

**Informe anual de actividades 2012-2013 de la plataforma
institucional de Microscopía Electrónica de Transmisión
(MET)**

Índice

- 1.- Actividades Específicas de la Plataforma de MET del IIBCE (2012-2013)***
- 2.- Formación de Recursos Humanos***
- 3.- Ejecución de Recursos***
- 4.- Mantenimiento de equipo***
- 5.- Equipamiento y material requerido para 2013***
- 6.- Material adjunto:***
 - Carta de Dr. José Manuel Verdes***
 - Informe de Pasantía de Juan Carlos Rosillo***

1.- Actividades Específicas de la Plataforma de MET del IIBCE (2012-2013)

Actividad desarrollada	Cantidad de material procesado	Usuario/Dpto/ Institución	Material procesado por	Observación en el MET	Fecha
Preparación de material, obtención de cortes semifinos y finos y observación al MET.	-6 diferentes tipos de muestras. - 70 bloques de Epon	Facultad de Veterinaria. DPAN-IIBCE	1.-Prof. Dr. Kosuke Okada; 2.- José M Verdes, Facultad de Veterinaria-UdelaR 3.- Juan C. Rosillo, Plataforma MET-IIBCE; 4.- Alejandra Kun, Plataforma MET-IIBCE DPAN.	1.-Prof. Dr. Kosuke Okada- 2.-Juan C. Rosillo. 3.- José M. Verdes 4.- Alejandra Kun.	Abril/2012- Marzo/2013
Cortes semifinos de ojo de D. melanogaster, material previamente incluido.	- 8 bloques	Biología del Neurodesarrollo	1.- Juan Carlos Rosillo, Plataforma MET-IIBCE	-----	Febrero-Marzo 2013
Cortes finos y semifinos de nervio ciático de ratón previamente incluido. Tinción de grillas. Observación al MET	- 8 bloques de epon. - 3 bloques de LRW	DPAN	1.- Juan C. Rosillo, Plataforma MET-IIBCE. 2.- Alejandra Kun DPAN.	1.- Alejandra Kun DPAN.	Noviembre-diciembre 2012. Febrero-Marzo 2013.
Cortes semifinos y finos de cerebros Austrolebias. Ultramicrotomía. Contraste de grillas. Observación al MET	- 6 bloques.	Anabel Fernández	1.-Juan C.Rosillo, Plataforma MET-IIBCE.	1.- Juan C. Rosillo. 2.- Anabel Fernández.	Febrero 2013
Preparación de grillas de ventana recubiertas con Formvard	- 5 grillas	Microbiología, Curso de microscopía/2013	1.-Juan C.Rosillo, Plataforma MET-IIBCE.	---	Marzo 2013
Preparación de material, ultramicrotomía, preparación de Films (Ma. Inés Rehermann)	15 bloques	Dpto de NFCM	Omar Trujillo,	1.- Omar Trujillo Cenóz	2012-2013

2.- Formación de Recursos Humanos

Actividad	Lugar	Responsable	Actividades específicas	Financiación	Fecha
Pasantía de Maestría de María Fernanda Dominguez	DPAN-Plataforma MET-IIBCE	Alejandra Kun	Procesamiento de muestras, ultramicrotomía, observación en el MET	PEDECIBA	Junio-setiembre 2012
Instrucción en el mantenimiento de columna	Plataforma MET-IIBCE	Omar Trujillo Cenóz	Se instruyó a: ; - Brauer, A. Kun, T. De los Campos, J.C. Rosillo.	-----	2012-2013
Pasantía de Doctorado de Juan C. Rosillo	Laboratorio de Neurobiología comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad, Valencia-España.	Dr. García-Verdugo	Procesamiento completo de material biológico partiendo de material incluido y observación en el MET. (ver informe adjunto).	PEDECIBA	Abril-mayo 2013
Pasantía de Doctorado de Laura Lafón	Plataforma MET-IIBCE	Alejandra Kun (contando con la colaboración del técnico Juan C. Rosillo)	Procesamiento de cultivos celulares en monocapa para estudio de ultraestructura e inmunomicroscopía electrónica. Ultramicrotomía y observación en el MET.	PEDECIBA	Junio-agosto 2013
Pasantía de Maestría de Natalia Oddone	Plataforma MET-IIBCE	Alejandra Kun (contando con la colaboración del técnico Juan C. Rosillo)	Procesamiento de cultivos celulares para estudio de ultraestructura e inmunomicroscopía electrónica. Ultramicrotomía y observación en el MET.	PEDECIBA	Junio-Agosto 2013

3.- Ejecución de Recursos

Origen de los fondos	Material adquirido	Ejecutado por	Fecha
PEDECIBA otorgados a A. Kun para mantenimiento de equipos, (US\$3.000)	1.-filamentos, 2.- lupa, 3.- llave foco medio.	Plataforma MET-IIBCE	Noviembre-Diciembre/2012
IIBCE para la Plataforma MET del IIBCE. (U\$20.000/2011)	1.- Alcohol, 2.- acetona, 3.- material de vidrio, 4.- juego de micropipetas, 5.- bisturíes, 6.- cubreobjetos, 7.- parafilm, 8.- guantes, 9.- probetas.	Plataforma MET IIBCE	Octubre/2012

4.- Mantenimiento de equipo

Actividad	Actividad específica	Plataforma MET IIBCE	Fecha
Visita del técnico de JEOL-BRASIL, Ingeniero Luis Marumoto.	1.- Cambio de aperturas, 2.- reparación shutter de lente proyectora, 3.- cámara de entrada de soporte de grillas.-	Omar Trujillo, Alejandra Kun.	27, 28 y 29 de mayo 2013

5.- Equipamiento y material requerido para 2013

Hasta el presente la Plataforma MET del IIBCE ha procesado los materiales de los nuevos usuarios con fungibles donados por los Departamentos que emplean habitualmente el procesamiento de muestras para microscopía electrónica

Sin embargo, consideramos que el mejor funcionamiento de la Plataforma requeriría poder disponer de sus propios materiales y equipamiento. Para cumplir con este objetivo, sería preciso que las autoridades del IIBCE asignaran los fondos necesarios a la Plataforma.

Estimamos para 2013 los siguientes gastos e inversiones:

Item	GASTOS	Monto estimado en U\$ (pesos uruguayos)
1	diferentes tipos de resinas (hidrofílicas, epóxicas)	35.000
2	fijadores (glutaraldehído y paraformaldehído)	
3	moldes y cápsulas	
4	grillas de ventana y de mesh	
5	pinzas de punta reforzada para el manejo de grillas	
6	portaobjetos y cubreobjetos	
7	vidrio para cuchillas	
8	aire comprimido en aerosol	
9	Tetróxido de osmio	

Item	INVERSIONES	Monto estimado en U\$ (pesos uruguayos)
1	una estufa para polimerización del material	70.000
2	un teclado con autoiluminación para la PC del MET	2000
3	una lámpara de mesa para la mesada de la PC del MET	2000
TOTAL		74.000

:

6.- Material adjunto:

Carta de Dr. José Manuel Verdes

Informe de Pasantía de Juan Carlos Rosillo



Montevideo, 10 de junio de 2013.

Sres. Miembros
Consejo Directivo IIBCE - MEC

Por la presente elevo a Uds. una breve síntesis de las actividades desarrolladas en el marco del convenio de cooperación existente entre el IIBCE y la Facultad de Veterinaria de la UdelaR durante la estancia en nuestro país del Prof. Dr. Kosuke Okada (Emeritus Prof. of Veterinary Pathology de la Iwate University, Japón y Experto Senior de la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional, JICA) en el Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión y en el Laboratorio de Proteínas y Ácidos Nucleicos de vuestra institución, con la colaboración y supervisión del MSc. Juan Carlos Rosillo y la Dra. Alejandra Kun.

En total se procesaron y analizaron 40 tacos, con muestras procedentes de 3 proyectos que venimos desarrollando en nuestra Facultad:

1. Proyecto de Doctorado del MSc. Claudio Borteiro, PEDECIBA (Zoología). Prevalencia y distribución de Chytridiomycosis en anfibios de Uruguay.
2. Proyecto de Maestría del Dr. Vet. Alejandro Crampet, Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria –PPFV- (Salud Animal). Caracterización inmunohistoquímica y ultraestructural de tumores de ofidios de la colonia existente en el Instituto de Higiene (UdelaR).
3. Proyecto de Investigación del Prof. Adj. Dr. José Manuel Verdes. Caracterización ultraestructural de la degeneración cortical cerebelosa inducida por la ingestión de *Solanum bonariense* en rumiantes.

Recientemente hemos enviado parte de los resultados obtenidos en el punto 1, a la revista internacional indexada *Journal of Wildlife Diseases*, estando aún en revisión (Borteiro et al. Dermocystid-chytrid co-infection in the frog *Hypsiboas pulchellus*: first report for Neotropical amphibians). Aún resta trabajo en las demás líneas de investigación en las que colaboramos, pero pensamos que en el correr de este año algunos resultados parciales podrán ser presentados en congresos nacionales e internacionales.

Por último, quiero resaltar lo fructíferos que han sido tanto la colaboración como el apoyo recibido del IIBCE, los cuales se han ido plasmando en nuevos proyectos, co-orientaciones de estudiantes, intercambio de equipamiento e infraestructura entre su institución y la Facultad de Veterinaria de la UdelaR.

Sin otro particular se despide atentamente.

Prof. Adj. Dr. José Manuel Verdes García

INFORME DE PASANTÍA REALIZADA EN EL EXTERIOR

MsC. Juan Carlos Rosillo Martí.

Cargo: Grado 1 Horas docentes Plataforma de Microscopia Electrónica de Transmisión

Lugar de la pasantía: Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, España.

Asesor: Dr. José Manuel García-Verdugo

Duración: 2 meses

Fecha de la pasantía: 1ro de abril al 1ro de junio/2013

Financiación: PEDECIBA Biología.

Objetivos: Familiarización con las técnicas y protocolos estandarizados en el Laboratorio de Neurobiología Comparada para procesar muestras y analizarse por Microscopia Electrónica de Transmisión y trabajar en uno de los objetivos de la Tesis Doctoral que estoy realizando.

En este período realicé directamente con los integrantes del laboratorio diferentes procesamientos de tejidos o células para ser analizadas con el Microscopio Electrónico de Transmisión o con el Microscopio Confocal. Pude acceder a nuevos protocolos que podrían realizarse a corto plazo en nuestro instituto como parte del servicio de la Plataforma. Por citar algunas, uso de la timidina tritiada, la inmunohistoquímica pre-inclusión con Oro coloidal y la inclusión de suspensiones celulares con nanopartículas magnéticas incorporadas. Ésta última en breve se intentará ponerla a punto con miembros del departamento dirigido por Juan Claudio Benech.

Con respecto al objetivo del tema de mi Tesis doctoral centramos la atención en los bulbos olfatorios de *Austrolebias* adultas, los cuales exhiben gran proliferación celular y hemos demostrado la presencia de nuevas neuronas que se incorporan a la red neuronal ya establecida, proceso definido como neurogénesis adulta. En la ejecución de este objetivo se pretende identificar y caracterizar las células madres que generan estas nuevas neuronas. Para ello, la Microscopia Electrónica de Transmisión ha sido una de las herramientas más utilizadas para obtener más detalles de la composición celular de los nichos neurogénicos. Particularmente, el Dr. José Manuel García-Verdugo quien dirige el departamento, es uno de los referentes en el tema y nos ofreció su aceptación como orientador de la Tesis que realizo junto con la Dra. Anabel Fernández.

Un resumen de las actividades realizadas se presenta en la siguiente tabla, seguida de algunas fotografías tomadas durante la pasantía.

Fecha	Actividad realizada	Tipo de Muestras	Observación al MET
Abril y Mayo	Presentación de resultados obtenidos en el desarrollo del proyecto de Tesis Doctoral en ejecución.	Telencéfalo y Bulbos Olfatorios de cerebro de peces adultos	
	Reinclusión en resina plástica (Araldita) de secciones de cerebro anterior de 200 μm de grosor orientadas en los tres planos espaciales. (Fig. 1)	Telencéfalo y Bulbos Olfatorios de cerebro de peces adultos	Sí
	Obtención de cortes semifinos y tinción con azul de toluidina. (Fig. 2)	Telencéfalo y Bulbos Olfatorios de cerebro de peces adultos	No
	Obtención de cortes finos y contrastado de los mismos con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. (Fig. 2)	Bulbos Olfatorios	Sí
	Inmunohistoquímica post-inclusión para detectar células GFAP+, BLBP+ y Ki67+.	Cerebro de ratones	Sí
	Inmunohistoquímica (con Oro Coloidal) pre-inclusión para detectar células madres previamente marcadas con GFP.	Cerebro de ratones	Sí
	Uso del MET (FEI Tecnai G2 Spirit y del software de procesamiento de las imágenes obtenidas mediante la cámara digital Morada de Olympus Soft Image System) (Fig. 3)	Bulbos Olfatorios	Sí

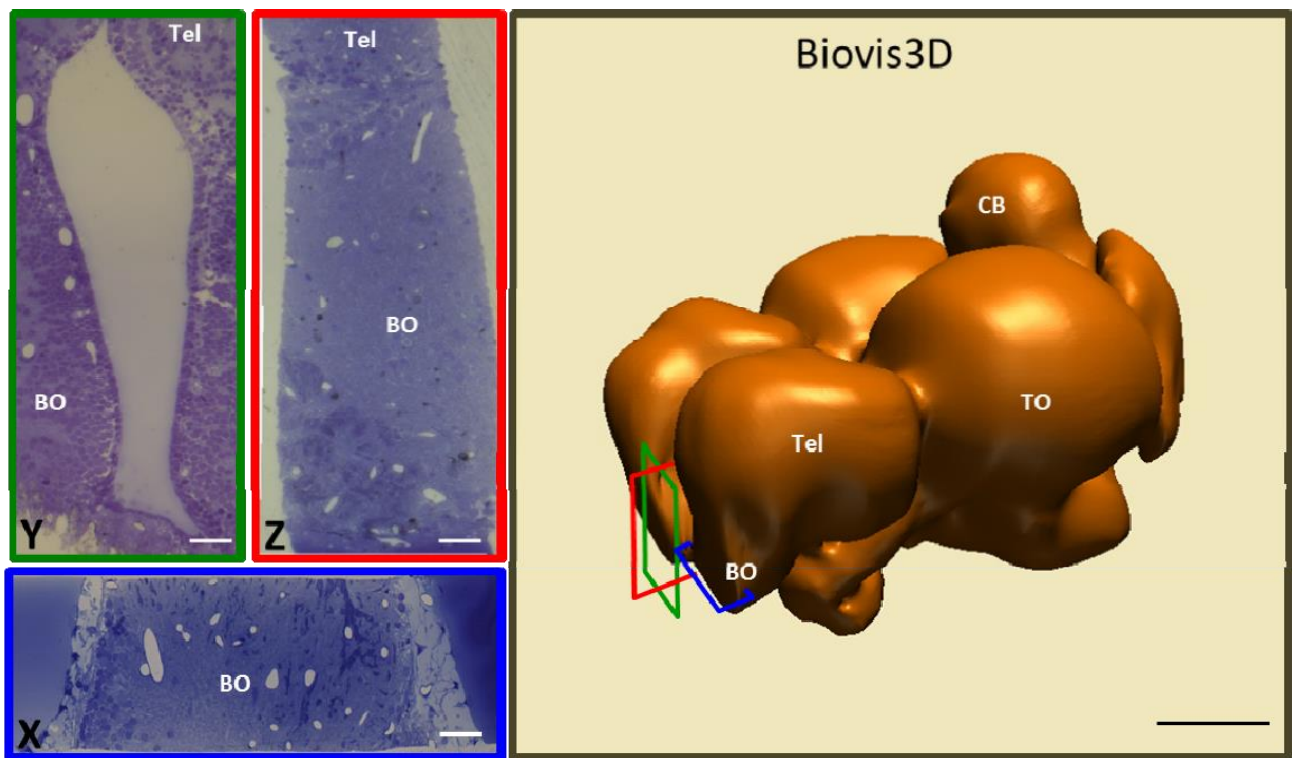


Fig. 1 Cerebro de *Austrolebias* adulto reconstruido con el programa Biovis3D. Las imágenes muestran secciones semifinas en los 3 planos espaciales (x,y,z), teñidas con azul de toluidina. Barras de calibración: en x,y,z=100 μ m, diagrama=1 mm.

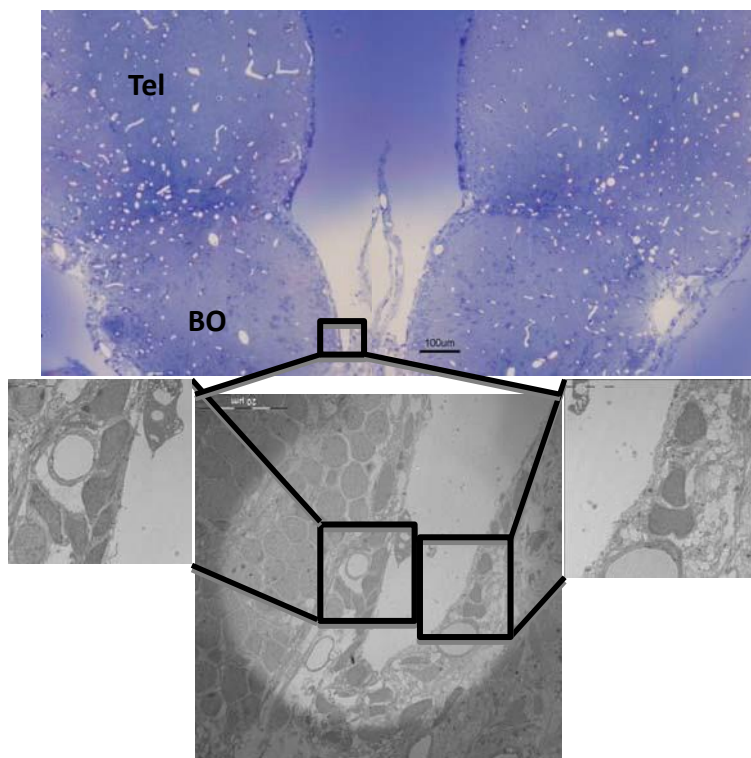


Fig. 2 Microfotografías de un corte transversal del cerebro anterior de *Austrolebias*. En azul, vista panorámica del corte semifino teñido con azul de toluidina donde se distinguen los bulbos olfatorios (BO) y los telencéfalos (Tel). En blanco y negro, imágenes a mayor aumento de la región del Bulbo olfatorio que muestra su composición celular.



Fig. 3 Microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit con el que se trabajó en el Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva.

Otras actividades

- Correcciones del paper enviado a publicar en la revista Neuroscience este año.
- Redacción de paper para reportar datos de la citoarquitectura de los Bulbos Olfatorios de las *Austrolebias*.
- Planificación de próximos experimentos para profundizar en la correlación entre la neurogénesis adulta en estos peces y su función.
- Apoyo en la organización del día EXPOCIENCIA 2013 (25 de Mayo), evento análogo al IIBCE abierto.

-