

CS - 285 / 2025

HURLINGHAM, 26/11/2025

VISTO el Estatuto, el Reglamento para las Actividades de Capacitación de la Universidad Nacional de Hurlingham (RCS. N° 38/2018) y el Expediente N° 967/2025 del registro de esta Universidad, y

CONSIDERANDO:

Que la Universidad tiene como objetivo contribuir al mejoramiento de la calidad de la vida de la comunidad transfiriendo tecnologías, elevando el nivel sociocultural, científico, político y económico con el fin de formar personas reflexivas y críticas con respeto al orden institucional y democrático y que desarrollen valores éticos y solidarios. -

Que con ese objetivo la UNAHUR se propuso incorporar a la oferta académica de esta Universidad cursos, módulos o trayectos encadenados de carácter extracurricular y que están dirigidas a estudiantes, graduados, profesores y no docentes de la Universidad, así como a toda persona interesada sea o no universitaria, según se establezca en cada caso.

CS - 285 / 2025

Que la Secretaría Académica a través del Expediente Nro.967/2025 propone la creación del "Taller de Fundamentos de microscopía de fluorescencia para Biotecnología. Uso de Cytation 5 y Microscopio confocal" .

Que el propósito del curso es proporcionar a los/as estudiantes de Licenciatura en Biotecnología una comprensión integral y habilidades prácticas en el campo de la microscopía óptica avanzada, con un enfoque particular en las técnicas de fluorescencia.

Que dicho taller está dirigido a estudiantes universitarios del Instituto de Biotecnología de UNAHUR, que posean conocimientos básicos de biología celular y molecular y física.

Que la Secretaría Académica emite su dictamen favorable y remite al Rector para su tratamiento en el Consejo Superior.

Que el Rector lo remite para su tratamiento en la comisión de Enseñanza atento a lo establecido en el artículo 30 del Reglamento Interno del Consejo Superior.

CS - 285 / 2025

Que la Dirección General de Asuntos Legales ha tomado la intervención que le compete.

Que reunida la Comisión de Enseñanza del Consejo Superior tal como indica el Reglamento de Actividades de Capacitación, evalúa según las pautas dispuestas y emite su dictamen favorable.

Que según el artículo 78 inc. c (del estatuto de la universidad, es una función del consejo directivo del instituto elevar al rector, para su presentación al consejo superior

Que en virtud del Artículo 55 a) del Estatuto de la Universidad, el Rector integrará el Consejo Superior de la Universidad.

Que la presente medida se dicta en uso de las atribuciones conferidas por el Estatuto de la UNIVERSIDAD NACIONAL de HURLINGHAM, el Reglamento Interno del Consejo Superior y luego de haberse resuelto en reunión del día 26 de noviembre de 2025 de este Consejo Superior.

Por ello,

CS - 285 / 2025

EL CONSEJO SUPERIOR DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL DE HURLINGHAM

RESUELVE:

ARTÍCULO 1°.- Crear el "Taller de Fundamentos de microscopía de fluorescencia para Biotecnología. Uso de Cytation 5 y Microscopio confocal" de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM.

ARTÍCULO 2°.- Aprobar el dictado del el "Taller de Fundamentos de microscopía de fluorescencia para Biotecnología. Uso de Cytation 5 y Microscopio confocal" de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, cuyo programa acompaña en Anexo único formando parte de la presente Resolución.

ARTÍCULO 3°.- Regístrese, comuníquese y archívese.

Taller de Fundamentos de microscopía de fluorescencia para Biotecnología. Uso de Cytation 5 y Microscopio confocal.

INSTITUTOS/S: **Instituto de Biotecnología**

CARRERA/S: Todas las carreras del Instituto de Biotecnología

RESPONSABLE DE LA ASIGNATURA Y EQUIPO DOCENTE:

Responsable: Dr. Néstor Gabriel Iglesias

Docente auxiliar: Lic. Mauricio Challiol

AÑO: 2025

CRÉDITOS: 1

CARGA HORARIA DE INTERACCIÓN PEDAGÓGICA: 16

CARGA HORARIA TOTAL: 25

1. Fundamentación

El presente taller tiene como objeto de estudio la interacción de la luz con la materia biológica a nivel microscópico, y las tecnologías ópticas y de procesamiento de imagen que permiten visualizar, analizar y cuantificar fenómenos biológicos a escalas subcelulares y celulares. Se centra en la comprensión de los principios físicos que rigen la formación de imágenes en microscopía óptica, con un énfasis particular en las técnicas de fluorescencia (widefield y confocal). Además, aborda la selección y gestión de fluoróforos y sondas, así como la operación y optimización de equipos modernos como el microscopio confocal y los sistemas de alto rendimiento tipo Cytation.

La biotecnología, por su naturaleza interdisciplinaria, se encuentra en la vanguardia de la investigación y el desarrollo en áreas tan diversas como la medicina, la agricultura, la industria y el medio ambiente. En el núcleo de muchas de estas aplicaciones y descubrimientos se encuentra la capacidad de observar y manipular sistemas biológicos a nivel celular y molecular.

Esta actividad curricular acreditable se posiciona como un taller teórico-práctico fundamental y aplicado, que tiende un puente entre los principios de la física óptica y las necesidades experimentales de la biotecnología. No busca formar ópticos o ingenieros de instrumentación, sino capacitar a los biotecnólogos para ser usuarios críticos de la microscopía avanzada.

El curso asume que los/as estudiantes tienen una base en biología celular y molecular, y se enfoca en cómo la microscopía puede ser utilizada para responder preguntas biológicas complejas. Se prioriza la aplicación práctica sobre la teoría abstracta, siempre manteniendo un rigor científico. El enfoque es "aprender haciendo", dotando a los/as estudiantes de las herramientas para seleccionar la mejor estrategia microscópica para sus proyectos.

2. Propósitos y/u objetivos

Objetivos

El presente taller está diseñado para proporcionar a los/as estudiantes de Licenciatura en Biotecnología una comprensión integral y habilidades prácticas en el campo de la microscopía óptica avanzada, con un enfoque particular en las técnicas de fluorescencia.

Objetivo General

Proporcionar a los estudiantes los conocimientos teóricos y las habilidades prácticas necesarias para operar, optimizar y aplicar de manera crítica microscopios de fluorescencia (widefield y confocal) y equipos de alto rendimiento (como el Cytation), seleccionando las técnicas, fluoróforos y parámetros de adquisición más adecuados para sus investigaciones y aplicaciones en biotecnología.

Objetivos Específicos

Al finalizar este curso, los estudiantes serán capaces de:

1. Comprender los Fundamentos Ópticos.
2. Identificar y Manejar Componentes del Microscopio.
3. Seleccionar y Gestionar Fluoróforos y Sondas.
4. Aplicar Técnicas de Microscopía Avanzada.
5. Tomar Decisiones Experimentales Fundamentadas.

3. Contenidos mínimos

Fundamentos de Óptica y Naturaleza de la Luz. Principios de Formación de Imagen en Microscopía Óptica. Componentes y Operación del Microscopio Óptico. Microscopía de Fluorescencia (Widefield y Confocal). Fenómeno de la Fluorescencia. Propiedades de los Fluoróforos. Fotoblanqueo y Crosstalk. Tipos de Fluoróforos. Microscopía Confocal. Aplicaciones y Toma de Decisiones.

4. Carga Horaria

<i>Créditos</i>	<i>Interacción pedagógica</i>	<i>Trabajo autónomo</i>	<i>TOTAL</i>
1	16h	9h	25h

4.1. Trabajo autónomo de la/el estudiante

Lectura de la bibliografía obligatoria
Preparación de evaluaciones

<i>Actividad</i>	<i>Carga horaria</i>
<i>Lectura de la bibliografía obligatoria</i>	6 h
<i>Preparación para las evaluaciones</i>	3 h

5. Programa analítico

Clase 1: Fundamentos de Óptica y Formación de Imagen en Microscopía (4 horas)

Contenido Teórico (2.5 horas):

1. **Introducción al Microscopio Óptico:**
Breve historia y evolución del microscopio. Componentes básicos de un microscopio moderno (fuente de luz, condensador, objetivo, ocular, sistema de detección).
2. **La Luz como Onda y Partícula:**
Naturaleza dual de la luz. Espectro electromagnético (énfasis en la región visible). Características de la luz: longitud de onda (λ), amplitud, frecuencia, energía, polarización. Tipos de haces de luz: colimada, divergente, puntual.
3. **Interacciones Luz-Materia:**
Absorción, transmisión, reflexión (especular y difusa), dispersión (scattering), refracción, dispersión cromática, difracción, interferencia.
4. **Formación de Imagen por Lentes Simples:**
Lentes convergentes: puntos focales (F , F'), distancia focal, eje óptico, planos focales (f , f'), puntos $2F/2F'$. Formación de imágenes reales (invertidas, magnificadas) y virtuales (magnificadas). Magnificación en microscopios compuestos ($M_{\text{total}} = M_{\text{objetivo}} \times M_{\text{ocular}}$).
5. **Resolución Óptica: El Límite de lo que Podemos Ver:**
Magnificación vs. Resolución: la resolución es clave para el detalle. Difracción y el patrón de Airy: cómo un punto se convierte en un patrón. Función de Dispersión del Punto (PSF). Criterio de Rayleigh para distinguir dos puntos. La fórmula de Abbe para la resolución ($r = 0.61\lambda / NA$). Impacto de la longitud de onda (λ) en la resolución. Apertura Numérica (NA): definición ($n \times \sin(\alpha)$), capacidad de capturar luz, impacto en la resolución. Resolución lateral vs. resolución axial (en el eje Z). Resolución óptica vs. resolución digital (píxeles de la cámara).
6. **Objetivos del Microscopio:**
Aberraciones ópticas: esférica, cromática, curvatura de campo. Tipos de objetivos según su corrección (acromáticos, planacromáticos, fluorita, plan fluorita, planapocromáticos). Información en el barril del objetivo (magnificación, NA, medio de inmersión, correcciones).

Actividad Práctica (1.5 horas):

- **Familiarización con el Microscopio Óptico (Cytation o similar):**
Identificación de todos los componentes mencionados en la teoría. Encendido y apagado seguro del equipo. Montaje de una muestra de referencia (ej. células epiteliales, fibras de algodón).
- **Ajuste de la Iluminación Köhler:**
Pasos detallados para lograr una iluminación uniforme y maximizar el contraste y la resolución. Observación de los efectos de un Köhler mal ajustado (filamento de la lámpara, artefactos).
- **Exploración de Magnificación y Resolución:**

Observación de la misma muestra con diferentes objetivos (4x, 10x, 20x, 40x, 60x/100x si aplica). Discusión sobre cómo la NA y la longitud de onda afectan la resolución percibida. Cálculo de la resolución teórica para un objetivo dado (ejercicio práctico).

Clase 2: Principios y Componentes de la Microscopía de Fluorescencia (4 horas)

Contenido Teórico (2.5 horas):

1. El Fenómeno de la Fluorescencia:

Interacción de la luz con la materia: absorción de un fotón. Diagrama de Jablonski: estados electrónicos (S_0 , S_1 , S_2), niveles vibracionales. Procesos de decaimiento: relajación vibracional, conversión interna, cruce intersistema, fosforescencia, fluorescencia. Espectros de excitación y emisión: relación con los niveles de energía. Stokes Shift: la energía de emisión siempre es menor que la de excitación.

2. Microscopía de Epifluorescencia (Widefield): Ruta de la Luz:

Configuración de un microscopio de epifluorescencia (vertical e invertido). El objetivo como condensador en epifluorescencia. Componentes esenciales:

Fuentes de Luz: Lámparas de arco (Mercurio HBO, Xenón XBO, Haluro Metálico HXP): espectros, pros y contras (vida útil, calor, mercurio). LEDs (Light Emitted Diode): espectros, pros y contras (vida útil, control, calor, filtros de excitación). Sistemas combinados de LEDs (ej. Zeiss Colibri).

Cubos de Filtros: Filtro de excitación, espejo dicróico, filtro de emisión. Su función en la separación de la luz de excitación y emisión.

Detectores: Cámaras científicas (CCD, sCMOS).

3. Terminología y Selección de Filtros:

Tipos de filtros: "short pass", "long pass", "band pass".

Densidad Óptica (OD) y Transmisión: importancia de un alto bloqueo de la luz de excitación para evitar el ruido.

Compromiso Brillo vs. Contraste: Ancho de banda estrecho del filtro de emisión: mejor contraste, menor brillo. Ancho de banda amplio del filtro de emisión: mayor brillo, menor contraste.

Juegos de filtros (ej. Semrock Filter Sets para FITC).

4. Cubos de Filtros Múltiples y Crosstalk:

Cubos dobles y triples para marcajes múltiples. Ventajas (adquisición rápida) y desventajas (crosstalk). Crosstalk de excitación y crosstalk de emisión: definición y ejemplos.

Actividad Práctica (1.5 horas):

• Exploración de Fuentes de Luz y Cubos de Filtros:

Identificación de las fuentes de luz disponibles en el Cytation y/o microscopio confocal. Reconocimiento de los cubos de filtros y sus especificaciones. Discusión sobre la selección de la fuente de luz y el cubo de filtros para diferentes fluoróforos.

• Simulación de Espectros y Filtros (Online):

Uso de herramientas online (ej. Semrock Searchlight, FPbase) para visualizar espectros de fluoróforos y la superposición con diferentes filtros.

Ejercicios de selección de filtros para un fluoróforo dado, considerando el compromiso brillo/contraste.

- **Adquisición Básica de Fluorescencia (Cytation):**

Carga de una muestra fluorescente simple (ej. células teñidas con DAPI).

Configuración de los parámetros básicos de adquisición (tiempo de exposición, ganancia, selección de canal).

Observación de los efectos de cambiar los filtros o la intensidad de la luz.

Clase 3: Fluoróforos, Sondas y Gestión de la Fluorescencia (4 horas)

Contenido Teórico (2.5 horas):

1. **Calidad de los Fluoróforos:** Coeficiente de Absorción (ϵ): cantidad de luz absorbida. Ley de Beer. Rendimiento Cuántico (QY): eficiencia de emisión de fluorescencia. Quenching. Fotoestabilidad: estabilidad química de la molécula en estado excitado. Factores que la afectan (pH, entorno químico). Brillo de un fluoróforo (Brightness = $\epsilon \cdot QY$).
2. **Fotoblanqueo (Photobleaching):**
Mecanismo: destrucción fotoinducida irreversible del fluoróforo. Factores que afectan la tasa de fotoblanqueo (intensidad de luz, longitud de onda, reactividad química, entorno intracelular). Estrategias para reducir el fotoblanqueo: Optimización de la adquisición (encontrar la muestra en campo claro/DIC, filtros ND, tiempos de integración). Agentes antifade (antioxidantes, "scavengers" de radicales libres). Selección de fluoróforos más estables. Medios de montaje caseros (ej. receta de DABCO).
3. **Tipos de Fluoróforos y Sondas: Fluoróforos Orgánicos:** Estructura: anillos de benceno conjugados, enlaces π , estructura rígida. Aplicaciones: inmunofluorescencia (conjugados a anticuerpos primarios/secundarios), marcajes específicos. Ejemplos y comparativa (Alexa Fluor, DyLight, Atto, STAR, Janelia Fluor). **Autofluorescencia:** Fuentes naturales en muestras biológicas (aminoácidos aromáticos, clorofila, NADH, FAD, elastina, colágeno, lipofuscina, aldehídos). Estrategias para minimizar el fondo de autofluorescencia. **Sondas para Células Vivas y Orgánulos:** ADN: DAPI, Hoechst 33342 (permeables a membrana, se unen al ADN). Membrana: FM4-64 (lipofílicas, se insertan en bicapas lipídicas). Lisosomas: LysoTracker (atraídos por pH ácido). Mitocondrias: Mitotracker Red (reactivos a tioles). **Proteínas Fluorescentes (FPs):** Historia: GFP de *Aequorea victoria* (Shimomura, Chalfie, Tsien - Premio Nobel). Estructura: barril beta, cromóforo interno. Aplicaciones: expresión génica, localización de proteínas, marcadores de linaje celular, imagen in vivo. Derivados de GFP: mutantes de color (eGFP, CFP, YFP, BFP), mejora de brillo y fotoestabilidad. Bases de datos de proteínas fluorescentes (ej. fpbase.org).
4. **Gestión del Crosstalk en Marcajes Múltiples:** Revisión de crosstalk de excitación y emisión. Estrategias para minimizar el crosstalk: selección cuidadosa de fluoróforos y filtros, "spectral unmixing" (introducción conceptual).

Actividad Práctica (1.5 horas):

- **Selección de Fluoróforos para un Experimento Biotecnológico:** Caso de estudio: diseño de un experimento de marcaje triple (ej. núcleo, actina, mitocondrias) para células vivas o fijas. Uso de FPbase y Semrock Searchlight para seleccionar fluoróforos y filtros compatibles, considerando el crosstalk y la fotoestabilidad. Discusión de las ventajas y desventajas de usar fluoróforos orgánicos vs. proteínas fluorescentes para el caso de estudio.

- **Preparación de Muestras y Agentes Antifade:** Demostración de la preparación de un medio de montaje con agente antifade (ej. DABCO). Discusión sobre la importancia de la preparación de la muestra para la microscopía de fluorescencia.
 - **Análisis de Imágenes con Crosstalk:** Análisis de imágenes pre-adquiridas con marcajes múltiples que presenten crosstalk. Discusión sobre cómo identificar el crosstalk y las posibles estrategias de corrección (ej. ajuste de ventanas espectrales, unmixing).
-

Clase 4: Microscopía Confocal: Aplicaciones Avanzadas (4 horas)

Contenido Teórico (2.5 horas):

1- Microscopía Confocal:

Principios: Escaneo punto a punto, iluminación puntual, detección puntual.

El Pinhole: Función (eliminación de luz fuera de foco), impacto en el seccionamiento óptico y la resolución axial.

Ventajas: Seccionamiento óptico, mejora del contraste y la resolución axial, reconstrucción 3D, reducción de fotoblanqueo fuera del plano focal.

Componentes Clave: Láseres (fuentes de luz), escáner (espejos galvanométricos), pinhole, detectores (PMTs - tubos fotomultiplicadores).

Modos de Adquisición: Z-stacks (adquisición 3D), time-lapse (imagen en vivo), multi-canal (marcajes múltiples). Comparación detallada: Microscopía Confocal vs. Epifluorescencia Widefield.

Actividad Práctica (1.5 horas):

- **Manejo Básico del Microscopio Confocal:**

Encendido y Apagado Seguro: Protocolo de inicio y cierre del equipo.

Configuración de un Experimento Confocal Simple:

Carga de una muestra multi-marcada (ej. células con núcleo y citoesqueleto fluorescentes). Selección de láseres y canales de detección. Ajuste del pinhole y observación de su efecto en el seccionamiento óptico y la resolución axial. Ajuste de parámetros de adquisición (potencia del láser, ganancia, offset, velocidad de escaneo). Adquisición de un z-stack y reconstrucción 3D básica (si el software lo permite).

- **Discusión de Optimización:** Cómo balancear la calidad de imagen con el fotoblanqueo y la velocidad de adquisición.

6. Bibliografía y recursos

6.1 Bibliografía obligatoria

Murphy, Douglas B. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging / Douglas B. Murphy, Michael W. Davidson. – 2nd ed.

6.2. Bibliografía optativa:

6.3 Recursos

<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>

<https://searchlight.idex-hs.com/>

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>

<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/image-brightness>

<https://www.fpbases.org/>

Manuales de equipos

7. Destinatarios/requisitos de ingreso:

Este taller está dirigido a estudiantes universitarios del Instituto de Biotecnología de UNA HUR, que posean conocimientos básicos de biología celular y molecular y física. No se requiere experiencia previa en el manejo de microscopios. Se espera que los participantes demuestren interés en la investigación experimental y la aplicación de técnicas de imagen para el estudio de sistemas biológicos. Las actividades prácticas se desarrollarán en el laboratorio de microscopía de UNA HUR, utilizando equipos de última generación como el Cytation (para microscopía widefield de campo claro y fluorescencia) y un microscopio confocal de barrido láser. La modalidad de supervisión será directa y personalizada, con el docente y/o ayudantes de cátedra guiando a pequeños grupos de estudiantes en cada estación de trabajo, asegurando la correcta ejecución de los protocolos y la resolución de dudas en tiempo real. La evaluación de las prácticas se realizará de forma continua, observando la participación activa de los estudiantes, su destreza en el manejo del equipamiento, la correcta aplicación de los conceptos teóricos (ej. alineación Köhler, selección de filtros, configuración de parámetros de adquisición) y la interpretación inicial de las imágenes obtenidas. Se fomentará la discusión grupal de los resultados y la resolución de casos de estudio prácticos para consolidar el aprendizaje.

8. Descripción de las actividades prácticas desarrolladas en la actividad curricular, indicando lugar donde se desarrollan, modalidad de supervisión y de evaluación.

El taller se desarrolla en clases teórico-prácticas, en las que se presentan los temas conceptuales y teóricos de las distintas unidades de modo que le permita al estudiante comprender y ser capaz de abordar la resolución de la ejercitación práctica donde éstos se aplican. Las actividades prácticas son realizadas en los laboratorios de UNA HUR y en instancias de trabajo autónomo fuera de la cursada. Tales prácticas consisten en la utilización de distintos microscopios a partir de preparados provistos por los docentes.

9. Condiciones de cursada y requisitos de aprobación

9.1 Modalidad de evaluación

El taller será presencial con una evaluación final.

9.2 Aprobación de la cursada

La aprobación de las actividades curriculares bajo el régimen de regularidad requerirá una asistencia no inferior al setenta y cinco por ciento (75%) en las clases presenciales y al menos el setenta y cinco por ciento (75%) de las actividades programadas para las clases virtuales; y la participación en las instancias de evaluación parcial y/o de integración definidas para cada una de ellas.

9.3 Acreditación del curso

La acreditación de los cursos/talleres, según nuevo reglamento

- a) *Aprobó la asignatura (de 7 a 10 puntos)*
- b) *Reprobó la asignatura (0 a 6 puntos)*
- c) *Ausente*

Se considerará ausente a aquel/lla estudiante que no cumpla con el porcentaje de asistencia o no se haya presentado a las instancias de evaluación pautadas en el Programa del curso.

10. Docente responsable del curso.

Néstor Gabriel Iglesias

Hoja de firmas