



Curso de postgrado: “De la Mesada al Citómetro. Optimización de la inmunocitometría Multicolorimétrica y Cell sorting”

1) Programa analítico :

Unidad 1): Reglas para optimizar la elección de fluoróforos en una combinación multicolorimétrica

(Parte Teórica) (Duración: 2 1/2 horas)

- 1a. Definición de inmunocitometría multicolorimétrica
- 1b. Configuración óptica del citómetro de flujo, su influencia en la sensibilidad de resolución.
- 1c. Índice de tinción del fluorocromo: concepto y aplicación.
- 1d. Nivel de expresión de la proteína blanco y su relación con dichas reglas.
- 1e. Sensibilidad de resolución y poblaciones brillantes.
- 1f. Fluorocromos en tándem y sus limitaciones.
- 1g. Superposición espectral en la emisión de fluorescencia. Su influencia en la resolución de poblaciones.

Casos Problemas: *Se evalúan distintas muestras; Biopsia endometrial humana, células mononucleares totales de sangre periférica humana, ganglio linfático de rata en las cuáles se valora la sensibilidad de resolución frente a distintos esquemas de combinación de fluoróforos. (Duración: 1 1/2 horas)*

Docente a cargo: Bioq. Luis Ariel Billordo

Unidad 2): Controles en la citometría de flujo: (Parte Teórica). (duración: 2 horas)

- 2a. Controles negativos en inmunofluorescencia directa e indirecta, con anticuerpos monoclonales y policlonales.
- 2b. Autofluorescencia, FMO, controles isotípicos, controles isoclónicos.
- 2c. Controles de compensación.
- 2d. Controles positivos. (control de desempeño del ensayo)

Casos Problemas: *Buenas prácticas del uso del control isotípico en muestra de células mononucleares totales de sangre periférica. (Duración: 1 hora)*

Docente a cargo: Bioq. y Farm. Plácida Baz

Unidad 3): Artefactos citométricos: (Parte Teórica) (duración: 2 horas)

4a. Agregados celulares: dobletes, tripletes. Detritos.

4b. Células muertas: su influencia. Exclusión de las mismas.

4c. Corrimientos inespecíficos del tubo de reacción respecto a sus controles negativos.

4d. Unión no deseada de los anticuerpos (principalmente vía Fc-RFc).

Casos Problemas: Exclusión de células apoptóticas por niveles de autofluorescencia y por tinción con sondas de viabilidad resistentes a la fijación/permeabilización. Exclusión de agregados celulares en forma analítica (gráficos de puntos de FSC-A vs FSC-W, SSC-A vs SSC-W, FSC-H vs FSC-A). Buenas prácticas del uso de control isotópico, consecuencias de su uso incorrecto en una muestra de mononucleares totales derivada de sangre periférica humana. Bloqueo de RFc con CD16/CD32 en muestra de tumor mamario para inhibir la unión inespecífica de anticuerpos monoclonales a células mieloides infiltrantes. (Duración: 1 hora)

Docente a cargo: Bioq.y Farm. Plácida Baz

Unidad 4): Inmunomarcación de fosfoproteínas (vías de señalización): (Parte Teórica) (duración: 2 1/2 horas)

3a. Comparación entre las distintas estrategias de detección de fosfoepítopes.

3b. Factores experimentales influyentes en los resultados.

3c. Métodos secuenciales y No secuenciales de inmunomarcación.

3d. Protocolos y reactivos comerciales de permeabilización/Fijación.

3e. Marcadores de superficie celular humanos/murinos validados para inmunoanálisis de fosfoproteínas.

Casos Problemas: Simulación de los pasos a evaluar para la inmunomarcación de pStat1 (pY701), CD4 y CD56 con la utilización de la base de datos Cytobank (www.Cytobank.org)

y la elección del protocolo más adecuado para ésta combinación. (Duración: 1 1/2 horas)

Docente a cargo: Bioq. Luis Ariel Billordo

Unidad 5): Interpretación y análisis de datos: (Parte Teórica) (duración: 3 horas)

5a. Validación interpretativa holística de los datos citométricos.

5b. Validación de la compensación.

5c. Número de eventos adquiridos; un abordaje estadístico.

5d. Métodos de análisis de datos: manual y automatizado.

Casos Problemas: Compensación y validación de la misma en una muestra de lavado hepático con una combinación de 7 colores. Infiltrado linfocitario en músculo cardíaco, la subjetividad del citometrista en la compensación. 3 Técnicas de análisis en una muestra de espermatozoides humanos en un ensayo de Tunel, su comparación de desempeño analítico. La importancia de la multiparametría para la identificación de LTreg en una muestra de ganglio linfático de rata. Uso de cuadrantes ortogonales en el análisis de muestras, sus limitaciones. (Duración: 2 horas)

Docente a cargo: Bioq. Luis Ariel Billordo

Unidad 6): Separación celular por Citometría de Flujo (Parte teórica) (duración:3 horas)

6a. Comparación entre los distintos métodos de Separación de Flujo- Mecánico y Deflección electroestática.

6b. Separación de Flujo aséptico y no aséptico.

6c. Desempeño de la separación celular de flujo por deflección electroestática: Rendimiento, Recuperación, eficiencia y Pureza.

6d. Puesta a punto de la separación celular de Flujo electroestático: Factores afectantes del desempeño de la separación celular; consideraciones de la citometría analítica, cálculo de Drop-delay, tamaño del nozzle, temperatura de la mezcla celular, umbral de lectura, modos de precisión del sorting, tipo celular, etc.

Casos problemas:

Estimación del número de células por muestra a separar de acuerdo al número de células purificadas requeridas, concentración celular requerida, estimación del tiempo de procesamiento.

Discusión de diferentes muestras separadas para interpretar el cálculo de Rendimiento, Recuperación y pureza.

Discusión de casos problemáticos; poblaciones poco frecuentes, células adherentes, etc. (Duración: 2 horas)

Docente a cargo: Bioq. Luis Ariel Billordo y Bioq. Farm Plácida Baz.

2) Características metodológicas:

Curso teórico con práctico, en el cual cada clase constará de 2 partes:

En la primera de ellas el docente hará una introducción teórica del tema, con un ejemplo del caso-problema y posterior discusión con el alumnado. La presentación será de tipo expositiva en un formato Power Point con ayuda del pizarrón en caso necesario.

En la segunda parte se les brindarán a los alumnos casos problemáticos a resolver relacionados a la unidad temática correspondiente, ésta actividad será realizada en grupos de 5 alumnos cada uno. Una vez resueltos los casos, su solución será expuesta al resto de la clase para ser discutida y analizada con el docente.

3) Recursos didácticos:

Diapositivas de Power Point.

Publicaciones científicas (Papers) en formato digital (pdf).

Software de análisis citométrico (Flow Jo, Cell Quest, etc).

4) Carga Horaria:

24 horas reloj total, distribuido en 2 clases de 5 horas, 2 clases de 4 hs y 1 clase de 6hs. Las mismas serán repartidas en 15 horas la parte teórica y 9 horas la parte práctica.

Los días de dictado de clases serán durante una semana de lunes a viernes en horarios a confirmar.

5) Procedimientos de evaluación:

Examen final escrito individual (Vía online): Se evaluarán 12 casos problemáticos. La aprobación del examen debe tener 9 casos resueltos correctamente.

Los requisitos de aprobación del curso serán una asistencia mínima del 80 % (5 clases) y aprobación del examen final.

Docentes:

Bioq. Luis Ariel Billordo

Dr. Héctor M Targovnik

Farm y Bioq. Plácida Baz

Director del Curso

Bibliografía:

Unidad 1:

-Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. Patrik K. Chattopadhyay, Brent Gaylord, Adrian Palmer, Nan Jiang, Mary A. Raven, Geoff Lewis, Morgan A. Reuters, A.K.M. Nur-ur Rahman, David A. Price, Michaels R. Betts, Mario Roederer. *Cytometry, Part A*. 81A:456-466.2012.

-Nine-Color flow Cytometry for accurate measurement of T cell subsets and Cytokine Responses. Part I: Panel design by empiric approach. Bridget E. McLaughlin, Nicole Baumgarth, Martin Bigos, Mario Roederer, Stephen C de Rosa, John D. Altman, Douglas F. Nixon, Janet Ottinger, Carol Oxford, Thomas G. Evans, David M. Asmuth. *Cytometry, Part A*. 73A: 400-410.2008.

-A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. Patrik K. Chattopadhyay, Carl Magnus Hogerkorp, Mario Roederer. *Immunology: Review article*. 7 october 2008. 125,441-449.

-Evaluation of a 12 color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cells subsets in humans. Patrick Autissier, Caroline Soulas, Tricia H. Burdo, Kenneth C. Williams. *Cytometry, Part A*. 77A: 410-419.2010.

-Quantifying Spillover Spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design. Richard Nguyen, Stephen Perfetto, Yolanda D. Mahnke, Patrik K. Chattopadhyay and Mario Roederer. *Cytometry, Part A*. 83(3):306-315.2013 March.

-Optimizing a multi-colour immunophenotyping assay. Yolanda D. Mahnke, Mario Roederer. *Clin Lab Med*. 27(3):469-v; 2007, September.

-Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. Holten T. Maecker, J. Philip McCoy and Robert Nussenzweig. *Nature Reviews Immunology*. Volume 12, March 2012.

Unidad 2

- Seventeen colour flow cytometry: unravelling the immune system. Perfetto, Chattopahyay, Roederer (2004) Nature Vol 4
- Evaluation of a 12-colour flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte and dendritic cell subset in humans. Autissier, Williams (2010). Cytometry 77A:410-419
- Today's technology and tomorrow's horizons. Chattopahyay, Roederer (2012). Methods July; 57(3) 251-258
- Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for Immunofluorescence experiments. Chattopadhyay, Roederer (2012). Cytometry Part A 81A: 456-466
- A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. Chattopadhyay, Roederer (2008). Immunology, 125: 441-449
- Optimizing a multi-colour immunophenotyping assay. Mahnke, Roederer (2007). Clin Lab Med September: 27(3) 469-v
- A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. Baumgarth, Roederer (2000) Jour Immunol Methods 243: 77-97
- Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. Hussel, Openshaw (2000). Jour Immunol Methods 243 107-124
- Determination of CD4 antigen density on cells: role of antibody valency, avidity, clones and conjugation (1998). Davis, Abraus, Bishop et al. Cytometry 33: 197-206
- Flow Cytometric quantitation of Immunofluorescence intensity: problems and perspective (1998) EUROPEAN GROUP OF CLINICAL CELL ANALYSIS Cytometry 33: 166-178
- Isotype controls in the analysis of lymphocytes and CD34+ stem and progenitor cells by flow cytometry-Time to let go! (1998). Keeney, Gratama, Sutherland Cytometry 34: 280-283
- Isotype Controls -Time to let go? O`Gorman and Thomás (1999) Cytometry 38: 78-80

Unidad 3:

- Techniques for Phospho Protein Analysis .Application Handbook 1st edition.Becton Dickinson Biosciences. Technical Resources. Becton Dickinson Biosciences, April 2011.
- Antibodies to human cell-surface markers tested for BD Phosflow protocols. Becton Dickinson Biosciences, 2009.
- Successful development of flow Cytometric assay to analyze Cytokine-induced phosphorylation pathways within peripheral blood leukocytes. David T. Montag Jr. Submitted to the Graduate Faculty of the School of Engineering in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of Science. University of Pittsburgh. Pensilvania, Estados Unidos,2006.
- Phospho Flow Cytometry methods for the analysis of Kinase signaling in cell lines and primary human blood samples. Peter O. Krutzik, Angelica Trejo,Kenneth R.Schulz and Garry P. Nolan. Chapter 9,Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology,vol.699.2011.

Unidad 4:

- Seventeen colour flow cytometry: unravelling the immune system. Perfetto, Chattopahyay, Roederer (2004) Nature Vol 4
- Evaluation of a 12-colour flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte and dendritic cell subset in humans. Autissier, Williams (2010). Cytometry 77A:410-419
- Fc block treatment, dead cells exclusion and cell aggregates discrimination concur to prevent phenotypical artifacts in the analysis of subpopulations of tumor – infiltrating CD11b positive myelomonocytic cells. Kuonen, Laurent, Ruegg (2010). Cytometry part A 77 A1082-1090

Unidad 5:

- Practical Flow Cytometry. Data Analysis, Shapiro, Howard M, 225-256.4th edition.
- Flow Cytometry Histograms: Transformations, resolutions and display. David Novo, James Wood. Cytometry, Part A. Review article, 73(A):685-692.2008.
- Data Analysis in Flow Cytometry: The future just started. Enrico Lugli, Mario Roederer and Andrea Cossarizza. Cytometry A, 2010 July; 77(7):705-713.
- Guide to Flow Cytometry: Data Analysis; pages 33-38, Stephen W. Pursley, DakoCytomation, 2004.
- Guide to Flow Cytometry : Rare-event Detection; pages 55-58, Terry Hoy, DakoCytomation, 2004.

Unidad 6:

- Flow Cytometry Protocols, third edition, Teresa S. Hawley, Robert G. Hawley, Humana Press, 2011.
- Modern Flow Cytometry, Tim Bushnell and Expert Cytometry LLC, 2015.
- Flow-based sorting of neonatal lymphocyte populations for transcriptomics analysis. Ravi S Misra et al, J Immunol Methods, 2016 October, 437:13-20.
- Advanced Topics in 4-10 color Compensation for Flow Cytometry, Tim Bushnell, Michael Kissner and Expert Cytometry LLC, 2018.
- General Concepts about Cell Sorting techniques, Alberto Orfao and Alejandro Ruiz-Arguelles, Clinical Biochemistry, vol 29, n°1, pp 5-9, 1996.
- Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies, Andrea Cossarizza et al, European Journal of Immunology, 47:1584-1797, 2017.

**INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA, GENÉTICA Y METABOLISMO
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET)
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.**

**Hospital de Clínicas “José de San Martín”
Av. Córdoba 2351 (C1120AAR) Buenos Aires, República Argentina
Tel (54) 11 5950-8803/05, e-mail: inigem@conicet.gov.ar**