

**Proyecto/Guía docente de la asignatura**

Se debe indicar de forma fiel cómo va a ser desarrollada la docencia. Esta guía debe ser elaborada teniendo en cuenta a todo el profesorado de la asignatura. Conocidos los espacios y profesorado disponible. Los detalles de la asignatura serán informados por el Campus Virtual.

Se recuerda la importancia que tienen los comités de título en su labor de verificar la coherencia de las guías docentes de acuerdo con lo recogido en la memoria de verificación del título y/o en sus planes de mejora. Por ello, **tanto la guía, como cualquier modificación** que sufra en aspectos "regulados" (competencias, metodologías, criterios de evaluación y planificación, etc..) deberá estar **informada favorablemente por el comité** de título **ANTES** de ser colgada en la aplicación web de la UVa. Se ha añadido una fila en la primera tabla para indicar la fecha en la que el comité revisó la guía.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|----------------------|---------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|-------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|------------------|
| Asignatura | Microscopía e imagen de fluorescencia | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Materia | Avances en Fisiología Celular y Molecular | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Módulo | II: Investigación Biomédica básica | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Titulación | Máster en Investigación Biomédica y Terapias Avanzadas | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Plan | 725 | Código | 55406 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Periodo de impartición | 1º Cuatrimestre | Tipo/Carácter | OP | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nivel/Ciclo | Máster | Curso | 2023-24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Créditos ECTS | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lengua en que se imparte | Español | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Profesor/es responsable/s | <table border="0"> <tr> <td>M. Teresa Montero Zoccola</td> <td>Catedrática UVA y coordinadora</td> </tr> <tr> <td>Rosalba Fonteriz García</td> <td>Profesora Titular UVA</td> </tr> <tr> <td>Lucía Nuñez Llorente</td> <td>Catedrática UVA</td> </tr> <tr> <td>Carlos Villalobos</td> <td>Investigador Científico CSIC</td> </tr> <tr> <td>Javier Casas</td> <td>Prof. Ayudante Doctor</td> </tr> <tr> <td>Sergio de la Fuente</td> <td>Prof. Ayudante Doctor</td> </tr> <tr> <td>Jonathan Rojo</td> <td>Prof. Ayudante Doctor</td> </tr> <tr> <td>Sendoa Tajada</td> <td>Prof. Ayudante Doctor</td> </tr> <tr> <td>Victor Tapias</td> <td>Investigador UVA</td> </tr> </table> | | | M. Teresa Montero Zoccola | Catedrática UVA y coordinadora | Rosalba Fonteriz García | Profesora Titular UVA | Lucía Nuñez Llorente | Catedrática UVA | Carlos Villalobos | Investigador Científico CSIC | Javier Casas | Prof. Ayudante Doctor | Sergio de la Fuente | Prof. Ayudante Doctor | Jonathan Rojo | Prof. Ayudante Doctor | Sendoa Tajada | Prof. Ayudante Doctor | Victor Tapias | Investigador UVA |
| M. Teresa Montero Zoccola | Catedrática UVA y coordinadora | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Rosalba Fonteriz García | Profesora Titular UVA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lucía Nuñez Llorente | Catedrática UVA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Carlos Villalobos | Investigador Científico CSIC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Javier Casas | Prof. Ayudante Doctor | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sergio de la Fuente | Prof. Ayudante Doctor | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jonathan Rojo | Prof. Ayudante Doctor | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sendoa Tajada | Prof. Ayudante Doctor | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Victor Tapias | Investigador UVA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Datos de contacto (E-mail, teléfono...) | mmontero@uva.es | 983 18 4118 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Departamento | Dpto de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología Dpto de Enfermería | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fecha de revisión por el Comité de Título | 21 de julio de 2023 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



1. Situación / Sentido de la Asignatura

1.1 Contextualización

1.2 Relación con otras materias

1.3 Prerrequisitos

Haber cursado el módulo común del Máster

2. Competencias

Conocimientos y Contenidos:

RA1.- Analizar los conceptos y realidades propias de la actividad investigadora en el área de la Biomedicina.

RA3.- Describir las bases de la fisiología celular y molecular en condiciones normales y cuando se ven alterados en la patología humana.

RA4.- Recordar los procesos biológicos de transporte y señalización celular.

Habilidades o Destrezas

RA11.- Enfrentarse de modo crítico a los conocimientos científicos descritos tanto oralmente como en la bibliografía en inglés y español.

RA12.- Utilizar las diferentes técnicas en investigación biomédica en el laboratorio.

RA13.- Seguir un protocolo experimental de investigación biomédica de forma autónoma.

RA14.- Interpretar los resultados obtenidos en los experimentos.

Competencias

RA23.- Diseñar experimentos en el campo de la investigación biomédica, aplicando las técnicas adecuadas para responder a la pregunta pertinente.

RA24.- Informar, tanto oralmente como por escrito, sobre problemas/proyectos biomédicos.

Competencias Transversales:

RA26.- Ser capaz de trabajar en equipo en un ambiente multidisciplinar para conseguir objetivos comunes desde perspectivas diferenciadas.

RA27.- Ser capaz de aplicar los principios de la ética, la integridad intelectual y la responsabilidad profesional.

Resultados de aprendizaje específicos de la materia

Los/as estudiantes serán capaces de:

- Identificar la estructura y función de las membranas biológicas: estructura y composición de las membranas, bases biofísicas de los mecanismos de transporte que en ellas acontecen y proteínas implicadas en los mismos: distintos tipos de transportadores y canales iónicos
- Describir las consecuencias fisiopatológicas de las alteraciones en la expresión o la función de los mecanismos de transporte
- Reconocer los mecanismos de señalización desarrollados por las células de los organismos pluricelulares para comunicarse entre sí y con su entorno.
- Describir las principales vías de señalización, los elementos implicados en ellas, sus mecanismos de regulación y las implicaciones patológicas de su disfunción.
- Explicar los mecanismos implicados en la homeostasis del calcio intracelular. Los marcadores de calcio intracelular y reconocer las funciones del ión calcio como mensajero intracelular.
- Aplicar las bases de los sistemas de señalización en procesos biológicos como, la proliferación y muerte celular y diferentes situaciones fisiopatológicas.
- Comprender el conocimiento teórico acerca de los principios de la microscopía de fluorescencia y confocal aplicada a la biomedicina.
- Procesar y analizar imágenes digitales, programar "macros" en el programa de análisis de imagen ImageJ/FIJI.
- Identificar las diferentes técnicas para el estudio de la señal de calcio, así como los diferentes tipos de indicadores de Calcio.
- Diseñar y realizar un experimento en el que se realicen medidas de calcio intracelular utilizando la imagen de fluorescencia
- Describir los procesos metabólicos y las bases teóricas de las enfermedades metabólicas, así como los abordajes experimentales actuales.
- Utilizar las nuevas técnicas en el estudio experimental del metabolismo y sus patologías asociadas.
- Diferenciar los diferentes modelos in vivo dentro de la biomedicina para responder a preguntas relacionadas con enfermedades metabólicas.
- Plantear el diseño de un experimento in vivo en función de los resultados esperados.



3. Objetivos

Al finalizar el curso el alumno debe saber los principios y fundamentos teóricos de la microscopía de fluorescencia y confocal.

Deberá procesar y analizar imágenes digitales y programar de forma básica "macros" para la automatización del análisis de imágenes digitales.

El alumno deberá conocer los distintos tipos de colorantes fluorescentes y proteínas utilizados.

Deberá saber realizar un espectro de emisión de un colorante y saber elegir el que mejor se adecúa a las necesidades además de saber realizar la calibración del mismo. Tendrá que ser capaz de cargar unas células con el colorante elegido y realizar un experimento de medida de calcio citosólico.

El alumno deberá comprender la importancia de las técnicas de direccionamiento de proteínas a compartimentos intracelulares para enviar de forma específica a los orgánulos proteínas luminiscentes o fluorescentes capaces de medir la concentración de Ca^{2+} .

Deberá entender el funcionamiento de las proteínas luminiscentes sensibles a Ca^{2+} , deberá ser capaz de manejar los equipos de luminiscencia para obtener medidas de Ca^{2+} , entender los métodos de calibración y obtener e interpretar los resultados.

El alumno será capaz de diseñar un experimento en el que se realicen medidas de calcio intracelular utilizando la imagen de fluorescencia.

El alumno aprenderá las directrices básicas para la realización de un experimento de medida de Ca^{2+} intracelular en célula única mediante imagen de fluorescencia.

El alumno utilizará el software para el procesamiento de imágenes y los cálculos necesarios para obtener valores de calcio intracelular en células individuales.

El alumno realizará experimentos de medida de expresión de genes en células vivas por imagen de bioluminiscencia y aprenderá a analizarlos e interpretarlos.

El alumno aprenderá a realizar estudios morfológicos neuronales, incluyendo el análisis de neuritas en tres dimensiones.

4. Contenidos y/o bloques temáticos

Bloque 1: Microscopía e imagen de fluorescencia

Carga de trabajo en créditos ECTS: 3

a. Contextualización y justificación

Se trata de introducir al alumno en las distintas técnicas de microscopía e imagen de fluorescencia con aplicación en la medida de calcio intracelular. La asignatura pertenece a las asignaturas con eminente carga práctica. Se ofrece un complemento de formación en técnicas novedosas y sofisticadas para alcanzar un alto grado de especialización en técnicas de Imagen en el área de la Fisiología Celular. Es un curso práctico y optativo que forma parte de la formación específica que debe tener un alumno una vez que haya elegido un itinerario del máster y quiera tener una formación más profunda en la microscopía e imagen de fluorescencia y sus implicaciones en la Fisiopatología Celular.

b. Objetivos de aprendizaje

La microscopía de fluorescencia es una forma especial de microscopía óptica. Utiliza la capacidad de los fluorocromos para emitir luz después de ser excitado con luz de una determinada longitud de onda. Es una de las técnicas de mayor uso en la actualidad en las ciencias biomédicas. Las proteínas de interés se pueden marcar con fluorocromos mediante tinción de anticuerpos o etiquetado con proteínas fluorescentes. Permite determinar la distribución de una sola molécula, su cantidad y su localización dentro de una célula. Además, se pueden llevar a cabo estudios de colocalización y de interacción, observándose incluso concentraciones de distintos metabolitos usando colorantes que se unen de forma reversible o diseñados genéticamente, también se pueden observar procesos celulares. Hoy en día incluso es posible detectar partículas de sub-resolución con la ayuda de la microscopía de fluorescencia. El tratamiento digital de las imágenes adquiridas permite procesar y analizar estas imágenes para obtener resultados con calidad suficiente para su publicación y extraer datos numéricos relevantes para su manejo e interpretación.

El alumno deberá conocer los distintos tipos de colorantes fluorescentes y proteínas utilizados. Deberá saber realizar un espectro de emisión de un colorante y saber elegir el que mejor se adecúa a las necesidades además de saber realizar la calibración del mismo. Tendrá que ser capaz de cargar unas células con el colorante elegido y realizar un experimento de medida de calcio citosólico. El alumno deberá comprender la importancia de las técnicas de direccionamiento de proteínas a compartimentos intracelulares para enviar de forma específica a los orgánulos proteínas luminiscentes o fluorescentes capaces de medir la concentración de Ca^{2+} . Deberá entender el funcionamiento de las proteínas luminiscentes sensibles a Ca^{2+} , deberá ser capaz de manejar los equipos de luminiscencia para obtener medidas de Ca^{2+} , entender los métodos de calibración y obtener e interpretar los resultados.



El alumno será capaz de diseñar un experimento en el que se realicen medidas de calcio intracelular utilizando la imagen de fluorescencia.

El alumno aprenderá las directrices básicas para la realización de un experimento de medida de Ca^{2+} intracelular en célula única mediante imagen de fluorescencia.

El alumno utilizará el software para el procesamiento de imágenes y los cálculos necesarios para obtener valores de calcio intracelular en células individuales.

El alumno realizará experimentos de medida de expresión de genes en células vivas por imagen de bioluminiscencia y aprenderá a analizarlos e interpretarlos.

c. Contenidos

TEMA1. CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. Introducción a la fluorescencia. El microscopio óptico y de fluorescencia. Tipos y partes de un microscopio óptico. Filtros. Espejos. Fuentes de luz. Magnificación. Resolución. Iluminación. Aberraciones de la luz. Conceptos básicos en microscopía confocal. Pinhole. Sección óptica. Detectores. Laser Scanning. Otros tipos de microscopía de Fluorescencia. TIRF. Multi Fotón. Superresolución.

TEMA 2 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES DIGITALES. Conocimientos básicos sobre imagen digital. Concepto de imagen digital, píxel, resolución de imagen digital, profundidad de bits, dimensiones de una imagen digital. Programas de análisis de imagen libres (FIJI/CellProfiler/Icy/Qupath). Primeros pasos con FIJI/ImageJ. Menús, información y visualización de imágenes con FIJI. Análisis de imágenes digitales. Histogram, Profile, Threshold (Segmentación), Measure, Tools, ROI manager.

TEMA 3. MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA. MICROSCOPIO CONFOCAL. ANÁLISIS DE IMAGEN DIGITAL CON FIJI/IMAGEJ. Demostración "in situ" de las partes del microscopio explicadas en clase con especial énfasis en los cubos de filtros de fluorescencia y las fuentes de luz. Adquisición de imágenes multicolor de una muestra de células teñidas con diferentes fluoróforos para mostrar la localización subcelular de distintos orgánulos. Deconvolución de las imágenes obtenidas. Demostración "in situ" de las partes del confocal, con especial énfasis en el sistema de iluminación y el sistema de adquisición/detección espectral. Adquisición de imágenes multicolor de la misma muestra de células teñidas con diferentes fluoróforos para mostrar la localización subcelular de distintos orgánulos. Comparación de deconvolución fluorescencia vs confocal.

TEMA 4. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL. Introducción y conceptos de la microscopía confocal.. Anatomía de un microscopio confocal. Aplicaciones avanzadas de microscopía confocal: (i) colocalización; (ii) niveles de fluorescencia de proteínas implicadas en la función y biogénesis mitocondrial, estrés oxidativo y apoptosis; (iii) aplicaciones en investigación clínica. Demostración del manejo (configuración) de un equipo confocal. Toma de imágenes. Seccionamiento óptico o Z-stack. Métodos de preparación de muestras, tanto en cultivos celulares como en cerebro de roedores. Obtención de imágenes con una pletina motorizada de alta resolución. Fundamentos básicos del procesamiento de imágenes. Análisis de imágenes digitales. Obtención y representación de los datos.

TEMA 4. MICROSCOPIA DE LOCALIZACIÓN SUPERRESOLUCIÓN. Los avances en las técnicas de microscopía de fluorescencia han permitido obtener imágenes con una resolución superior a las imágenes convencionales, condicionadas por el límite de difracción, determinado por Ernst Abbe, mediante dos métodos: método determinístico, que utiliza un patrón espacial muy preciso de excitación de los fluoróforos y método estocástico que se basa en la propiedad de los fluoróforos de emitir luz de forma aleatoria, lo que permite la localización de moléculas individuales. Límite de difracción: Ley de Abbe. Anatomía de un microscopio de localización. Introducción y conceptos básicos sobre microscopía de superresolución. Método determinístico y estocástico. Diagramas de Jablonsky. Elección de los fluoróforos apropiados. Preparación de las muestras. Identificación y localización del punto máximo. Post procesado de los datos: drif correction, merging/linking y filtrado. Representación de una imagen de superresolución. Análisis de imágenes de superresolución con ThunderSTORM.

TEMA 5. MEDIDAS DE CALCIO INTRACELULAR CON TÉCNICAS DE ALTA SENSIBILIDAD. Descripción teórica de los fundamentos de las técnicas. Demostración del manejo de los equipos. En la parte correspondiente a imagen de Ca^{2+} , los estudiantes aprenderán técnicas básicas de medidas de Ca^{2+} intracelular en diferentes orgánulos y con diferentes tipos de sensores. Estos sensores incluyen tanto colorantes fluorescentes como GECIs (Genetically Encoded Ca^{2+} Indicartors).



TEMA 6. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE MEDIDA DE CALCIO DINÁMICAS. Realización de medidas dinámicas de la expresión génica mediante imagen de bioluminiscencia. Manejo e utilización práctica de microscopio/lupa de fluorescencia para la realización de experimentos de medida de calcio intracelular. Aspectos técnicos a tener en cuenta para optimizar el registro de las señales de calcio intracelulares mediante fluorescencia. Utilización de elementos accesorios en los experimentos: Estimulación eléctrica. Perfusión. Preparación de la muestra para la realización de experimentos "in vivo" / "ex vivo". Realización de experimentos de medida de calcio intracelular usando técnicas de fluorescencia. Análisis de los datos (sensores ratiométricos/no ratiométricos). Se realizarán experimentos midiendo la dinámica del calcio intracelular en animales transgénicos expresando diferentes sensores de calcio fluorescentes, dirigidos genéticamente al citosol o retículo endoplasmático de tejido muscular o nervioso. Para ello se utilizará como modelo *Drosophila melanogaster* en dos preparaciones experimentales:

- "in vivo", inmovilizando animales adultos.
- "ex vivo", realizando una preparación de la unión neuromuscular en larvas de *Drosophila*, mediante disección, evisceración y exposición del tejido muscular de la larva.

La excitación en ambas preparaciones se llevará a cabo mediante estimulación eléctrica de las vías nerviosas

TEMA 8. CALIBRACIÓN DE LOS RESULTADOS, OBTENCIÓN Y REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS.

d. Métodos docentes

Clases teóricas: 6 horas

Se utilizarán estas clases como medio para proporcionar a los alumnos los fundamentos teóricos del programa de la materia. En estas clases se utilizarán diversos tipos de apoyos audiovisuales cuyo contenido se hará accesible a los alumnos. Los alumnos tendrán acceso a un guion detallado de las sesiones teóricas y a las presentaciones utilizadas por el profesorado para dichas sesiones.

Prácticas de laboratorio: 24 horas

El alumno realizará ejercicios relacionados con los temas de microscopía e imagen de fluorescencia para practicar los procedimientos y de análisis explicados en el curso.

Se realizarán experimentos de FRET por el método de Acceptor Photobleaching con muestras celulares positivas y negativas para FRET. Primeros pasos con FIJI/ImageJ. Menús, información y visualización de imágenes con FIJI.

Análisis de imágenes digitales: Histogram, Profile, Threshold (Segmentación), Measure, Tools, ROI manager. Tratamiento de imágenes digitales. Análisis de partículas, uso y funcionamiento de filtros, eliminar fondo y ruido. Proyección Z, Reconstrucción 3D, Secciones ortogonales. Segmentación manual vs Segmentación avanzada (CellPose).

Análisis de Colocalización (comparativa con el experimento de FRET). Análisis de imágenes de FRAP.

Registro de imágenes (compensar movimientos no deseados y pérdida de fluorescencia). Análisis de translocación de fluorescencia time lapse ImageJ. Maneras de mostrarlo (time Re-slice). Ejemplo de Automatización de análisis (cuenta de partículas fagocitadas).

Preparación de muestras. Cocktail de imagen para STORM. Cocktail de imagen para SIM. Cocktail de imagen para GSD. Análisis de datos de microscopía de localización usando ThunderSTORM. Cellprofiler como alternativa/asistencia a ImageJ. Matlab para detección de señales en regiones submembrana (TIRF). ImageJ plugins para detección y rastreo de partículas, reconstrucción en profundidad de stacks de imágenes obtenidas en microscopio de 2P, Hyperstacks, macros y medidas con Image J

El alumno conocerá los distintos tipos de colorantes fluorescentes y proteínas utilizados. Los estudiantes tendrán oportunidad de trabajar tanto con las sondas fluorescentes como las bioluminiscentes. Los estudiantes podrán ver cómo funcionan estas técnicas a nivel de célula única y a nivel de organismo vivo (medidas en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*). Los alumnos practicarán todos los pasos necesarios para realizar las medidas (cultivo y transfección de células cuando sea necesario), medidas en sí mismas, y finalmente algunas nociones básicas de análisis tratamiento e interpretación de datos.

Realizará un espectro de emisión de un colorante y saber elegir el que mejor se adecúa a las necesidades además de saber realizar la calibración del mismo. Cargará unas células con el colorante elegido y realizará un experimento de medida de calcio citosólico. El alumno deberá comprender la importancia de las técnicas de direccionamiento de proteínas a compartimentos intracelulares para enviar de forma específica a los orgánulos proteínas luminiscentes o fluorescentes capaces de medir la concentración de Ca^{2+} . Deberá entender el funcionamiento de las proteínas luminiscentes sensibles a Ca^{2+} , deberá ser capaz de manejar los equipos de luminiscencia para obtener medidas de Ca^{2+} , entender los métodos de calibración y obtener e interpretar los resultados.

El alumno diseñará un experimento en el que se realicen medidas de calcio intracelular utilizando la imagen de fluorescencia. El alumno aprenderá las directrices básicas para la realización de un experimento de medida de



Ca²⁺ intracelular en célula única mediante imagen de fluorescencia. El alumno utilizará el software para el procesamiento de imágenes y los cálculos necesarios para obtener valores de calcio intracelular en células individuales. El alumno realizará experimentos de medida de expresión de genes en células vivas por imagen de bioluminiscencia y aprenderá a analizarlos e interpretarlos.

Los alumnos analizarán los datos obtenidos en los programas adecuados previa indicación de los profesores. El profesorado pondrá a disposición de los alumnos diferentes recursos en la plataforma informática (bibliografía, manuales, etc..) y propondrá a los alumnos actividades relacionadas con ellos.

e. Plan de trabajo

Se iniciará la asignatura con clases teóricas donde se hará una descripción teórica de los fundamentos de las técnicas y demostración del manejo de los equipos. El resto de la asignatura consistirá en sesiones prácticas de desarrollo de técnicas de medida de fluorescencia de alta sensibilidad en poblaciones celulares y en célula única bajo condiciones de perfusión controlada en citosol.

Los alumnos sembrarán células de diversas líneas celulares modelo sobre cubreobjetos tratado con poli-L-lisina, células que serán utilizadas para los experimentos de imagen de fluorescencia y bioluminiscencia.

Una vez sembradas las células se procederá a su transfección, por un lado, y a la carga con los colorantes fluorescentes.

Se estudiará el manejo de técnicas de medida de luminiscencia de alta sensibilidad en poblaciones celulares y en célula única bajo condiciones de perfusión controlada en distintos orgánulos subcelulares: citosol, mitocondria, retículo endoplásmico, vesículas de secreción.

Se realizarán medidas de concentración de calcio libre en orgánulos intracelulares utilizando colorantes fluorescentes y aequorinas dirigidas.

Los alumnos aprenderán el manejo básico del microscopio invertido, la perfusión con medios fisiológicos y la captura de imágenes de fluorescencia y bioluminiscencia.

Los alumnos realizarán experimentos de imagen de fluorescencia y/o bioluminiscencia a largo plazo utilizando un incubador adherido a la platina del microscopio. Se realizarán medidas dinámicas de la expresión génica mediante imagen de bioluminiscencia

Los alumnos utilizarán del software para el procesamiento de imágenes y los cálculos necesarios para obtener valores de calcio intracelular en células individuales.

Por último, se realizará una calibración de los resultados, obtención y representación de los datos.

Se proporcionarán, además, muestras teñidas con diferentes marcadores fluorescentes para localizar distintas estructuras subcelulares. Se trabajará la correcta adquisición de imágenes multicolor tanto en un equipo de fluorescencia como en uno confocal haciendo hincapié en sus diferencias, ventajas y desventajas. Se analizarán después distintos ejemplos prácticos.

f. Evaluación

Evaluación continuada de la evolución del alumno durante la realización del trabajo práctico y de las tareas programadas en la plataforma digital. Al finalizar la asignatura el alumno preparará un trabajo que incluya los datos obtenidos, la representación gráfica de los mismos y las conclusiones de las medidas realizadas

Evaluación continua: 50% Mínimo 50% Máximo

Presentación de una memoria de la asignatura: 50% Mínimo 50% Máximo

g. Material Docente

Aula de informática y ordenadores personales.

El programa de open source ImageJ

Laboratorios de investigación en Facultad de Medicina e IBGM.

g.1 Bibliografía básica

Handbook of Biological Confocal Microscopy. James B. Pawley. 2006 (<https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-45524-2>)

Análisis de Imágenes de Microscopía con ImageJ. Victor Campa. CreateSpace Independent Publishing Platform; N.º 1. 2017 (https://www.researchgate.net/profile/Victor-Campa/publication/313768335_Analisis_de_Imagenes_de_Microscopia_con_ImageJ/links/5b2ba17c45851505d4c25300/Analisis-de-Imagenes-de-Microscopia-con-ImageJ.pdf)



Nikon Microscopy Education web (<https://www.microscopyu.com>)

Olympus Microscopy Education web (<https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fluorointrohome/>)

Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung: I. Die Construction von Mikroskopen auf Grund der Theorie. Arch für mikroskopische Anat [Internet]. 1873 Dec 1 [cited 2023 May 23];9(1):413–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02956173>

Cremer C, Masters BR. Resolution enhancement techniques in microscopy. Eur Phys J H 2013 383 [Internet]. 2013 Jan 23 [cited 2023 May 23];38(3):281–344. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1140/epjh/e2012-20060-1>

Shtengel G, Galbraith JA, Galbraith CG, Lippincott-Schwartz J, Gillette JM, Manley S, et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2009 Mar 3 [cited 2023 May 23];106(9):3125–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19202073/>

Hell SW. Microscopy and its focal switch. Nat Methods [Internet]. 2009 [cited 2023 May 23];6(1):24–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19116611/>

Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. Alvarez J, Montero M., Cell Calcium. 2002 Nov-Dec;32(5-6):251-60. Review.

Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J, Alvarez J., Nat Cell Biol. 2000 Feb;2(2):57-61

Modulation of Calcium Entry by Mitochondria. Fonteriz R, Matesanz-Isabel J, Arias-Del-Val J, Alvarez-Illera P, Montero M, Alvarez J. Adv Exp Med Biol. 2016;898:405-21. doi: 10.1007/978-3-319-26974-0_17. Review.

Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies A β oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. Sanz-Blasco S, Valero RA, Rodríguez-Crespo I, Villalobos C, Núñez L (2008). PLoS ONE 3(7): e2718 doi:10.1371/journal.pone.0002718.

g.2 Bibliografía complementaria

Alberts B., Johnson A, Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P (2014) "Molecular Biology of the Cell" ed. Garland Science; 6ª Edición

Molecular Probes® Handbook (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/global/forms/mp-handbook-download-request-form-2014.html>)

h. Recursos necesarios

Las presentaciones que se utilicen en las clases teóricas estarán disponibles vía Moodle.

Los alumnos deben disponer de bata blanca de laboratorio para asistir a las clases prácticas.

Para impartir la docencia se dispone de los equipos de los laboratorios de la 5ª planta de la Facultad de Medicina y del edificio IBGM, y de los cuartos de cultivos de la 5ª planta de la Facultad de Medicina donde se localiza el servicio de Microscopía y de la segunda planta del edificio del IBGM, donde se encuentra el material y equipos necesario para la realización de las sesiones prácticas de la asignatura.

**i. Temporalización**

| CARGA ECTS | PERIODO PREVISTO DE DESARROLLO |
|------------|---|
| 3 | 1º cuatrimestre, 15 al 25 de Enero, de 10:00 a 14:00. |

5. Métodos docentes y principios metodológicos

Clases Teóricas: Se utilizarán estas clases como medio para proporcionar a los alumnos los fundamentos teóricos del programa de la materia. En estas clases se utilizarán diversos tipos de apoyos audiovisuales cuyo contenido se hará accesible a los alumnos.

Prácticas de Laboratorio:

El alumno utilizará los distintos equipos de microscopia del IBGM: El alumno conocerá los distintos tipos de colorantes fluorescentes y proteínas utilizados. Realizará un espectro de emisión de un colorante y saber elegir el que mejor se adecúa a las necesidades además de saber realizar la calibración de este. Cargará unas células con el colorante elegido y realizará un experimento de medida de calcio citosólico. El alumno deberá comprender la importancia de las técnicas de direccionamiento de proteínas a compartimentos intracelulares para enviar de forma específica a los orgánulos proteínas luminiscentes o fluorescentes capaces de medir la concentración de Ca^{2+} . Deberá entender el funcionamiento de las proteínas luminiscentes sensibles a Ca^{2+} , deberá ser capaz de manejar los equipos de luminiscencia para obtener medidas de Ca^{2+} , entender los métodos de calibración y obtener e interpretar los resultados.

El alumno diseñará un experimento en el que se realicen medidas de calcio intracelular utilizando la imagen de fluorescencia. El alumno aprenderá las directrices básicas para la realización de un experimento de medida de Ca^{2+} intracelular en célula única mediante imagen de fluorescencia. El alumno utilizará el software para el procesamiento de imágenes y los cálculos necesarios para obtener valores de calcio intracelular en células individuales. El alumno realizará experimentos de medida de expresión de genes en células vivas por imagen de bioluminiscencia y aprenderá a analizarlos e interpretarlos.

Los alumnos analizarán los datos obtenidos en los programas adecuados previa indicación de los profesores.

El profesorado pondrá a disposición de los alumnos diferentes recursos en la plataforma informática (bibliografía, manuales, etc..) y propondrá a los alumnos actividades relacionadas con ellos.

6. Tabla de dedicación del estudiante a la asignatura

| ACTIVIDADES PRESENCIALES o PRESENCIALES A DISTANCIA ⁽¹⁾ | HORAS | ACTIVIDADES NO PRESENCIALES | HORAS |
|--|-----------|---|-----------|
| Clases teórico-prácticas (T/M) | 6 | Estudio y trabajo autónomo individual | 20 |
| Laboratorios (L) | 24 | Discusión y preparación de trabajo individual | 20 |
| Tutorías | 2 | | |
| Total presencial | 32 | Total no presencial | 40 |
| TOTAL presencial + no presencial | | | 72 |

(1) Actividad presencial a distancia es cuando un grupo sigue una videoconferencia de forma síncrona a la clase impartida por el profesor.



7. Sistema y características de la evaluación

| INSTRUMENTO/PROCEDIMIENTO | PESO EN LA NOTA FINAL | OBSERVACIONES |
|--|-----------------------|--|
| Evaluación continua | 50% | Al ser grupos tan reducidos el profesor evalúa la actividad de cada alumno en las sesiones presenciales. |
| Presentación memoria de la asignatura y resultados | 50% | La presentación de la memoria de resultados es obligatoria |

CRITERIOS DE CALIFICACIÓN

- **Convocatoria ordinaria:**
 - hasta un máximo de 50% de la nota total en la evaluación continua y hasta un máximo del 50% en la memoria de la asignatura y resultados
- **Convocatoria extraordinaria:**
 - hasta un máximo de 50% de la nota total en la evaluación continua y hasta un máximo del 50% en la memoria de la asignatura y resultados

(*) Se entiende por convocatoria extraordinaria la segunda convocatoria.

Art 35.4 del ROA 35.4. La participación en la convocatoria extraordinaria no quedará sujeta a la asistencia a clase ni a la presencia en pruebas anteriores, salvo en los casos de prácticas externas, laboratorios u otras actividades cuya evaluación no fuera posible sin la previa realización de las mencionadas pruebas.

<https://secretariageneral.uva.es/wp-content/uploads/VII.2.-Reglamento-de-Ordenacion-Academica.pdf>

8. Consideraciones finales

La evaluación de calidad del curso se realizará mediante una encuesta a los alumnos que han realizado el curso al finalizar el mismo. Los resultados obtenidos se evalúan por los profesores del curso para decidir qué aspectos conceptuales, metodológicos y prácticos deben ser modificados.