



"Técnicas Inmunocitoquímicas"

2002

Fecha: El curso tendrá lugar entre los días 9 al 14 de diciembre de 2002.

Horario: El mismo tiene un desarrollo intensivo (9-13 y 14-19 hs).

Puntaje: 2 puntos para la Carrera de Doctorado, U.B.A. (45 hs. semanales).

Lugar: Ciudad Universitaria, Pabellón 2. Fac. Cs. Exactas y Naturales, Depto. de Biodiversidad y Biología Experimental, 4º piso. Lab. N° 15. (1428) Buenos Aires, Argentina.

Fax: (0054 1) 576 – 3384 / **TE:** (0054 1) 576-3348.

Arancel : \$ 200

Alumnos inscriptos en el doctorado de la FCEN: \$100

Cupo máximo: 20 alumnos.

Cuerpo docente: Dr. Dante Paz (responsable), Dra. Paula Vissio (responsable), Dra. Fabiana Lo Nstro, Dr. Mario Ravaglia, Dra. Andrea Stefano.

E-mails: dante@bg.fcen.uba.ar// paulav@bg.fcen.uba.ar// fabi@bg.fcen.uba.ar// mario@bg.fcen.uba.ar

INDICE TEMÁTICO:

- Immunocitoquímica	Cap 1.
- Fluorescencia	Cap. 2
- Immunofluorescencia	Cap. 3
- F.I.S.H	Cap. 4
- Immunoperoxidasa	Cap. 5
- Técnica de "Free Floating"	Cap. 6
- Inmunomarcación <i>in toto</i>	Cap. 7
- Immunoblotting	Cap. 8
- Recuperación Antigénica	Cap. 9

<u>Apéndices</u>	Cap. 10
-------------------------	---------

- Soluciones Reveladoras de Peroxidasa
- Soluciones Buffers
- Soluciones Fijadoras



Contenido teórico:

- **Introducción a las técnicas inmunocitoquímicas.** Antígenos. Anticuerpos. Reacción antígeno-anticuerpo. Anticuerpos policlonales: Obtención. Ventajas y desventajas de los anticuerpos policlonales. Anticuerpos monoclonales. Obtención. Ventajas y desventajas de su uso. Distintas metodologías inmunocitoquímicas.
- **Obtención del material biológico.** Fijación de las muestras. Distintos tipos de fijadores. Inclusión en parafina. Inclusión en resinas plásticas. Cortes por congelación. Microscopía óptica y electrónica. Inmunomarcación *in toto*.
- **Inmunofluorescencia.** Métodos directos. Métodos indirectos. Distintos marcadores fluorescentes. Doble y triple marcación. Ventajas y desventajas de la inmunofluorescencia. Microscopía de fluorescencia.
- **Hibridización *in situ* fluorescente.** Qué significa F.I.S.H. Tipos de material. Como es la técnica. Sondas moleculares marcadas con fluorocromos. Aplicaciones del F.I.S.H. y su factibilidad en material fijado
- **Inmunoperoxidasa.** Métodos directos. Métodos indirectos. Complejo PAP. Método de avidina-biotina peroxidasa (ABC). Ventajas y desventajas de las distintas metodologías que utilizan peroxidasa. Métodos que utilizan otro sistema enzimático: APAAP. Reveladores. Coloración de contraste. Kit de revelado ABC.
- **Immunoblotting.** Caracterización de antígenos por immunoblotting. Obtención de las muestras. Separación por electroforesis. Transferencia a membranas de nitrocelulosa o similares (blotting). Inmunomarcación en la membrana de nitrocelulosa. Distintas opciones de inmunomarcación. Interpretación de los resultados. Ventajas y desventajas del immunoblotting.
- **Otras aplicaciones.** Marcación simultánea de varios antígenos. Lectinas: concepto y aplicaciones. Evaluación de la proliferación celular por métodos inmunocitoquímicos (PCNA y BrdU). Recuperación antigénica en material añejado.
- **Documentación de resultados.** Fotomicrografía. Microscopio fotográfico. Iluminación diascópica. Fluorescencia. Fotografía color. Películas color. Papel y diapositivas. Tipos de película. Temperatura color. Filtros. Sobre y subexposición. Ventajas y desventajas. Fotografía blanco y negro. Tipos de películas. Filtros de contraste. Ventajas y desventajas. Otros tipos de almacenamiento de imágenes.



Programa y trabajos prácticos programados:

- El curso se basa principalmente en la realización de Trabajos Prácticos en donde desarrollamos distintas metodologías de inmunomarcación. En particular se llevarán a cabo los siguientes trabajos prácticos:

**** Inmunofluorescencia**

1. Inmunomarcación indirecta de una citoqueratina en epitelios de embriones y larvas de anfibios.
2. Doble marcación para evidenciar actina sarcomérica y nCadherina en embriones de anfibios.

**** Inmunoperoxidasa:**

Inmunomarcación de células productoras de PRL y SL en hipófisis de peces mediante la técnica de ABC.

**** Fotomicrografía:**

Métodos de documentación. Fotografía blanco y negro y color de las distintas inmunomarcas obtenidas en el curso.

**** F.I.S.H. Conceptos de hibridización *in situ* fluorescente.**

**** Inmunoblotting:**

Caracterización de SL de hipófisis de peces mediante Western Blots con diferentes antisueros.

**** Inmunomarcación de células en proliferación utilizando PCNA y recuperación de antígenos por tratamiento en horno a microondas.**

****Exámen.**

BIBLIOGRAFIA

- Aiken, K.D. and Roth, K.A. 1992. Temporal Differentiation and Migration of Substance P, Serotonin, and Secretin Immunoreactive Enteroendocrine Cells in the Mouse Proximal Small Intestine. *Dev. Dynamics.* **194**: 303-310.
- Carmanchahi, P.D.; C.C. Ferrari, H.J. Aldana Marcos; C.A. Soñez; J.M. Affanni and D.A. Paz. (2000). Characterization of glycoconjugates sugar residues in the vomeronasal organ of the Armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Xenarthra). *J. Anat.* **196**:357-370.
- Cuello, A.C. 1993. Immunohistochemistry II. IBRO handbook Series: Methods in Neuroscience. Vol. 14. John Wiley & Sons, Ltd. Sussex. England.
- Gresik, E.W., M. Kashimata, et al. 1997. Expression of epidermal growth factor receptor in fetal mouse submandibular gland detected by a biotinyltyramide-based catalyzed signal amplification method. *J. Histochem. Cytochem.* **45**: 1651-1657.
- Härtig, W., Brückner G., et al. 1995. Digoxigenylated primary antibodies for sensitive dual-peroxidase labelling of neural markers. *Histochemistry Cell Biol.* **104**:467-472.
- Hougaard, D.M., H. Hansen and L.I. Larsson. 1997. Non-radioactive in situ hybridization for mRNA with emphasis on the use of oligodeoxynucleotide probes. *Histochem. Cell Biol.* **108**: 335-344.
- Klymkowsky, M.W. and Hanken, J. 1991. Whole-Mount Staining of *Xenopus* and Other Vertebrates. In: "Methods in Cell Biology". Vol. 36. (B.K. Kay & H.B. Peng Eds.) Academic Press. New York.
- Larsen, P.J. and Mikkelsen J.D. 1994. Simultaneous detection of neuropeptides and messenger RNA in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system by a combination of non- radioactive in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry. *Histochemistry.* **102**:415-423.
- Northington, F.J., Koehler, R.C. et al. 1996. Nitric oxide synthase 1 and nitric oxide synthase 3 protein expression is regionally and temporally regulated in fetal brain. *Devel. Brain Res.* **95**:1-14.
- Ortego, L.S., Hawkins, W.E., Walker W.W., Krol R.M. and Benson W.H. 1992. Detection of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Tissues of Three Small Fish Species. *Biotech. Histotech.* **69**:317-323.
- Shimamura, K. and Takeichi, M. 1992. Local and transient expression of E-cadherin involved in mouse embryonic brain morphogenesis. *Development.* **116**:1011-1019.
- Stern, C.D. 1993. Immunocytochemistry of embryonic material. In: " Essential Developmental Biology. A Practical Approach " (C. D. Stern and W.H. Holland Eds.) IRL PRESS. Oxford.

- Szekeres, G., Lutz, Y, Le Tourneau, A. et al. 1994. Steroid Hormone Receptor Immunostaining on Paraffin Sections with Microwave Heating and Trypsin Digestion. *J. Histotechnol.* **17**:321-324.
- Tornehave, D., D.M. Hougaard and L.I. Larsson. 2000. Microwaving for double indirect immunofluorescence with primary antibodies from the same species and for staining of mouse tissues with mouse monoclonal antibodies. *Histochem. Cell Biol.* **113**: 19-23.
- Tulli, H.M., Carlson C.S., Jayo, M.J., et al. 1992. Immunohistochemical Method for the Simultaneous Demonstration of Three Proteins in EDTA Decalcified Paraffin Embedded Bone Sections. *J. Histotechnol.* **15**:93-97.
- Vilaró, S. 1991. Fijación química en inmunocitoquímica: métodos y fundamentos. En: "Técnicas de Inmunocitoquímica en Microscopía Electrónica" (M.Durfort, S. Vilaró, J. Reneau and J. Senatrosa, eds). Estudi General Publications. Univ. Barcelona. Barcelona.
- Vissio, P.G.; A.V. Stefano; G.M. Somoza; M.C. Maggese and D.A. Paz. (1999). Close association of gonadotropin-releasing hormone fibers and gonadotropin, growth hormone, somatolactin and prolactin expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol. Biochem.* **21**: 121-127.