



# INTRODUCCIÓN A LA CITOMETRÍA DE FLUJO MODALIDAD ON LINE

## PROGRAMA 2023

1

### MÓDULO UNO

- **Primera Parte** Introducción.-Historia.-Esquema básico del Citómetro de Flujo.
- **Segunda Parte** Fuente de luz.-Geometría del haz de luz.-Sistema óptico. Detector y amplificador de señales.
- **Tercera Parte** Sistema de fluidos.-Celda o cámara de flujo.-Sistema Informático

**Actividad práctica:** Investigación y descripción de las especificaciones de un citómetro de flujo  
*Cuestionario de Revisión*

2

### MÓDULO DOS

- **Gráfico de Puntos.**-Gráfico Tri-dimensional.
- **Gráfico de Contornos.**-Gráfico de Densidad.-Histograma.
- **Estadísticas.** Herramientas de análisis.-Operadores Lógicos.
- **Controles del ensayo**
- **Introducción al análisis multiparamétrico**

**Actividad práctica:** - Resolución de ejercicios con autocorrección para aprender el uso de las herramientas del programa. -Análisis de distintas muestras ya adquiridas en un equipo utilizando el programa Flowing (Software libre). Los docentes proporcionarán los archivos y las consignas para la utilización de las herramientas  
*Cuestionario de Revisión*

3

### MÓDULO TRES

#### Fluorocromos y colorantes

- Introducción.- Revisión-Citometría de fluorescencia: Fluorocromos: Aspectos generales.
- Fluorocromos Orgánicos: Compuestos que se intercalan en el DNA. Aplicaciones y propiedades diferenciales.
- Compuestos orgánicos pequeños que se conjugan a Biomoléculas.
- Compuestos orgánicos que se modifican por actividad celular.
- Compuestos orgánicos lipofílicos que se integran en las biomembranas.
- Fluorocromos Biológicos: Ficobiliproteínas.

### Ejemplos:

- Conjugación de fluorocromos proteicos.
- Fluorocromos en tandem FRET: f [D<sub>em</sub>, A<sub>ex</sub>, r].
- Proteína fluorescente verde (GFP) y sus derivados (FP's). Fluorocromos Nanotecnológicos.
- Quantum-Dots (Q-Dots). Propiedades fluorescentes de los Q-Dots.
- Diseño de los Q-Dots aplicados en citometría de fluorescencia.

**Actividad práctica:** Empleo de una aplicación on line, el SpectraViewer, para consultar los espectros de excitación y emisión de los distintos fluorocromos a fin de relacionarlos entre sí y conocer la posible utilización en cada equipo de acuerdo a sus especificaciones. Ejercicios prácticos

*Cuestionario de Revisión*

# 4

## MÓDULO CUATRO

### Aplicaciones de la Citometría de Flujo

- **Primera Parte:** -Estudio de Poblaciones leucocitarias. -Subpoblaciones LTCD4 y LTCD8 : utilidad en el seguimiento del paciente pediátrico infectado con VIH -Estudio de otras Poblaciones sanguíneas.
- **Segunda Parte:** -Funcionalidad y Viabilidad Celular.
  - Contenido de ADN.
  - Apoptosis.
  - Aplicación de las Microesferas.
  - Células NK.
  - Otras aplicaciones

### Actividad práctica:

- Discusión de distintos aspectos de la evaluación de linfocitos CD3+CD4+, recuentos absolutos: citómetros de plataforma única y doble, recomendaciones del CDC
- Análisis de neutrófilos y eritrocitos en muestras proporcionadas por los docentes mediante el empleo del programa Flowing para responder determinadas consignas
- Lectura de trabajos científicos en los cuales se han desarrollado aplicaciones de la citometría.
- Investigación bibliográfica sobre nivel de subpoblaciones de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ evaluables por citometría de flujo, que están directamente relacionadas al tratamiento anti-retroviral en pacientes pediátricos VIH+

*Cuestionario de Revisión*

# 5

## MÓDULO CINCO

- **Primera Parte:** Procesamiento de las muestras Preparación de una muestra para adquirir. Consideraciones prácticas.
- **Segunda Parte:** Citómetros Analógicos. Conceptos básicos. Calibración Manual.
  - Amplificación Lineal y Logarítmica.
  - Adquisición de Células pequeñas. Umbral.
  - Calibración manual
    - I) Protocolo de marcación. Gráficos para la adquisición.
    - II) Ajuste de los Voltajes.
    - III) Compensación.
  - Control de linealidad

• **Tercera Parte A:** Citómetros Digitales. Calibración del equipo: Calibración automática

- Optimización de Voltajes y estandarización de lecturas citométricas.
- Control de calidad instrumental con microsferas: Adquisición e interpretación.
- Compensación Automática.
- Validación de la compensación automática.

• **Tercera Parte B:**

- Compensación post-adquisición (off line)

**Actividad práctica:**

- Desarrollo de un procedimiento para marcar células de una muestra de médula ósea.
- Evaluación de distintos esquemas de compensación automática
- Armado de paneles de marcación multicolor que se adecuen a las especificaciones de un modelo determinado de citómetro.
- Compensación off line de una muestra de células marcadas con dos fluorescencias empleando el programa Flowing

*Cuestionario de Revisión*

# 6

## MÓDULO SEIS

### Nuevos equipos y aplicaciones emergentes de la Citometría de Flujo.

- Tecnología aplicada en Citometría de Flujo.
- Citometría de flujo multiparamétrica Convencional
  - Láseres
  - Detectores,
  - Configuración del instrumental óptico.
  - Nuevos reactivos fluorescentes
  - Aplicaciones de la citometría multiparamétrica.
  - Compensación electrónica en Citometría Multiparamétrica.
- Citometría de Flujo multiparamétrica No convencional
  - Citometría de Flujo de Espectro completo ó espectral
  - Citometría de masa o CyTof
- Aplicaciones emergentes en Citometría de Flujo
  - Citómetros de Flujo para muestras Ambientales
  - Citómetros que permiten el análisis cuantitativo de imágenes.

**Actividad práctica:** -Diseño de un experimento de cell sorting. Respuesta a las consignas dadas por el docente

*Cuestionario de Revisión*

# 7

## MÓDULO SIETE

### Trabajo Grupal

Diseño de un Protocolo para la evaluación de marcadores celulares. Dispondrán de diferentes temas, cada alumno tendrá que elegir uno, y los grupos quedarán conformados de acuerdo a su elección. Cada grupo dispondrá de un espacio de intercambio en el cual podrán compartir bibliografía relacionada con el tema elegido, discutir los distintos aspectos del trabajo y elaborar un texto que cumpla los objetivos propuestos por los docentes. Al final del módulo se habilitará un foro general para que los alumnos tengan acceso a todos los trabajos y compartan sus experiencias .

# CRONOGRAMA 2023

Durante el desarrollo de cada módulo los docentes incluirán actividades en los FOROS de carácter obligatorio, en donde los alumnos expondrán sus respuestas/resultados y debatirán con sus compañeros con el acompañamiento docente. Es un requisito indispensable responder cada uno de los Cuestionarios de Revisión para avanzar al siguiente módulo.

Módulos y Actividades	Fecha de Inicio *	Fecha de Finalización **
Presentaciones en el Foro General	5 de Abril	10 de Abril
Módulo I	12 de Abril	17 de Abril
Módulo II	19 de Abril	1° de Mayo
Módulo III	3 de Mayo	15 de Mayo
Módulo IV - <b>Primera Parte</b>	17 de Mayo	29 de Mayo
Módulo IV *** - <b>Segunda Parte</b>	31 de Mayo	12 de Junio
Elección de temas y formación de equipos para Trabajo Grupal	14 de Junio	19 de Junio
Módulo V - <b>Primera Parte</b>	21 de Junio	26 de Junio
Módulo V*** - <b>Segunda Parte</b>	28 de Junio	3 de Julio
Modulo V - <b>Tercera Parte</b>	5 de Julio	17 de Julio
Módulo VI	19 de Julio	24 de Julio
Módulo VII - <b>Primera Parte</b>	26 de Julio	Entrega - 7 de Agosto
Diseño de protocolo de diagnóstico/investigación		
Módulo VII - <b>Segunda Parte</b>		
Discusión	9 de Agosto	14 de Agosto
Recuperación de Módulo No realizado/No aprobado	16 de Agosto	21 de Agosto
Repaso	23 de Agosto	28 de Agosto
Evaluación Final (envío por correo)	30 de Agosto	5 de Septiembre

\*a las 8 am hora de Argentina

\*\* 23.50 hora de Argentina- marca el límite para enviar cada cuestionario de Revisión.

\*\*\*El Cuestionario de Revisión del Módulo IV se habilitará a partir de la Segunda Parte y el del Módulo V a partir de la Tercera Parte.

16 de Agosto: Es la fecha en que **se enviarán** por e-mail los cuestionarios recuperatorios a quienes les corresponda recuperar.

30 de Agosto: Es la fecha en la que la Evaluación Final **será enviada**, por e-mail, a cada alumno.-

5 de Septiembre : Es la fecha límite que tiene el alumno para enviar- por e-mail- la Evaluación Final con sus respuestas.

Los Certificados los recibirán, en el e-mail particular, a partir del 27 de Septiembre de 2023.