



Asignatura: Caracterización de neurotransmisores y sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central y periférico: Inmunocitoquímica, bioquímica y Biología molecular
Código: 32264
Centro: Facultad de Medicina
Titulación: Master en Neurociencia
Nivel: Posgrado. Master. Créditos: 6

1. ASIGNATURA / COURSE TITLE

Caracterización de neurotransmisores y sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central y periférico: Inmunocitoquímica, bioquímica y Biología molecular.

Chemical structure of the nervous system: Immunohistochemistry, biochemistry and molecular biology.

(Curso dentro del convenio UAM-CSIC del Master de Neurociencia)

1.1. Código / Course number 32264

1.2. Tipo / Course type

Optativa, perteneciente al Módulo III del Máster: Cursos de Carácter Metodológico.

Optional, integrated in the Master's Module III: Methodological type Course.

1.3. Nivel / Course level

Posgrado Máster/ Postgraduate Master

1.4. Curso / Year of course

1^o/2^o. Semestre 1

1.5. Idioma de impartición / Imparting language

Clases impartidas en español. Bibliografía en inglés./ Classes taught in Spanish. Bibliography in English

1.6. Requisitos previos / Prerequisites

Las propias del Máster e interés en el conocimiento práctico de las técnicas impartidas en el Curso. Se oferta para un máximo de 10 alumnos, preferentemente del primer año del Master; dando prioridad a aquellos que deseen continuar los estudios de Máster realizando una Tesis Doctoral.



Asignatura: Caracterización de neurotransmisores y sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central y periférico: Inmunocitoquímica, bioquímica y Biología molecular
Código: 32264
Centro: Facultad de Medicina
Titulación: Master en Neurociencia
Nivel: Posgrado. Master. Créditos: 6

Se requiere dominio del español y conocimientos de inglés al menos a nivel de lectura y traducción. / Spanish language skills and knowledge of English at least at the level of reading and translation are required.

1.7. Requisitos mínimos de asistencia a las sesiones presenciales / **Minimum attendance requirement**

80% del total de actividades

1.8. Datos del equipo docente / **Faculty data**

Coordinador: Dr. Ricardo Martínez Murillo (r.martinez@cajal.csic.es).
Neurovascular Research Group. Department of Molecular, Cellular and Developmental Neurobiology. Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain.

Profesores:

Dr. Ricardo Martínez Murillo

Dr^a. Julia Serrano Masa

Dr^a. Ana Patricia Fernández Fernández

Información también en:

*Departamento de / Department of Anatomía, Histología y Neurociencia

Facultad / **Faculty**: Universidad Autónoma de Madrid

Despachos - Módulos / **Office - Module**: Módulo A de la facultad.

Teléfono / **Phone**: +34 91 497 53 22

Correo electrónico/**Email**: administracion.anatohistoneuro@uam.es

Página web / **Website**: <http://www.ahnfmed.uam.es>

Horario de atención al alumnado/**Office hours**: Los profesores estarán en todo momento a disposición de los alumnos durante la realización del curso. Otras consultas a establecer de acuerdo con el profesor

1.9. Objetivos del curso / **Course objectives**

El objetivo fundamental del curso es adquirir conocimientos sobre el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales realizados contra sustancias neuroactivas, caracterizándolas mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas mediante la observación con microscopía óptica, confocal y electrónica. Asimismo, cuantificación de la expresión de proteínas mediante técnicas de Western blotting y análisis de su expresión génica mediante RT-PCR.



Asignatura: Caracterización de neurotransmisores y sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central y periférico:
Inmunocitoquímica, bioquímica y Biología molecular
Código: 32264
Centro: Facultad de Medicina
Titulación: Master en Neurociencia
Nivel: Posgrado. Master. Créditos: 6

The goal of this course is to provide basic training in histochemistry, biochemistry and molecular biology approaches to neuroscience. The program includes a series of laboratory practices which provide first-hand experience in neuroscience research. Also, offers a strong foundation in modern tools for neuroscience for those wishing to be introduced or pursue research and teaching careers in Neuroscience.

Competencias específicas: Adquirir destreza en la utilización de las técnicas inmunocitoquímicas y la cuantificación de sus diferentes expresiones mediante la aplicación de Western blotting, de RT-PCR y de genotipado. Comprender los fundamentos de su uso.

Specific Skills: To acquire skill in the use of immunocytochemical techniques and quantification of different expressions by applying Western blotting, RT-PCR and genotyping. Understanding the basics of their use.

1.10. Contenidos del programa / Course contents

Se impartirán 9 horas teóricas a cargo de profesores pertenecientes al equipo de trabajo. En caso necesario se contará con profesores invitados y expertos en temas específicos del curso. Además, se prestará especial atención a la práctica de laboratorio para la realización con destreza de técnicas inmunocitoquímicas, de Western blotting, RT-PCR y genotipado. El propio alumno realizará las diferentes técnicas de uso habitual en nuestro laboratorio. El alumno estará asistido durante todo su entrenamiento y aprendizaje por el profesorado del curso.

Teachers belonging to the Neurovascular research group of the Cajal Institute, CSIC, will impart 9 hours of theoretical teaching. If necessary, there will be guest lecturers and experts on specific topics of the course. Special attention will be paid to practical teaching of immunocytochemistry, Western blotting and basic molecular biology. The students will be involved in laboratory practice related with the techniques mentioned above, under supervising teachers.

Programa detallado

2. Teoría . Duración: hora y media cada conferencia

INTRODUCCIÓN AL CURSO “IMPACTO DE LAS NEUROCIENCIAS EN LA MEJORA DE LA CALIDAD DE VIDA”: Actividad científica del Instituto Cajal, Presentación de profesores y alumnos. 1 h 30 min



Asignatura: Caracterización de neurotransmisores y sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central y periférico:
Inmunocitoquímica, bioquímica y Biología molecular
Código: 32264
Centro: Facultad de Medicina
Titulación: Master en Neurociencia
Nivel: Posgrado. Master. Créditos: 6

INMUNOHISTOQUÍMICA EN NEUROCIENCIAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE DIVERSOS ANTICUERPOS Y SU LOCALIZACIÓN CELULAR Y SUBCELULAR. Fundamentos teóricos y aplicabilidad. 1 h 30 min.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA “MICROSCOPIA CONFOCAL”: Fundamentos Teóricos y aplicabilidad: 1 h 30 min.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA “LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SUSTANCIAS NEUROACTIVAS Y TÉCNICA DE CORRELACIÓN ÓPTICO-ULTRAESTRUCTURAL”: Fundamentos Teóricos y aplicabilidad: 1 h 30 min.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE “WESTERN BLOT”: Fundamentos Teóricos y aplicabilidad: 1 h 30 min.

INTRODUCCIÓN A LA PRÁCTICA DE BIOLOGÍA MOLECULAR: Extracción de DNA y RNA, PCR y Real Time PCR (RT-PCR): 1 h 30 min.

3. Practicas. Duración: 3 horas y media cada practica

DÍAS LECTIVOS: 5. Total horas prácticas/día: 7,00 h.

PRIMER DÍA

1.- Técnica de microscopía óptica y electrónica:

- Anestesia de los animales de experimentación: Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.
- Fijación mediante perfusión de los tejidos “Fijación del animal completo”:
 - Osmolaridad, el pH y tiempo de fijación.
- Extracción de los órganos.
- Post-fijación de los tejidos.
- Crio-protección.
- Sistemas de corte histológico (vibratomo, micrótopo-criostato).
- Manejo de las secciones histológicas resultantes.
- Aplicación de anticuerpos primarios específicos frente al antígeno que se pretende detectar.

2.- Técnica de Western blot:



- Sacrificio de los animales de experimentación
- Perfusión de los tejidos y extracción
- Homogenización de los tejidos y extracción de proteína

3.- DISCUSIÓN

SEGUNDO DÍA

1.- Continuación de la técnica de microscopía óptica y electrónica:

- Aplicación de anticuerpos secundarios.
- Aplicación de la tercera capa marcada.
- Revelado para microscopía óptica.
- Revelado para microscopía electrónica e inicio de la inclusión en resina
(Durcupan)

2.- Técnica de western Blot:

- Cuantificación de la concentración de proteínas:
Espectrofotómetro
ND-100 (NanoDrop)
- Preparación de muestras para electroforesis

3.- DISCUSIÓN

TERCER DÍA

1.- Continuación de la técnica de microscopía óptica y electrónica:

- Análisis de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal.
- Inclusión “en plano” de las secciones histológicas para su procesamiento al microscopio electrónico y estudio de correlación óptico-ultraestructural.

2.- Técnica de Western Blot:

- Preparación de los geles de SDS-Bis/Acrilamida.
- Electroforesis de proteínas.
- Transferencia de proteínas a membrana de PDVF.
- Incubación de la membrana de PDVF en anticuerpo primario.



3.- DISCUSIÓN

CUARTO DÍA

1.- Continuación de la técnica de microscopía óptica y electrónica:

- Observación con el microscopio óptico.
- Tallado de las muestras para microscopía electrónica.
- Obtención de cortes ultrafinos: ultramicrotomía.
- Observación de cortes ultrafinos con el microscopio electrónico.

2.- Técnica de Western Blot:

- Incubación con el anticuerpo secundario.
- Revelado
- Análisis de resultados: determinación cualitativa/semicuantitativa de proteínas mediante densitometría de bandas.

3.- Extracción de RNA y DNA. Cuantificación Espectrofotómetro ND-100 (NanoDrop).

QUINTO DÍA

1.- Continuación de la técnica de microscopía óptica y electrónica:

- Análisis de los resultados

2.- Técnica de Western blot:

- Análisis de los resultados: Determinación cualitativa/semicuantitativa de proteínas mediante densitometría de bandas

3. PRESENTACIÓN POR PARTE DE LOS ALUMNOS DE CASOS PRÁCTICOS RELACIONADOS CON LAS MATERIAS IMPARTIDAS.



3.1. Referencias de consulta / Course bibliography

1. Hurtado O, Serrano J, Sobrado M, Fernandez AP, Lizasoain I, Martinez-Murillo R *et al.*: **Lack of adrenomedullin, but not complement factor H, results in larger infarct size and more extensive brain damage in a focal ischemia model.** *Neuroscience* 2010, **171**: 885-892.
2. Serrano J, Fernandez AP, Martinez-Murillo R, Martinez A: **High sensitivity to carcinogens in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease.** *Oncogene* 2010, **29**: 2165-2171.
3. Martinez-Murillo R, Serrano J, Fernandez AP, Martinez A: **Whole-body periodic acceleration reduces brain damage in a focal ischemia model.** *Neuroscience* 2009, **158**: 1390-1396.
4. Martinez-Murillo R, Martinez A: **Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells.** *Histol Histopathol* 2007, **22**: 1309-1326.
5. Fernandez AP, Serrano J, Rodrigo J, Monleon E, Monzon M, Vargas A *et al.*: **Changes in the expression pattern of the nitrergic system of ovine cerebellum affected by scrapie.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2007, **66**: 196-207.
6. Martinez-Murillo R, Fernandez AP, Serrano J, Rodrigo J, Salas E, Mourelle M *et al.*: **The nitric oxide donor LA 419 decreases brain damage in a focal ischemia model.** *Neurosci Lett* 2007, **415**: 149-153.
7. Serrano J, Fernandez AP, Martinez-Murillo R, Alonso D, Rodrigo J, Salas E *et al.*: **The nitric oxide donor LA 419 decreases ischemic brain damage.** *Int J Mol Med* 2007, **19**: 229-236.
8. Rodrigo J, Fernandez-Vizarra P, Castro-Blanco S, Bentura ML, Nieto M, Gomez-Isla T *et al.*: **Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid-precursor protein (SW) Tg2576 transgenic mice.** *Neuroscience* 2004, **128**: 73-89.
9. Serrano J, Alonso D, Fernandez AP, Encinas JM, Lopez JC, Castro-Blanco S *et al.*: **Adrenomedullin in the central nervous system.** *Microsc Res Tech* 2002, **57**: 76-90.
10. Serrano J, Uttenthal LO, Martinez A, Fernandez AP, Martinez d, V, Alonso D *et al.*: **Distribution of adrenomedullin-like immunoreactivity in the**

rat central nervous system by light and electron microscopy. *Brain Res* 2000, 853: 245-268.

11. Martinez-Murillo R, Fernandez AP, Bentura ML, Rodrigo J: **Subcellular localization of low-affinity nerve growth factor receptor-immunoreactive protein in adult rat purkinje cells following traumatic injury. *Exp Brain Res* 1998, 119: 47-57.**
12. Rodrigo J, Riveros-Moreno V, Bentura ML, Uttenthal LO, Higgs EA, Fernandez AP *et al.*: **Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol* 1997, 378: 522-534.**
13. Martinez-Murillo R, Bentura ML, Fernandez AM, Nieto-Sampedro M, Rodrigo J: **Chemical heterogeneity in adult rat cerebellar Purkinje cells as revealed by zebrin I and low-affinity nerve growth factor receptor immunocytochemical expression following injury. *J Neurocytol* 1995, 24: 807-817.**
14. Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, badia-Molina F, Riveros-Moreno V *et al.*: **Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994, 345: 175-221.**
15. Aguado F, Sanchez-Franco F, Rodrigo J, Cacicedo L, Martinez-Murillo R: **Insulin-like growth factor I-immunoreactive peptide in adult human cerebellar Purkinje cells: co-localization with low-affinity nerve growth factor receptor. *Neuroscience* 1994, 59: 641-650.**
16. Rodrigo J, Uttenthal O, Bentura ML, Maeda N, Mikoshiba K, Martinez-Murillo R *et al.*: **Subcellular localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P400, in the vestibular complex and dorsal cochlear nucleus of the rat. *Brain Res* 1994, 634: 191-202.**
17. Rodrigo J, Suburo AM, Bentura ML, Fernandez T, Nakade S, Mikoshiba K *et al.*: **Distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P400, in adult rat brain. *J Comp Neurol* 1993, 337: 493-517.**
18. Villalba RM, Rodrigo J, Martinez-Murillo R: **Presence of C-flanking peptide of neuropeptide Y(C-PON)-immunoreactive neurons in the olfactory cortex of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Neurosci Lett* 1993, 158: 109-112.**
19. Aguado F, Sanchez-Franco F, Cacicedo L, Fernandez T, Rodrigo J, Martinez-Murillo R: **Subcellular localization of insulin-like growth factor**

I (IGF-I) in Purkinje cells of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 1992, **135**: 171-174.

20. Martinez-Murillo R, Fernandez T, Alguacil MM, Aguado F, Achaval M, Bovolenta P *et al.*: **Subcellular localization of nerve growth factor receptors in identified cells of the rat nucleus basalis magnocellularis: an immunocytochemical study.** *Neuroscience* 1991, **42**: 463-472.
21. Martinez-Murillo R, Villalba RM, Rodrigo J: **Immunocytochemical localization of cholinergic terminals in the region of the nucleus basalis magnocellularis of the rat: a correlated light and electron microscopic study.** *Neuroscience* 1990, **36**: 361-376.
22. Martinez-Murillo R, Villalba R, Montero-Caballero MI, Rodrigo J: **Cholinergic somata and terminals in the rat substantia nigra: an immunocytochemical study with optical and electron microscopic techniques.** *J Comp Neurol* 1989, **281**: 397-415.
23. Martinez-Murillo R, Villalba RM, Rodrigo J: **Electron microscopic localization of cholinergic terminals in the rat substantia nigra: an immunocytochemical study.** *Neurosci Lett* 1989, **96**: 121-126.
24. Martinez-Murillo R, Semenenko F, Cuello AC: **The origin of tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers in the regions of the nucleus basalis magnocellularis of the rat.** *Brain Res* 1988, **451**: 227-236.
25. Martinez-Murillo R, Blasco I, Alvarez FJ, Villalba R, Solano ML, Montero-Caballero MI *et al.*: **Distribution of enkephalin-immunoreactive nerve fibres and terminals in the region of the nucleus basalis magnocellularis of the rat: a light and electron microscopic study.** *J Neurocytol* 1988, **17**: 361-376.

4. Métodos docentes / Teaching methodology

Conferencias teóricas y sesiones prácticas en laboratorio

- Clases teóricas: 9 h

- Prácticas, Laboratorio y Seminarios de discusiones conjuntas después de cada practica : 25 h.



Asignatura: Caracterización de neurotransmisores y sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central y periférico:
Inmunocitoquímica, bioquímica y Biología molecular
Código: 32264
Centro: Facultad de Medicina
Titulación: Master en Neurociencia
Nivel: Posgrado. Master. Créditos: 6

Lectures: 9 h

Practice Lab: 25 h

5. Tiempo de trabajo del estudiante / Student workload

		Nº de horas
Presencial	Clases teóricas/ Lectures	9 h
	Clases prácticas y Seminarios/ Practices and Seminars	40 h
	Examen	1h
No presencial	Estudio y trabajo individual y	60 h
	Preparación presentación bibliográfica	15
	Otros (realización cuaderno laboratorio)	25
Carga total de horas de trabajo: 25 horas x 6 ECTS		150 h

6. Métodos de evaluación y porcentaje en la calificación final / Evaluation procedures and weight of components in the final grade

- Asistencia 15%
- Participación: 15%
- Evaluación de los logros del estudiante (70%) mediante:
 - 1.-Calificación del “Cuaderno de laboratorio”: 10%.
 - 2.-Exposición pública de un trabajo de investigación seleccionado por el/la alumno/a relacionado con las clases teóricas y práctica de laboratorio: 15%
 - 2.-Examen tipo test de 20 preguntas: 45%
- Attendance: 15%
- Participation: 15%
- Evaluation of the student's achievement (70%) by:
 - 1.-Student's notation laboratory book: 10%



Asignatura: Caracterización de neurotransmisores y sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central y periférico:
Inmunocitoquímica, bioquímica y Biología molecular
Código: 32264
Centro: Facultad de Medicina
Titulación: Master en Neurociencia
Nivel: Posgrado. Master. Créditos: 6

- 2.-Public presentation of a research work, freely chosen by the student, related to the given lectures: 15%
- 3.-Test of 20 questions, to follow the individual student's acquisition of knowledge and skills: 45%

Cronograma* / Course calendar

Es un curso intensivo de una semana de duración (mañana y tarde) a impartir en el Instituto Cajal.

Consultar damero primer semestre en pagina web del Master :

http://www.ahnfmed.uam.es/ver_master.php?id_carrera=23

Comprehensive intensive one-week (morning and afternoon) basic course in immunohistochemistry, biochemistry and molecular biology to be held at the Cajal Institute.

Check "damero 1st semester at Master's website :

http://www.ahnfmed.uam.es/ver_master.php?id_carrera=23