

# ***CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO DE CITOMETRÍA DE FLUJO***

*Del 07 al 10 de octubre de 2024*

*Organizado por:*

***Servicio de Citometría de Flujo del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo (CITF-SAI-HNP)***

---

## **- A quién va dirigida la actividad:**

- Investigadores de la Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Paraplégicos (licenciados y doctores).
- Profesionales del campo de la biología, bioquímica, biotecnología y ciencias afines, incluyendo veterinaria y medicina.
- Titulados técnicos y licenciados en Ciencias Biomédicas.
- Grados medios y grados superiores.
- Estudiantes de Máster en Ciencias Biomédicas

## **- Fechas concretas de los días y horas del curso:**

**Fechas:** del 07 al 10 de octubre de 2024. 4 días completos en horario de 9:30-18:00 (incluyendo descansos).

**Duración:** 25 horas totales repartidas en 12 horas teóricas (3 días 4 horas/día) + 13 horas prácticas (laboratorio/diseño experimental/análisis).

**Horario (incluye descansos-ver tabla):** 9:30-18:00

Nº horas teóricas: 12

Nº horas prácticas: 13

Horario	Día 1	Día 2	Horario	Día 3	Horario	Día 4
9:30-11:00	Introducción	Diseño experimental/ paneles	9:30-11:00	Análisis datos	9:30-11:00	Práctica análisis
11:00-11:30	PAUSA	PAUSA	11:00-11:30	PAUSA	11:00-11:30	PAUSA
11:30-13:00	Aplicaciones y nuevos tipos citometría	Compensación	11:30-13:00	Análisis datos	11:30-13:00	Práctica análisis
13:00-13:15	PAUSA	PAUSA	13:00-13:15	PAUSA	13:00-14:00	PAUSA
13:15-14:15	Reactivos	Controles	13:15-14:15	Casos prácticos	14:00-15:30	Práctica análisis
14:15-15:30	PAUSA	PAUSA	14:15-15:30	PAUSA	15:30-16:00	PAUSA
15:30-17:45	Práctica adquisición en citómetros	Práctica diseño	15:30-18:00	Práctica paneles y compensación	16:00-17:30	Práctica análisis

**- Objetivo General:**

La finalidad principal del curso es dotar a todos los participantes de conocimientos y experiencias suficientes sobre la tecnología de la Citometría de Flujo, y su utilización como herramienta de investigación y de diagnóstico. Además, a los participantes se les proporcionarán suficientes recursos tanto teóricos como prácticos, que les permitirán en un futuro planificar y llevar a cabo experimentos basados en la Citometría de Flujo, así como interpretar los datos que genera un citómetro de flujo.

**- Objetivos Específicos:**

La finalidad primordial de la formación es dar a conocer la tecnología de la Citometría de Flujo. En concreto, los objetivos a alcanzar serían:

1) Comprender qué es la Citometría de Flujo y cuáles son sus aplicaciones más comunes.

2) Conocer el funcionamiento del citómetro analítico, capacitando a los alumnos para su manejo a nivel de usuario independiente.

3) Conocer distintos tipos de reactivos de utilización común en citometría de flujo y elegirlos correctamente en función de la finalidad experimental.

4) Aprender a diseñar y realizar protocolos experimentales de citometría, incluyendo los controles necesarios de validación.

5) Diseñar paneles multiparamétricos y aprovechar recursos automáticos disponibles en la red.

6) Comprender qué es la compensación de fluorescencias y aplicarla en tinciones multiparamétricas.

7) Conocer controles necesarios para la correcta adquisición y análisis de los datos obtenidos.

8) Entender las distintas formas de visualización de datos en citometría de flujo, y conocer las herramientas de análisis de datos básicas.

9) Diseñar y realizar estrategias de análisis de datos de citometría y obtener las principales medidas estadísticas de las muestras.

10) Interpretar los datos generados por el citómetro de flujo y el posterior análisis que se hace de ellos.

## CONTENIDOS

*Día 1 (07/10/2024)*

**MÓDULO 1:**

**FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO, INSTRUMENTACIÓN, APLICACIONES Y REACTIVOS**

(Unidad de Citometría de Flujo-Lab 22 i1-Edificio Investigación / Aula de investigación i1-Edificio Investigación)

**Docentes:** *Dra. Virginia Vila del Sol (teoría y práctica)*

*Dña. Ángela Marquina Rodríguez (teoría y práctica)*

*Docente invitado: D. Ignacio Martín (charla-seminario)*

**Horario:** **9:30-14:15**, 4 h teoría

**15:30-17:45**, 2h 15 min práctica

9:30-9:45 **Presentación del curso y entrega de documentación**

9:45-11:00

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

- *¿Qué es la Citometría de Flujo?*
  - *Preguntas que se pueden resolver con la Citometría de Flujo*
  - *Aplicaciones más conocidas*
  - *¿Qué se puede medir?: Parámetros y sondas.*
- *Los comienzos: microscopía y citometría*

### **1.2. FUNCIONAMIENTO DEL CITÓMETRO**

- *Visión general*
- *Sistema de fluidos*
- *Sistema óptico*
  - *Óptica de excitación*
  - *Óptica de colección*

- Sistema electrónico
  - Pulsos: creación y cuantificación
  - Conversión digital

11:00-11:30 Descanso

11:30-13:00

### **1.3 ADQUISICIÓN DE DATOS**

- Parámetros
- Fluorescencia y fluorocromos
- Obtención de datos
- Tipos de representación

### **1.4 APLICACIONES**

- Fenotipaje
- Expresión génica
- Análisis de ADN
- Proliferación
- Apoptosis
- Cambios en estado redox, potencial de membrana, calcio intracelular.
- Señalización intracelular
- Ensayos multiplex
- Endocitosis/fagocitosis
- Vesículas extracelulares
- Separación celular

### **1.5 OTROS TIPOS DE CITOMETRÍA**

- Nanocitometría
- Citometría espectral. Charla impartida por Ignacio Martín (Palex)

13:00-13:15 Descanso

13:15-14:15

## 1.6 REACTIVOS UTILIZADOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO

- *Fluorescencia y fluoróforos:*
  - *¿Qué es la fluorescencia?*
  - *Tipos de fluoróforos*
  - *Autofluorescencia*
- *Tipos de reactivos fluorescentes:*
  - *Anticuerpos*
  - *Tinción de ácidos nucleicos*
  - *Sondas de viabilidad celular*
  - *Anexina V y Ioduro de propidio*
  - *Proteínas fluorescentes*
  - *Sondas para proliferación celular*

14:15-15:30 Descanso comida

15:30-17:45 Prácticas en laboratorio (Unidad de Citometría de Flujo-Lab 22 i1-Edificio

Investigación)

- *Demostración funcionamiento de citómetros FACS Canto II (Becton Dickinson) y CytoFLEX S (Beckman Coulter) y práctica básica de adquisición y optimización “settings”*

*Día 2 (08/10/2024)*

**MÓDULO 2:**

**DISEÑO EXPERIMENTAL, COMPENSACIÓN Y CONTROLES**

(Aula de investigación i1-Edificio Investigación/ Aula de informática-HNP)

**Docentes:** *Dra. Virginia Vila del Sol (teoría y práctica)*

*Dña. Ángela Marquina Rodríguez (práctica)*

**Docente invitada:** *Dña. Irene Martínez (charla-seminario)*

**Horario:** **9:30-14:15**, 4 h teoría

**15:30-17:45**, 2h 15 min práctica

9:30-11:00

### **2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

- *Introducción al diseño de paneles multicolor para citometría de flujo. Charla impartida por Irene Martínez (Becton Dickinson).*

- *Optimización de reactivos:*

- *Titulación*

- *Bloqueo*

- *Especificidad*

- *Optimización del equipo*

- *Compensación*

- *Controles experimentales*

11:00 – 11:30 Descanso

11:30-13:00

### **2.2 COMPENSACIÓN**

- *Spillover: Espectros de excitación y emisión*

- *Sistema de recolección de fluorescencia*

- *Métodos de compensación*

- *Reglas y mitos de la compensación*

13:00 – 13:15 Descanso

13:15-14:15

### **2.3 CONTROLES**

- *Conceptos clave*
- *Fuentes de variabilidad*
- *Optimización de detectores*
- *Controles de tinción*
- *Controles de referencia*
- *Controles Isotópicos*
- *Controles biológicos*
- *Controles de análisis*
- *Controles Positivos*
- *Control “Fluorescence minus one” o FMO*
- *Controles de Compensación*

14:15-15:30 Descanso comida

15:30-17:45 Prácticas de diseño (aula de informática-HNP)

- *Uso de recursos online para conocer antígenos y fluorocromos*
- *Diseño de paneles: Categorización de pares antígeno-anticuerpo, elección de fluorocromos.*
- *Diseño de paneles automático: uso recursos online*

*Día 3 (09/10/2024)*

**MÓDULO 3:**

**ANÁLISIS DE DATOS**

(Aula de investigación i1-Edificio Investigación/ Unidad de Citometría de Flujo-Lab 22 i1-Edificio Investigación)

**Docentes:** Dra. Virginia Vila del Sol (teoría y práctica)

Dña. Ángela Marquina Rodríguez (práctica)

**Horario:** 9:30-14:15, 4 h teoría

15:30-18:00, 2h 30 min práctica

9:30-11:00

### **3.1 VISUALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS**

- Archivos FCS
- Escalas lineal, logarítmica y biexponencial
- Tipos de gráficos
- Tipos de regiones
- Tipos de "gating"

### **3.2 DISEÑO ESTRATEGIA DE ANÁLISIS**

- Diseño de estrategia de análisis
- Aplicación matriz de compensación
- Uso del parámetro tiempo
- Eliminación de dobletes
- Discriminación muerte celular
- Controles: FMO

11:00-11:30 Descanso

11:30-13:00

### **3.3 ANALISIS ESTADISTICO**

- *Análisis estadístico*
- *Principales medidas estadísticas*
- *Análisis de grupos*

### **3.4 INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE DATOS MULTIDIMENSIONAL**

13:00-13:15 Descanso

13:15-14:15

### **3.5 CASOS PRÁCTICOS**

14:15-15:30 Descanso comida

15:30-17:45 Prácticas en laboratorio

- *Práctica de titulación, bloqueo, compensación y optimización de equipos CytoFLEX S y FACS Canto II.*

*Día 4 (10/10/2024)*

**PRÁCTICAS ANÁLISIS DE DATOS**

(Aula de informática-HNP)

**Docentes:** *Dra. Virginia Vila del Sol*

*Dña. Ángela Marquina Rodríguez*

**Horario: 9:00-17:30** 6 horas prácticas

*9:30-11:00 Manejo del programa de análisis FlowJo con casos prácticos*

*11:00-11:30 Descanso*

*11:30-13:00 Manejo del programa de análisis FlowJo con casos prácticos*

*13:00-14:00 Descanso comida*

*14:00-15:30 Manejo del programa de análisis FlowJo con casos prácticos*

*15:30-16:00 Descanso*

*16:00-17:30 Manejo del programa de análisis FlowJo con casos prácticos*