

## **CURSO “LOCALIZACIÓN CELULAR Y TISULAR DE BIOMOLÉCULAS”**

### **Profesorado:**

Victoriano Mulero Méndez (vmulero@um.es; 968-367581) (Prof. responsable)  
Alfonsa García Ayala (agayala@um.es; 968-364968)  
M<sup>a</sup> Angeles Esteban Abad (aesteban@um.es; 968-367665)  
José Meseguer Peñalver (meseguer@um.es; 968-364965)

**Créditos y distribución:** 5 créditos ECTS (125 horas)  
15 horas teóricas      25 horas prácticas      85 horas de trabajo personal

### **Objetivos pedagógicos:**

Conocer y saber aplicar la metodología que permite el estudio de la célula eucariota  
Reconocer a la célula como la unidad estructural, funcional y de origen de todos los seres vivos  
Mejorar la capacidad de describir e interpretar resultados experimentales  
Practicar la exposición oral de contenidos científicos  
Familiarizarse con el uso de las bases de datos bibliográficos  
Fomentar, en lo posible, tanto su entusiasmo por la biología como su espíritu crítico.

### **Programa Teórico:**

Procesamiento de muestras para microscopía. Fundamentos ópticos de la microscopía. Microscopía óptica (MO). MO de campo claro. MO de contraste de fases e interferencial. MO de fluorescencia y de barrido confocal. Microscopía electrónica (ME). ME de transmisión. ME de barrido.

Técnicas histoquímicas de enzimas. Producción de anticuerpos policlonales. Producción de anticuerpos monoclonales. Inmunocitoquímica directa e indirecta. Inmunocitoquímica simple y co-localización. PAP y avidina-biotina.

Medida del calcio intracelular. Medida del potencial de membrana. Medida del pH. Localización *in vivo* (“*in vivo imaging*”). Fusiones traduccionales con GFP. Fusiones transcripcionales con GFP.

Localización celular de mRNA. Hibridación *in situ*

Citometría de flujo. Análisis del ciclo celular. Determinación de apoptosis: TUNEL/ISEL.

Cultivos celulares. Establecimiento de un cultivo primario. Métodos físicos de separación celular. Sedimentación por gravedad y elutriación. Centrifugación isopícnica. Cromatografía de afinidad y recolección en placa. FACS. MACS. Control de variables químicas: medios de cultivo y sueros. Control de variables físicas: pH y T<sup>a</sup>.. Control de contaminaciones biológicas. Evolución de un cultivo. Cultivo primario, línea celular y línea celular continua. Transformación y senescencia. Desdiferenciación, desadaptación y selección.

### **Programa Práctico:**

*Práctica 1. Técnicas de detección in situ.* Inmunocitoquímica: PAP y avidina-biotina. Inmunofluorescencia. Inmunocitoquímica para microscopía electrónica. Análisis de proliferación celular y apoptosis. Hibridación *in situ*.

*Práctica 2. Cultivos celulares.* Manejo de líneas celulares continuas. Transfección. Establecimiento de un cultivo primario. Separación celular mediante MACS.

*Práctica 3. Citometría de flujo.* Estudio de poblaciones celulares. Análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio. Inmunofluorescencia.

*Práctica 4. Localización in vivo: Microscopía de barrido confocal.* Localización celular de proteínas de fusión con GFP en líneas celulares. Localización in vivo de linfocitos T en peces cebra rag2-GFP y Ick-GFP.

### **Trabajo Personal del Alumno:**

El trabajo personal del alumno consistirá en la asistencia a las prácticas y preparación del correspondiente informe del trabajo experimental realizado. Además, los alumnos tendrán que preparar un seminario sobre artículo(s) científico(s) que se les proporcione.

### **Bibliografía:**

- Celis J.E. Cell Biology: "A laboratory handbook", 2ª edición. 1997. Academic Press.
- Goding JW Monoclonal antibodies: principles and practice. 1986. Academic Press.
- Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique (3ª ed.). 1994. John Wiley & Sons.
- Hsu K, Look AT, Kanki JP. Lessons from transgenic zebrafish expressing the green fluorescent protein (GFP) in the myeloid lineage. 2004. Methods Cell Biol. 77:333-347.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M., Scott M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J.: "Biología Celular y Molecular", 5ª edición. 2005. Médica Panamericana.
- Zhu H, Zon LI. 2004. Use of the DsRed fluorescent reporter in zebrafish. Methods Cell Biol. 76:3-12.

### **Metodología:**

La exposición de los temas por parte de los profesores será el componente mayoritario del programa de teórica. Las clases fomentarán la participación de los alumnos y el desarrollo de discusiones que faciliten la asimilación y un aprendizaje significativo. Se proporcionarán listados de preguntas teórico-prácticas al finalizar cada tema que tendrán que entregar resueltas los alumnos para ser discutidas en clase. De igual forma, también se suministrarán artículos científicos que los alumnos deberán presentar en forma de seminarios. El resto de alumnos y el profesorado discutirán el trabajo con el alumno que exponga el seminario. Los alumnos tendrán disponible toda la información anterior a través de la aplicación SUMA de la Universidad de Murcia. Además podrán realizar consultas *on-line* a los profesores así como auto-evaluaciones.

Las clases prácticas se desarrollarán de forma individualizada. A cada alumno se le planteará un problema concreto y se le ayudará a formular una hipótesis de trabajo. A continuación se le suministrarán las muestras adecuadas para el desarrollo del trabajo experimental que permita validar o refutar la hipótesis formulada.

### **Criterios de evaluación:**

- Valoración de preguntas teórico-prácticas suministradas con cada tema: 4 puntos.
- Realización y aprovechamiento de las prácticas: 3 puntos.
- Exposición de artículo científico: 3 puntos.