

Curso:

Técnicas de biología celular y molecular utilizadas en investigación científica básica y aplicada

Carácter: optativo para el Módulo de Formación Específica

Fundamentación

La formación científica del estudiante de la carrera de doctorado en el ciclo introductorio implica la adquisición de un conocimiento general e integral en diversas áreas de las ciencias biológicas y sociales.

El avance de la medicina y disciplinas afines, se debe a la constante aplicación del método científico, que permite la formulación de hipótesis de trabajo, las que deberán ser confirmadas o refutadas. Para lograr este objetivo será necesario aplicar en el campo de las ciencias biológicas, diversos instrumentos y técnicas de laboratorio. La correcta y racional elección de los mismos, permitirá que los resultados obtenidos sean transformados en conclusiones científicas.

Dada las dimensiones verdaderamente pequeñas del objeto de estudio de la Biología Celular y Molecular, es que estas ciencias dependen del desarrollo de nuevos instrumentos y técnicas. Por consiguiente, es difícil estudiar y comprender los procesos fisiológicos que rigen y regulan los niveles celular y molecular, sin aprender acerca de la tecnología necesaria para recopilar datos.

En el presente curso se incluirán los aspectos teóricos que fundamentan la práctica y los procedimientos técnicos que se desarrollan en un laboratorio de investigación básica y aplicada. Su objetivo principal es la enseñanza de los métodos y técnicas empleados en Biología Celular y Molecular, estando destinado a los profesionales del Área Biomédica, que iniciándose en la investigación utilizarán estos procedimientos como instrumentos de trabajo.

Por lo expresado con anterioridad, se describirá de qué manera se aplican las diferentes técnicas y se proporcionarán ejemplos del tipo de información e interpretación de los resultados que se pueden obtener utilizando distintos procedimientos.

Objetivos de la actividad curricular:

Que al finalizar el curso el alumno logre:

1. Conocer y comprender los aspectos morfo-funcionales de las células eucariotas.
2. Interpretar imágenes ultraestructurales de células eucariotas extrayendo conclusiones del estado funcional celular.
3. Conocer las diferentes técnicas de estudio de biología celular y molecular utilizadas en investigación científica básica y aplicada.
4. Seleccionar adecuadamente las técnicas a utilizar para desarrollar un determinado objetivo.
5. Identificar ventajas, desventajas y limitaciones de las diferentes técnicas de estudio.
6. Aplicar los conocimientos de las diferentes técnicas de laboratorio a sus proyectos de tesis doctoral.
7. Manipular de manera adecuada diferentes instrumentos de laboratorio para la realización de las técnicas.
8. Relacionar e integrar los conocimientos teóricos-prácticos desarrollados en el presente curso.

Contenidos de la actividad curricular:

Aspectos teóricos:

La célula eucariota animal: ultraestructura y función. Descripción de los diferentes componentes de la célula, asociando la morfología y función de los mismos.

Fundamentos de Microscopía Fotónica y Electrónica. Usos y aplicaciones de los diferentes tipos de microscopios.

Aproximación a las diferentes técnicas de laboratorio que pueden utilizarse para el análisis de los componentes celulares. Presentación de incógnitas a resolver en la Biología Celular. Enunciado de los diferentes parámetros que se pueden cuantificar para evaluar la actividad biológica de la célula.

Obtención y preparación de células y tejidos para el estudio morfológico por microscopía fotónica y electrónica. Proceso de fijación tisular. Métodos y técnicas de inclusión. Micrótomos y técnicas de corte de tejidos. Fundamentos de coloración. Coloración histológica de rutina: hematoxilina-eosina. Contrastado de los cortes para Microscopía Electrónica.

Detección de diferentes compuestos químicos en células y tejidos.

- Histoquímica: coloración para hidratos de carbono: PAS y PAS-DAB.
- Histoenzimología: Fosfatasa ácida – Fosfatasa alcalina.
- Inmunocitoquímica: anticuerpos mono y policlonales. Técnica de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Método avidina-biotina. Técnica del oro coloidal y del oro coloidal-plata.
- Inmunocitoquímica a nivel de microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y ultraestructural: Fundamentos y protocolos. Diferencias con los procedimientos para el estudio morfológico ultraestructural. Métodos pre y post-inclusión. Co-localización de dos antígenos simultáneos utilizando doble inmunomarcación. Determinación de los alcances de la inmunocitoquímica ultraestructural.
- Métodos de detección de apoptosis.

Cultivos celulares: equipamiento del laboratorio de cultivos. Preparación y esterilización del material. Medios de cultivo. Cultivo celular primario. Mantenimiento de los cultivos de líneas celulares en el laboratorio.

Citometría de flujo. Fundamentos, principios y aplicaciones.

Microscopía confocal. Fundamentos, principios y aplicaciones.

Aislamiento y fraccionamiento de proteínas. Técnica de Western Blotting: separación electroforética de proteínas por sus pesos moleculares, transferencia a membrana de nitro celulosa y detección del complejo antígeno-anticuerpo.

Cuantificación de proteínas por enzimo inmunoanálisis: ELISA.

Correlative light-electron microscopy (CLEM). Técnica de inmunocitoquímica en secciones ultrafinas para combinar microscopía de luz y electrónica de transmisión. Hibridización in situ.

Cada una de las técnicas mencionadas será abordada desde los fundamentos físicos y químicos considerando ventajas y limitaciones de cada una de ellas. Estos aspectos serán complementados con ejemplos de los resultados obtenidos de la aplicación de cada una de ellas en trabajos de investigación básica y aplicada, publicados en revistas internacionales de diferentes áreas de la disciplina Biomédica.

Aspectos Prácticos:

Obtención de materiales biológicos.

Tejidos: fijación y procesamiento para el análisis por microscopía fotónica y electrónica de transmisión.

- Coloración histológica con hematoxilina-eosina.
- Tinción de los cortes para microscopía óptica de alta resolución: azul de toluidina y para electrónica de transmisión: empleo del citrato de plomo y acetato de uranilo.
- Técnicas inmunocitoquímicas a nivel de microscopía óptica y electrónica: Complejo Avidina Biotina (ABC), inmunofluorescencia y con oro coloidal. Simple y doble inmunomarcación.

Observación de muestras al microscopio electrónico de transmisión.

Cultivos celulares:

- Laboratorio de cultivo celular.
- Técnica de cultivo celular.
- Técnicas aplicadas en cultivo celular: Cuantificación de proteínas, estudios morfológicos e inmunocitoquímicos a nivel de microscopía fotónica y electrónica.

1506

BIOF. DR. ROQUELO D. PIZZI
SECRETARIO TECNICO
FACULTAD CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Los aspectos prácticos del desarrollo de las diversas técnicas enumeradas, implicarán la realización de las mismas, con el correspondiente análisis de los resultados obtenidos.

Las conclusiones surgirán de un cabal análisis de los aspectos morfo-funcionales de las células y tejidos analizados por los procedimientos aprendidos.

Modalidad de enseñanza

Teórico-práctico. La perspectiva que proponemos para este curso se basa en que cada estudiante de la carrera de doctorado encuentre las claves a partir de las cuales comprenda y desarrolle su práctica profesional, basándola en el método científico. Se procurará que el conocimiento inicial del educando quede ligado a una nueva visión integrada de las técnicas en biología celular y molecular para la aplicación racional de los procedimientos en su tarea cotidiana. El enfoque metodológico de las actividades de enseñanza parte de la premisa de construir una visión crítica de este nuevo instrumental aplicado al proceso enseñanza-aprendizaje y debe ofrecer a los profesionales la oportunidad de analizar y evaluar las metodologías existentes y de construir sus propios materiales, integrando el conocimiento de sus especialidades a estos recursos. Además, se considera fundamental que los doctorandos experimenten el proceso de construcción, elaboración, ejercitación y aplicación de los contenidos teórico- prácticos, es decir desde la determinación de la técnica de laboratorio adecuada a sus proyectos hasta la implementación de las mismas.

Las etapas de construcción y elaboración estarán sustentadas en la exposición dialogada como recurso didáctico, y el empleo de cañón conectado a PC, tiza y pizarrón, y altas virtuales como materiales didácticos. Estas actividades teóricas serán desarrolladas en la biblioteca del INICSA, unidad ejecutora de CONICET de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Las fase de ejercitación y aplicación del método didáctico, se fundamentarán tanto en el desarrollo teórico como práctico del presente curso. En estas instancias el trabajo individual y grupal, permitirán la confrontación de ideas y el establecimiento de relaciones entre el conocimiento adquirido y situaciones nuevas, planteadas desde otras problemáticas de la misma disciplina. Los materiales didácticos serán los resultados obtenidos de la aplicación de las técnicas estudiadas los que con guía del docente serán evaluados por los estudiantes de doctorado, con el objetivo de obtener conclusiones. Estas actividades serán desarrolladas en laboratorios adecuadamente equipados para realizar las diferentes técnicas en ámbitos del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Modalidad de evaluación:

Para la evaluación, los alumnos analizarán diferentes publicaciones científicas y realizarán la interpretación de resultados obtenidos en dichos trabajos de investigación en los que se utilicen las técnicas desarrolladas en el presente curso, teniendo en consideración el criterio de selección de cada una de ellas. Se evaluará además los fundamentos de la metodología utilizada. Estas actividades se llevarán a cabo de manera grupal.

Asimismo, al finalizar el curso los alumnos expondrán sus proyectos de investigación en los que deberán incorporar una o más metodologías expuestas en el presente curso con su correspondiente justificación y resultados esperados. Esta presentación se evalúa con una escala de 1 a 10 y la aprobación requiere 7 puntos o más.

Finalmente, los estudiantes completarán una encuesta evaluando diferentes aspectos en relación a los contenidos teóricos dictados, las actividades prácticas desarrolladas, la claridad conceptual y capacidad de transferencia de los docentes.

Carga horaria teórica: 10 horas
Carga horaria práctica: 15 horas
Carga horaria Total: 25 horas
Duración en semanas: 3

1506

Prof. Dr. ROSELIO PIZZI
SECRETARIO TECNICO
FACULTAD CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Bibliografía de la actividad curricular:

- García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. Madrid, España. Ed Interamericana McGraw-Hill. 1993.
- De Paul AL, Mukdsi JH, Petiti JP, Gutiérrez S, Quintar AA, Maldonado CA, Torres AI. Applications of Immunocytochemistry. Immunoelectron Microscopy: a reliable tool for the analysis of cellular processes. Chapter 4, pp 65-96. INTECH Open Access Publisher. Publisher InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0229-8. Rijeka, Croatia. 2012.
http://cdn.intechopen.com/pdfs/30339/InTech-Immunoelectron_microscopy_a_reliable_tool_for_the_analysis_of_cellular_processes.pdf
- Freshney RI. Culture of animals cells. A manual of basic technique. New York. USA. Ed Wiley-Liss. Fourth edition. 2000.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. Biología Celular y Molecular. Buenos Aires, Argentina. Ed. Panamericana, 2008.
- Albert B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raf M Roberts K, Walter P. Introducción a la Biología Celular. Madrid, España. Ed. Panamericana, 2006.
- Curtis H, Barnes N, Schnek A, Massarini A. Curtis Biología. Buenos Aires, Argentina. Ed. Panamericana, 2008.
- Maunsbach AB, Afzelius BA. Biomedical electron microscopy. Illustrated methods and interpretations. California, USA. Academic Press. 2000.

1506


DR. DE BOBELIO R. RIZZI
SECRETARIO TECNICO
FACULTAD CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Curso:
Técnicas básicas de cultivos celulares

Carácter: optativo para el Módulo de Formación Específica

Fundamentación

Los métodos de cultivo de células animales son un complemento imprescindible en el campo de la investigación. Es creciente el interés por las técnicas de cultivo de células, ya que son una herramienta útil en la investigación básica, clínica e industrial; en este punto radica la importancia del proceso de actualización permanente. Este curso está dirigido a los graduados de ciencias biológicas, químicas, odontológicas y médicas, a fin de brindarle los contenidos teóricos y prácticos básicos necesarios para el manejo y utilización de las técnicas de cultivos celulares para investigación científica y sus aplicaciones.

Objetivos de la actividad curricular:

Que al finalizar el curso el alumno logre:

1. Introducir criterios, adquirir competencias-y habilidades en técnicas básicas de cultivo celular.
2. Instruirse en la obtención de cultivos celulares primarios y continuos.
3. Ser capaz de manejar y mantener cultivos celulares para su utilización en investigación.

Contenidos de la actividad curricular:

Célula animal: Características - Ciclo Celular -Características morfológicas.

Cultivos Celulares: Origen de los cultivos celulares (Cultivo Primario - Línea celular continua).

Establecimiento de cultivos primarios.

Tipos de Cultivo celular según sus características genéticas (diploides y heteroploides). Tipos de Cultivo según su Crecimiento (monocapa dependiente del anclaje, suspensión y en gran escala, principios, diferentes sistemas)

Manejo de líneas establecidas, subcultivos.

Condiciones de crecimiento celular: Soporte (vidrios blandos y duros, plásticos y superficies especiales), Fase gaseosa (O₂, CO₂), Medios y suplementos (Suero Fetal, aminoácidos, vitaminas, sales, glucosa, hormonas, otros suplementos orgánicos) Propiedades físicas (pH/soluciones tamponadas, osmolaridad, temperatura, viscosidad, tensión superficial).

Laboratorio de Cultivo: Diseño de áreas estériles - Equipamiento (Incubador de temperatura, Microscopio de óptica invertida, Sistemas de frío, Sistemas de filtración de aire, Purificador de agua, mesas de flujo laminar, autoclave, estufas).

Bioseguridad en el laboratorio de cultivo celular: Presentación del Laboratorio de Cultivos celulares.

Métodos de esterilización para Cultivos Celulares: Técnicas de Asepsia - Métodos de esterilización: Físicos (calor húmedo/seco y radiación UV), Mecánicos (sistemas de filtración) y Químicos (Oxido de etileno, soluciones desinfectantes, etc.).

Controles de Esterilización: químicos, físicos y biológicos.

Limpieza y Esterilización: de diferentes materiales usados y nuevos (lavado, enjuague y secado). Preparación de materiales y reactivos del laboratorio de cultivos celulares. Manejo de estufa y autoclave.

Preparación de soluciones autoclavables: Tampón PBS sin Ca/Mg, H₂O.

1506

Preparación de soluciones filtrables: Medios de cultivo, tripsina/EDTA, NaHCO₃ 7%, Glutamina. Mostración de diferentes equipos de filtración.

Fuentes de información y obtención de células, insumos y reactivos para cultivo celular. Bancos de células. Proveedores de equipamiento, instrumentos y fungibles. Solicitud de diferentes insumos y reactivos ante un protocolo experimental hipotético.

Condiciones de obtención y mantenimiento del cultivo primario: Obtención de cultivo primario de neuronas de embrión de ratón. (Video)

Los alumnos realizan la obtención de células de diferentes órganos de embrión de ratón a fin de establecer su cultivo primario.

Cultivo de linfocitos periféricos obtenidos por gradiente de Ficoll-Triyoson. Subcultivo de línea en suspensión (Video)

Introducción a la metodología para la obtención de osteoblastos y osteoclastos. Utilización actual y aplicaciones futuras del cultivo de osteoclastos/osteoblastos en la investigación clínica y tecnológica. Observación de cultivos de osteoblastos y osteoclastos.

Presentación del subcultivo de Cultivos celulares. (Video).

Observación microscópica de los cultivos primarios obtenidos por los alumnos. Observación de cultivos de células en monocapa y en suspensión mantenidas en el laboratorio.

Los alumnos realizan subcultivo en monocapa y la infección de un cultivo celular con microorganismos (*Chlamydia*, *Herpes*, *Chikungunya*, *virus Respiratorio Sincicial*).

Criopreservación: Mantenimiento, congelamiento y descongelamiento de líneas celulares (Fundamentos). Los alumnos realizarán la congelación y descongelación de líneas celulares.

Caracterización celular (morfología, cariología, isoenzimas, determinación de DNA, RNA, proteínas y marcadores antigénicos).

Características generales de cultivos contaminados, rutas de contaminación: Detección de bacterias y hongos, eliminación y prevención. Micoplasmas; importancia en el cultivo celular. Métodos para su detección: tinción de Hoescht y PCR.

Líneas celulares de linaje mielomonocítico. Generalidades, condiciones de cultivo. Diferenciación de monocitos a macrófagos: agentes químicos utilizados, observación morfológica y expresión de antígenos de superficie. Evaluación de este proceso por microscopía y citometría de flujo. Video conferencia: Células Madres, preguntas, respuestas, debates.

Análisis de la viabilidad: Factores que inciden en la proliferación, supervivencia y muerte de las células. Fundamentos para la determinación de la proliferación/viabilidad celular: ensayos de la capacidad reproductiva, ensayos de integridad de la membrana plasmática, ensayos de actividad metabólica, ensayos directos de proliferación. Ejemplos: técnicas de plaqueo y formación de colonias *in vitro*, técnicas de exclusión del colorante, técnicas con sales de tetrazolio, técnicas con análogos de nucleótidos.

Recuento de células y determinación de viabilidad mediante técnica de exclusión del colorante TripanBlue.

Observación de los subcultivos, cultivos primarios realizados por los alumnos, células descongeladas y de los efectos citopáticos en los cultivos celulares infectados.

Los alumnos realizarán el revelado del efecto citopático de las células infectadas con cristal violeta y naranja de acridina.

1506

Prof. Dr. ROCELIO E. PIZZI
SECRETARIO TÉCNICO
FACULTAD CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Modalidad de enseñanza

Teórico-práctico. Las actividades se realizarán de manera grupal e individual: preparación de diferentes reactivos, técnicas de esterilización, subcultivos y obtención de cultivos primarios. Se realizarán infecciones virales y la observación de sus diferentes efectos citopáticos.

Modalidad de evaluación:

La evaluación es escrita, abierta, individual: Monografía escrita de un anteproyecto de investigación en el que el alumno proponga protocolos de obtención y manejo de cultivos celulares primarios y líneas continuas. Como aplicaría lo aprendido en el curso en su laboratorio o proyecto de investigación. Mínimo 5 carillas y máximo 10 carillas. Deberá ser enviado en un plazo máximo de 10 días. Los alumnos deben asistir al 80% de las actividades del curso. Aprobarán el curso con 7 (siete) y en caso de ser reprobada su evaluación, se le permitirá reenviar una vez el trabajo con correcciones como un sistema de recuperación.

Carga horaria teórica: 25 horas

Carga horaria práctica: 25 horas

Carga horaria Total: 50 horas

Duración en semanas: 1

Bibliografía de la actividad curricular:

Virología Médica InViVo. Editores Marta Contigiani y María Pilar Adamo. Año 2015. Editorial Brujas-Grupo Encuentro. ISBN 9785913936.

Culture of animal cells a manual of basic technique and specialized applications. Author(s): R. Ian Freshney. 2010. Wiley-Blackwell. Print ISBN: 9780470528129. DOI: 10.1002/9780470649367

Cell and Tissue Culture for Medical Research. Alan Doyle (Editor), J. Bryan Griffiths (Editor). 2000. Wiley. SBN: 978-0-471-85213-1

Bone Research Protocols. Methods in Molecular Medicine. Vol. 80. 2003. Edited by: M. H. Helfrich and S. H. Ralston © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

1506

Prof. Dr. ROQUE RIZZI
SECRETARIO TECNICO
FACULTAD CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA