

## II CURSO DE INTRODUCCIÓN A LA CITOMETRÍA DE FLUJO

### - A quién va dirigida la actividad:

- Investigadores de la Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Paraplégicos (licenciados y doctores). Reservadas 4 plazas.
- 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 Másters y de Grado en Ciencias Biomédicas

### - Fechas concretas de los días y horas.

- *Duración:* 15 horas teóricas (5 días 3 horas/día) + 5 horas prácticas repartidas en 2.5 h para todos (prácticas de análisis) y 2.5 h de demostración práctica por cada grupo (1 día cada grupo, en grupos de 5 personas).
- *Horario:* De 15:00 a 18:30 las clases teóricas y de 15:00 a 18:00 las clases prácticas con descanso de 30 minutos.
- *Fechas:*
  - Teoría:* Lunes 05/11/18  
Martes 06/11/18  
Miércoles 07/11/18  
Jueves 08/11/18  
Lunes 12/11/18
  - Prácticas:* Martes 13/11/18- práctica común de análisis  
Miércoles 14/11/18- práctica Grupo 1  
Jueves 15/11/18 práctica Grupo 2

### - Objetivo General.

La finalidad principal del curso es dotar a todos los participantes de un conocimiento sobre la tecnología de la Citometría de Flujo, y su utilización como herramienta de investigación y de diagnóstico. Además se dará respuesta a qué es la Citometría de Flujo y para qué sirve, cuáles son las principales técnicas utilizadas en citometría,

cómo diseñar protocolos experimentales adecuados, cómo realizar la adquisición y análisis de muestras, y cómo 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) Conocer 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 la citometría de flujo, sus aplicaciones y el diseño de paneles multiparamétricos.
- 4) Conocer controles necesarios para la correcta adquisición y análisis de los datos obtenidos.
- 5) Conocer y comprender el fenómeno de la compensación de fluorescencias en tinciones multiparamétricas.
- 6) Aprender a diseñar y realizar protocolos experimentales de citometría, incluyendo los controles necesarios.
- 7) Introducción al análisis de datos de citometría y estadística.

### **- Plazas y Precio curso:**

Total plazas: 10

Nº plazas externas: 6

Nº plazas reservadas internas: 4

Precio: 100 €/alumno. Alumnos internos: 25 €/alumno

**- Contenidos**, desglosado por horas (incluido el tiempo de descanso).

**PROGRAMA DEL CURSO: (INCLUYENDO LOS TIEMPOS DE LOS DESCANSOS)**

## **PARTE TEÓRICA (15h totales)**

### **Día 1 (05/11/18) FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO, INSTRUMENTACIÓN Y APLICACIONES**

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

*Docente:* Dra. Virginia Vila del Sol

*Horario:* 15:00-18:30 3 horas teoría

15:00-15:15 ***Presentación del curso y entrega de documentación***

15:15-16:30

#### **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

16:30-17:00 Descanso

17:00-18:30

#### **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

### **Día 2 (06/11/18) SEPARACIÓN CELULAR Y REACTIVOS UTILIZADOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO**

**(Aula de investigación i1-Edificio Investigación)**

*Docente:* Dra. Virginia Vila del Sol

**Horario:** 15:00-18:30 3 horas teoría

15:00-16:30

#### **2.1 SEPARACIÓN CELULAR**

- Fundamentos
  - Separación magnética
  - Separación electrostática
- Funcionamiento citómetro separador
- Preparación de muestras para separación celular
- Aplicaciones posteriores a la separación

16:30- 17:00 Descanso

17:00-18:30

#### **2.2 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

### **Día 3 (07/11/18) DISEÑO EXPERIMENTAL Y COMPENSACIÓN**

**(Aula de investigación i1-Edificio Investigación)**

*Docente:* Dra. Virginia Vila del Sol

**Horario:** 15:00-18:30 3 horas teoría

15:00-16:30

#### **3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

- Establecimiento de hipótesis
- Instrumentación disponible
- Conocimiento de los antígenos y de los fluorocromos
- Diseño del panel multiparamétrico
- Optimización de reactivos:
  - Titulación
  - Bloqueo
  - Especificidad
- Optimización del equipo
- Compensación
- Controles experimentales

16:30 – 17:00 Descanso

17:00-18:30

#### **3.2 COMPENSACIÓN**

- Spillover: Espectros de excitación y emisión

- Sistema de recolección de fluorescencia
- Métodos de compensación
- Reglas y mitos de la compensación

**Día 4 (08/11/18) CONTROLES Y ANÁLISIS DE DATOS (I)**  
**(Aula de investigación i1-Edificio Investigación)**

*Docente:* Dra. Virginia Vila del Sol

**Horario:** 15:00-18:30 3 horas teoría

15:00-16:30

**4.1 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

16:30-17:00 Descanso

17:00-18:30

**4.2 VISUALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS**

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

## **Día 5 (12/11/18) ANÁLISIS DE DATOS (II)**

**(Aula de informática)**

*Docente:* Dra. Virginia Vila del Sol

**Horario: 15:00-18:30** 3 horas teoría

15:00-16:30

### **5.1 DISEÑO ESTRATEGIA DE ANÁLISIS Y ANALISIS ESTADISTICO**

- Diseño de estrategia de análisis
  - Aplicación matriz de compensación
  - Uso del parámetro tiempo
  - Eliminación de dobletes
  - Discriminación muerte celular
  - Controles: FMO
- Análisis estadístico
  - Principales medidas estadísticas
  - Análisis de grupos

### **5.2 PROGRAMA DE ANÁLISIS DE DATOS**

- programa de análisis FlowJo y FACS Diva 6.1
- Introducción al uso del programa FlowJo

16:30-17:00 Descanso

17:00-18:30

### **5.3 CASOS PRÁCTICOS**

**PARTE PRÁCTICA (5h totales en dos días)**

**Día 6 (13/11/18) PRÁCTICA COMÚN 3h (Aula de informática)**

*Docente:* Dra. Virginia Vila del Sol

**Horario: 15:00-18:00** 2.5 horas Práctica

15:00-16:15 Manejo del programa de análisis FlowJo

16:15-16:45 Descanso

16:45-18:00 Análisis casos prácticos con programa FlowJo

**Días del 14/11/18 y 15/11/18 GRUPOS DE PRÁCTICAS (5 personas/grupo, 2 grupos)**

**Lugar:** Servicio de Citometría de Flujo. I1-Lab 22 (edificio de investigación)

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

**Horario: 15:00-18:00** 2.5 horas Práctica

15:00-18:00 Demostración funcionamiento del citómetro FACS Canto II y práctica básica

Descanso de 16:15-16:45

**Docente:**

Dra. Virginia Vila del Sol

DNI: 52.536.431-S

Email: [vila@sescam.jccm.es](mailto:vila@sescam.jccm.es)

Tlf: 925 396 833