



## **Curso virtual “Avances en citometría de flujo y citometría computacional para estudios inmunológicos”**

Coordinadores: Guillermo Blanco, Ariel Billordo, Fernando Chirido y Florencia Quiroga

**Miércoles 25 de noviembre**

**09:30 h (UTC-3). Gabriel Morón. CIBICI-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina**

### *Aspectos básicos de citometría de flujo*

Componentes de hardware de instrumentos de citometría de flujo clásicos y nuevos. Sistema de fluidos, óptica y electrónica, componentes digitales. Evolución histórica, perspectiva presente y futura. El impacto del creciente número de parámetros fluorescentes. Conceptos básicos de fluorescencia. Absorción y emisión de luz, espectros, selección de fluoróforos, herramientas de software de visor espectral. Resolución espectral con filtros ópticos. Derrame, controles de compensación, matriz de compensación. Otros controles básicos de fluorescencia en citometría de flujo multicolor. Conjuntos de datos de citometría de flujo convencional.

**10:30 h (UTC-3). Ariel Billordo. INIGEM-UBA-CONICET, Argentina**

### *Citometría de flujo policromática convencional: ¡Nunca olvide la relación señal/ruido!*

Conceptos clave para el diseño y prueba de paneles de anticuerpos multicolores (directrices de diseño). El concepto y la importancia del error de propagación (SE) de la detección de fluoróforos en el diseño de paneles de citometría de flujo. Matrices en Citometría de flujo y sus interpretaciones. Titulación. Fluoróforos brillantes y tenues. Índice de tinción. Valor de desbordamiento (SOV). Opciones para marcadores bajos y muy abundantes. Controles de tinción (FMO, isotipo, controles biológicos, etc.). Compensación: las cuatro reglas de oro. *Beads* vs células como controles de compensación. Documentación de paneles complejos (OMIPs). Herramientas de software de compensación automática. Edición de la matriz de compensación. Excluyendo células muertas y agregadas en tinción multicolor. El uso del canal basura. Titulación y optimización de voltajes. Lecturas intra- e interinstrumentales estandarizadas. Control de calidad instrumental.

**Jueves 26 de noviembre**

**10:30 h (UTC-3). Andrew Filby. Newcastle University, Reino Unido**

***Citometría de flujo basada en imágenes \****

Medición de luz a partir de imágenes de células únicas. Parámetros morfométricos. Imágenes digitales frente a PMT. Resolución y aumento. Aplicaciones más comunes: recuentos puntuales, endocitosis, morfología nuclear y celular, translocación nuclear, etc.

***Citometría de masas \****

Citometría por tecnología Time-Of-Flight (CyTOF). Citometría de flujo de células marcadas con anticuerpos acoplados a isótopos de metales de tierras raras. Espectrómetro de masas: la fuente de iones, el analizador de iones y el detector de iones. Integración de las intensidades de señal obtenidas para una célula en los diferentes canales de masa y conversión a archivos de formato estándar de citometría de flujo (FCS) 3.0. Aplicaciones más comunes de CyTOF. Conjuntos de datos de citometría de masas.

\* Clase a dictarse en idioma inglés.

**12:00 h (UTC-3). Diana Bonilla. Cytek Biosciences. California, USA**

***Citometría de flujo espectral***

Fundamentos del hardware de la tecnología espectral, sus aplicaciones, las diferencias con el enfoque tradicional y su contribución a aplicaciones en inmunología. Diferencias en el análisis de los datos en relación con el enfoque tradicional. Modo de registro de espectros, etc. Fortalezas y debilidades.

**14:00 h (UTC-3). Florencia Quiroga. INBIRS-UBA-CONICET, Argentina**

***Introducción al análisis de datos en inmunología***

Métodos "tradicionales" en el análisis de datos y sus limitaciones. Análisis manual. Preprocesamiento, *gating* y post-procesamiento. Curación de conjuntos de datos. Transformación de datos en citometría. Normalización de los valores de intensidad de fluorescencia. Posicionamiento automático de ventanas "magnéticas". Subpoblaciones que actúan como "puntos de referencia". Identificación de poblaciones celulares mediante *gating* bivariado secuencial. Tamaño de poblaciones e intensidades medias de fluorescencia. Transiciones suaves entre poblaciones. Nuevas herramientas para visualizar poblaciones celulares de N dimensiones.

**14:45 h (UTC-3). Carla Pascuale. INBIRS UBA-CONICET, Argentina**

### ***Demostración práctica empleando FlowJo.***

Introducción práctica al análisis de datos en FlowJo. Compensación. Limpieza de datos con FlowAI. Estrategia de "gating". Análisis manual. Análisis booleano. Tablas, mapa de calor y exportación de datos. Transformación de datos. Concatenación. Exploración de datos mediante visualización con t-SNE.

**15:15 h (UTC-3). Guillermo Blanco. IDEHU-UBA-CONICET, Argentina**

### ***Introducción al análisis multidimensional en citometría***

Presentación intuitiva basada en el análisis manual de citometría de los conceptos básicos del análisis de datos en un espacio N-dimensional. Visualización y reducción del espacio N-dimensional. Distancia N-dimensional, correlación de parámetros, análisis de componente principal. El método t-SNE para visualizar el espacio N-dimensional. Gráficos de fuerza, árbol de expansión mínimo. Agrupación jerárquica aglomerativa y divisiva, K-means. Algoritmos de citometría de flujo que utilizan *clustering* jerárquico, k-means y redes neuronales artificiales. Estandarización y acceso compartido de datos de citometría de flujo (fluorescencia y masa) utilizando MiFlowcyt y repositorios de datos (ej, Flowrepository y Cytobank).

## **Viernes 27 de noviembre**

**10:00 h (UTC-3). Sofie Van Gassen. Ghent University, Bélgica**

### ***Estado actual de la citometría de flujo computacional \****

\* Clase a dictarse en idioma inglés.

**11:15 h (UTC-3). Sara de Biasi. University of Modena and Reggio Emilia, Italia**

### ***Aplicaciones prácticas de la citometría computacional de múltiples dimensiones en temas de investigación básica y clínica en inmunología \****

\* Clase a dictarse en idioma inglés.