

CURSO DE POSTGRADO

Técnicas de Biofísica Celular y Molecular

Nombre Curso
SEMESTRE Año

PROF. ENCARGADO Dr. Victor Castro (Uchile), Dra. Maria Gabriela Rivas (UNL), Dra. Eneida de Paula (Unicamp) y Lisandro J. Falomir (UPlata)

Nombre Completo Cédula Identidad

Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (Universidad Nacional del Litoral, Universidad de Campinas y Universidad de La Plata)

UNIDAD ACADÉMICA

TELÉFONO E-MAIL

TIPO DE CURSO
(Básico, Avanzado, Complementario, Seminarios Bibliográficos, Formación General)

CLASES Y SEMINARIOS	66 HRS.
---------------------	---------

Nº HORAS PRESENCIALES	66
Nº HORAS NO PRESENCIALES	150
Nº HORAS TOTALES	216

CRÉDITOS
(1 Crédito Equivale a 27 Horas Semestrales)

CUPO ALUMNOS
(Nº mínimo) (Nº máximo)

PRE-REQUISITOS *Postulación* hasta el día 12 de marzo 2025.
<https://forms.gle/oA6aFaMEJ1T23N29A>

INICIO TERMINO

DIA/HORARIO POR SESION DIA / HORARIO POR SESION

LUGAR

Escuela De Postgrado (Sala a determinar) u otro lugar

METODOLOGÍA

El curso tendrá una modalidad virtual con un total de 66 h. El curso tendrá 66 hs totales de duración (directas) de las cuales 48 h serán de clases sincrónicas y 18 h de actividades de tutorías online. Los encuentros serán semanales y durarán aproximadamente 3 horas diarias (1.5 h de teoría y 1.5 h de aplicaciones prácticas). Las clases serán dictadas en español y portugués.

Todos los alumnos realizarán la parte virtual (teoría y aplicaciones); y unos 20 alumnos se espera que puedan realizar los trabajos prácticos presenciales en la CNPEM (Brasil).

(Clases, Seminarios, Prácticos)

EVALUACIÓN (INDICAR % DE CADA EVALUACIÓN)

La evaluación de la modalidad virtual tendrá dos instancias: en forma de **presentación personal para contextualizar el plan de trabajo propio incorporando alguna técnica nueva del curso (50%)**, y mediante una **prueba objetiva (50%)**.

PROFESORES PARTICIPANTES (INDICAR UNIDADES ACADÉMICAS)

Directoras del Curso: Dra. Eneida de Paula y Dra. María Gabriela Rivas

Coordinador: Lisandro J. Falomir Lockhart (Universidad de La Plata) y Victor Castro Fernández (Universidad de Chile).

Profesores

María Gabriela Rivas	Universidad Nacional del Litoral	Argentina
Luis González Flecha	Universidad de Buenos Aires	Argentina
Pietro Ciancaglini	Universidade Sao Paulo	Brasil
Juliana Yoneda	Brazilian Synchrotron Light Laboratory –LNLS-	Brasil
Lisandro J. Falomir Lockhart	Universidad de La Plata	Argentina
Leonel Malacrida	Universidad de la República	Uruguay
Fernando Dupuy	Universidad Nacional de Tucumán	Argentina
Victor Castro	Universidad de Chile	Chile
Sebastian Klinke	Fundación Instituto Leloir	Argentina
Ana Paula Valente	Universidade Federal de Rio de Janeiro	Brasil
Vanesa Galassi	Universidad Nacional de Cuyo	Argentina
Marcelo Costabel	Universidad Nacional del Sur	Argentina
Leandro Barbosa	Universidade Sao Paulo CNPEM	Brasil
Aline Passos	LNLS-CNPEM	Brasil
Lia Pietrasanta	Universidad de Buenos Aires	Argentina
Natalia Wilke	Universidad Nacional de Córdoba	Argentina

DESCRIPCIÓN / OBJETIVOS

El curso de posgrado “Técnicas de Biofísica Celular y Molecular” tiene como objetivo introducir a los estudiantes graduados interesados en esta área de investigación en una amplia variedad de métodos biofísicos que actualmente se utilizan para el estudio de sistemas biológicos y biomiméticos. Las técnicas que se abordarán incluyen principios de técnicas cromatográficas para aislamiento de proteínas, preparación de muestras, Dicroísmo Circular, Fluorescencia UV-Vis, espectroscopia de Infrarrojo, pinzas ópticas, cristalografía de Rayos X, Cryo-EM, Resonancia Magnética Nuclear, microscopía de fuerza atómica y espectroscopia de fuerza (AFM-FS), y Biología computacional, junto con aplicaciones de las técnicas mencionadas. El curso será dictado tanto por docentes representantes como no miembros del núcleo disciplinario biofísica, pertenecientes a diferentes universidades parte del Grupo Montevideo. También hemos invitado a docentes/investigadores especialistas en determinados temas que pertenecen a prestigiosos centros de investigación sudamericanos. Como en las propuestas anteriores, la escuela está orientada a que estudiantes de doctorado puedan identificar y entender las bases de técnicas que pueden ser utilizadas para estudiar los sistemas en los que trabajan. Los trabajos prácticos presenciales tendrán como objetivo mostrar el equipamiento utilizado para cada técnica y su modo de utilización, además de brindar nociones básicas en el tratamiento de datos obtenidos.

Todos los alumnos realizarán la parte virtual (teoría y aplicaciones); y unos 20 alumnos se espera que puedan realizar los trabajos prácticos presenciales en la CNPEM. La evaluación de la modalidad virtual tendrá dos instancias: en forma de presentación personal para contextualizar el plan de trabajo propio incorporando alguna técnica nueva del curso, y mediante una prueba objetiva. La evaluación de los trabajos prácticos presenciales será por medio de la entrega de un informe donde reportarán las experiencias de las que participaron.

Programa analítico del Curso: Se detalla a continuación el programa detallado de las clases virtuales, el número de clases (teóricas y prácticas), carga horaria y responsables de cada unidad.

Purificación de Proteína (3hs):

Profesora: María Gabriela Rivas (Universidad Nacional del Litoral, Argentina)

Parte Teórica: Consideraciones generales antes de iniciar un proceso de purificación de proteínas. Métodos de ruptura celular. Preparación de extractos para purificación de proteínas. Estrategia de purificación de tres fases: Captura, fase Intermedia y Polishing. Selección de técnicas cromatográficas a utilizar de acuerdo con las características de la proteína a purificar. Bases de las cromatografías usadas en los procesos de purificación. Consideraciones generales de los equipos utilizados. Seguimiento de proteínas durante la purificación: técnicas bioquímicas y espectroscópicas. Acondicionamiento de la muestra: concentración, diálisis y uso de estabilizadores. Cálculo del rendimiento del proceso de purificación.

Parte Práctica: análisis de procesos de purificación de proteínas.

2. Plegamiento y Estabilidad de Proteínas (3hs)

Profesor: Luis González Flecha (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Control de calidad de proteínas purificadas: evaluación de actividades enzimáticas y/o la interacción con ligandos específicos. Métodos espectroscópicos y calorimetría de titulación isotérmica. Estabilidad de proteínas. Conceptos de estabilidad termodinámica y cinética. Estabilidad frente al congelamiento. Métodos experimentales para el estudio de la estabilidad. Estabilidad de preparaciones de proteínas integrales de membrana. Factores que afectan la estabilidad de una proteína.

3. Preparación de Liposomas y Proteoliposomas (3h)

Profesor: Pietro Ciancaglini (Universidade de Sao Paulo, Brasil)

Micelas de lípidos. Liposomas: SUV, LUV, GUVs. Proteínas de membrana en contextos de solubilización y reconstitución. Tipos de interacciones en proteínas de membrana. Elección de detergentes para solubilización e implicaciones para el proceso de purificación de proteínas de membrana. Estrategias de reconstitución de proteínas en sistemas modelo. Ejemplos de métodos de inserción directa. Ejemplos de métodos de cosolubilización.

4. Dicroísmo Circular (3h)

Profesora: Juliana Ionedá (CNPq, Brasil)

Parte 1: Teoría: Aspectos generales de espectroscopía de absorción, fundamentos de espectroscopía de Dicroísmo Circular, equipamiento, Ventajas de la Radiación sincrotrón de Dicroísmo Circular (Línea CEDRO /Sirius).

Parte 2: Aplicaciones: Determinación de la estructura secundaria de proteínas, Proteínas globulares vs. proteínas de membrana, Films de proteínas deshidratadas, Proteínas intrínsecamente desordenadas, CD orientado, Otras biomoléculas/biomaterials.

5. Fluorescencia UV-Vis (3h)

Profesores: Lisandro J. Falomir Lockhart (UNLP, Argentina) y Leonel Malacrida (UdeLaR, Uruguay).

Introducción al fenómeno de fluorescencia. Propiedades generales de sondas fluorescentes. Fluoróforos orgánicos, inorgánicos y proteínas fluorescentes. Sondas sensibles al entorno y fotoconversiones. Técnicas de microscopía óptica de fluorescencia. FRAP, FRET y FLIM. Estrategias de análisis. Representación y análisis por Phasores.

6. Espectroscopía Infrarroja (3 h)

Profesor: Fernando Dupuy (Univesidad Nacional de Tucumán, Argentina)

Fundamentos, IR aplicado a sistemas biológicos: consideraciones prácticas, estudio de membranas biológicas por IR, estudio de proteínas por IR, ejercicios y procesamiento de datos.

7. Cristalografía de Rayos X (3 h)

Profesores: Victor Castro (Univesidad de Chile) y Sebastian Klinke (Fundación Instituto Leloir, Argentina)

Cristalización de proteínas, Celda unitaria y simetría cristalográfica (concepto de grupos espaciales). Difracción: Rayos X y su interacción con la materia. Conceptos básicos de onda y Rayos X. Difracción de cristales (ley de Bragg) y planos de Miller. Relación espacio directo y recíproco: concepto de transformada de Fourier. El experimento de difracción con un cristal, y como reconstruir la densidad electrónica. El experimento de difracción: información obtenida (amplitudes de ondas e índices de Miller). El problema de las fases y metodologías para resolver. Densidad electrónica y refinamiento de la estructura - Validación: Calidad de los datos medidos y del modelo 3D. Calidad de la información experimental (consistencia interna, valores R y CC, etc) Validación del modelo, factores R, consistencia estereoquímica y correlación densidad electrónica-modelo (RSRZ). Herramientas del PDB para validación (wwPDB Validation)

8. Crio-Microscopía Electrónica (Cryo-EM) (3h)

Profesores: Guilherme A.P. de Oliveira (Universidade Federal de Rio de Janeiro, Brasil), Andre L.B. Ambrosio (Universidade de Sao Paulo, Brasil)

Fundamentos de la microscopía electrónica y extrapolación para la resolución de estructura de complejos de biomacromoléculas. Equipamiento y estrategias de adquisición de datos. Procesamiento de datos y obtención de modelos 3D. Aplicaciones, ventajas y limitaciones.

9. Resonancia Magnética Nuclear (3h)

Profesora: Ana Paula Valente (Universidade Federal de Rio de Janeiro, Brasil)

Parte I: Conceptos básicos, experimentos básicos, (1D, 2D, TOCSY, NOESY, 1H/15N-HSQC), Dinámica de proteínas (escala de tiempo y tipo de experimentos).

Parte II: Aplicaciones en biología estructural (Determinación de estructura, unión del ligando, cinética, análisis conformacional, etc.), Metabolómica, Otras aplicaciones.

10. Biología Computacional (3h)

Profesores: Vanesa Galassi (Universidad Nacional de Cuyo, Argentina) y Marcelo Costabel (Universidad Nacional del Sur, Argentina)

- Modelado por homología: métodos y validación

- *Docking*

- Introducción a las simulaciones: coordenadas, campo de fuerza, métodos de muestreo: dinámica molecular y Monte Carlo

- Implementación de MD: algoritmos de integración, PBC, truncamiento y algoritmos de corrección de largo alcance para interacciones no ligadas, acoplamiento de temperatura y presión

- Muestreo estadístico: variables colectivas, Umbrella Sampling, metadinámica, muestreo mejorado de múltiples variables-. Métodos multiescala: QM/MM y embedding electrostático.

- Modelos de grano grueso: alcances, modelos más comunes y ejemplos

- Modelos de mesoescala: alcances y ejemplos

- Combinación de escalas experimentales y de simulación, aplicaciones avanzadas para virus y células completos.

11. SAXS (3h)

Profesora: Leandro Barbosa (Universidade de Sao Paulo, Brasil)

Fundamentos teóricos y principios físicos. Dispersión de rayos-X, relación entre patrones obtenidos y estructura proteica. Ventajas: determinación de tamaño, forma y flexibilidad sin cristalización. Reconstrucción tridimensional, métodos y algoritmos aplicados. PRIMUS y GNOM como software de análisis y herramientas complementarias. Integración con otras técnicas estructurales. Aplicaciones prácticas: estudios de interacciones proteína-proteína, transiciones conformacionales y ensamblaje macromolecular. Flujo de trabajo desde la obtención de datos hasta la interpretación.

12. XPCS (3h)

Profesora: Aline Passos (CNPEM, Brasil) (3h)

Fundamentos teóricos y principios de XPCS. Dispersión coherente de rayos X y observación de speckles. Instrumentación, fuentes coherentes y configuración experimental. Separación de fases en soluciones de proteínas. Organización coloidal en procesos de gelificación. Evolución estructural de geles termo-reversibles. Relajación en electrolitos poliméricos. Análisis de la separación de fases líquido-líquido y dinámica estructural. Métodos para interpretar fluctuaciones y correlación de intensidad. Aplicaciones: condensados biomoleculares y dinámica de materia blanda; Experiencias en la línea de haz Cateretê en Sirius (LNSL, Brasil).

13. Microscopía de fuerza atómica y espectroscopía de fuerza (AFM-FS) (3h)

Profesora: Lia Pietrasanta (Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina)

Microscopía de Fuerza Atómica: principio y aplicaciones: Componentes básicos de un AFM, Cómo funciona y modos de operación, Sensores de fuerza, Instrumentación, Preparación de muestras, Ventajas y limitaciones de AFM. Espectroscopía de Fuerza: principio y aplicaciones: Curvas fuerza-distancia, Propiedades mecánicas, Reconocimiento molecular, Nuevas técnicas.

14. Pinzas ópticas (1,5h)

Profesora: Natalia Wilke (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina)

Teoría: Historia de la manipulación óptica, fundamentos, setup del equipamiento, calibración.

Aplicaciones: Biofísica de moléculas únicas, Biofísica de membranas, Sistemas coloidales.

BIBLIOGRAFÍA- *Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3er Ed. Joseph R. Lakowicz. (2011) Springer ISBN: 978-0387312781*

- *Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3er Ed. James B. Pawley. (2006) Springer ISBN: 978-0387259215*

- *Introduction to Fluorescence Sensing. Volume 1: Materials and Devices. 3rd Ed. Alexander P. Demchenko (2020) Springer ISBN: 978-3-030-60154-6*

- *Pesce, G., Jones, P.H., Maragò, O.M. et al. Optical tweezers: theory and practice. Eur. Phys. J. Plus 135, 949 (2020). <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-020-00843-5>*

- *Arbore, C., Perego, L., Sergides, M. et al. Probing force in living cells with optical tweezers: from single-molecule mechanics to cell mechanotransduction. Biophys Rev 11, 765–782 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00599-y>*

- *Rupp, B. (2010) Biomolecular Crystallography. Principles, Practice and Application to Structural Biology. Garland Science New York.*

- *Zanotti, G. (2011) Protein Crystallography in Fundamentals of Crystallography, Edited by Carmelo Giacovazzo, Third Edition Oxford University Press New York.*

- *Blow D. (2002) Outline of Crystallography for Biologists. Oxford University Press New York.*

- *Drenth, J (2002) Principles of Protein X-ray Crystallography. Second Edition Springer Verlag.*

- *Understanding NMR spectroscopy, James Keeler. Editors: John Wiley & Sons. ISBN: 9780470746080*

- *Modern NMR Spectroscopy, Jeremy Sanders; Brian Hunter, Editors: Oxford, ISBN: 9780198555674*

- *Protein NMR spectroscopy: Principles and Practice, J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N.J. Skelton, M. Rance, Editor: Academic Press (2006, 2nd Edition), ISBN: 012164491X.*

- *R.N.A.H. Lewis and R.N. McElhaney. Membrane lipid phase transitions and phase*

organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* Volume 1828, Issue 10, 2013.

- E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.M. Ruyschaert, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. Sub-cellular biochemistry*, (1994)

- J.L.R. Arrondo, F.M. Goñi. *Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes Chemistry and Physics of Lipids. Volume 96, Issues 1–2*, (1998)

- *Understanding molecular simulation; from algorithms to applications*, Dan Frenkel, Berend Smit, AP, (2002)

- A. Leach. *Molecular Modeling, principles and applications*, Pearson, (2001).

- Allen, Michael P., and Dominic J. Tildesley. *Computer simulation of liquids*. Oxford university press, (2017).

- A. Laio, M. Parrinello, *Escaping free-energy minima*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (20) 12562–12566, (2002)

- Gurtovenko, Andrey A., and Ilpo Vattulainen. "Calculation of the electrostatic potential of lipid bilayers from molecular dynamics simulations: Methodological issues." *The Journal of chemical physics* 130.21 06B610, (2009)

- Chiarpotti M.V., Longo G.S., Del Pópolo M.G. *Coll. and Sur. B: Bioint.* 197, (2021)

- V.V. Galassi, and G. Menegon Arantes. "Partition, orientation and mobility of ubiquinones in a lipid bilayer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1847.12: 1560-1573, (2015).

- *Atomic Force Microscopy-Based Force Spectroscopy and Multiparametric Imaging of Biomolecular and Cellular Systems*, D. J. Müller, A. C. Dumitru, C. Lo Giudice, H. E. Gaub, Peter Hinterdorfer, Gerhard Hummer, J. J. De Yoreo, Y. F. Dufrêne, and D.

Alsteens, *Chem. Rev.*, 121, 19, 11701–11725 (2021).

- *Biophysical reviews top five: atomic force microscopy in biophysics*, T. Ando, *Biophysical Reviews* 13:455–458 (2021)

- *Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology*, Müller DJ, Dufrêne YF, *Nat Nanotechnol* 3:261–269 (2008).

- *Book: Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. 1996 ISBN: 978-1-4419-3249-5. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2508-7>.

- *Review: Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review*. *Chem Soc Rev.* 2021 Aug 7;50(15):8400-8413. doi: 10.1039/d0cs00558d.

Cronograma de Actividades

Encuentros	Parte I (17-18:30hs)	Parte II (18:30-20hs)
Semana 1 (17/3/2025)	Introducción <i>Eneida De Paula</i>	Purificación de Proteínas (Teórica) <i>Ma. Gabriela Rivas</i>
Semana 2 (24/3/2025)	Purificación de Proteínas (Aplicaciones) <i>Ma. Gabriela Rivas</i>	Plegamiento y Estabilidad de Proteínas (Teórica) <i>Luis Gonzalez Flecha</i>
Semana 3 (31/3/2025)	Plegamiento y Estabilidad de Proteínas (Aplicaciones) <i>Luis Gonzalez Flecha</i>	Preparación de Liposomas y Proeoliposomas (Teórica) <i>Pietro Ciancaglini</i>
Semana 4 (7/4/2025)	Preparación de Liposomas y Proeoliposomas (Aplicaciones) <i>Pietro Ciancaglini</i>	Dicroísmo Circular (Teórica) <i>Juliana S. Yoneda</i>
Semana 5 (14/4/2025)	Dicroísmo Circular (Aplicaciones) <i>Juliana S. Yoneda</i>	Fluorescencia UV-Vis (Teórica) <i>Leonel Malacrida // Lisandro J. Falomir Lockhart</i>
Semana 6 (21/4/2025)	Fluorescencia UV-Vis (Aplicaciones) <i>Leonel Malacrida // Lisandro J. Falomir Lockhart</i>	Espectroscopía Infrarroja (Teórica) <i>Fernando Dupuy</i>
Semana 7 (28/4/2025)	Espectroscopía Infrarroja (Aplicaciones) <i>Fernando Dupuy</i>	Cristalografía de Rayos X (Teórica) <i>Victor Castro // Sebastian Klinke</i>
Semana 8 (5/5/2025)	Cristalografía de Rayos X (Aplicaciones) <i>Victor Castro // Sebastian Klinke</i>	Cryo-EM (Teoría) <i>Guilherme A.P. de Oliveira</i>
Semana 9 (12/5/2025)	Cryo-EM (Aplicaciones) <i>Andre L.B. Ambrosio</i>	Resonancia Magnética Nuclear (Teórica) <i>Ana Paula Valente</i>
Semana 10 (19/5/2025)	Resonancia Magnética Nuclear (Aplicaciones) <i>Ana Paula Valente</i>	Biología Computacional (Teórica) <i>Vanesa Galassi // Marcelo Costabel</i>
Semana 11 (26/5/2025)	Biología Computacional (Aplicaciones) <i>Vanesa Galassi // Marcelo Costabel</i>	SAXS (Teórico) <i>Leandro Barbosa</i>
Semana 12 (2/6/2025)	SAXS (Aplicaciones) <i>Leandro Barbosa</i>	XPCS (Teórico) <i>Aline Passos</i>
Semana 13 (9/6/2025)	XPCS (Aplicaciones) <i>Aline Passos</i>	Espectroscopía de Fuerza Atómica y Microscopía de Fuerzas de Tracción (Teórica) <i>Lia Pietrasanta</i>
Semana 14 (16/6/2025)	Espectroscopía de Fuerza Atómica y Microscopía de Fuerzas de Tracción (Aplicaciones) <i>Lia Pietrasanta</i>	Pinzas Ópticas (Teoría + Aplicaciones) <i>Natalia Wilke</i>
Semana 15 (23/6/2025)	Consultas	Discusión Final y Cierre del Curso <i>Eneida De Paula</i>
Semana 16 (a definir)	Evaluación	