



INTRODUCCIÓN A LA CITOMETRÍA DE FLUJO MODALIDAD ON LINE

PROGRAMA 2024

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_{em}, A_{ex}, 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 microesferas: 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 2024

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	3 de Abril	8 de Abril
Módulo I	10 de Abril	15 de Abril
Módulo II	17 de Abril	29 de Abril
Módulo III	1 de Mayo	13 de Mayo
Módulo IV - Primera Parte	15 de Mayo	27 de Mayo
Módulo IV *** - Segunda Parte	29 de Mayo	10 de Junio
Elección de temas y formación de equipos para Trabajo Grupal	12 de Junio	17 de Junio
Módulo V - Primera Parte	12 de Junio	17 de Junio
Módulo V*** - Segunda Parte	19 de Junio	24 de Junio
Modulo V - Tercera Parte	26 de Junio	15 de Julio
Módulo VI	17 de Julio	22 de Julio
Módulo VII Diseño de protocolo de diagnóstico/investigación	24 de Julio	Entrega - 5 de Agosto
Repaso	7 de Agosto	12 de Agosto
Recuperación de Módulo No realizado/No aprobado	14 de Agosto	19 de Agosto
Evaluación Final (envío por correo)	21 de Agosto	26 de Agosto

*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.

14 de Agosto: Es la fecha en que se enviaran por e-mail los cuestionarios recuperatorios a quienes les corresponda recuperar y el **19 de Agosto** tienen que ser enviadas las respuestas.

21 de agosto: Es la fecha en la que la Evaluación Final será enviada, por e-mail, a cada Alumno.

26 de agosto: 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 16 de Septiembre de 2024.