

Evaluación de la sensibilidad bioenergética y de la capacidad respiratoria de reserva de los linfocitos T utilizando el análisis del flujo extracelular

Autores

Jessica Walls y
Natalia Romero
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

El kit de análisis metabólico de linfocitos T de Agilent Seahorse XF es una solución robusta para la evaluación completa del metabolismo celular de los linfocitos T en tiempo real. El metabolismo se ha revelado como un factor clave para el destino y la función de los linfocitos T. De hecho, se ha demostrado que la reprogramación metabólica de los linfocitos T se puede usar como estrategia para mejorar la eficacia antitumoral de las terapias con linfocitos T adoptivos. El kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF permite la medida simultánea de la actividad glicolítica y mitocondrial en poblaciones de linfocitos T, junto con la medida de la capacidad respiratoria mitocondrial. Estos parámetros se han vinculado con la función óptima y la persistencia mejorada de las terapias con linfocitos T. Anteriormente, la medida de la capacidad respiratoria mitocondrial empleando FCCP precisaba de la optimización de la concentración entre los tipos de células, la etapa de diferenciación, el donante y el estado sano o patológico. El kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF utiliza un desacoplador mejorado (BAM15) para conseguir unas medidas más uniformes y exactas de la capacidad bioenergética de los linfocitos T, con menos necesidades de optimización de la concentración que con FCCP. Además, esta nota de aplicación destaca el uso del kit para evaluar la influencia de la composición del medio durante la expansión de los linfocitos T siguiendo el flujo de trabajo del ensayo de persistencia de linfocitos T de XF. Este flujo de trabajo permite la evaluación de la glicólisis y la actividad y capacidad mitocondriales de manera simultánea, proporcionando un perfil metabólico completo de los linfocitos T que se puede incorporar a la monitorización y mejora del diseño y desarrollo de las terapias con linfocitos T.

Introducción

El desarrollo de inmunoterapias celulares ha revolucionado la investigación del cáncer y el estudio del sistema inmunitario. Uno de los tipos más prometedores de terapias celulares implica la ingeniería genética de los linfocitos T con receptores antigénicos quiméricos (CAR) dirigidas a células cancerígenas. Existe una importante evidencia que sugiere que las propiedades metabólicas de los linfocitos T (es decir, el modo en que satisfacen sus demandas bioenergéticas) desempeñan una función esencial en la regulación de su función antitumoral y en la eficacia de las inmunoterapias con linfocitos T.¹

Los linfocitos T sufren una serie de cambios en su fenotipo metabólico durante la activación y diferenciación en células efectoras y de memoria, que son esenciales para mantener la función de los linfocitos T.² Los linfocitos T indiferenciados se encuentran en un estado inactivo, con bajas demandas metabólicas sostenidas principalmente por la respiración mitocondrial. La estimulación antigénica induce la salida del estado inactivo, un rápido incremento en el consumo de nutrientes, un aumento del metabolismo anabólico y la reprogramación del metabolismo mitocondrial. Estos cambios metabólicos son esenciales para sustentar la proliferación y diferenciación rápida de linfocitos T a fin de producir citoquinas o moléculas que desencadenen la citotoxicidad. Después de suprimir con éxito el estímulo antigénico, los linfocitos T de memoria diferenciados restantes revierten a un fenotipo más inactivo apoyados principalmente por la actividad mitocondrial y la elevada capacidad respiratoria de reserva (SRC). Bajo condiciones de estimulación crónica o en un entorno metabólicamente restringido, los linfocitos T pueden pasar a ser metabólicamente disfuncionales (un estado conocido como agotamiento de los linfocitos T) y mostrar una disminución de la capacidad bioenergética mitocondrial y de la función efectora (Figura 1).

Debido al intenso impacto de la modulación metabólica en el destino y la función de los linfocitos T, la determinación de las firmas metabólicas de CAR-T y otras terapias con linfocitos T adoptivos pueden desempeñar una función esencial en la definición de la persistencia de los linfocitos T y de la función antitumoral. Además, la modulación o reprogramación de las vías metabólicas de los linfocitos T se puede usar como estrategia para mejorar la eficiencia antitumoral de los linfocitos T.

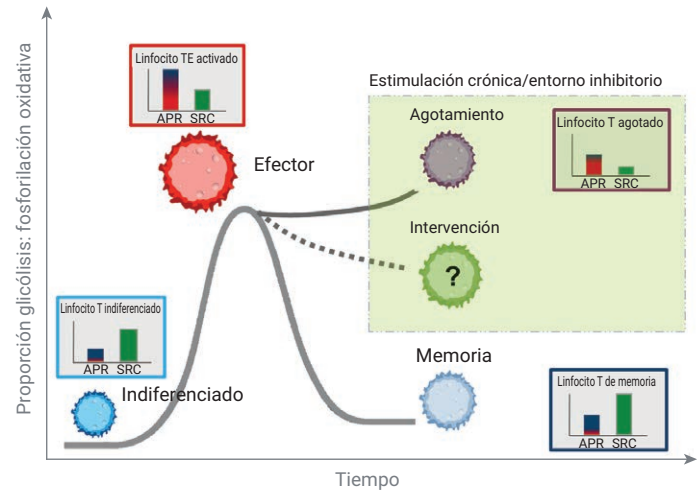


Figura 1. Fundamentos del metabolismo energético de los linfocitos T con medidas de los fenotipos metabólicos de los linfocitos T, que ilustra una relación entre la proporción glicólisis/fosforilación oxidativa y el destino, la adecuación y la función celulares. Bajo estimulación crónica o en presencia de un entorno inhibitorio como el microentorno tumoral, los linfocitos T pueden desarrollar un fenotipo agotado con disfunción mitocondrial.

La caracterización completa de las vías bioenergéticas tanto glicolíticas como mitocondriales en las distintas etapas del ciclo vital de los linfocitos T, así como información sobre las adaptaciones metabólicas a entornos celulares o señales de estrés diferentes, son resultados críticos para optimizar las terapias con linfocitos T y para mejorar la potencia antitumoral de los productos de inmunoterapia. Diseñada para examinar al mismo tiempo la función glicolítica y mitocondrial en células vivas, la tecnología Agilent Seahorse XF es una de las principales plataformas empleadas para estudiar el metabolismo de las células inmunitarias, y contribuye activamente a los conocimientos actuales del inmunometabolismo y del reconocimiento del papel esencial que desempeñan los cambios metabólicos que tienen lugar durante la activación y diferenciación de los linfocitos T.^{3,4}

Esta nota de aplicación presenta el nuevo kit de análisis metabólico de linfocitos T de Agilent Seahorse XF, diseñado para permitir la adquisición simultánea de medidas robustas de la actividad glicolítica y mitocondrial en poblaciones de linfocitos T junto con la capacidad respiratoria mitocondrial. Estas medidas proporcionan una completa caracterización del perfil metabólico de los linfocitos T a partir de un mismo análisis y se pueden emplear para correlacionarse con el aumento o la disminución de la función antitumoral de los productos de terapias con linfocitos T. La obtención de estas medidas puede resultar especialmente valiosa durante los procesos de desarrollo de terapias dirigidas a la mejora de la persistencia de los linfocitos T o para evitar la postactivación del agotamiento metabólico en el microentorno tumoral.

Revisión del rendimiento del desacoplador mitocondrial empleado en los linfocitos T

El estudio de la función mitocondrial de los linfocitos T con el análisis Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress, combinado con los analizadores Agilent Seahorse XF, ha proporcionado los conocimientos fundacionales sobre el metabolismo energético de los linfocitos T y su función en la dirección del destino y la función de estas células.^{3,4} El kit de análisis Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress combina diversos reactivos que permiten una caracterización completa de la función mitocondrial. En particular, las inyecciones secuenciales de un inhibidor de la ATP sintasa (oligomicina), un desacoplador mitocondrial (carbonilcianuro *p*-(trifluorometoxi)fenilhidrazona, FCCP) y un inhibidor mitocondrial (mezcla de rotenona y antimicina A (rot/AA)) permiten el cálculo en células intactas de la tasa de consumo de oxígeno acoplada a la producción de ATP mitocondrial (respiración vinculada a ATP), la respiración máxima desacoplada y la SRC, es decir, la diferencia entre la respiración basal y la capacidad respiratoria máxima. Estos parámetros se utilizan habitualmente para caracterizar la función mitocondrial de diferentes poblaciones de linfocitos T y para describir procesos que mejoran la potencia antitumoral de los linfocitos T.⁵⁻⁷ Sin embargo, a pesar de la amplia adopción de este ensayo en el ámbito del inmunometabolismo, su uso en los linfocitos T presenta diversas dificultades, principalmente debidas al uso del desacoplador protonóforo FCCP.

Existen distintos motivos por los que el uso de FCCP con linfocitos T (y potencialmente con otras células inmunitarias) no es idóneo. En primer lugar, la concentración óptima de FCCP varía en función de numerosos factores, incluido el tipo de célula inmunitaria, la etapa de diferenciación, el donante y el estado patológico. Si su concentración no se valora u optimiza para cada experimento individual, puede provocar la subestimación de la capacidad respiratoria máxima. En segundo lugar, en linfocitos T indiferenciados y en algunos linfocitos T diferenciados, la tasa de consumo de oxígeno (OCR) tras la exposición a FCCP no es estable, lo que provoca una elevada variación en las medidas y, posiblemente, el registro de una capacidad respiratoria máxima menor de la real.

Además, el uso de FCCP en el análisis XF Cell Mito Stress limita la capacidad del ensayo para proporcionar medidas cuantitativas de la actividad glicolítica como la tasa de producción de ATP glicolítico (glicoATP). El cálculo de la tasa de producción de glicoATP utilizando medidas de ECAR (tasa de acidificación extracelular) de Seahorse XF precisa de la corrección de la contribución del CO₂, que se calcula con las medidas de OCR basal y OCR tras la adición de rot/AA.⁸ Sin embargo, si se emplea FCCP antes que rot/AA en el ensayo, se puede subestimar la contribución del CO₂, lo que afecta a la cuantificación de la actividad glicolítica. Esto es especialmente importante en células altamente oxidativas, es decir, células que se basan principalmente en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial para obtener energía, donde la contribución del CO₂ a la ECAR no es despreciable.

La evaluación simultánea de la tasa de producción de ATP mitocondrial (mitoATP) y de las tasas de producción de glicoATP permiten la caracterización de la demanda energética celular basal (es decir, la tasa de producción de ATP total) y de la sensibilidad metabólica basal (es decir, la relación entre las tasas de producción de glicoATP y mitoATP). Estos parámetros son esenciales para determinar el destino y la función de los linfocitos T. Sin embargo, no se proporcionan con el análisis XF Cell Mito Stress, por lo que la caracterización de la bioenergética de los linfocitos T resulta incompleta.

Desarrollo del nuevo kit de análisis metabólico de linfocitos T de Agilent Seahorse XF

El kit de análisis metabólico de linfocitos T de Agilent Seahorse XF se ha desarrollado con el fin de permitir la adquisición simultánea de medidas bioenergéticas precisas, uniformes y cuantitativas de la actividad tanto glicolítica como mitocondrial en poblaciones de linfocitos T. Este kit permite realizar mediciones precisas de la capacidad respiratoria máxima en los linfocitos T empleando el desacoplador BAM15 ((2-fluorofenil){6-[(2-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina). BAM15 es un desacoplador novedoso que, según se ha informado, presenta una potencia similar a la de FCCP, pero con menor citotoxicidad y menor afinidad a la membrana plasmática, por lo que su rango de eficacia es superior.⁹

Tal y como se muestra en las Figuras 2A a 2C (líneas rojas), cuando se analizan linfocitos T con el kit de análisis XF Cell Mito Stress, la tasa de variación en el nivel de O₂ durante los tres minutos de la medida del instrumento tras la inyección de FCCP no es constante ni lineal, lo que provoca cálculos de OCR variables y subestimación de la respiración máxima (Figuras 2D a 2F, líneas rojas). Además, podría haber una sobreestimación notable de OCR después de la inyección de rot/AA, como se indica con la comparación de las líneas de la cinética obtenidas con la inyección de FCCP con la inyección de vehículo (Figura 2D, línea roja o azul). Sin embargo, cuando se utilizó el desacoplador BAM15 en lugar de FCCP, se obtuvo un incremento estable en OCR tras la inyección de BAM15 (Figuras 2A a 2C, líneas verdes), lo cual dio lugar a una determinación más exacta y precisa de la respiración máxima (Figuras 2D a 2F, líneas verdes).

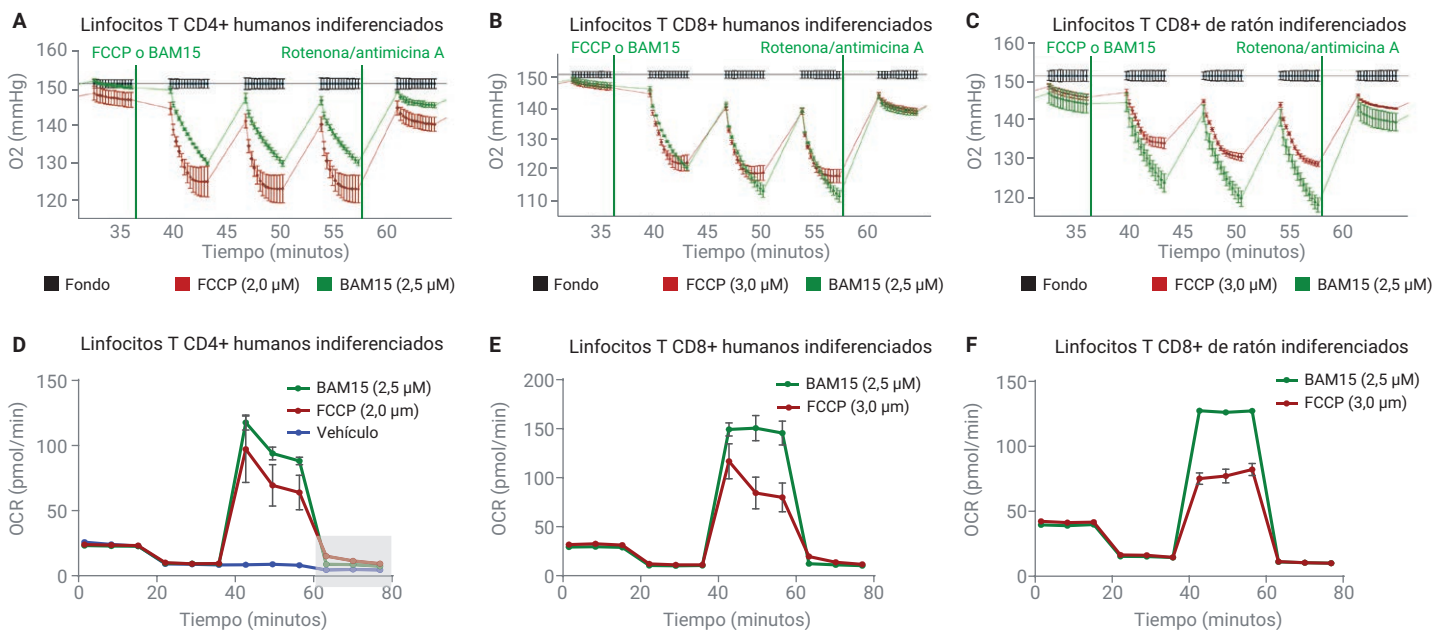
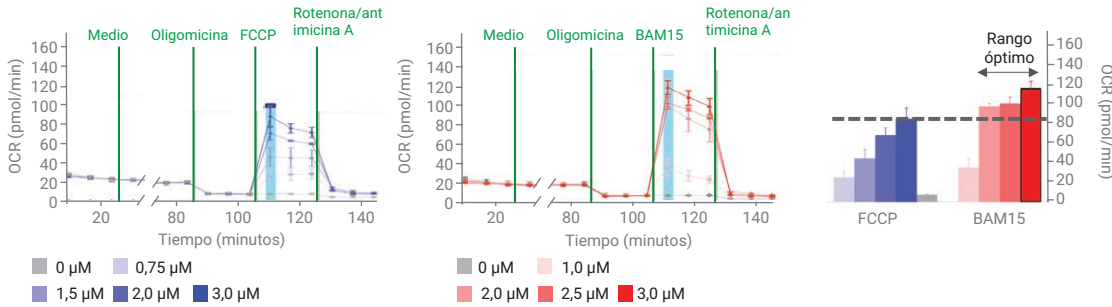


Figura 2. Comparación de medidas de consumo de oxígeno con los desacopladores FCCP y BAM15. Se sembraron todas las celdas con 2×10^6 células/pocillo en medio de ensayo Seahorse XF RPMI a pH 7,4 suplementado con glucosa 10 mM, glutamina 2 mM y piruvato 1 mM. Cambios en el nivel de oxígeno extracelular en linfocitos T CD4⁺ humano indiferenciado (A), CD8⁺ humano indiferenciado (B) y CD8⁺ de ratón obtenidos del bazo (C) tras la adición de concentraciones óptimas de los desacopladores FCCP (líneas rojas) o BAM15 (líneas verdes). Tasa de consumo de oxígeno (OCR) obtenida con la prueba XF Cell Mito Stress (líneas rojas) o con el ensayo del kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF (líneas verdes) en linfocitos T CD4⁺ humanos indiferenciados (D), CD8⁺ humanos indiferenciados (E) y CD8⁺ de ratón obtenidos del bazo (F). La línea azul de 2D corresponde con la condición en la que se inyectó medio de ensayo en lugar de desacoplador.

A estas pruebas preliminares siguieron otros experimentos utilizando linfocitos T CD4⁺ humanos indiferenciados, CD8⁺ humanos indiferenciados, PBMC humanos y CD8⁺ de ratón obtenidos del bazo de al menos tres donantes diferentes por cada tipo de célula. En todos los casos, se llevaron a cabo valoraciones en paralelo con FCCP o BAM15. Cuando se usó BAM15 como desacoplador se obtuvieron en todos los casos una respiración máxima mayor y unas desviaciones

estándar menores en comparación con las obtenidas con las concentraciones óptimas de FCCP (Figuras 3A a 3C). Los experimentos de valoración también demostraron que el rango de concentración óptima de BAM15 es más amplio que el rango óptimo de FCCP, lo que indica que la necesidad de optimizar la concentración del desacoplador para cada muestra es mínima cuando se emplea BAM15 (Figuras 3A y 3B, gráficos de barras del centro).

A Líneas de la cinética y respiración máxima de linfocitos T CD4⁺ humanos indiferenciados a diferentes concentraciones



B Líneas de la cinética y respiración máxima de linfocitos T CD8⁺ humanos indiferenciados a diferentes concentraciones

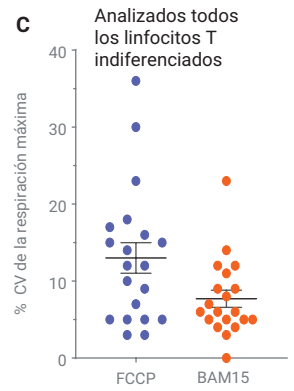
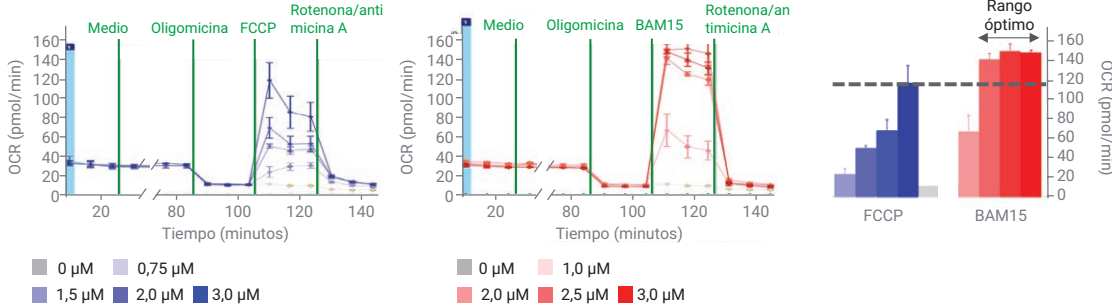


Figura 3. Comparación de las medidas de respiración máxima en experimentos de valoración con FCCP y BAM15 utilizando linfocitos T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) humanos indiferenciados. Los gráficos de barras del centro representan la respiración máxima obtenida con diferentes concentraciones del desacoplador. (C) % CV de la respiración máxima obtenida para el grupo de linfocitos T indiferenciados analizados cuando se usaron concentraciones óptimas de FCCP o BAM15 2.5 μM.

Las tasas de producción de glicoATP calculadas a partir del uso del kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF (con el desacoplador BAM15) también se compararon con las obtenidas en experimentos en paralelo utilizando el kit de ensayo de tasa de ATP Agilent Seahorse XF Real-Time. Los resultados indican que no hay diferencias significativas en las tasas de producción de glicoATP obtenidas a partir de estos dos kits o ensayos (Figura 4).

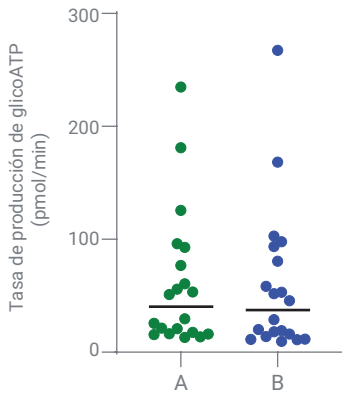


Figura 4. Comparación de tasas de producción de glicoATP en linfocitos T indiferenciados, calculadas con el kit del ensayo de tasa de ATP Agilent Seahorse XF Real-Time (B) o el kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF (A) con BAM15 inyectado entre las inyecciones de oligomicina y de rot/AA.

Finalmente, se seleccionó un amplio grupo de linfocitos T para evaluar el kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF, de humanos y ratones e incluyendo donantes y estados de diferenciación diferentes. Se llevaron a cabo experimentos de valoración y los valores máximos de OCR obtenidos en concentraciones óptimas de FCCP se compararon con los valores obtenidos a una sola concentración de BAM15 (2,5 μ M) para el grupo de linfocitos T (Figura 5). En todos los casos, la OCR máxima obtenida con BAM15 2,5 μ M fue al menos del 90 % de la OCR máxima obtenida con la concentración óptima de FCCP dentro del mismo tipo de célula. La OCR máxima obtenida con BAM15 2,5 μ M fue, en promedio, un 20 % superior al valor obtenido con la concentración óptima de FCCP, lo que demuestra que se puede emplear el reactivo BAM15 del kit a una concentración fija de 2,5 μ M para todos los tipos de linfocitos T o se precisa un trabajo de optimización mínimo.

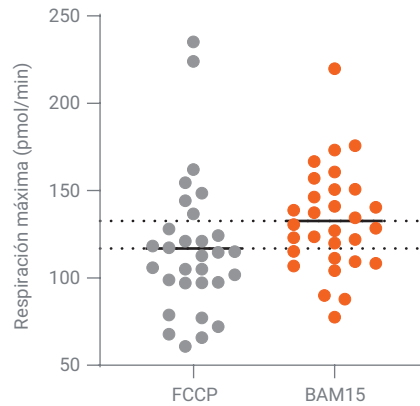


Figura 5. Comparación de la respiración máxima obtenida a una concentración óptima de FCCP o con BAM15 2,5 μ M de un amplio grupo de linfocitos T, incluidos PBMC, CD4⁺ indiferenciados, CD8⁺ indiferenciados, CD4⁺ activados, CD8⁺ activados, CD8⁺ efectores y CD8⁺ de memoria humanos y CD8⁺ indiferenciados y activados de ratón (n = 3 por tipo de célula).

Aplicación del kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF a la optimización de la persistencia para los productos de terapia de linfocitos T

Un atributo crítico que hay que considerar a la hora de evaluar CAR-T y otras terapias de linfocitos T adoptivos es la firma metabólica de las células, puesto que desempeña un papel esencial en la definición de la persistencia y función antitumoral de los linfocitos T. De hecho, según se informa, las células CAR-T que adquieren un fenotipo efector con alta actividad metabólica durante la expansión *in vitro* muestran una persistencia y una actividad antitumoral deficientes *in vivo*. Sin embargo, las células CAR-T que presentan una actividad metabólica entre baja y media durante la expansión *in vitro* y una alta capacidad respiratoria de reserva confieren una buena inmunidad antitumoral, caracterizada por la mejora de las capacidades de proliferación y unas tasas más altas de eliminación de células tumorales y de producción de citoquinas.¹⁰ Diversas publicaciones indican que las condiciones de expansión durante la fabricación podrían producir productos de linfocitos T con un fenotipo metabólico no deseado que redujera la potencia *in vivo*. Estas publicaciones también señalan que el acondicionamiento metabólico de los linfocitos T durante la expansión puede inducir una reprogramación metabólica que origine una mayor persistencia *in vivo* y una función antitumoral mejorada.^{5,11,12}

Diseñado para contribuir al desarrollo de terapias con linfocitos T, el kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF proporciona una visión completa del perfil metabólico de estas células en un mismo análisis que incluye la demanda energética basal total, la sensibilidad metabólica basal y la capacidad respiratoria de reserva; todos estos parámetros se han utilizado anteriormente para describir los estados metabólicos de los linfocitos T con una persistencia incrementada o disminuida.¹⁰ Por tanto, es idóneo para la evaluación y optimización de las condiciones de expansión de los linfocitos T que originan el fenotipo metabólico deseado para aumentar la persistencia de los linfocitos T.

Aquí se utilizó el kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF para evaluar cómo puede afectar la composición del medio de cultivo celular (RPMI con glucosa 10 mM + FBS al 10 % FBS o medio ImmunoCult XF (STEMCELL Technologies)), así como la adición de diferentes interleucinas (IL-2 o IL-15) al perfil metabólico de los productos de linfocitos T. Los estudios anteriores indicaron que las células expandidas en IL-15 presentan un fenotipo menos diferenciado que las cultivadas en IL-2.¹³ En este

estudio, se activaron linfocitos pan-T de diferentes donantes humanos sanos con microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpos CD3/CD28. Al cabo de tres días, se retiraron las microesferas magnéticas y las células crecieron en las condiciones del medio indicadas (Figura 6). Las células se mantuvieron en cultivo con una densidad celular de 1×10^6 células/ml, renovándose el medio y ajustándose el volumen cada tres días. En los días 7, 14 y 22, las muestras se retiraron y analizaron con el ensayo XF T Cell Persistence ayudado por el kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF y siguiendo las condiciones de ensayo recomendadas.¹⁴

En primer lugar, se comparó la SRC en el transcurso de la expansión celular. Como se muestra en la Figura 6A, el día 7 se observó una diferencia en la SRC de las células expandidas en IL-15 o e IL-2, independientemente del medio de cultivo celular utilizado durante la expansión. La SRC incrementada de las células expandidas en IL-15 se ve acentuada el día 22, en particular para las células cultivadas en el medio ImmunoCult XF optimizado (Figura 6C). La SRC incrementada es característica de un fenotipo similar al de memoria y se ha asociado anteriormente con el aumento de la persistencia.

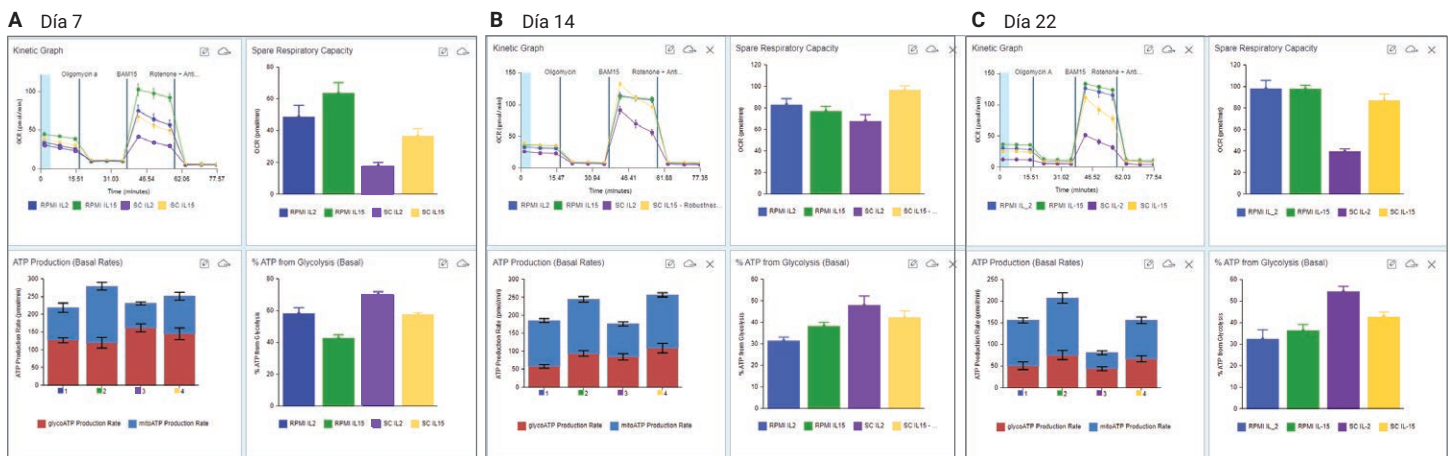


Figura 6. Influencia de la condición de expansión celular sobre las medidas del metabolismo de los linfocitos T. Se activaron linfocitos pan-T de sangre periférica humana con Dynabeads Human Activator CD3/CD28 en el medio de expansión de linfocitos T ImmunoCult XF y se cultivaron a 37 °C en un incubador con un 5 % de CO₂. Dos días después de la activación, se retiraron las microesferas Dynabeads y las células se dividieron en 4 grupos y se resuspendieron a 1×10^6 células/ml en las 4 siguientes condiciones de medios: Azul: RPMI suplementado con glutamina 2 mM, 10 % FBS e IL-2 (300 U/ml). Verde: RPMI suplementado con glutamina 2 mM, 10 % FBS e IL-15 (10 ng/ml). Morado: medio ImmunoCult XF suplementado con IL-2 (300 U/ml). Amarillo: medio ImmunoCult XF suplementado con IL-15 (10 ng/ml). Las muestras se tomaron y analizaron en los días 7, 14 y 22 después de la activación. Los datos comunicados para cada día incluyen trazas cinéticas de OCR (parte superior izquierda), SRC (parte superior derecha), tasas de producción de ATP (parte inferior izquierda) y porcentaje de ATP procedente de la glicólisis (parte inferior derecha).

El siguiente paso fue examinar los resultados adicionales que habilita este ensayo para caracterizar mejor y mejorar las condiciones de expansión, que son las tasas de producción de ATP basal de la glicólisis y de la mitocondria (Figura 6, los dos gráficos inferiores de cada panel). Las células expandidas en medio ImmunoCult XF que contenían IL-15 tienen una sensibilidad metabólica oxidativa (menor % ATP procedente de la glicólisis) en comparación con las que contenían IL-2 (Figura 6, gráfico de la parte inferior derecha de cada panel, barras amarillas frente a las moradas). Además, las células expandidas y diferenciadas en medio RPMI presentaban mayor demanda metabólica (mayor tasa de producción de ATP basal) que las

células expandidas y diferenciadas en medio ImmunoCult XF, independientemente de la interleucina empleada (Figura 6, gráfico de la parte inferior izquierda de cada panel). La demanda metabólica incrementada está asociada con el fenotipo de los linfocitos T efectores. De hecho, cuando se analizó la expresión de los marcadores superficiales CCR7-A y CD45RO-A utilizando el citómetro de flujo Agilent NovoCyte Advanteon, se observó que las células expandidas en el medio ImmunoCult XF mantuvieron una mayor proporción de población de memoria central CCR7-A⁺/CD45RO-A⁺ en comparación con las células expandidas en RPMI y enriquecidas en el fenotipo de memoria efectora (Figura 7).

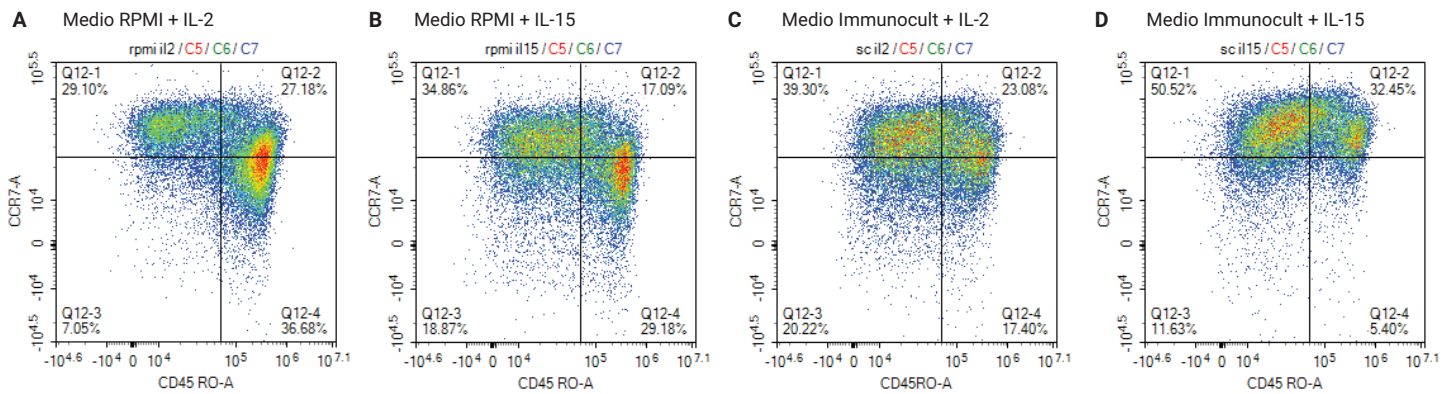


Figura 7. Análisis por citometría de flujo de los marcadores de la superficie celular CCR7-A y CD45RO-A con muestras del día 22 expandidas en diferentes condiciones de medios tal y como se indica en los gráficos. El medio RPMI también estaba suplementado con glutamina 2 mM y FBS al 10 %.

Conclusión

Este documento presenta un ensayo optimizado para la caracterización completa del perfil metabólico de los linfocitos T. El ensayo combina el uso del analizador XF con el kit de análisis metabólico de linfocitos T de XF, proporcionando un desacoplador optimizado que permite medidas robustas de respiración máxima y capacidad respiratoria de reserva en linfocitos T y unas necesidades mínimas de optimización de la concentración de desacoplador. Además, este ensayo permite que los usuarios obtengan información cuantitativa sobre la actividad glicolítica en la misma muestra celular, junto con una medida única de la demanda bioenergética celular basal.

Con el fin de mejorar la capacidad de desarrollar y predecir la eficiencia de la terapia con linfocitos T, es necesario utilizar una combinación de herramientas y ensayos ortogonales que proporcionan un completo conjunto de datos para caracterizar los productos terapéuticos de células CAR-T. Es evidente que la caracterización metabólica de los linfocitos T es uno de los atributos críticos que hay que analizar para mejorar la persistencia y la potencia antitumoral de los productos de linfocitos T. El ensayo XF T Cell Persistence proporciona resultados multiparamétricos que ofrecen una completa caracterización del perfil metabólico de los linfocitos T a partir de la misma muestra, y puede incorporarse como ensayo de rutina para optimizar el diseño y la fabricación de terapias derivadas de linfocitos T.

Referencias

1. Chang C. H.; Pearce, E. L. *Nature Immunology* **2016**, 17, 364–368. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fni.3415>.
2. Sukumar *et al.* *Current Opinion in Immunology* **2017**, 46, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.011>.
3. Wei *et al.* *Frontiers in Immunology* **2021**, 12, 717014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717014>.
4. Voss *et al.* *Nature Reviews Immunology* **2021**, 21, 637–652. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00529-8>.
5. Geiger *et al.* *Cell* **2016**, 167, 829–842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>.
6. Kawalekar *et al.* *Immunity* **2016**, 44, 380–390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.021>.
7. Scharping *et al.* *Immunity* **2016**, 45, 374–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>.
8. Natalia, R. Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology. *Documento Técnico Informativo de Agilent Technologies*, número de publicación **5991-9309EN**.
9. Kenwood *et al.* *Molecular Metabolism* **2014**, 3, 114–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.005>.
10. Rostamian *et al.* *Cancer Letters* **2021**, 500, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.004>.
11. Hermans *et al.* *PNAS* **2020**, 117(11), 6047–6055. <https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1920413117>.
12. Geltink *et al.* *Nature Metabolism* **2020**, 2, 703–716. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0256-z>.
13. Alizadeh *et al.* *Cancer Immunol. Res.* **2019**, 7(5), 759–772. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0466>.
14. Agilent Seahorse XF T Cell Metabolic Profiling Kit User Guide. *Agilent Technologies*, número de publicación **5994-3493EN**.

www.agilent.com/xfpro

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

RA44573.6858796296

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE. UU., 8 de febrero de 2022
5994-4494ES