



"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 Nostro, 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:

- Inmunocitoquímica	Cap. 1.
- Fluorescencia	Cap. 2
- Inmunofluorescencia	Cap. 3
- F.I.S.H	Cap. 4
- Inmunoperoxidasa	Cap. 5
- Técnica de "Free Floating"	Cap. 6
- Inmunomarcación <i>in toto</i>	Cap. 7
- Inmunoblotting	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 simultanea 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.