u></b></p> <p><b>Microscopía óptica de cultivos celulares y de organismos modelos animales</b>  Líneas celulares y cultivos primarios eucariotas. Modelos animales invertebrados, teleosteos y mamíferos. Visualización de bacterias formadoras de biofilms. Descripción de procesos a nano- y micro-escala observables al microscopio (transporte vesicular, migración celular, morfogénesis epitelial, formación de biofilms, interacción ligando-receptor).</p> <p><b>Criterios y requisitos para la adquisición de imágenes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>:</b> Características y composición de los medios de incubación para microscopía <i>in vivo</i>, control de pH, temperatura, oxigenación, incubadoras para</p>
--

microscopios invertidos, técnicas de montaje y orientación de embriones. Efecto de la fuente de iluminación, fototoxicidad y fotoblanqueo. Pérdida del foco durante la adquisición.

#### **Ventajas del pez cebra para microscopía de fluorescencia.**

Características y nociones de anatomía. El pez cebra como modelo de enfermedades humanas. Legislación y regulación para su uso experimental. Conceptos básicos sobre desarrollo embrionario del pez cebra y morfogénesis epitelial. Técnicas de microscopía, para estudiar su desarrollo *in vivo*. Técnicas para la obtención de embriones transgénicos fluorescentes.

#### **Microscopía sobre especímenes gruesos**

Técnicas microscópicas para el análisis de especímenes gruesos. Ventajas y limitaciones para adquisición de imágenes *in vivo*. Microscopía y óptica no lineal. Análisis de fluorescencia endógena en criptas de colon en modelo murino.

#### **Seguimiento de la formación de *biofilms* de bacterias**

Preparación del sustrato y marcación de bacterias con fluoróforos para el monitoreo de la formación del biofilm. Aplicaciones en sistemas de microfluídica.

#### **Práctica de Unidad I y II:**

##### Trabajo Práctico 1

En acuario y sala de microscopía:

Observación de embriones de pez cebra bajo la lupa, reconocimiento de estadio de desarrollo, decoronado y montaje de embriones completos *in vivo* en agarosa. Anestesiado y eutanasia. Preparación de esferas fluorescentes micro y nanométricas. Preparación de bacterias para biofilms y marcación con nanocristales.

##### Trabajo Práctico 2

Práctica en Microscopio invertido Olympus IX 83 de seccionamiento: observación de esferas fluorescentes. Adquisición de imágenes para la obtención de psf experimental en 3D. Ésta será analizada durante el desarrollo de la parte práctica de la Unidad III.

##### Trabajo práctico 3

Observación de embriones de pez cebra transgénicos fluorescentes que expresan cadherina-E-GFP, adquisición de secciones ópticas en el tiempo (3D+t), determinación de parámetros de adquisición de imágenes, objetivos, potencia de lámpara, tiempo de exposición, muestreo x,y,z.

Pruebas de fotoblanqueo de fluorescencia.

##### Trabajo práctico 4

Marcado de bacterias con nanocristales fluorescentes y monitoreo de formación de *biofilms* (iniciado en TP1).

#### **Unidad III: Procesamiento de imágenes y análisis estadístico**

Formación y restauración de imágenes en microscopía de fluorescencia multidimensional. Desconvolución digital. Introducción al procesamiento digital de imágenes empleando software libre (FIJI). Segmentación automática de células en imágenes 3D, análisis cuantitativo de la fluorescencia, intensidad y morfología celular en función del tiempo, conteo de bacterias, mapas de velocidad.

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

#### **Práctica de la unidad III:**

En sala de computación, en PC o notebooks con software libre FIJI instalado.

Trabajo práctico 5:

Generación de psf teórica y comparación con psf experimental obtenida. Aplicación de psf experimental y teórica para la restauración de imágenes de epidermis embrionaria de pez cebra utilizando el paquete Deconvolution Lab (Fiji), análisis de las ventajas y limitaciones de cada una.

Trabajo práctico 6:

Segmentación de epidermis embrionaria de pez cebra con Algoritmo de Segmentación (Trainable Weka Segmentation) en imágenes pre y pos-desconvolución. Obtención de parámetros morfológicos y de densidad celular.

Trabajo práctico 7:

Conteo de bacterias, cálculo de velocidad de desplazamiento a partir de las imágenes obtenidas durante la formación de *biofilms*.

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.

**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), técnicas de FRET, FRAP, 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:**

- adquiera destreza básica en el manejo del embrión del pez cebra (*Danio rerio*), con el reconocimiento de estadio de desarrollo embrionarios, 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 3D+t (bajo supervisión de CPA).
- pueda obtener imágenes de esferas fluorescentes, calcular psf experimental y relacionarla con la resolución óptica del sistema.
- pueda restaurar (desconvolución digital) y procesar las imágenes obtenidas con software abierto FIJI, segmentar imágenes y extraer información cuantitativa a partir de intensidad de fluorescencia y de la morfología.

**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 *in vivo* (montaje completo de embriones, organoides, cultivo en monocapa y sobre matrices 3D) y formación de biofilms de bacterias.
- 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 (decoronado bajo la lupa, anestesiado y montaje completo *in vivo* para microscopio invertido).
- proponga condiciones y variables para la adquisición de imágenes de embriones de pez cebra transgénicos cadherina-E-GFP (potencia de la lámpara, binning, secciones ópticas e intervalos de tiempo) que registrará y sobre las cuáles realizará el procesamiento digital.
- adquiera imágenes de esferas nanométricas y determine una psf experimental. Relacione la psf con la resolución óptica del sistema.
- 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 9 clases teóricas y prácticas. Se prevén cinco encuentros en la primera semana y cuatro en la segunda, totalizando 63 horas de clases presenciales. Éstas serán complementadas con 27 hs nominales de trabajo no presencial para el estudio de la bibliografía, análisis de imágenes y preparación de informes.

En la primera semana se realizarán los experimentos bajo el microscopio en una serie de trabajos prácticos de laboratorio (TP 1-4) para lo cual se prevé primero dictar los contenidos teóricos complementados con ejemplos de la aplicación. En la segunda semana se realizará el análisis y procesamiento de imágenes en el laboratorio de

computación (TP 5-7) y se cerrará con la discusión de los resultados obtenidos.

El TP1 incluirá el manejo de embriones de pez cebra, observación previa bajo la lupa y el montaje para microscopía, manejo de bacterias no patógenas y preparación de esferas fluorescentes, luego en la sala de microscopía con las muestras preparadas se realizarán los TP2, TP3 y TP4 que consistirán en la adquisición de imágenes en el microscopio Olympus IX83. Durante la 2da semana se discutirán las condiciones de trabajo implementadas por cada estudiante para obtener las imágenes. Las imágenes obtenidas con esferas fluorescentes, biofilms bacterianos y embriones de pez cebra se analizarán con el software libre FIJI como parte de los TP 5, 6 y 7, que se complementarán con una discusión sobre métodos estadísticos y diseño experimental relacionado a la temática del curso.

Las clases teóricas se dictarán en el Aula de Posgrado y las de procesamiento digital de las imágenes se realizarán en el laboratorio de computación.

La preparación de muestras se realizará en el Bioterio de FI-UNER, 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 dos alumnos y bajo la supervisión del docente responsable y del CPA Juan Ignacio Etchart, con reserva previa de turnos a través del Sistema Nacional de Microscopía.

La última de clase se reserva para la exposición pública de los trabajos finales en la que los alumnos deberán presentar en forma individual o por pares, el modelo biológico, las condiciones elegidas para trabajar, los datos obtenidos, y el procesamiento realizado, discutiendo los resultados obtenidos y los esperados *y que será requisito para la aprobación del curso.*

Al finalizar el dictado de todos los temas, se realizará un examen escrito de carácter integrador, el cual podrá recuperarse en caso de ser necesario.

Equipo docente:

Responsable:

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

Docentes colaboradores:

Dr. Javier Díaz Zamboni (LAMAE-FI-UNER) (Formación de la imagen en microscopía, concepto de psf)

Dr. Gastón Miño (LAMAE-FI-UNER- IBB-CONICET) (Formación de biofilms bacterianos, sistemas de microfluídica)

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) (Modelo de anuros, morfogénesis epitelial)

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



Dra. Luciana Erbes (LAMAE-IBB) (Procesamiento de imágenes)

Bioing. Juan Ignacio Etchart (CPA-IBB- CONICET -LAMAE-FI-UNER, responsable del uso del microscopio Olympus IX83)

Dr. José Biurru Manresa (LIRINS-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:** 5

**Cupo máximo:** 10

**Cronograma del Curso:**

**Días de encuentros presenciales:**

Fecha	Tema	Profesor
<i>Semana 1</i>		
Lunes 9 a 15 hs	Unidad I, teoría	V Sigot J Adur
Martes 9 a 17 hs	Unidad II, teoría TP 1	V Sigot, MF Sampedro C Galetto L Erbes
Miércoles 9 a 17 hs	Unidad II, teoría TP 2	V Sigot GL Miño JI Etchart
Jueves 9 a 17 hs	TP3	V Sigot MF Sampedro JI Etchart
Viernes 9 a 15 hs	TP4 Unidad III, teoría	JD Zamboni/L Erbes V Sigot GL Miño JI Etchart
<i>Semana 2</i>		
Lunes 12 a 18 hs	Unidad III teoría TP5 en Lab de computación	V Sigot L Erbes
Martes 9 a 17 hs	Unidad III teoría TP6 en Lab de computación	V Sigot MF Sampedro

	Miércoles 9 a 17 hs	Unidad III teoría TP 7 en Lab de computación	V Sigot MF Sampedro J Biurrun Manresa
	Jueves 12 a 17 hs	Presentación de resultados en forma oral	V Sigot

**Condiciones de Regularidad y Promoción:**

Asistencia al 80 % de las clases de teoría.

Entregar todos los informes de los trabajos prácticos.

Presentación de resultados en forma oral y aprobación de un examen final escrito con al menos 60/100 puntos.

**Infraestructura y equipamiento necesarios:**

- Aula de posgrado
- Cañón proyector
- Laboratorio de computación con al menos 3 computadoras con software libre FIJI instalado
- Microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX83 (LAMA E) para el cual se hará la reserva a través del Sistema Nacional de Microscopía
- Microinyector MPPI3 en el Bioterio
- Estufa DALVO y lupa del LAMA E
- Insumos para inyección y montaje de embriones de pez cebra (placas para microscopía, agujas, pinzas, anestesia, agarosa, portaobjetos y cubreobjetos, pipetas Pasteur, placas de plástico de 10 cm)