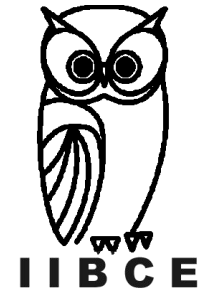


# DIA VIRTUAL DE MICROSCOPIA

## 18 de junio de 2015



Montevideo – República Oriental del Uruguay

# **ACTIVIDADES DESARROLLADAS**

**Enseñanza**

**Investigación Científica Básica**

**Colaboración científica**

**Investigación Científica Aplicada**

**Diagnóstico**

**Control de Calidad**



# FACULTAD DE CIENCIAS

## Unidad de Microscopía Electrónica



**25 AÑOS**



Iguá 4225 esq. Mataojo – Montevideo, Uruguay. CP11400  
Planta Baja Anexo Norte Tel. +598 2525 8618 internos 7217 & 7218

# Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión

umetrans@gmail.com



## Equipamiento disponible:

- TEM: **JEOL JEM 1010**

## Personal Científico – Técnico:

- Prof. Adj. Gabriela Casanova (DT)  
Responsable de los Laboratorios de  
Microscopía Electrónica  
[casanova@fcien.edu.uy](mailto:casanova@fcien.edu.uy)

## Ayudantes:

- Mag. Marcie Jiménez
- Mag. Gaby Martínez
- Dr. Marcelo Pedraza

# Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido



## Equipamiento disponible:

- SEM: **JEOL JEM-5900LV**
- Ultra Dry EDS, Thermo Scientific

## Personal Científico – Técnico:

### Profesores Asistentes:

Dr. Alejandro Márquez

Dra. Silvia Villar

### Ayudantes:

Mag. Ana Laura Reyes

Br. Magela Rodado

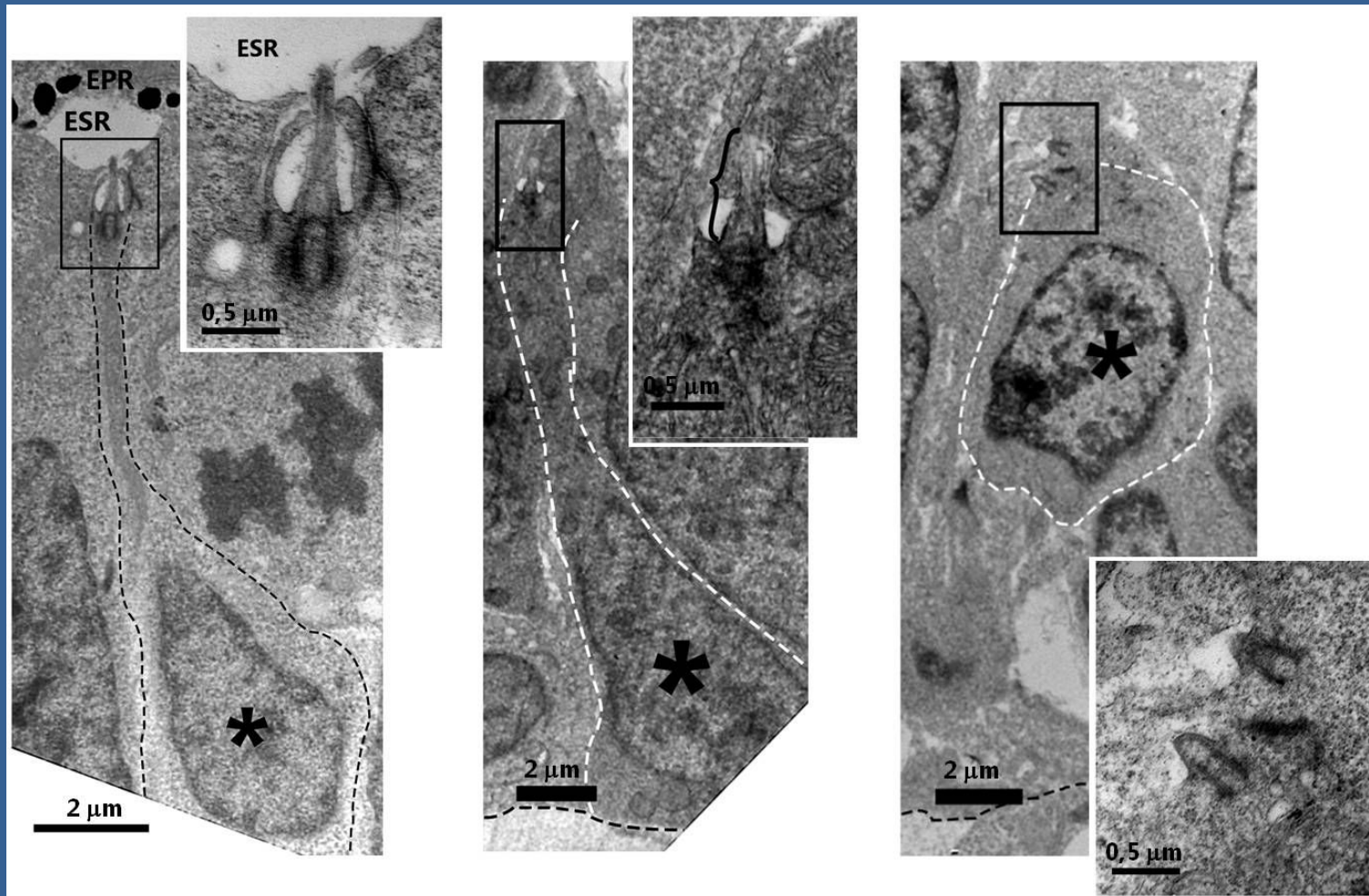


# Usuarios de los Servicios de Microscopía Electrónica:

- \* **Distintas unidades académicas de la Facultad de Ciencias**
- \* **Otros Servicios de la Universidad de la República:** Facultades de Química, Medicina, Ingeniería, Agronomía, Veterinaria, Odontología, Arquitectura, Centros Regionales.
- \* **Universidades Privadas:** Universidad Católica del Uruguay; Facultad de Odontología.
- \* **Organismos del Estado:** Poder Judicial, Policía Técnica, Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”, MEC, AFE, LATU, Dirección Nacional de Aduanas, Dirección Nacional de Medio Ambiente, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, OSE.
- \* **Empresas Privadas:** Laboratorios de Anatomía Patológica y Diagnóstico, CCC S.A., CONATEL, Ing., ANCAP, Laboratorio Clausen S.A., TEYMA S.A., CINTER S.A., Finning Uruguay, Curtiembre Branaa, IMTRAM, America Chemicals; FILSA, DUCSA, SALUS, Biogénesis.

# “La cilia primaria durante la diferenciación neuronal en la retina”

Investigación básica: Tesina de grado de la Licenciatura en Bioquímica

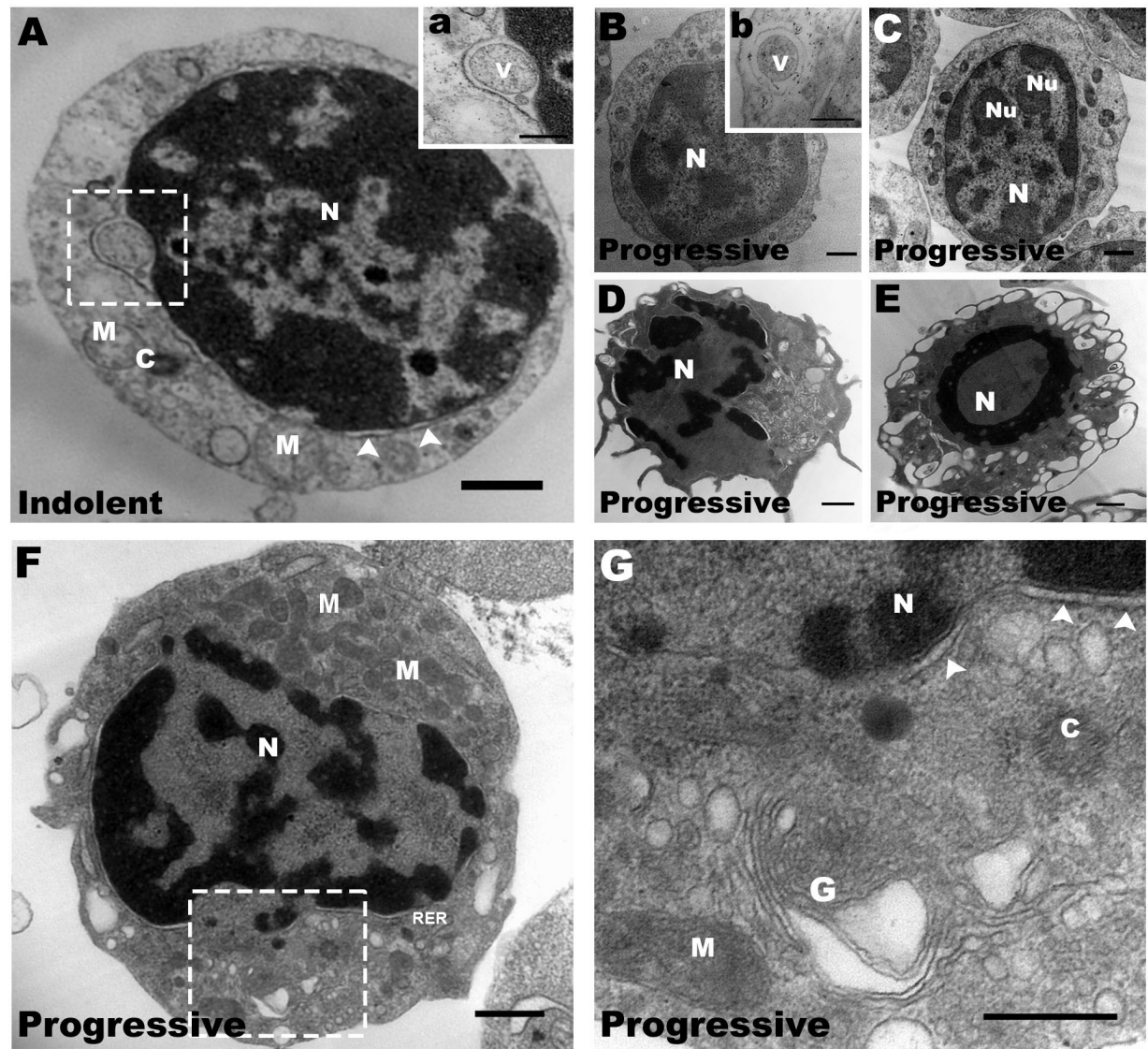


Gentileza de la Lic. Camila Davison

Investigación básica  
sobre problemas  
relacionados con  
patologías humanas  
Tesina de grado de la  
Licenciatura en  
Biología Humana

## Cambios en la ultraestructura de Linfocitos de pacientes con leucemia linfoide crónica

Gentileza de  
Estefanía Sicco





# Ultraestructura de los espermatozoides de peces anuales como herramienta para el estudio de relaciones filogenéticas

Investigación básica: Tesina de grado de la Licenciatura en Biología

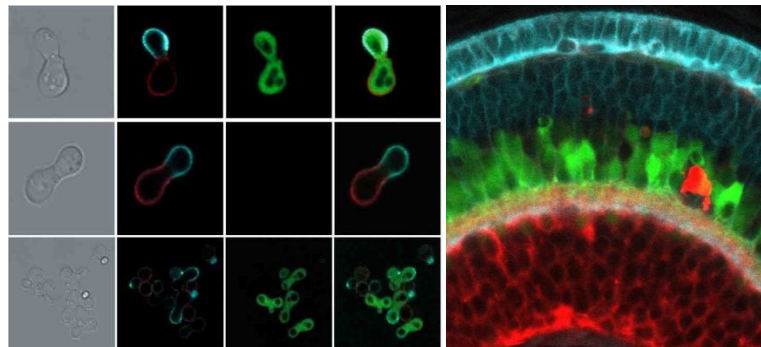


Gentileza de Magela Rodao



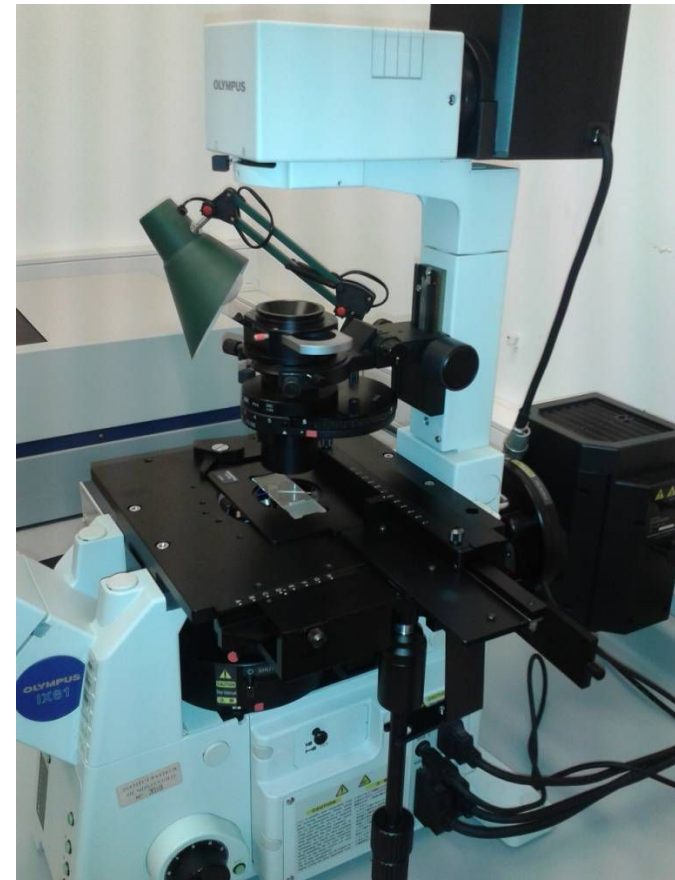
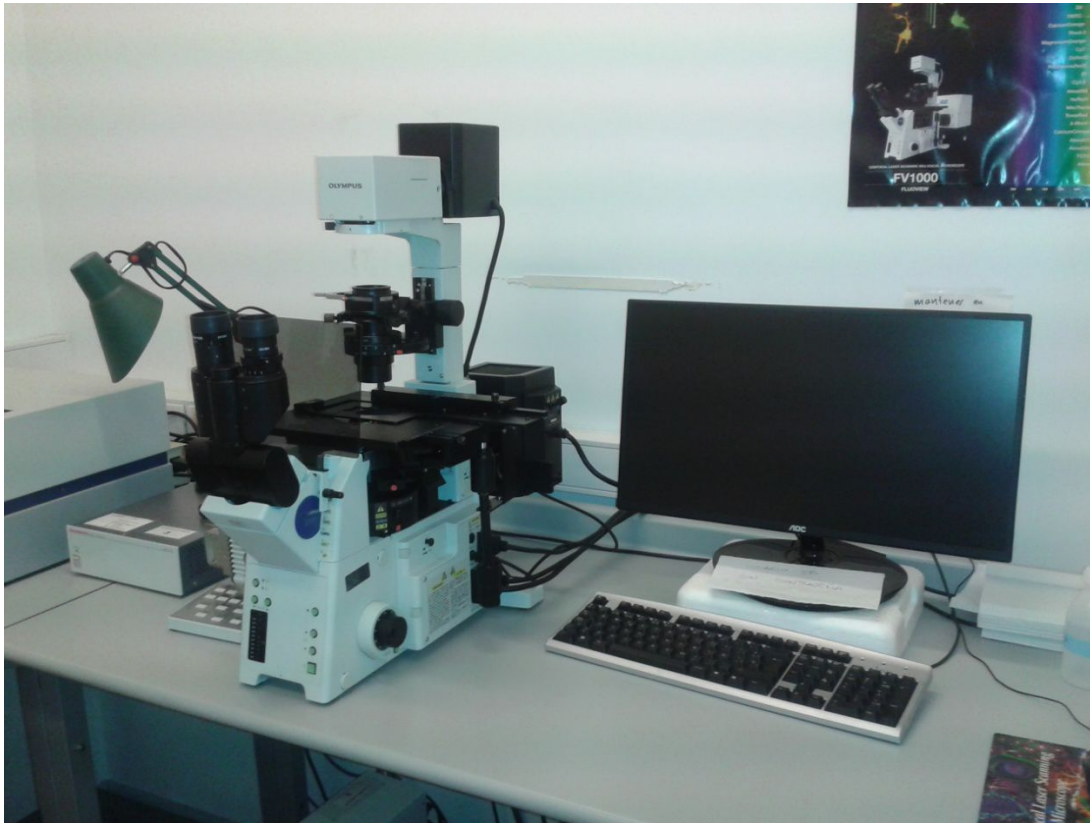
## **Servicio de microcopia confocal y epifluorescencia Plataforma de microscopia IPMONT**

Responsables : Dr. Pablo Aguilar/ Dr. Flavio Zolessi  
Técnica de la plataforma: MSc. Marcela Díaz



<http://www.pasteur.edu.uy/index.php/es/plataforma-de-microscopia>

# MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA OLYMPUS INVERTIDO IX81

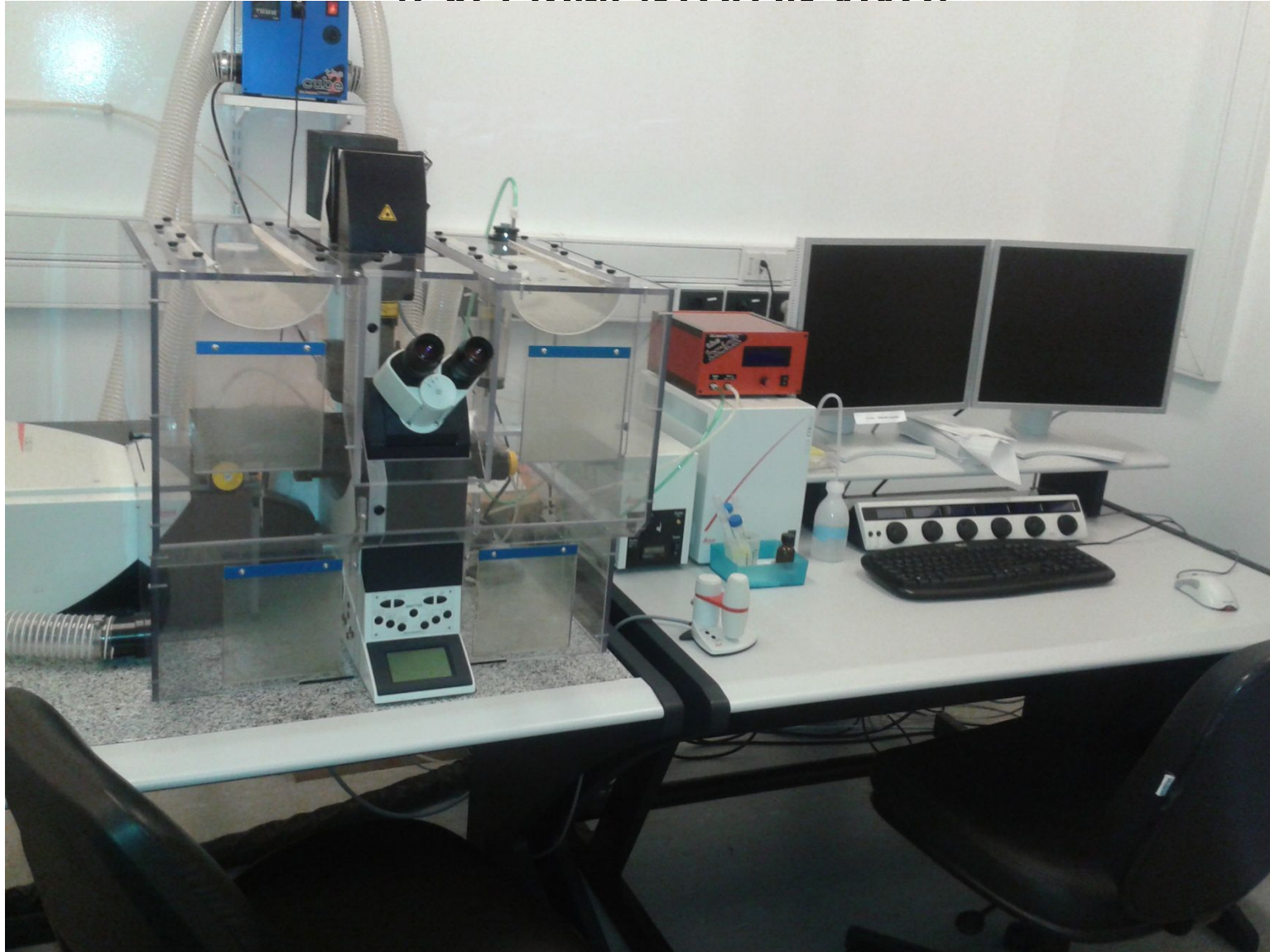


Software de  
adquisición de  
código abierto



<https://www.micro-manager.org/>

**MICROSCOPIO CONFOCAL LEICA TCS SP5, CON  
CÁMARA PARA CONTROL DE CO<sub>2</sub> Y TEMPERATURA  
(EXPERIMENTOS IN VIVO)**



# Institut Pasteur de Montevideo

## Grupos de investigación que utilizan microscopía



- Laboratorio de neurodegeneración
- Laboratorio de neuroinflamación y terapia génica
- Laboratorio de biología celular de membranas
- **Laboratorio de genética molecular humana**
- Laboratorio de biología redox de Tripanosomátidos
- Laboratorio de patologías del metabolismo y envejecimiento
- Laboratorio de biología de gusanos
- **Laboratorio de biología celular del desarrollo neural**
- Unidad de biología molecular
- Unidad de biología celular

## Laboratorio de biología celular del desarrollo neural



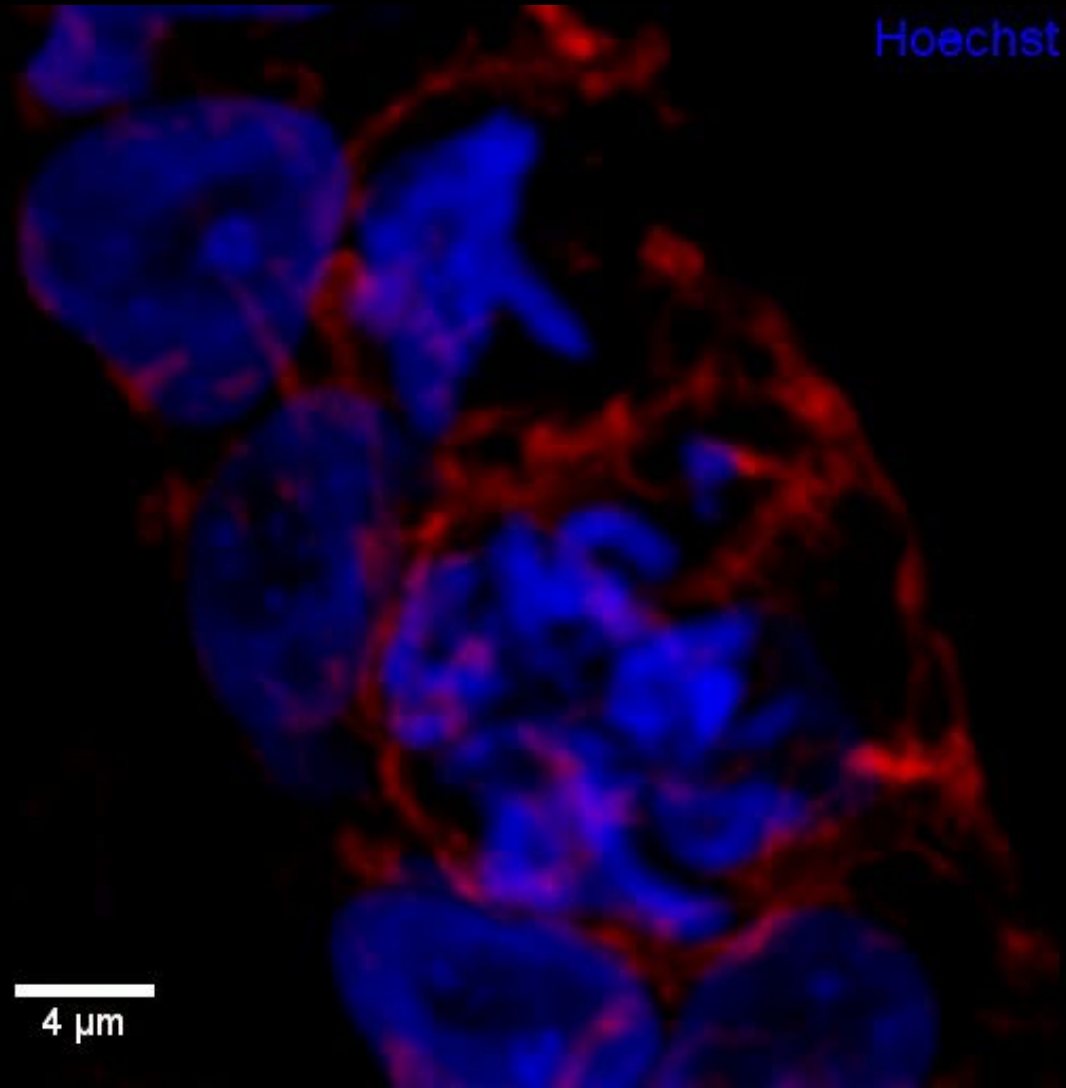
Células ectodérmicas de embrión de pollo.

• Comparación en la tinción fluorescente de ADN utilizando los marcadores Hoechst 33342 (azul) y verde de metilo (verde).

F actina-Faloidina (rojo).

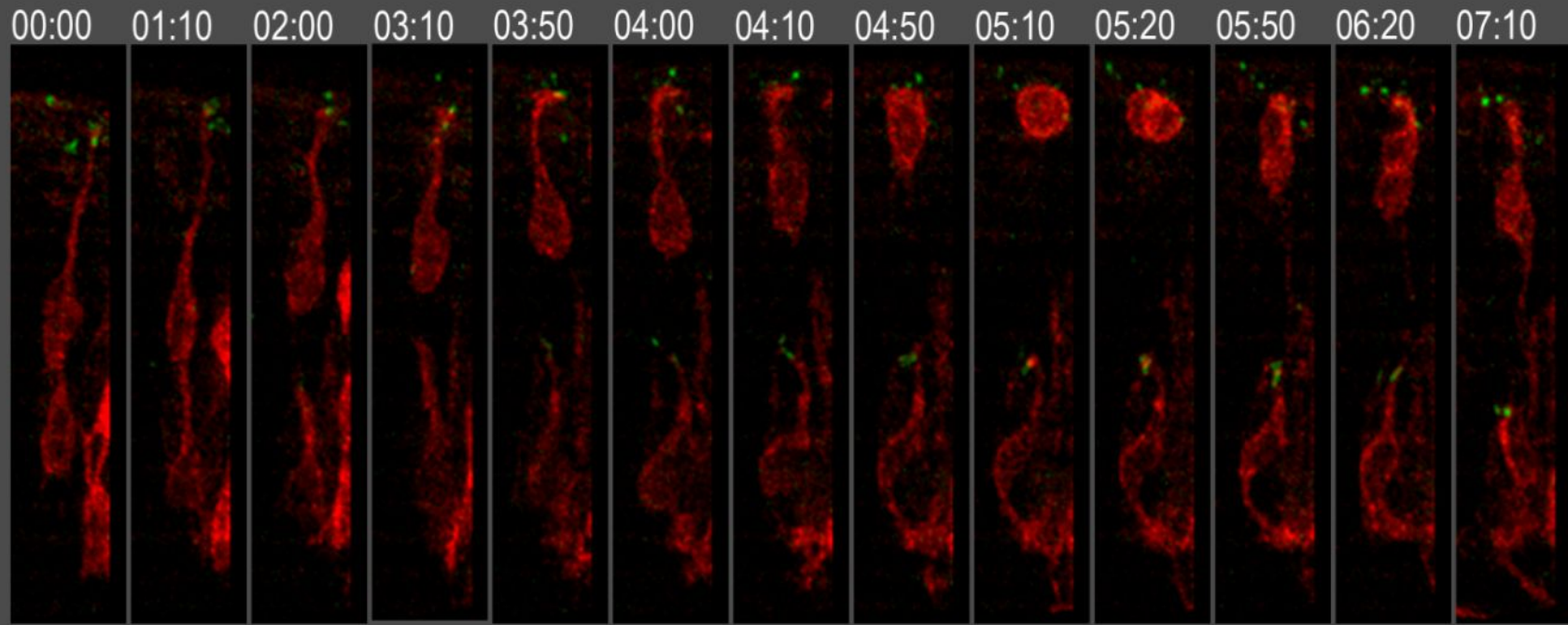
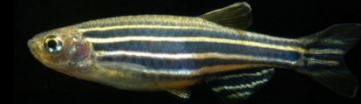
Microscopio confocal Leica SP5.  
Láseres: 405, 633 y 543.

4  $\mu$ m



Taken from:  
Prieto D., Aparicio G., Morande P.E., Zolessi F.R. (2014)  
A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green.  
Histochem Cell Biol 142(3):335-45.

- Estudio del desarrollo de la retina en zebrafish



Diferenciación y división de las células ganglionares

# Retina neural de un embrión transgénico de zebrafish (SoFa1) 72 hs post fecundación



Cyan: Crx:gapCFP; Verde:  
Ptf1a:GFP; Rojo:  
Atoh7:gapRFP.

Microscopio confocal Leica  
SP5.  
Láseres: 458, 488 y 543.



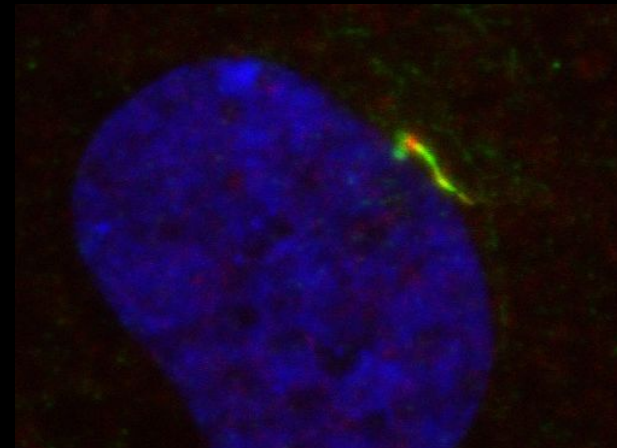
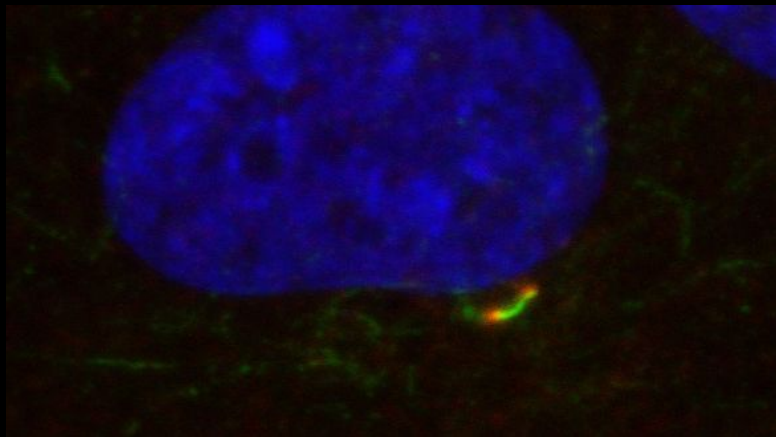
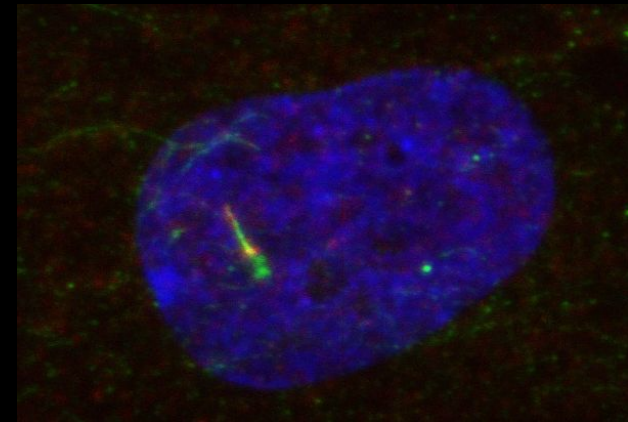
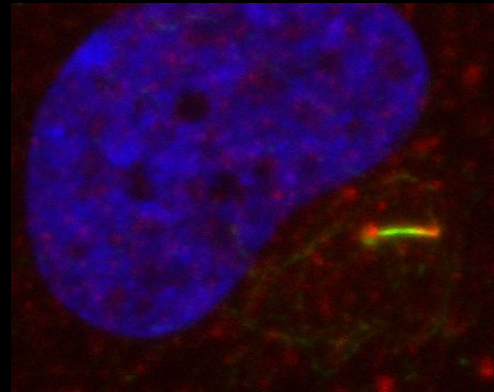


## Laboratorio de genética molecular humana

- **Cilias primarias en línea celular RPE (epitelio pigmentario de retina humana).**

DAPI (Azul),  
ARL13B (rojo),  
tubulina acetilada  
(verde)

Microscopio confocal  
Leica SP5.  
Láseres: 405, 488 y 543.



# Servicio de Microscopía de Epifluorescencia y Confocal

**Miembros Comisión Confocal**  
**Dr. Ángel Caputi**  
**Dra. Claudia Piccini**  
**Dra. Rosana Rodríguez Casuriaga**

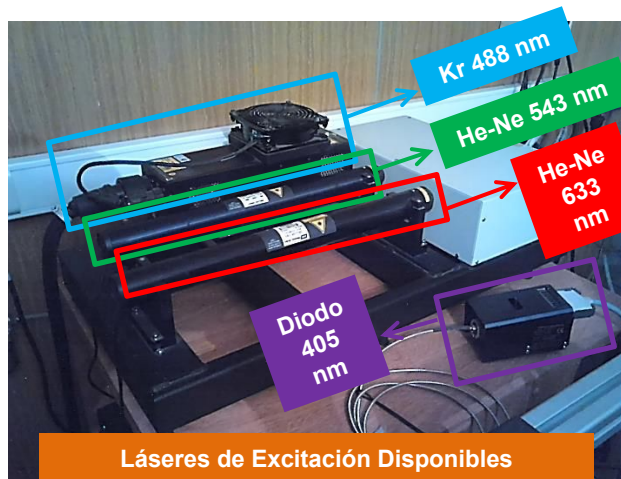
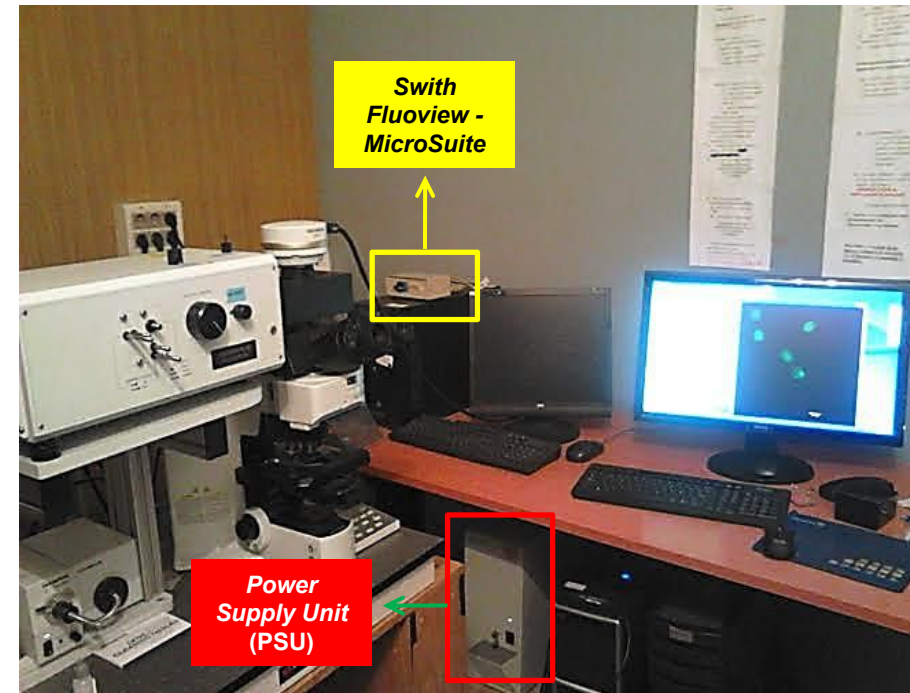
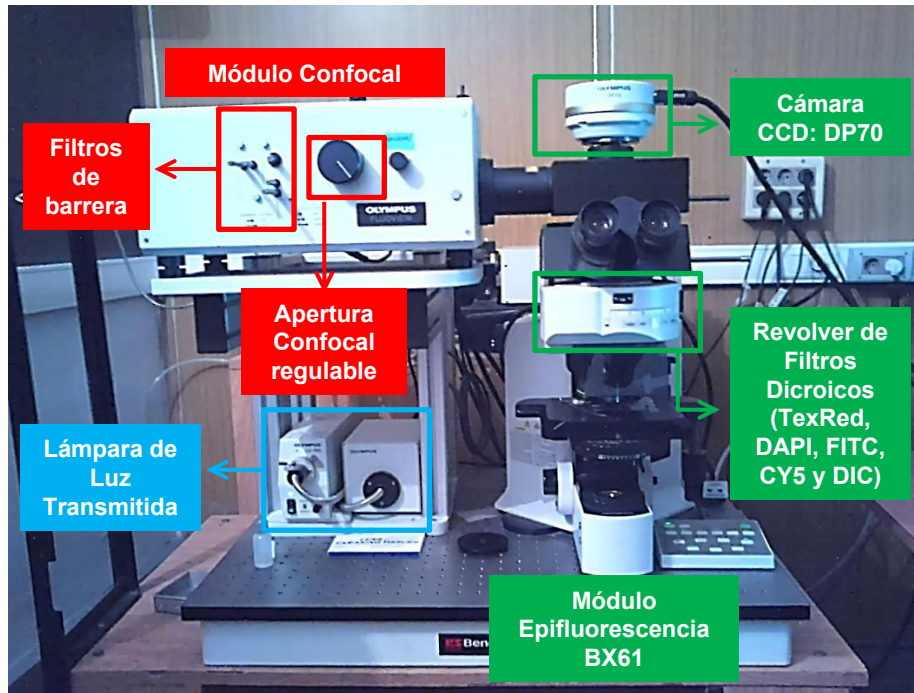
**Técnico Plataforma**  
**Lic. Andrés Di Paolo**  
**24871616 Int. 112**  
**[apdi Paolo@gmail.com](mailto:apdi Paolo@gmail.com)**



**Instituto de Investigaciones Biológicas  
Clemente Estable**

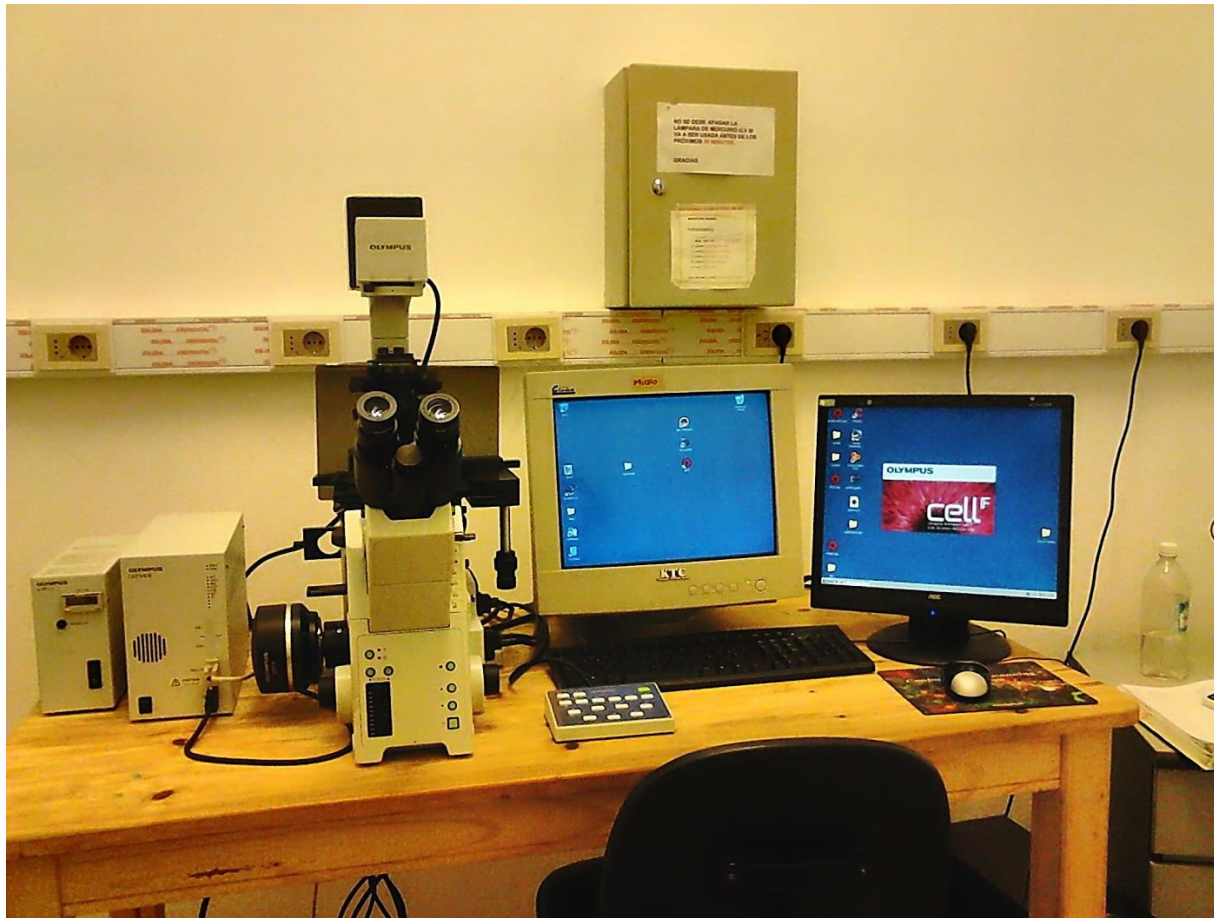


# Microscopio Láser Confocal



- \* Desarrollador: OLYMPUS Corporation
- \* Modelo: microscopio epifluorescencia BX61 con módulo confocal Fluoview 300
- \* Versión de software 5.0c (2008)
- \* Láseres de Excitación: Kr 488 – He-Ne verde 543 – HeNe rojo 633 – Diodo 405
- \* Módulo confocal con 3 Fotomultiplicadores y 6 filtros de barrera para amplio espectro de emisiones.

# Microscopio de Epifluorescencia Invertido



- \*Desarrollador:  
**OLYMPUS Corporation**
- \*Modelo: IX81
- \*Software disponibles:  
**CellF y DP Controller**
- \*Cámara CCD: DP71
- \*Filtros dicróicos para  
amplio rango de  
fluorocromos (como  
ser la GFP, Alexa Fluor  
488, 555, 594 y DAPI)
- \*Completo sistema de  
filtros de polarización  
para observaciones  
por Nomarski

# ALGUNOS NÚMEROS RESPECTO AL USO DEL CONFOCAL EN EL IIBCE

Alrededor de 40 publicaciones que utilizaron este sistema en los últimos 5 años

Un promedio elevado del número de horas de encendido de los láseres por año:

Kr 488 nm .... hrs.  
 HeNe 543 nm .... hrs  
 He-Ne 633 nm .... hrs  
 Diodo 405 nm .... hrs.

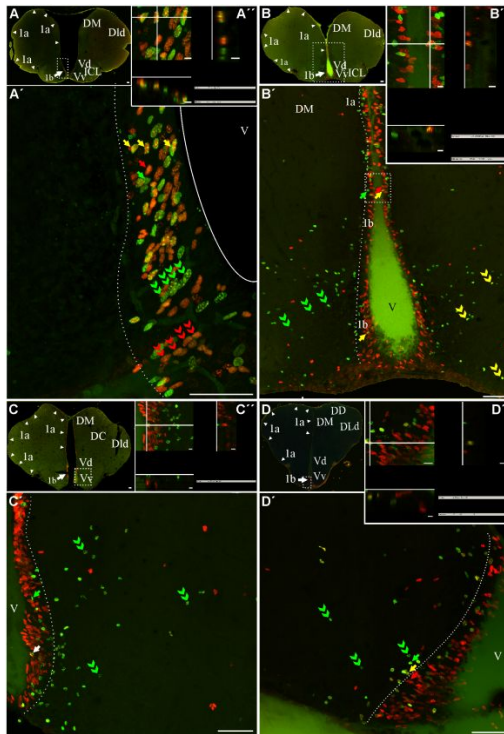
Gran parte de la semana en uso permanente y continuo

Cerca de 50 usuarios activos y otros tanto que se marcharon del IIBCE

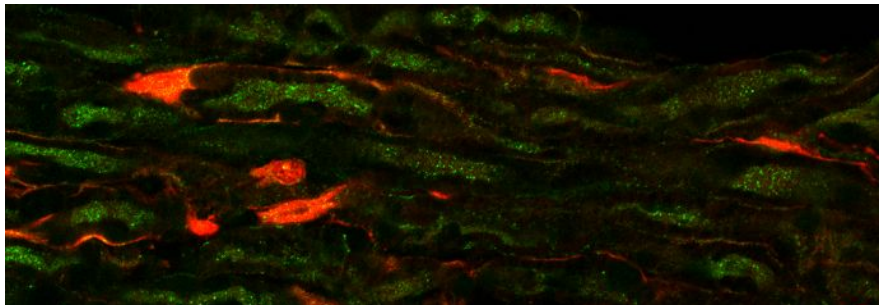
RESERVA DEL MICROSCOPIO CONFOCAL  
 Semana del 8 al 14 de Junio del 2015

DÍA	HORAS	DATOS DEL USUARIO				LÁSERES A UTILIZAR
		NOMBRE	USUARIO	TEL		
LUNES	08:00-10:00	Silvia	NFCM	171	TODOS	
	10:00-12:00	Di.Pablo	Geromica	112	TODOS	
	12:00-14:00	Di.PabloE. Astman	Geromica	112	TODOS	
	14:00-16:00	Inga Bernatogueta	NAC	110	488 543	
MARTES	08:00-10:00	Rosana	BM	130	405 488 633	
	10:00-12:00	Marta	UMIC	149	488 543 633	
	12:00-14:00	Silvia	NFCM	171	TODOS	
	14:00-16:00	Maria Ines R.	NFCM	110	488 633	
	16:00-18:00	Di.Pablo/Adriana Estrover	Miguelo FAI	112	TODOS	
	18:00-20:00	Rosana	BM	130	405 488 633	
MIÉRCOLES	08:00-10:00	Di.Pablo/Daniel Villar	Geromica	112	488 543 633	
	10:00-12:00	Silvia	NFCM	171	TODOS	
	12:00-14:00	MARTA NECS II	NFCM	110		
	14:00-16:00	Jessica Urtebarnechea	GNFE	115	543	
JUEVES	08:00-10:00	Marta	UMIC	149	488 543 633	
	10:00-12:00	Natalia Odono	LSCM	107	405 488	
	12:00-14:00	Inga Bernatogueta	NAC	110	488 543	
	14:00-16:00	Laura Leton	UJIC	124	405 488 543	
VIERNES	08:00-10:00	Laura Leton	PSI	121	488 543	
	10:00-12:00	Carlos Romeo	OPAN	170	TODOS	
	12:00-14:00	Carlos Romeo	OPAN	170	TODOS	
	14:00-16:00	gabriel	ifon	166	405 488 633	
SÁBADO	08:00-10:00	gabriel	ifon	121	488 543	
	10:00-12:00	Jessica	GNFE	115	405 488 543	
	12:00-14:00	Laura Leton	DGEN	135	405 488 543	
	14:00-16:00	Karina Cal	OPAN	170	405 488 543	
DOMINGO	08:00-10:00	Karina Cal	OPAN	170	405 488 543	
	10:00-12:00					
	12:00-14:00					
	14:00-16:00					

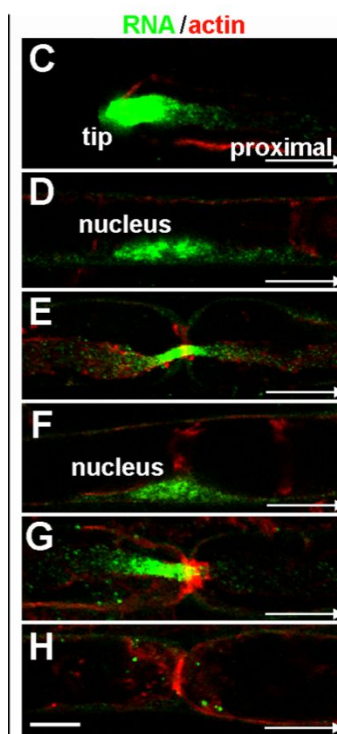
# ALGUNAS IMÁGENES OBTENIDAS CON EL CONFOCAL DEL IIBCE



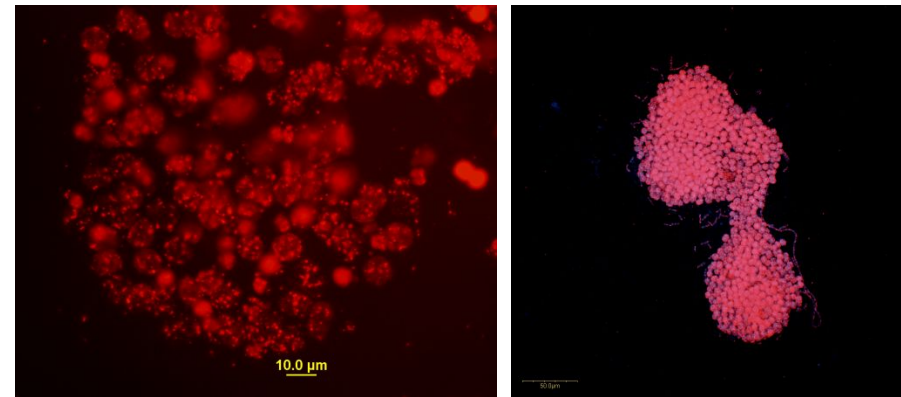
Olivera-Pasilio, V., Peterson, D. a., & Castello, M. E. (2014). *Frontiers in Neuroanatomy*,



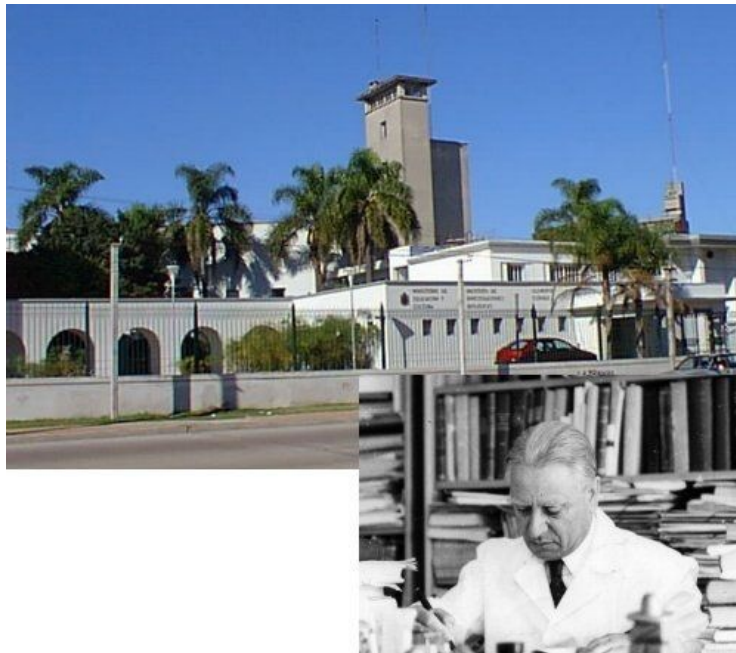
# ALGUNAS IMÁGENES OBTENIDAS CON EL EPIFLUORESCENCIA INVERTIDA DEL IIBCE



Canclini et al (2013). *Plos One*



# Servicio de Microscopía de Fuerza Atómica



Responsable: Dr. Juan C.  
Benech. Laboratorio de  
Señalización Celular y  
Nanobiología.

[jbenech@iibce.edu.uy](mailto:jbenech@iibce.edu.uy)

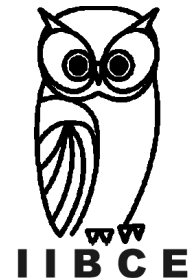
Técnica de Plataforma: Inés  
Rauschert.

[irauschert@iibce.edu.uy](mailto:irauschert@iibce.edu.uy)

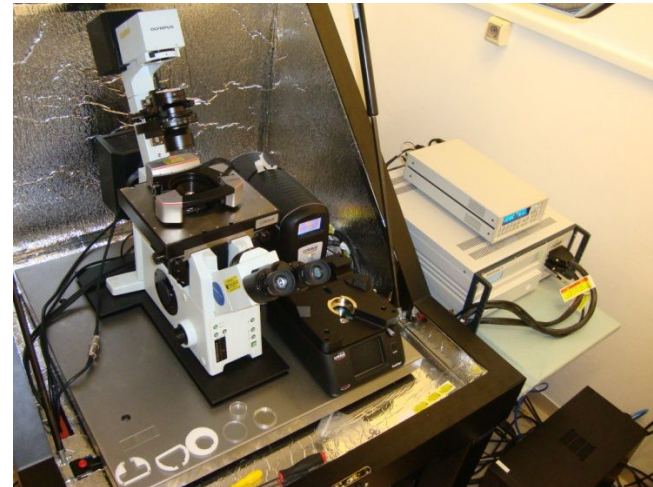
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

CLEMENTE ESTABLE

**mec**  
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA



# “Optical and Atomic Force Microscopy: An Integrated Approach to Life Science”



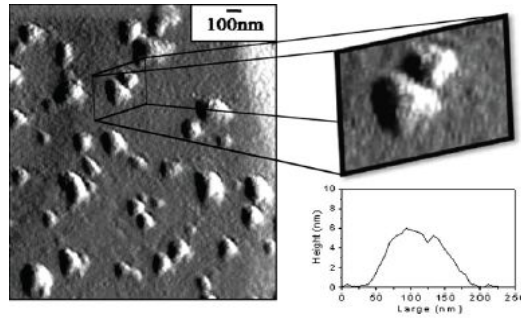
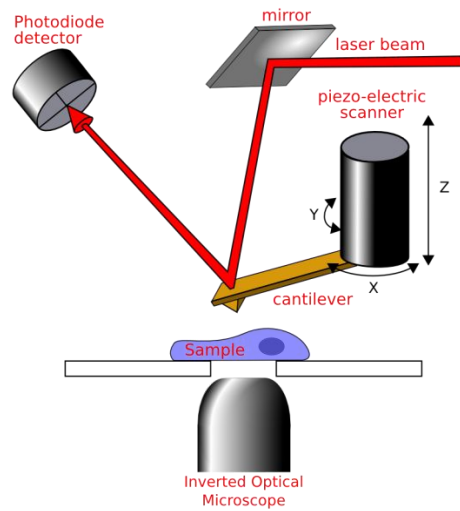
El AFM (BioScope Catalyst), está acoplado a un microscopio invertido de epifluorescencia

Técnico de Plataforma: Inés Rauschert [iruschert@iibce.edu.uy](mailto:iruschert@iibce.edu.uy).

Responsable de Plataforma: Dr. Juan C. Benech [jbenech@iibce.edu.uy](mailto:jbenech@iibce.edu.uy)



# Imagenología de alta resolución



Nanopartículas de Plata

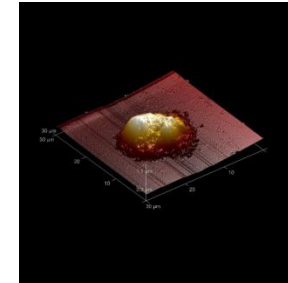
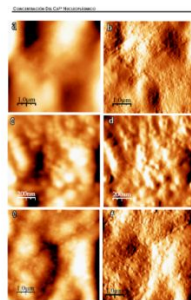
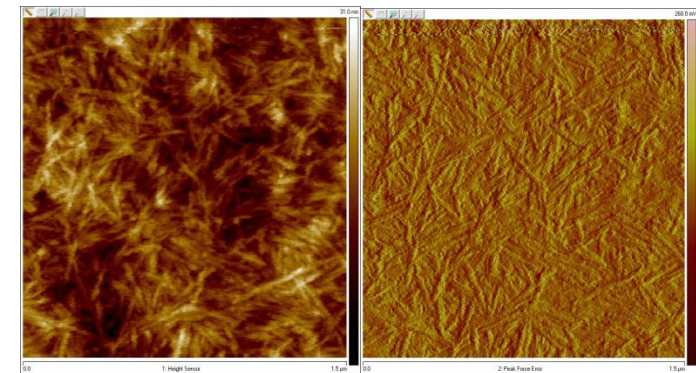
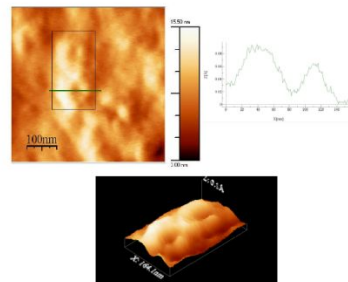


Imagen 3D de célula tumoral

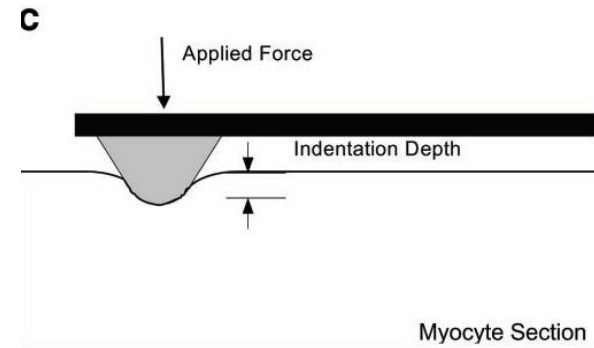
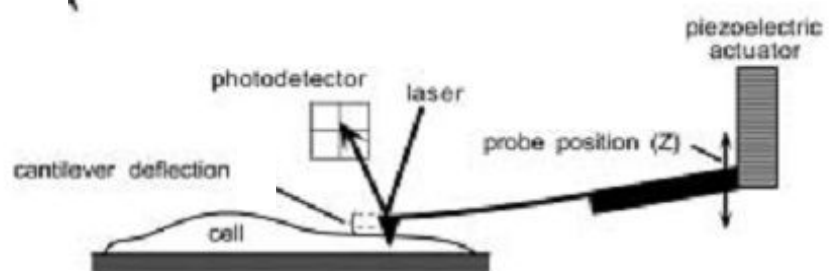
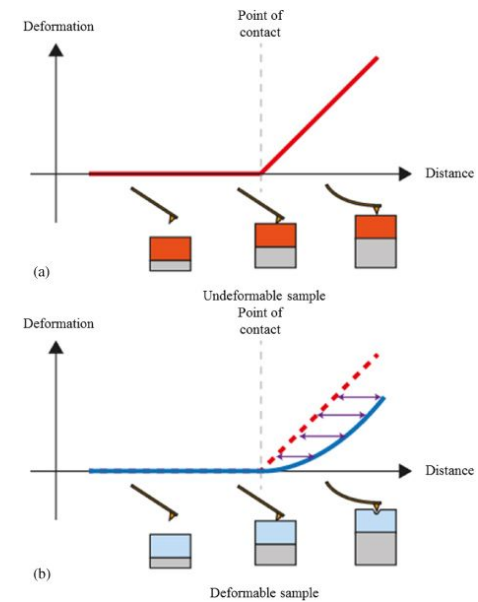
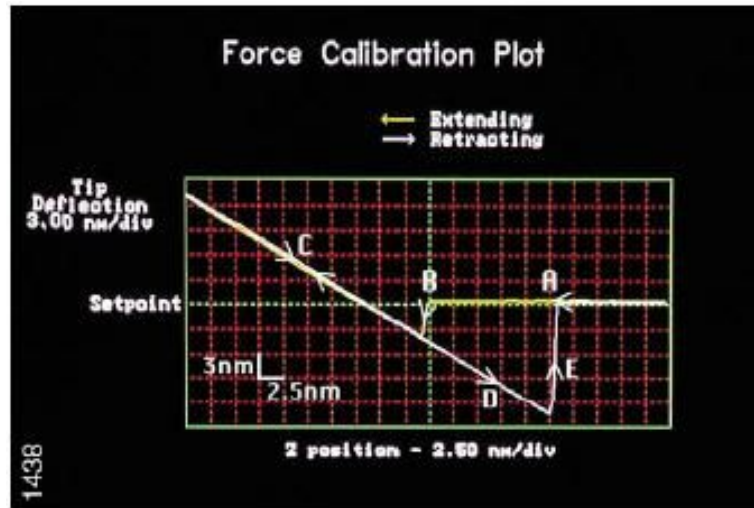


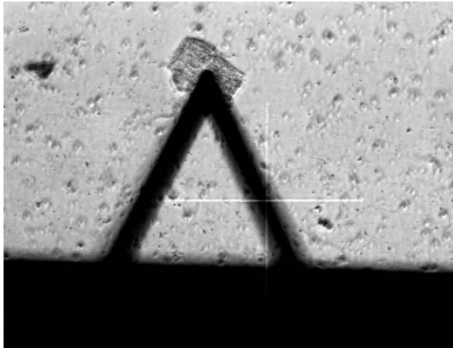
Nuclear Pore Complex rat liver nuclei



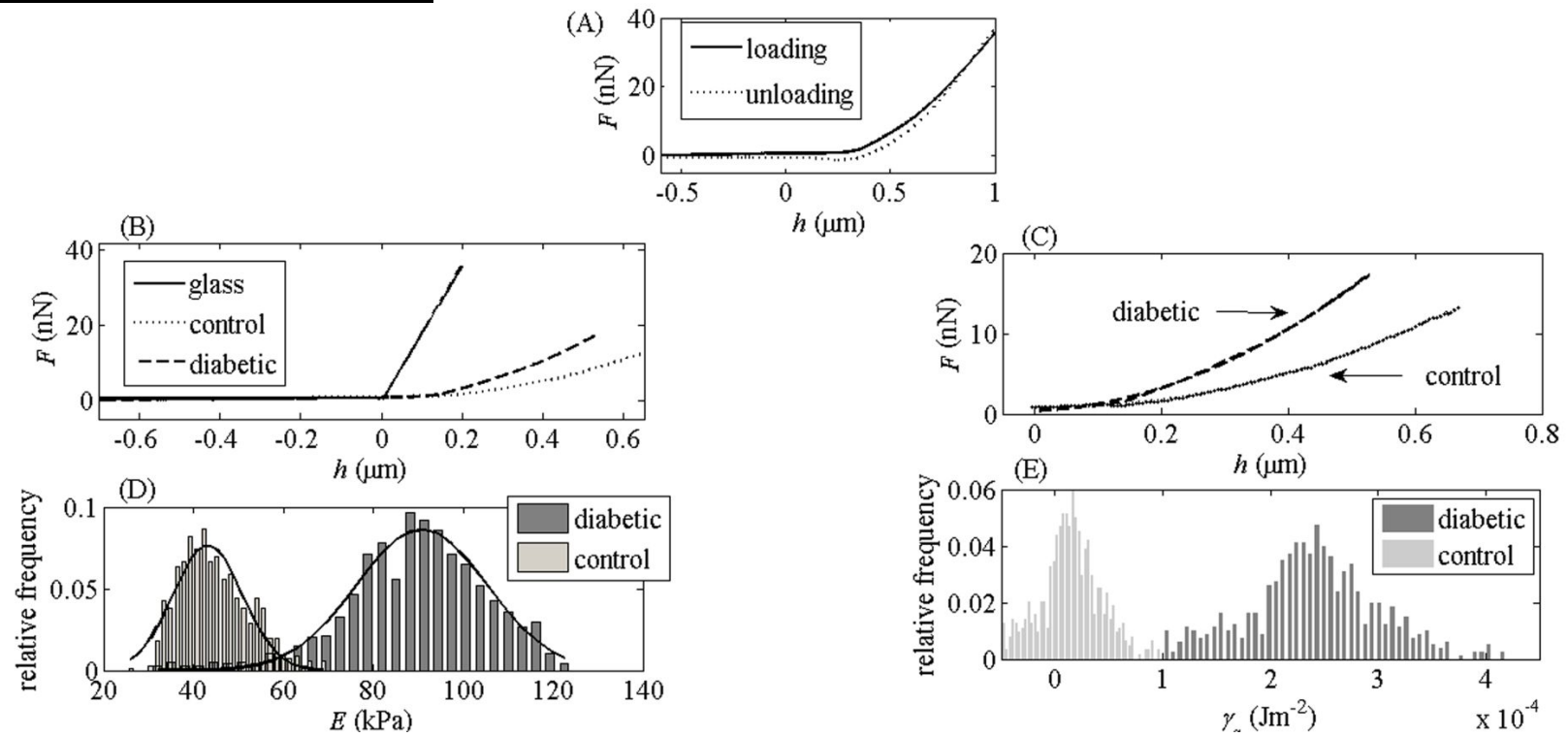
Fibras  $\alpha$ -synuclein

# Curvas de fuerza y elasticidad. Nanoindentación.

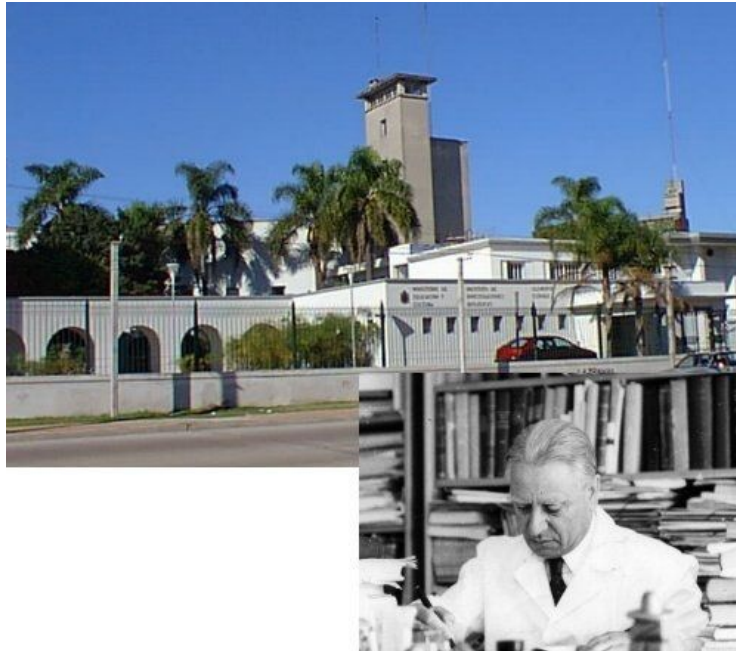




## Curvas de Fuerza y Módulo Elástico Aparente (E)



# Servicio de Microscopía Electrónica de transmisión



**Miembros de la comisión:**

**Dr. Omar Trujillo-Cenóz**  
[otrujillo@iibce.edu.uy](mailto:otrujillo@iibce.edu.uy)

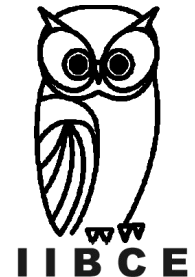
**Dr. Pablo Zunino**  
[pzunino@iibce.edu.uy](mailto:pzunino@iibce.edu.uy)

**Dra. Alejandra Kun**  
[akun@iibce.edu.uy](mailto:akun@iibce.edu.uy)

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

**CLEMENTE ESTABLE**

**mec**  
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA



# Microscopio Electrónico del IIBCE



**Modelo fabricado en  
Japón por la compañía  
JEOL (100CXII).  
Está equipado con una  
cámara digital lateral.  
En este modelo es  
posible operar con  
electrones acelerados  
con distintos voltajes  
(20, 40, 60, 80 y 100 KV)  
y cubre un amplio  
rango de aumentos  
(desde X 1900 hasta X  
320000).**

# Unidad de Microscopía Confocal

Facultad de Medicina

Universidad de la República

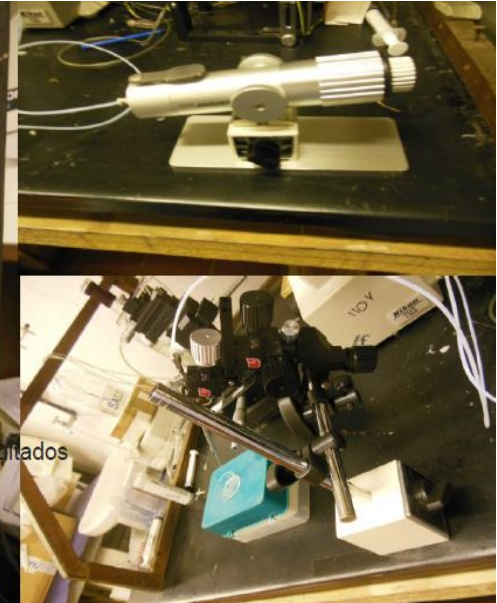
**A. EQUIPOS**

*Responsables: Gustavo Brum y Gonzalo Ferreira*

## I. Microscopio Confocal Leica SP5 con perfusión controlada y electrofisiología



## II. Microscopios de Epifluorescencia Olympus IX8.1 Computer Assisted Sperm Analysis



## **B. LINEAS DE TRABAJO USUARIOS HABITUALES (ejemplos por orden alfabético investigadores)**

**Verónica Abudara** *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina.* “Modulación de las interacciones neuro-glio-vasculares mediadas por conexinas, panexinas y óxido nítrico y su impacto en el funcionamiento cerebral en condiciones de salud y enfermedad.”

**Gabriel Anesetti/ Rossana Sapero** *Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina.* “Efecto de la exposición neonatal a andrógenos sobre la actividad ovárica”. Observación de cortes de ovario de ratas de diferentes edades marcadas con anticuerpos anti receptores esteroideos, receptores de neurotrofinas, marcadores de proliferación y apoptosis.

**Marcel Bentancor.** *Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias.* “Optimización de visualización de GFP (sensible a redox) en Arabidopsis para dictado de un práctico sobre estrés oxidativo en Facultad de Ciencias.”

**Gustavo Brum (Lab. Biof. Músculo)** *Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina.* “Estudios de centellas (sparks) en músculo esquelético de mamífero ante situaciones de fatiga”.

**Patricia Cassina, Laura Martínez Palma** *Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina.* “Participación mitocondrial en la neurotoxicidad de astrocitos.” Implica observación de mitocondrias en astrocitos con Mitotracker Green FM (Molecular Probes) para medida de tamaño mitocondrial. “Evaluación de poblaciones gliales en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) y respuesta a terapias dirigidas a la mitocondria” con evaluación de marcadores de tipo celular y de proliferación en cortes de médula espinal de ratas ALS.

**Silvia Chifflet (Lab cicatrización epit)** *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.* “Estudio de las vías desencadenantes en la estabilización y desestabilización de uniones intercelulares por los cambios en el potencial de membrana”. Se usa el microscopio confocal para el estudio de las uniones intercelulares en corneas extraídas de vaca preservadas en distintos medios hiperpolarizantes. Se estudió por inmunofluorescencia como varían las uniones en la córnea visualizando las proteínas cadherina, actina, alfa-catenina, beta-catenina y cadena liviana de miosina fosforilada.



**Gonzalo Ferreira (Lab Can Iónicos)** *Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina.* “Estudio de agentes contaminantes ambientales en canales iónicos y calcio intracelular en células aisladas de músculo cardíaco y espermatozoides”. “Innovación en terapéutica farmacológica a nivel cardiovascular y espermatozoides valorando efectos en función celular, canales iónicos y calcio intracelular”.

**Lucía Guggeri (epifluorescencia) (Laboratorio de interacciones moleculares),** *Facultad de Ciencias* Se usa el microscopio de epifluorescencia para determinar la localización subcelular de TcNDPK1, proteína que interacciona con los repetidos TG para conocer su posible función en la regulación de la expresión génica. (se utiliza DAPI para teñir el núcleo y anticuerpos específicos anti-TcNDPK1).

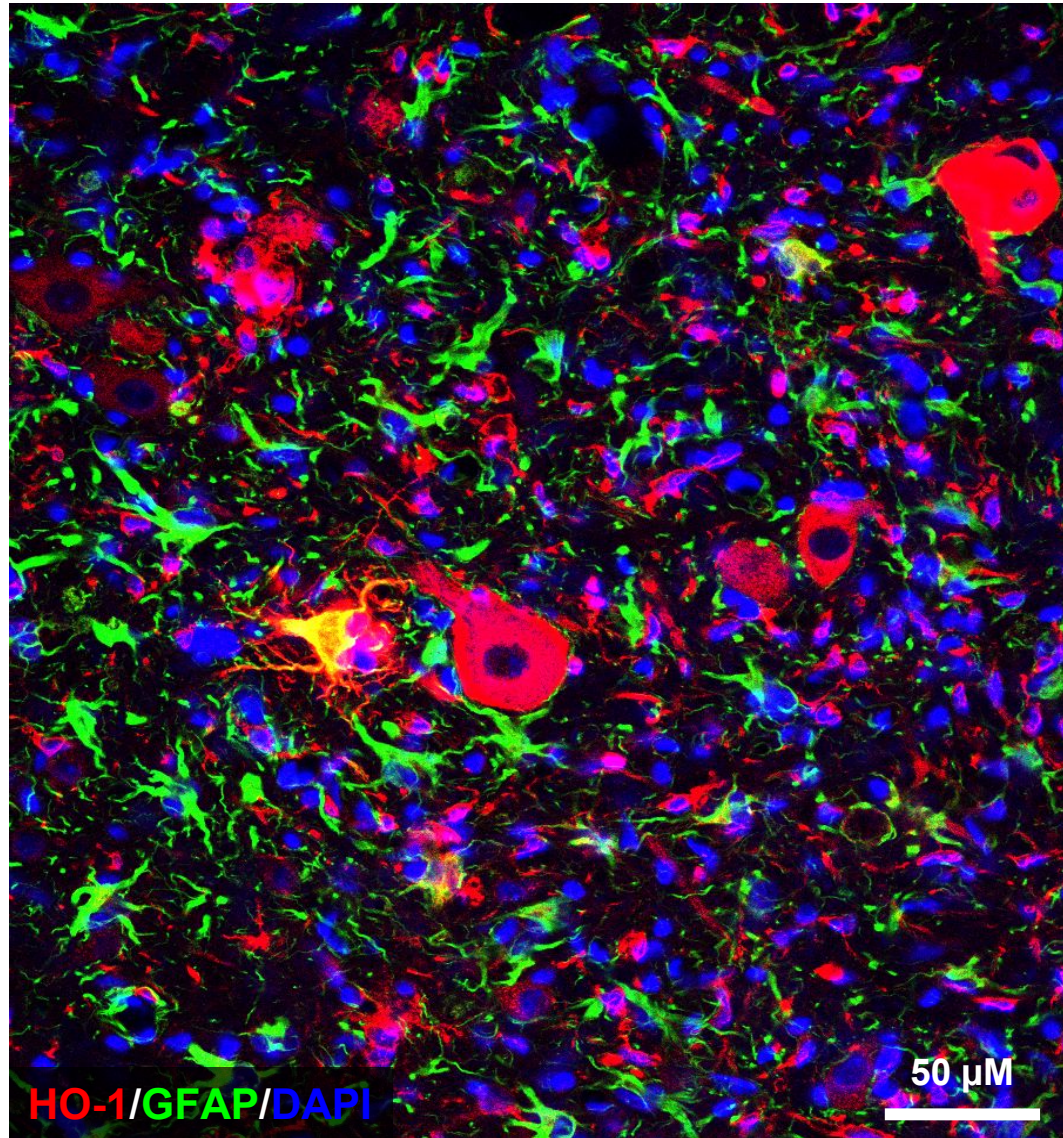
**Laura Lafón /Pablo Liddle / Ana Laura Reyes** *Departamento de Genética, IIBCE* Visualización de territorios cromosómicos en núcleos interfásicos mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), inmunocitoquímica en núcleos interfásicos contrateñidos con DAPI Y “Localización del daño celular primario en retinas de ratón, mediante marcación con anticuerpos anti-gammaH2AX”. Escaneos en eje Z para realizar reconstrucciones 3D y ensayos de colocalización. Para ello triple marcado de núcleos de la línea celular HL-60 teñidos con DAPI, cr 18 en rojo (DIG.Cy3) y cr 19 en verde (BIO. Strep-Alexa488) ó dobles y triples inmunes (ARN polII, H3K9trimet,yH3K4 trimet) y con marcadores de fase S (EdU).

**Martín Masner** *Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene.* Se observan cultivos de líneas tumorales mamarias infectados con salmonellas atenuadas fluorescentes (GFP). Se sigue el proceso de invasión y replicación a distintos tiempos y se observa el efecto sobre la célula infectada. Se realiza contrateñimiento con DAPI y citoesqueleto con phaloídina (Alexa 555).

**Milka Radmilovich/ Paula Pouso** *Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina y Unidad Bases neurales de la conducta, IIBCE.* Observación de cortes histológicos del SNC de peces y anuros procesados para inmunodetección de neuropéptidos, genes de respuesta temprana, marcadores nucleares, marcadores neuronales, receptores hormonales.

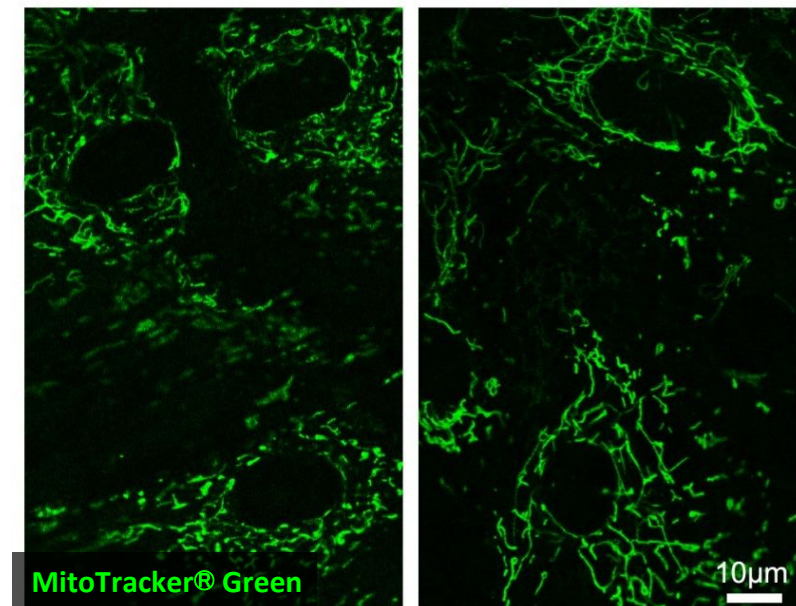
## C. RESULTADOS (algunos labs seleccionados)

1-Patricia Cassina/Laura Martínez Palma - [lmartinezpalma@fmed.edu.uy](mailto:lmartinezpalma@fmed.edu.uy)

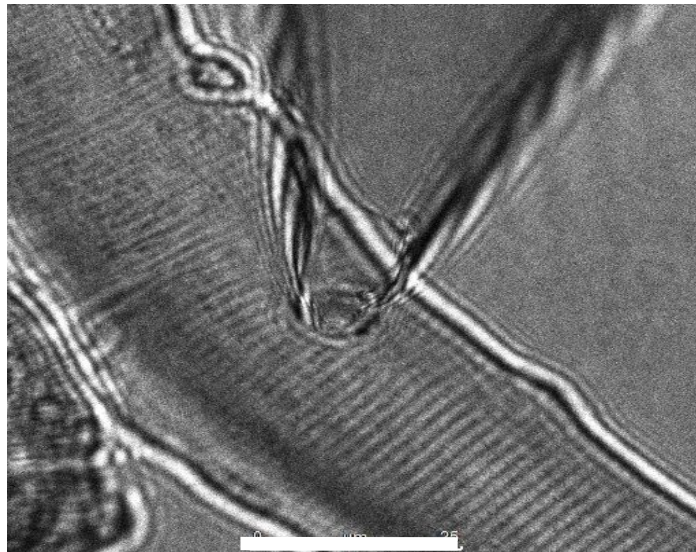
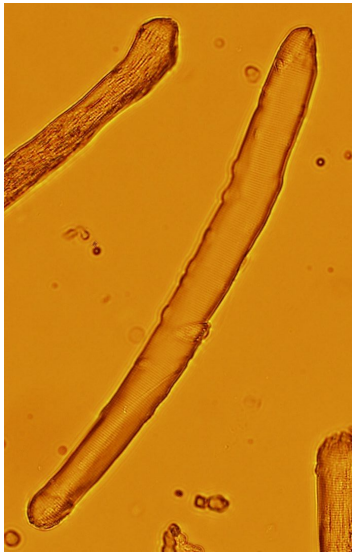


**Papel de la mitocondria en el fenotipo de las células gliales: estudios en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica**

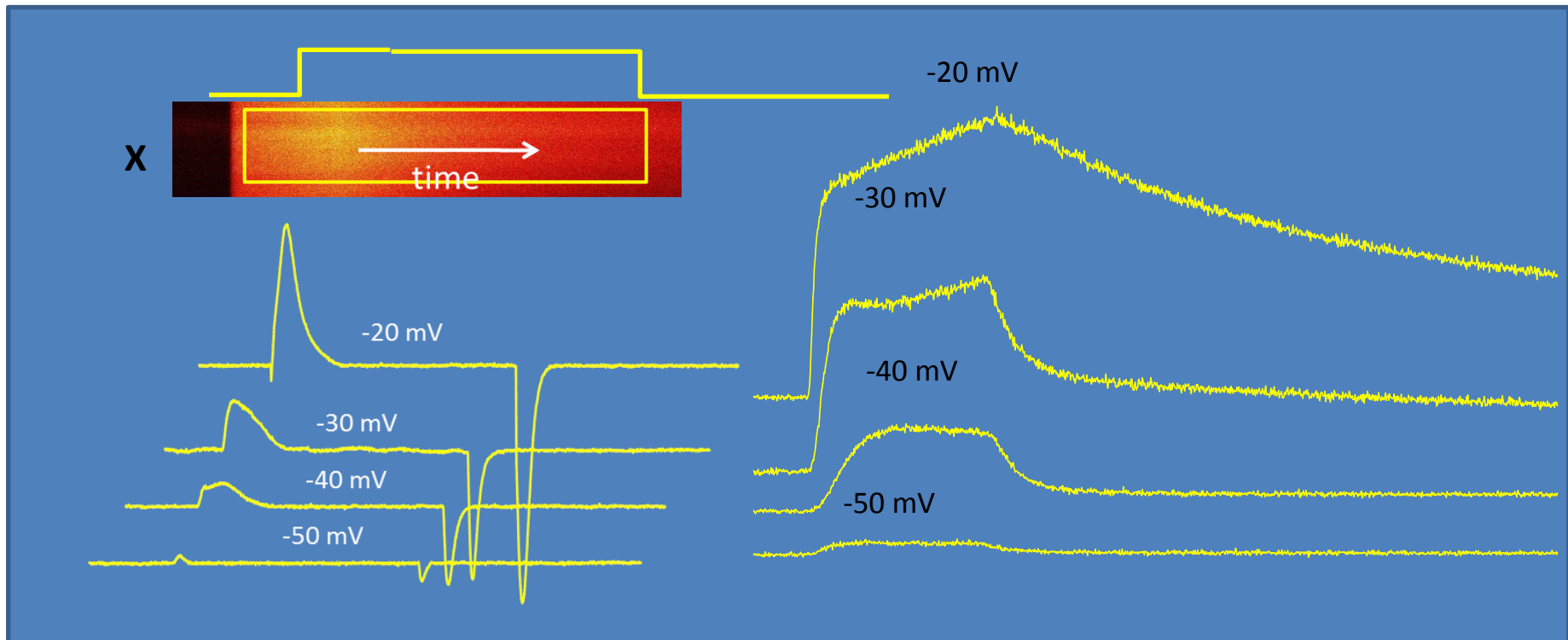
Neuronas y glias de rata



**2- Gustavo Brum. Laboratorio de Biofísica del Músculo. gbrum@fmed.edu.uy**

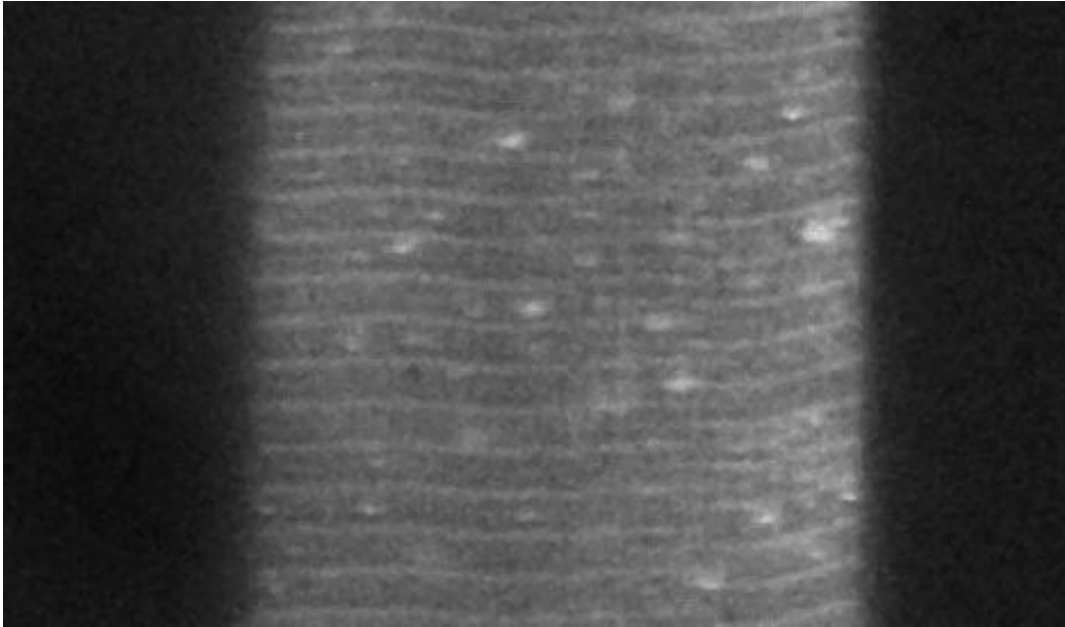


**Músculo Esquelético de Ratón**

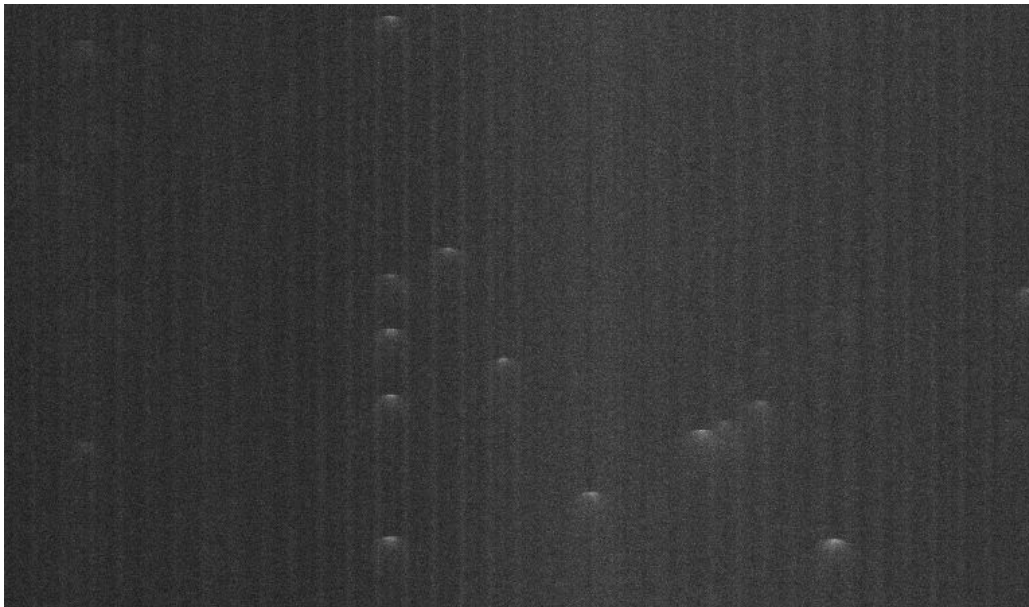


## Músculo Esquelético de Rana

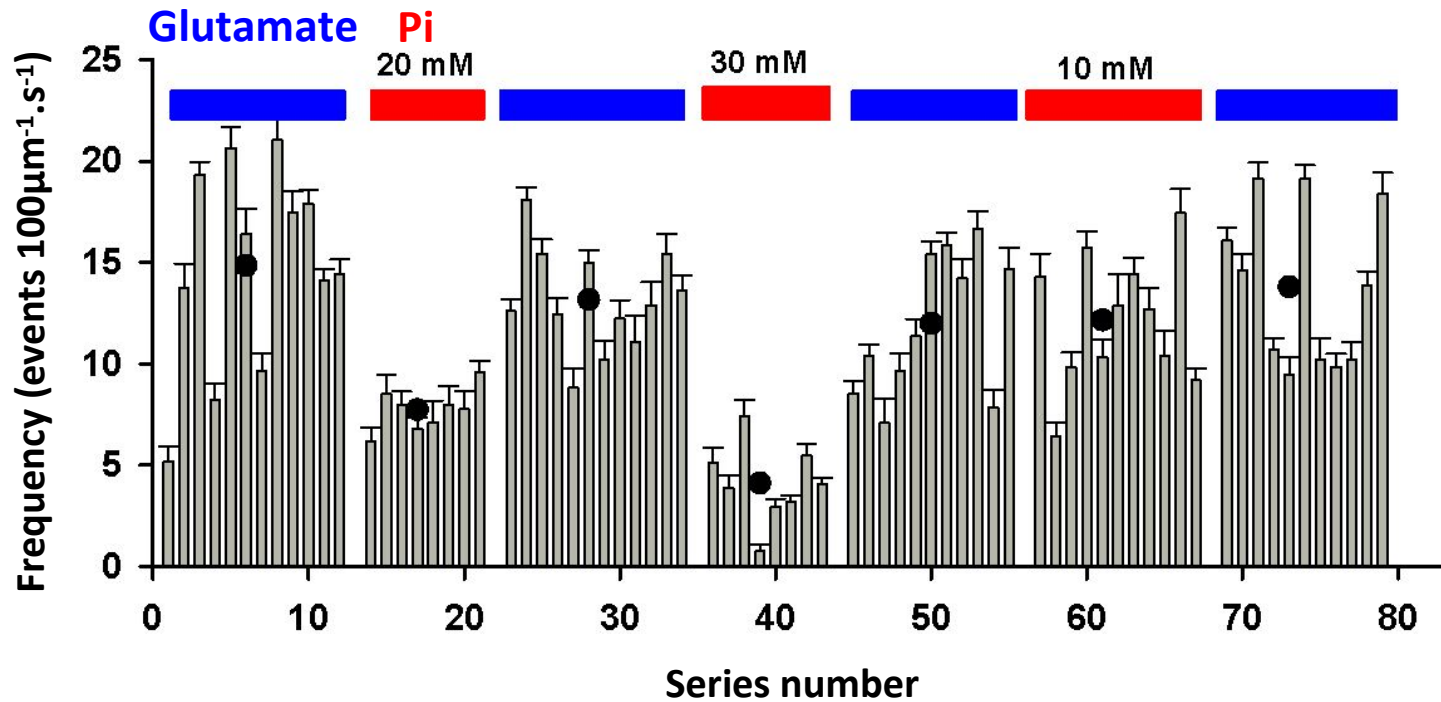
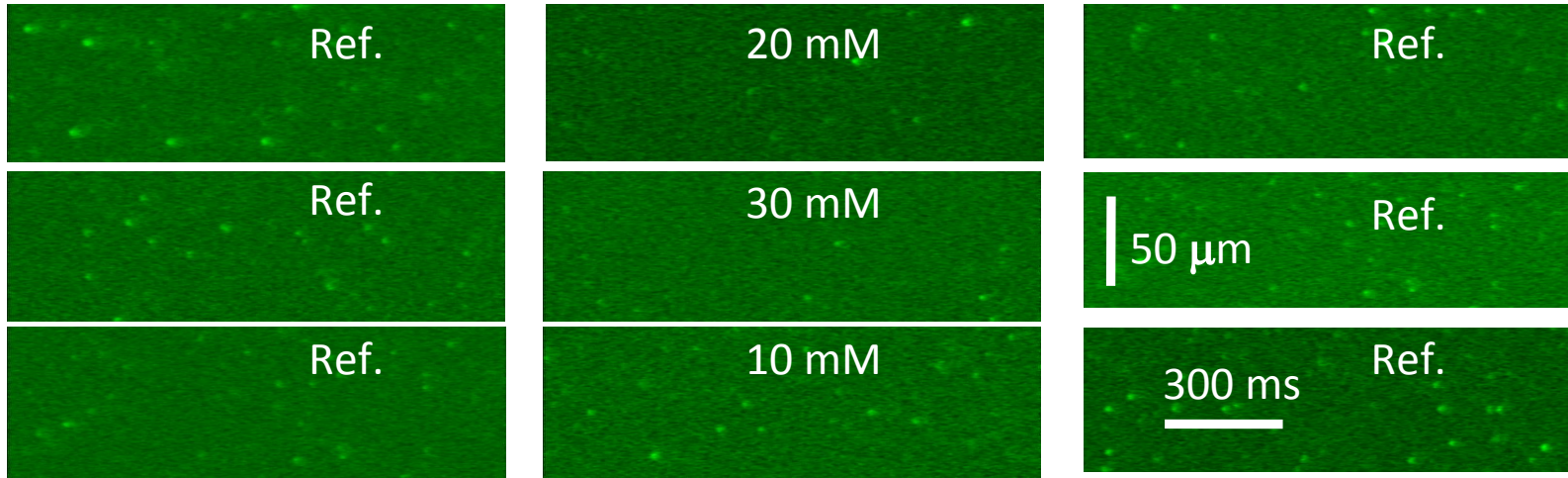
xy scan



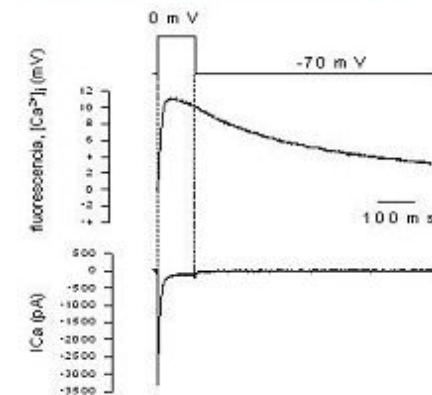
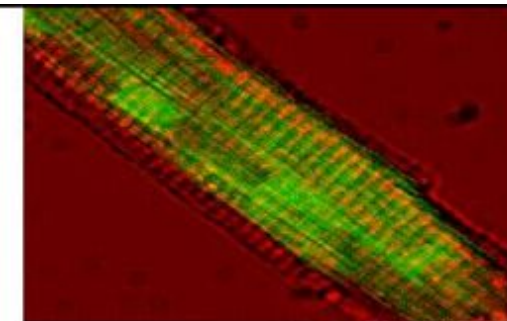
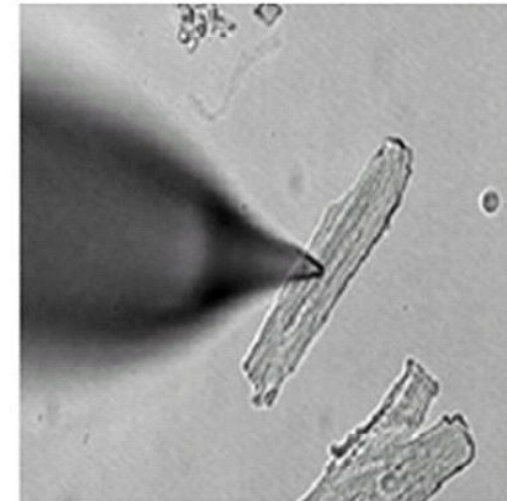
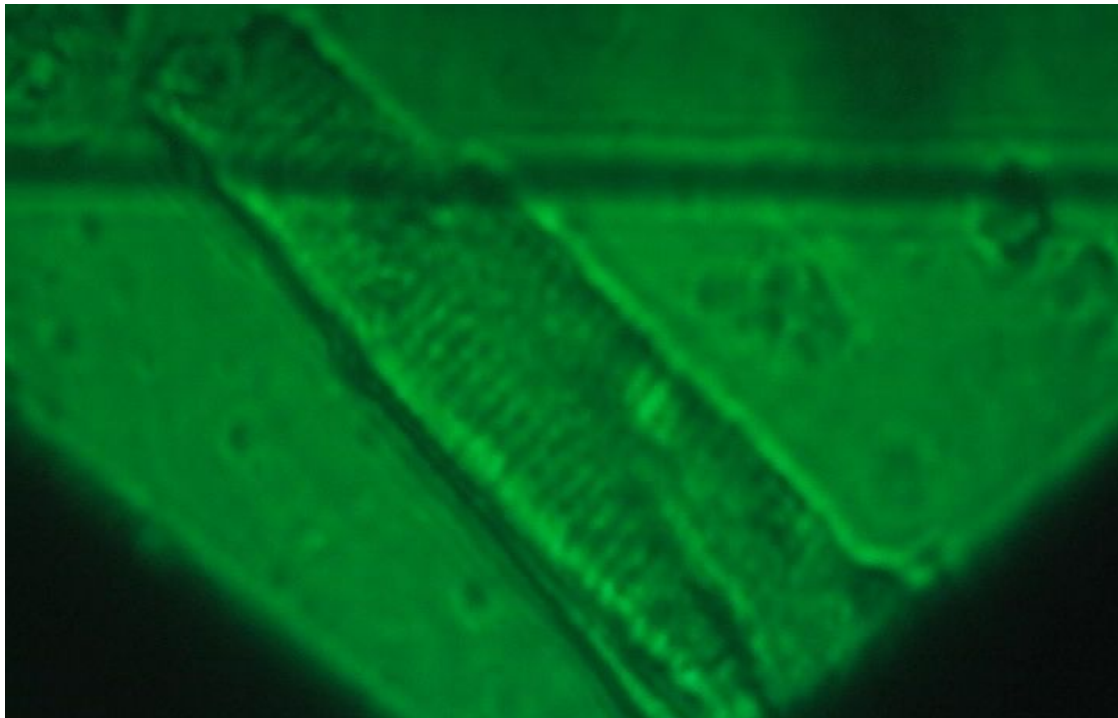
XT



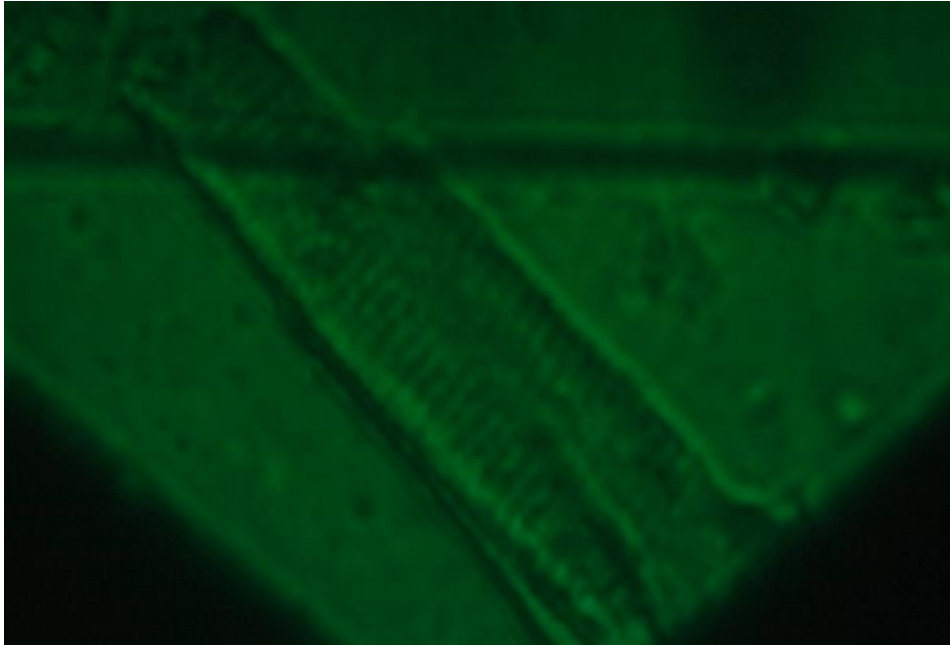
xt scan



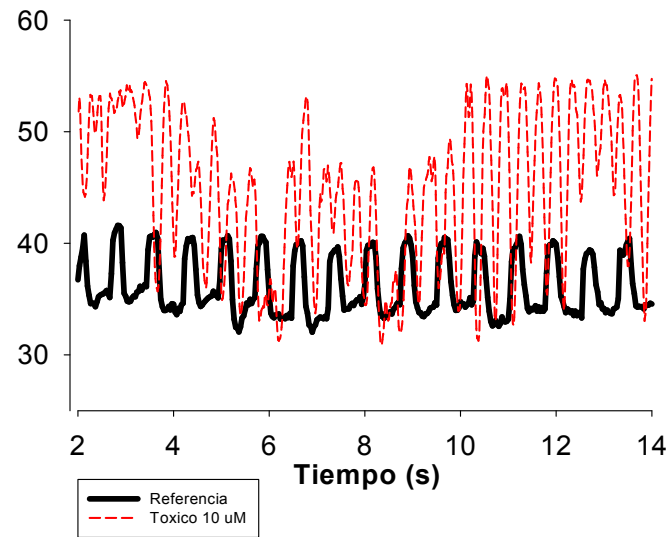
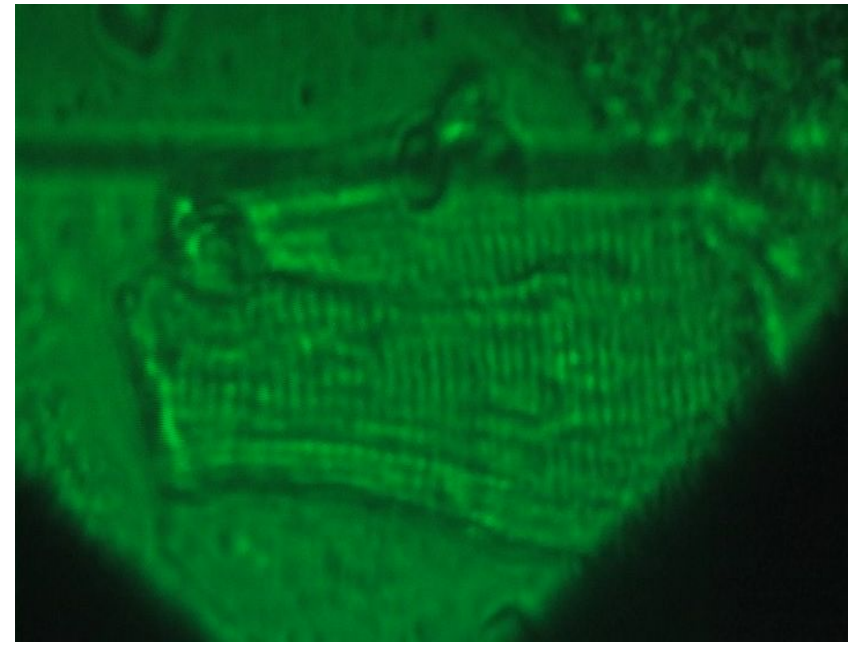
Músculo Cardíaco de Cobayo



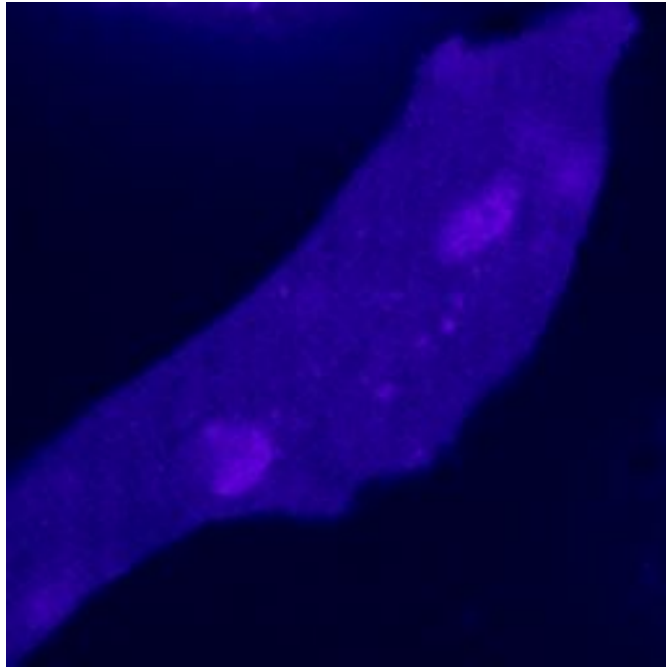
Ctrl



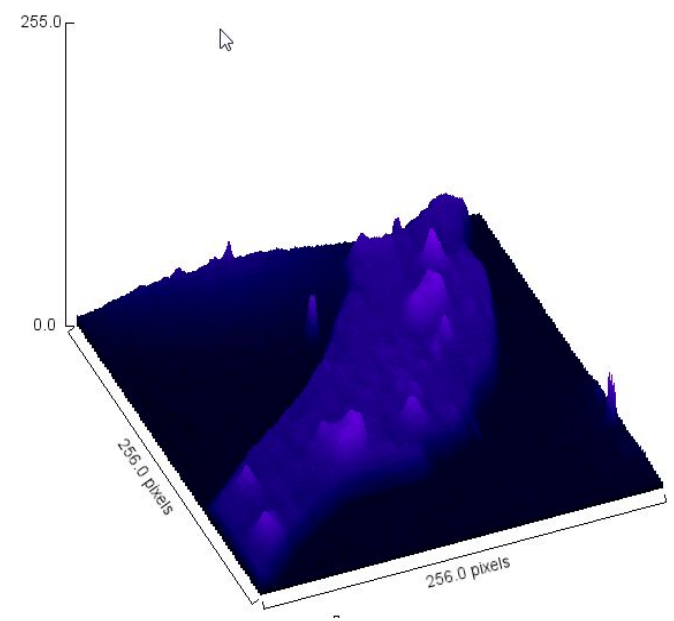
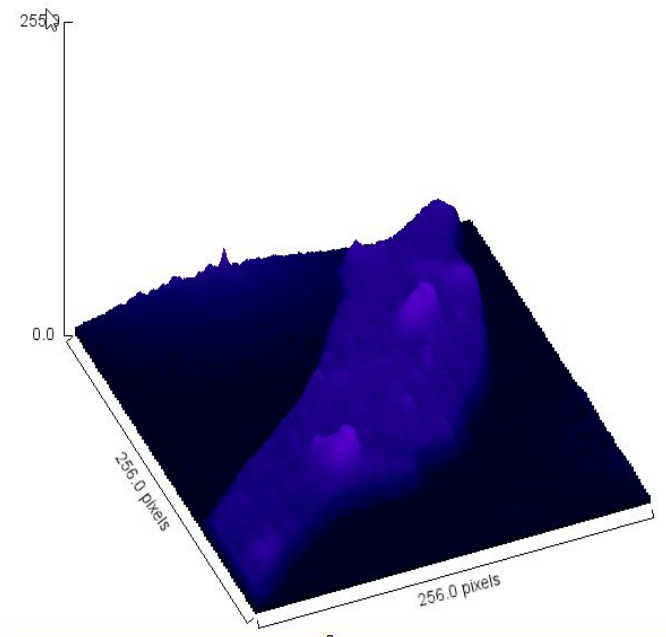
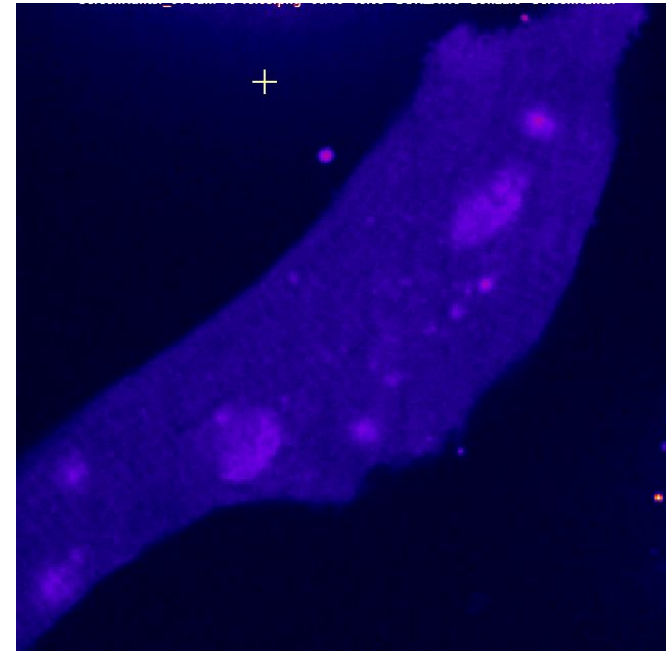
Toxico 10-30 uM



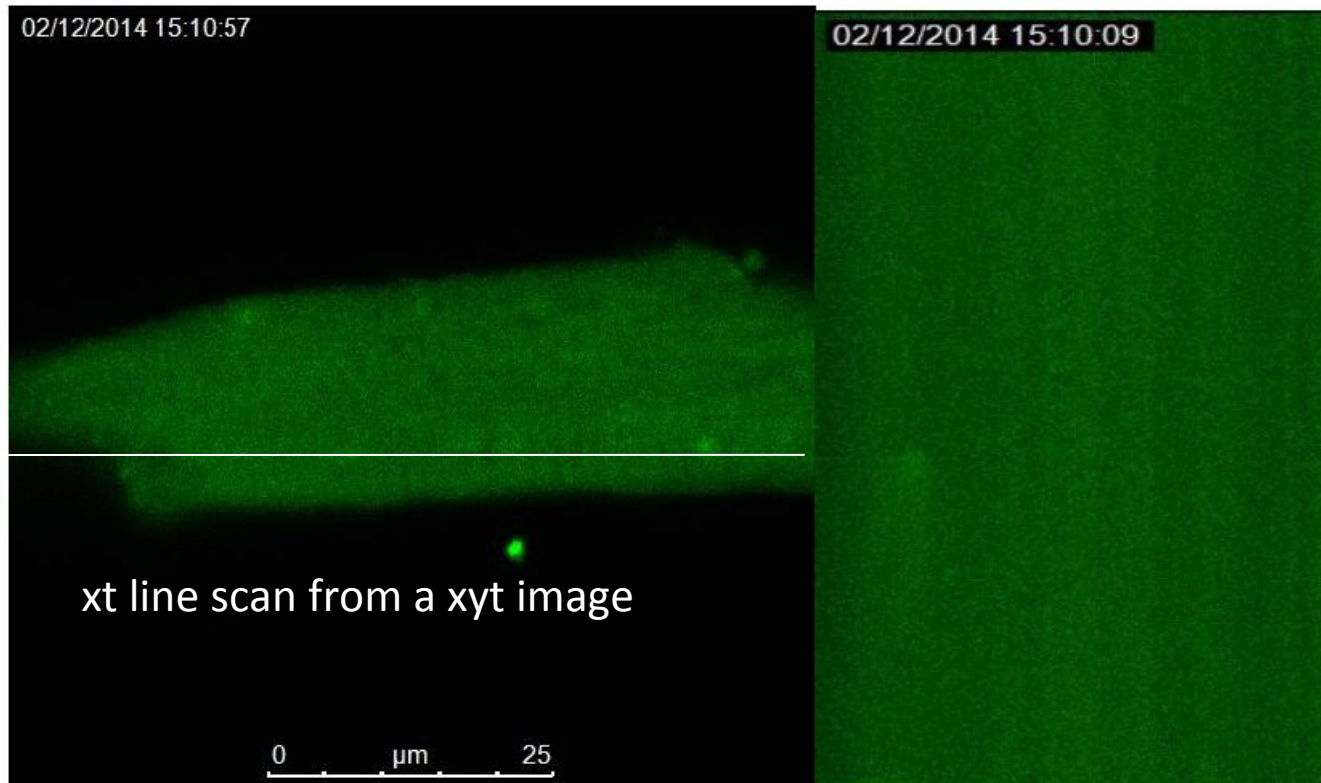
t1



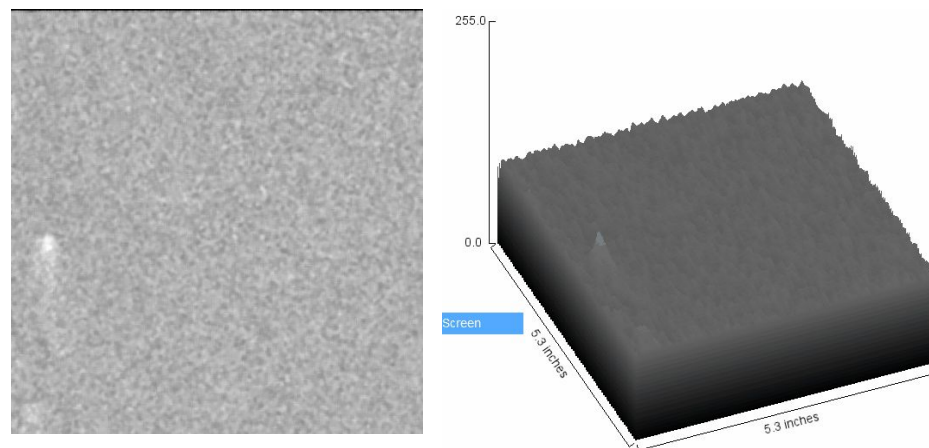
t2







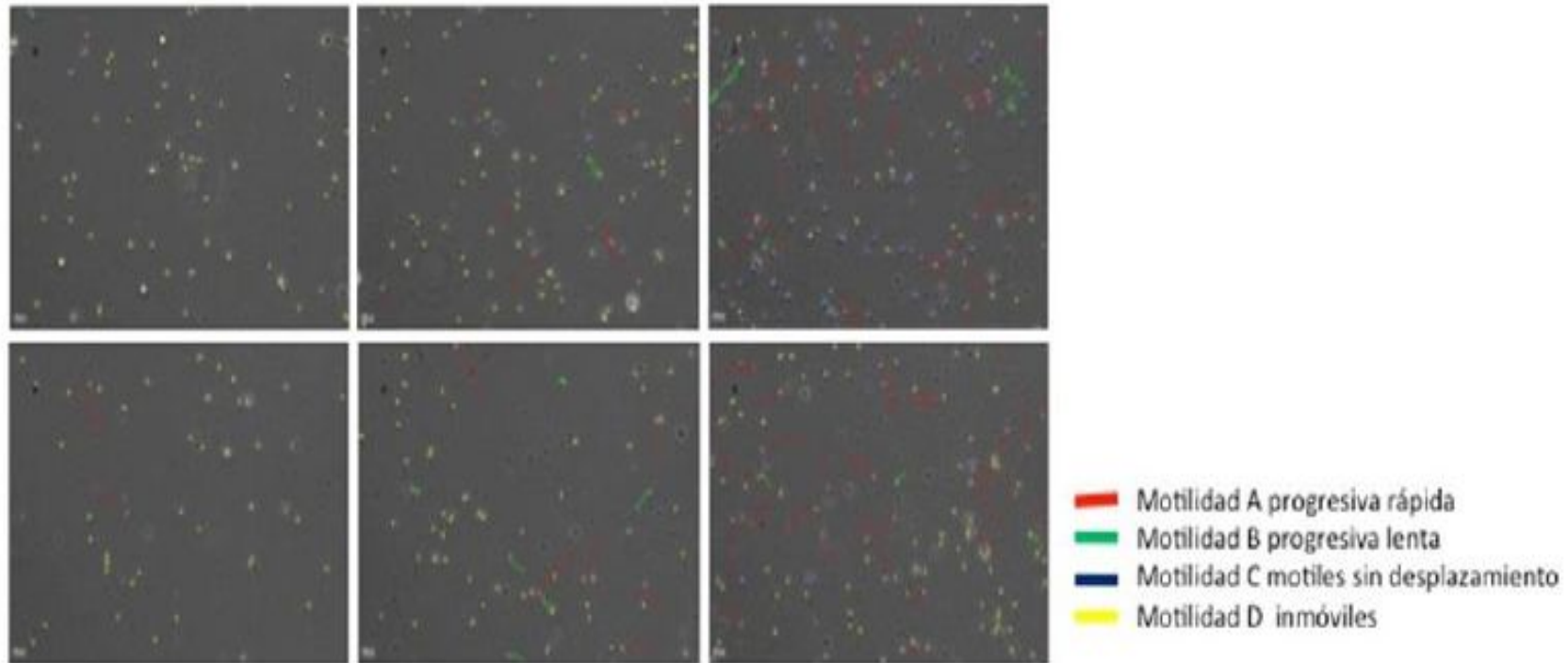
**Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  sparks upon exposure to toxic agents**



## Espermatozoides Humanos

### *Sistema de Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)*

(Imágenes típicas de videos para análisis motilidad)



### **D. AGRADECIMIENTOS**

Gustavo Brum ([gbrum@fmed.edu.uy](mailto:gbrum@fmed.edu.uy))

Mariana Di Doménico ([marianadidomenico@gmail.com](mailto:marianadidomenico@gmail.com))

Se ag