

"DE LA MESADA AL CITÓMETRO. OPTIMIZACIÓN DE LA INMUNOCITOMETRÍA MULTICOLORIMÉTRICA Y CELL SORTING"

Programa analítico

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

Parte teórica: duración 2:30 h.

- a) Definición de inmunocitometría multicolorimétrica
- b) Configuración óptica del citómetro de flujo, su influencia en la sensibilidad de resolución.
- c) Índice de tinción del fluorocromo: concepto y aplicación.
- d) Nivel de expresión de la proteína blanco y su relación con dichas reglas.
- e) Sensibilidad de resolución y poblaciones brillantes.
- f) Fluorocromos en tándem y sus limitaciones.
- g) Superposición espectral en la emisión de fluorescencia. Su influencia en la resolución de poblaciones.
- h) Matrices en Citometría de Flujo; Matriz de derrame o solapamiento espectral (visores espectrales), matriz de compensación, matriz de dispersión del derrame y su uso en el diseño de paneles.

Casos Problema: 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. Uso práctico de los visores espectrales (*Duración: 2 h*).

*Docente a cargo: **Bioq. Luis Ariel Billordo***

*Docente moderador: **Lic. Soledad Collado***

Unidad 2: Controles en la citometría de flujo.

Parte teórica: duración: 2:00 h.

- a) Controles negativos en inmunofluorescencia directa e indirecta, con anticuerpos monoclonales y policlonales.
- b) Autofluorescencia, FMO, controles isoclónicos, controles isotípicos y sus limitaciones.
- c) Controles de compensación. Las 4 reglas de oro.
- d) Controles positivos. (control de desempeño del ensayo)

- e) Estandarización de lecturas citométricas intrainstrumental: Ejemplo con microesferas comerciales de *application setting* vs. voltaje fijo. Optimización de voltajes de adquisición: Los distintos métodos.

Casos Problemas: Buenas prácticas del uso del control isotópico en muestra de células mononucleares totales de sangre periférica. Limitaciones del uso de control isotópico (*Duración: 1:30 h*)

Docentes a cargo: Bioq. y Farm. Plácida Baz y Lic. Soledad Collado

Docente moderador: Bioq. Ariel Billordo

Unidad 3: Artefactos citométricos.

Parte teórica: duración 1.30 h.

- a) Agregados celulares: dobletes, tripletes. Detritos.
- b) Células muertas: su influencia y su exclusión.
- c) Corrimientos inespecíficos del tubo de reacción respecto a sus controles negativos.
- d) Unión no deseada de los anticuerpos (principalmente vía Fc-rFc). Su bloqueo experimental.

Casos Problema: 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 h*).

Docente a cargo: Bioq. y Farm. Plácida Baz

Docente moderador: Lic Soledad Collado

Unidad 4: Inmunomarcación de fosfoproteínas (Vías de señalización).

Parte Teórica: duración: 2 h.

- a) Comparación entre las distintas estrategias de detección de fosfoepitopes.
- b) Factores experimentales influyentes en los resultados.
- c) Métodos secuenciales y no secuenciales de inmunomarcación.
- d) Protocolos y reactivos comerciales de permeabilización/fijación.

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

Casos Problema: 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 esta combinación.
Duración: 1 h.

Docente a cargo: Bioq. Luis Ariel Billordo

Docente moderador: Lic Soledad Collado

Unidad 5: Vesículas extracelulares

Parte teórica: Duración: 1:00 h.

- a) Definiciones y clasificación.
- b) Biogénesis y secreción.
- c) Estudio comparativo de distintos métodos de detección, aislamiento y caracterización de microvesículas. Nuevas tecnologías. Aplicaciones clínicas.

Docente a cargo: Bioq. y Farm. Plácida Baz

Docente moderador: Lic Soledad Collado

Unidad 6: Interpretación y análisis de datos

Parte teórica: duración 2 h.

- a) Validación interpretativa holística de los datos citométricos.
- b) Validación de la compensación. Las limitaciones de la compensación manual y la importancia de las 4 reglas de oro de la compensación.
- c) Número de eventos adquiridos; un abordaje estadístico.
- d) Métodos de análisis de datos: manual (Booleano) y automatizado. Introducción a las técnicas de Reducción de la dimensionalidad y algoritmos de *Clustering* (tSNE, PCA, FlowSOM, etc).

Casos Problema: Compensación y validación en una muestra de lavado hepático con una combinación de 7 colores. Infiltrado linfocitario en músculo cardíaco, la subjetividad del citometrista en la compensación. 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 LT regulatorios en una muestra de ganglio linfático

de rata. Uso de cuadrantes ortogonales en el análisis de muestras, sus limitaciones (*Duración: 2 h*).

Docente a cargo: Bioq. Luis Ariel Billordo

Docente moderador: Lic. Soledad Collado

Unidad 7: Separación celular por Citometría de Flujo

Parte teórica: duración: 2 h.

- a) Comparación entre los distintos métodos de Separación de Flujo- Mecánico y deflexión electroestática.
- b) Separación de Flujo aséptico y no aséptico.
- c) Desempeño de la separación celular de flujo por deflexión electroestática: Rendimiento, Recuperación, eficiencia y Pureza.
- d) 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 problema: Estimación del número de células por muestra a separar de acuerdo con el 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: 1:30 h*).

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

Docentes moderadores: Bioq y Farm Plácida Baz y Bioq. Ariel Billordo

Unidad 8: Nuevas tecnologías

Parte teórica: duración: 3:00 h.

- a) Citometría de flujo espectral: Nuevas tecnologías para análisis en High parameters.
- b) Nuevos fluorocromos para potenciar paneles en Citometría de flujo espectral
- c) Tecnologías de Análisis Multiómico de célula única (*Single Cell multiomics*) para análisis multiparamétrico.
- d) Citometría de Flujo de imagen, espectral con cell-sorting.

Docente a cargo: Dra. Bernarda Ganem, Bioq. Ariel Billordo

Docente moderador: Bioq. Ariel Billordo

"1983/2023-40 años de Democracia"

Unidad 9: Taller de Flow Jo

Práctico: duración: 8 h.

Se definirá de acuerdo con el nivel de conocimiento y experiencia multiparamétrica de los alumnos inscriptos. (Evaluado a través de la encuesta de preinscripción)

*Docente a cargo: **a confirmar***

*Docente moderador: **Bioq. Ariel Billordo y Lic. Soledad Collado***



Dra. Liliana G. Bianciotti
Directora del Curso



Dr. Guillermo H. Giambartolomei
Director del Curso



BIBLIOGRAFÍA

Unidad 1:

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.
2. Nine-Color flow Cytometry for accurate measurement of T cell subsets and cytokine responses. Part I: Panel design by empirical 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.
3. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. Patrik K. Chattopadhyay, Carl Magnus Hogerkerp, Mario Roederer. *Immunology*, 125,441-449, 2008.
4. 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.
5. 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.
6. Optimizing a multi-colour immunophenotyping assay. Yolanda D. Mahnke, Mario Roederer. *Clin Lab Med*. 27(3):469, 2007.
7. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. Holten T. Maecker, J. Philip McCoy and Robert Nussenblatt. *Nat. Rev. Immunol.*, 12: 191-200, 2012.

Unidad 2:

1. Seventeen colour flow cytometry: unravelling the immune system. Stephen Perfetto, Patrik K Chattopadhyay, Mario Roederer. *Nat. Rev. Immunol.*, 4(8): 648-655, 2004.
2. Evaluation of a 12-colour flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subset in humans. Autissier, Williams. *Cytometry* 77A:410-419, 2010.
3. Today's technology and tomorrow's horizons. Chattopadhyay, Roederer (2012). *Methods* July; 57(3) 251-258
4. Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for Immunofluorescence experiments. Chattopadhyay, Roederer. *Cytometry Part A* 81A: 456-466, 2012.
5. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. Chattopadhyay, Roederer. *Immunology*, 125: 441-449, 2008.

6. Optimizing a multi-color immunophenotyping assay. Mahnke, Roederer. Clin. Lab. Med., 27(3) 469- v, 2007.
7. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. Baumgarth, Roederer. J. Immunol. Methods, 243: 77-97, 2000.
8. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. Hussel, Openshaw. J. Immunol. Methods, 243 107-124, 2000.
9. Determination of CD4 antigen density on cells: role of antibody valency, avidity, clones, and conjugation. Davis, Abraus, Bishop et al. Cytometry 33: 197-206, 1998.
10. Flow Cytometric quantitation of Immunofluorescence intensity: problems and perspective. European Group of Clinical Cell Analysis. Cytometry 33: 166-178, 1998.
11. Isotype controls the analysis of lymphocytes and CD34+ stem and progenitor cells by flow cytometry-Time to let go! Keeney, Gratama, Sutherland Cytometry 34: 280-283, 1998.
12. Isotype Controls -Time to let go? O`Gorman and Thomas. Cytometry 38:78-80, 1999.
13. Advanced Topics In 4-10 Color Compensation for Flow Cytometry. Tim Bushnell, Michael Kissner, BA, 2018
14. Evaluation of Voltration Approaches for Optimal Data Acquisition in Flow Cytometry. Weglarz, M. 2018. <http://nrs.harvard.edu/urn3:HUL.InstRepos:37945126>
15. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). Cossarizza et al. <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>
16. Flow Cytometry Controls, Instrument Setup, and the Determination of Positivity
17. Holden T. Maecker* and Joseph Trotter. Cytometry Part A 69A:1037–1042, 2006.

Unidad 3:

1. Seventeen colour flow cytometry: unravelling the immune system. Stephen Perfetto, Pratip K Chattopadhyay, Mario Roederer. Nat. Rev. Immunol., 4(8): 648-655, 2004.
2. Evaluation of a 12-colour flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte and dendritic cell subset in humans. Autissier, Williams. Cytometry 77A:410-419, 2010.
3. 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. Cytometry part A 77 A1082-1090, 2010.

Unidad 4:

1. Techniques for Phospho Protein Analysis. Application Handbook 1st edition. Becton Dickinson Biosciences. Technical Resources. Becton Dickinson Biosciences, April 2011.
2. Antibodies to human cell-surface markers tested for BD Phosflow protocols. Becton Dickinson Biosciences, 2009.

3. 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.
4. 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 5:

1. Single vs Swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. E van der Pol 1, M J C van Gemert, A Sturk, R Nieuwland, T G van Leeuwen. Thromb. Haemost., 10(5): 919-930, 2012.
2. Analytical Challenges of Extracellular Vesicle Detection: A comparison of Different Techniques. Uta Erdbrugger, Joanne Lannigan. Cytometry Part A 89A: 123-134, 2016.
3. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. Huilin Shao, Hyungsoon Im, Cesar Castro, Xandra Breakefield, Ralph Weissleder, and Hakho Lee. Chem. Rev., 28; 118(4): 1917-1950, 2018.
4. Flow Cytometry Analysis of Extracellular Vesicles from Cell-conditioned Media Carolina Balbi, Sara Bolis, Giuseppe Vassalli, Lucio Barile. J. Vis. Exp. 144: e59128, 2019.

Unidad 6:

1. 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, 73(A): 685-692. 2008.
2. Data Analysis in Flow Cytometry: The future just started. Enrico Lugli, Mario Roederer and Andrea Cossarizza. Cytometry A 77(7): 705-713, 2010.
3. Guide to Flow Cytometry: Data Analysis; Stephen W. Porsley, Dako Cytomation. Pages 33-38, 2004.
4. Guide to Flow Cytometry: Rare-event Detection. Terry Hoy, Dako Cytomation. Pages 55-58, 2004.

Unidad 7:

1. Flow Cytometry Protocols, third edition, Teresa S. Hawley, Robert G. Hawley, Humana Press, 2011.
2. Modern Flow Cytometry, Tim Bushnell and Expert Cytometry LLC, 2015.
3. Flow-based sorting of neonatal lymphocyte populations for transcriptomics analysis. Ravi S Misra et al, J Immunol Methods, 437:13-20, 2016.

4. Advanced Topics in 4-10 color Compensation for Flow Cytometry, Tim Bushnell, Michael Kissner and Expert Cytometry LLC, 2018.
5. General Concepts about Cell Sorting techniques, Alberto Orfao and Alejandro Ruiz-Arguelles. Clin. Biochem., 29: 5-9, 1996.
6. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies, Andrea Cossarizza et al, Eur. J Immunol., 47:1584-1797, 2017.

Unidad 8:

1. Smc3 dosage regulates B cell transit through germinal centers and restricts their malignant transformation. Nat Immunol., 22(2): 240-253, 2021.
2. Single-cell analysis reveals transcriptomic remodellings in distinct cell types that contribute to human prostate cancer progression. Nat. Cell Biol., 23(1):87-98, 2021.
3. Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids. Nat. Med., 27(1):125-135, 2021.
4. Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods. Lee J, Hyeon DY, Hwang D. Exp. Mol. Med., 52(9):1428-1442, 2020.
5. Single Cell Multi-Omics Technology: Methodology and Application. Hu Y, An Q, Sheu K, Trejo B, Fan S, Guo Y. Front. Cell Dev. Biol., 20;6:28, 2018.
6. Spectral flow cytometry. Nolan JP, Condello D. Curr. Protoc. Cytom., Chapter 1: Unit1.27, 2013.
7. Panel Design and Optimization for High-Dimensional Immunophenotyping Assays Using Spectral Flow Cytometry. Ferrer-Font L, Pellefigues C, Mayer JU, Small SJ, Jaimes MC, Price KM. Curr. Protoc. Cytom., 92(1): e70, 2020.
8. Acquisition of High-Quality Spectral Flow Cytometry Data. Fox A, Dutt TS, Karger B, Obregón-Henao A, Anderson GB, Henao-Tamayo M. Curr. Protoc. Cytom., 93(1): e74, 2020.
9. Evaluating spectral cytometry for immune profiling in viral disease. Niewold P, Ashhurst TM, Smith AL, King NJC. Cytometry A, 97(11):1165-1179, 2020.
10. Panel Design and Optimization for High-Dimensional Immunophenotyping Assays Using Spectral Flow Cytometry. Ferrer-Font L, Pellefigues C, Mayer JU, Small SJ, Jaimes MC, Price KM. Curr. Protoc. Cytom., 92(1): e70, 2020.
11. Acquisition of High-Quality Spectral Flow Cytometry Data. Fox A, Dutt TS, Karger B, Obregón-Henao A, Anderson GB, Henao-Tamayo M. Curr. Protoc. Cytom., 93(1): e74, 2020.
12. Analysis of Cell Suspensions Isolated from Solid Tissues by Spectral Flow Cytometry. Schmutz S, Valente M, Cumano A, Novault S. J Vis Exp., 5 (123):55578, 2017.
13. Multispectral Flow Cytometry: Unaddressed Issues and Recommendations for Improvement. Parks DR. Cytometry A. 97(12):1276-1277, 2020.

"1983/2023-40 años de Democracia"

14. Spectral Cytometry Has Unique Properties Allowing Multicolor Analysis of Cell Suspensions Isolated from Solid Tissues. Schmutz S, Valente M, Cumano A, Novault S. PLoS One, 11(8): e0159961, 2016.
15. Data reduction for spectral clustering to analyze high throughput flow cytometry data. Zare H, Shooshtari P, Gupta A, Brinkman RR. BMC Bioinformatics, 28;11:403, 2010.

Unidad 9:

1. Introduction to FlowJo. Versión 10.6.