

## **MÓDULO 1: FUNDAMENTOS**

### **1.1 - Fotoquímica y Fluorescencia**

1.1.1 – Estados y transiciones electrónicas: orbitales moleculares; espín electrónico. Probabilidades de transición: ley de Beer; coeficientes de Einstein; reglas de selección; principio de Frank-Condon.

Cinética de reacciones fotoquímicas: producción y desactivación de estados excitados, diagramas de Jablonski, tiempos de vida y eficiencias cuánticas.

1.1.2 – Características de la emisión de fluorescencia: espectros de excitación y emisión; corrimiento de Stokes. Desactivación de la fluorescencia y transferencia de energía (mecanismo dipolar - Förster). Anisotropía de emisión.

1.1.3 – Estructura molecular y fluorescencia: fluoróforos y sondas de fluorescencia comunes (colorantes, QDs, VFPs).

1.1.4 – Estrategias de marcación con sondas fluorescentes: Sondas intrínsecas y extrínsecas; técnicas básicas de bioconjugación; inmunomarcación.

### **1.2 – Microscopías ópticas**

1.2.1 – Descripción básica del microscopio por óptica geométrica: trazado de rayos; formación de imágenes. Interferencia y difracción. Leyes de Snell y reflexión total. Interferencia y difracción. Magnificación y resolución. Distancia de trabajo.

1.2.2 – Componentes básicos de un microscopio óptico: fuentes de iluminación coherentes e incoherentes; objetivo y otras lentes (ocular, *tube lens*, condensador, etc.); detectores (puntuales, cámaras); etc..

1.2.3 – Tipos de microscopios: Microscopios de fluorescencia, de campo oscuro, de contraste de fase, de contraste por interferencia diferencial.

## **MÓDULO 2: TÉCNICAS Y APLICACIONES**

### **2.1 – Microscopía de fluorescencia: técnicas clásicas**

2.1.1 – Microscopía confocal

2.1.2 – Microscopía de excitación por dos fotones

2.1.3 – Microscopía TIRF (*total internal reflection -fluorescence- microscopy*)

2.1.3 – Microscopía confocal con disco giratorio.

### **2.2 – Microscopías FLIM, FRAP y FRET**

#### **2.3 – Métodos de moléculas/partículas únicas**

2.2.1 – Espectroscopia de moléculas únicas

2.2.2 – Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS, PCH, FIDA)

2.2.3 – Tracking

#### **2.4 – Nanoscopias de fluorescencia**

2.3.1 – RESOLFT (STED, GSD, etc.)

2.3.2 – Métodos basados en la detección y localización de moléculas únicas (PALM, STORM, GSDIM, etc.).

#### **Prácticas de Laboratorio:**

(1.1.A) – Técnicas de medición de fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo. Medición de espectros de fluorescencia y rendimientos cuánticos de fluorescencia. Medición de tiempos de vida de fluorescencia.

(1.1.B) – Desactivación de la fluorescencia y transferencia de energía. Cálculo de la constante de Stern-Volmer, y de la eficiencia de FRET.

(1.2.A) – Microscopios ópticos. Construcción de microscopios simple y sistemas de formación de imágenes.

- (2.1.A) – Microscopios de fluorescencia: observación de microscopios comerciales (WF y confocal).
- (2.2.A) – Observación de moléculas individuales: *blinking*, *bleaching*, localización.
- (2.2.B) – Espectroscopia de correlación de fluorescencia

### Bibliografía

1. J. R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer; 2<sup>nd</sup> ed. (June 30, 1999)
2. B. Valeur. Molecular fluorescence: Principles and applications. Wiley-VCH; 1<sup>st</sup> ed. (October 11, 2001)
3. Digital microscopy. Volume 72, Second Edition: A second edition of "Video Microscopy" (Methods in Cell Biology). Academic Press; 2<sup>nd</sup> ed. (December 19, 2003)
4. Hecht E. Optics. Addison Wesley; 4<sup>th</sup> ed. (August 2, 2001)
5. Fluorescence Correlation Spectroscopy. R. Rigler (Editor), E.S. Elson (Editor). Springer; 1<sup>st</sup> ed. (March 15, 2001)