

**PROGRAMA DE POSTGRADO “BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA”**  
**CURSO “LOCALIZACIÓN CELULAR Y TISULAR DE BIOMOLÉCULAS”**

**Profesorado:**

Dr. Victoriano Mulero Méndez ([vmulero@um.es](mailto:vmulero@um.es); 868-887581) (Profesor Responsable)  
Dra. Alfonsa García Ayala ([agayala@um.es](mailto:agayala@um.es); 868-884968)  
Dra. M<sup>a</sup> Angeles Esteban Abad ([aesteban@um.es](mailto:aesteban@um.es); 868-887665)  
Dr. José Meseguer Peñalver ([meseguer@um.es](mailto:meseguer@um.es); 868-884965)  
Dra. M<sup>a</sup> Pilar Sepulcre Cortés ([mpsepul@um.es](mailto:mpsepul@um.es); 868-883938)  
Dr. Iván Mulero Méndez ([ivan.mulero@um.es](mailto:ivan.mulero@um.es); 868-883938)

**Créditos y distribución:** 6 créditos ECTS (150 horas)

20 horas teóricas                      30 horas prácticas                      100 horas de trabajo personal

**Objetivos pedagógicos:**

Conocer los fundamentos y aplicaciones de los distintos tipos de microscopios  
Manejar los microscopios de fluorescencia y láser confocal.  
Conocer los fundamentos de las técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ*.  
Ser capaz de realizar técnicas inmunohistoquímicas.  
Comprender los fundamentos de la localización *in vivo* de biomoléculas mediante el uso de marcadores fluorescentes.  
Ser capaz de localizar moléculas *in vivo* mediante el uso de marcadores fluorescentes.  
Comprender los fundamentos de la citometría de flujo y ser capaz de utilizarla para identificar y separar poblaciones celulares.  
Comprender los fundamentos del aislamiento y cultivo de células animales.  
Ser capaz de utilizar la metodología de aislamiento y cultivo de células animales.  
Conocer los fundamentos de la producción de anticuerpos poli y monoclonales.

**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  
Localización celular de mRNA. Hibridación *in situ*

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

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 doble  
Análisis de proliferación celular y apoptosis

#### **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 cebras *rag2:GFP* y *lck:GFP*  
Localización *in vivo* de macrófagos en peces cebras *mpx:GFP* y *lys:GFP*: movilización en respuesta a una herida

### **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.