

Cribado de la disfunción mitocondrial farmacógena usando MitoXpress Xtra en mitocondrias aisladas

Autores

Ryan McGarrigle
Conn Carey
James Hynes
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

Las mitocondrias son reguladores funcionales de la vida y la muerte de las células, por lo que desempeñan un papel esencial en la etiología de numerosas enfermedades. Se ha comprobado que la disfunción mitocondrial también contribuye significativamente a la toxicidad farmacógena y, en consecuencia, tiene especial interés dentro de la industria farmacéutica. La medida del consumo de oxígeno ha sido tradicionalmente el método de referencia para evaluar la función mitocondrial. Sin embargo, la complejidad de la medida y la baja productividad de los abordajes polarográficos convencionales con electrodos de Clark han limitado la aplicabilidad de este tipo de medidas de obtención de información, en particular en el contexto del cribado de compuestos. En esta nota de aplicación describimos cómo puede subsanarse este déficit con el ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress Xtra de Agilent, que facilita un análisis de alta productividad del consumo mitocondrial de oxígeno por fluorescencia en placas de 96 o 384 pocillos. Hemos prestado atención a los parámetros de optimización más importantes y descrito los datos de las muestras, ilustrando cómo se pueden cribar las bibliotecas de compuestos y realizar análisis de relación dosis-respuesta.

Introducción

La disfunción mitocondrial está implicada en la etiología de numerosas enfermedades y también se ha identificado que es un importante mecanismo de la toxicidad farmacológica [1-6]. El análisis del consumo de oxígeno ha sido históricamente la técnica de referencia para evaluar la función mitocondrial, pues se trata de una medida directa de la cadena respiratoria (ETC) y, en mitocondrias acopladas, proporciona información específica sobre la fosforilación oxidativa (OXPHOS).

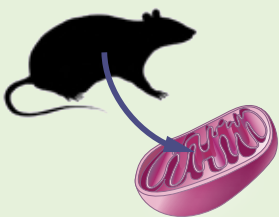
Tradicionalmente, el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas se ha analizado mediante métodos polarográficos de baja productividad. No obstante, este planteamiento no ofrece ni la productividad ni la comodidad necesarias para evaluar múltiples condiciones experimentales en paralelo, ya sea mediante el cribado de bibliotecas de compuestos, la evaluación de las relaciones dosis-respuesta o el análisis del mecanismo de actuación. En este documento describimos cómo el ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress Xtra de Agilent combina la obtención de información sobre la rapidez con la que las mitocondrias consumen oxígeno con la comodidad y la productividad propias de los ensayos para lectores de placas de fluorescencia. Gracias a esa productividad y a que los volúmenes de medida son inferiores a los de los análisis polarográficos convencionales, se pueden generar conjuntos de datos de tamaño sensiblemente mayor a partir de una única preparación mitocondrial.

El sensor MitoXpress Xtra es el que facilita estas potentes medidas. El oxígeno molecular inactiva la emisión del sensor; en consecuencia, la reducción de la concentración de oxígeno disuelto provocada por la actividad de la ETC se observa como un incremento en la señal del sensor MitoXpress Xtra. A cada pocillo de prueba se le aplica una capa sellante de aceite mineral, con el fin de limitar la difusión de oxígeno ambiental. Después, se realiza una medida cinética de la placa en un lector de placas de fluorescencia para obtener con comodidad una evaluación de alta productividad de la actividad de la ETC. La reducción en la velocidad de cambio de la señal en comparación con un control sin tratar sugiere la inhibición de actividad de la ETC, mientras que el aumento de la señal indica el aumento de la respiración, ya sea debido al aumento de la actividad de la ETC o al desacoplamiento de la ETC respecto a la fosforilación oxidativa. Asimismo, al igual que sucede con los abordajes polarográficos tradicionales, se puede obtener información mecanicista mediante el uso de sustratos formadores de complejos específicos para la ETC. Sin embargo, el planteamiento basado en el uso de microplacas que aplicamos aquí permite medir en paralelo todas las condiciones de interés, lo que simplifica la configuración de los ensayos y evita que la interpretación de los datos se vea confundida por el deterioro gradual de la preparación mitocondrial.

A continuación resumimos cómo se realizan estas medidas, centrándonos en particular en los principales parámetros de optimización y en la aplicación de dichas medidas al cribado de compuestos y al análisis de las relaciones dosis-respuesta.

Preparación previa al ensayo

1. Preparación de soluciones madre de glutamato/malato, succinato y ADP
2. Preparación de FCCP, rotenona y antimicina A
3. Aislamiento de mitocondrias de hepatocitos de rata

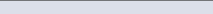


Flujo de trabajo del ensayo

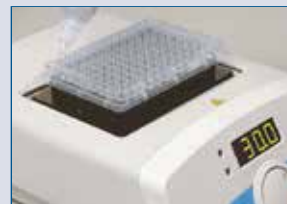


Carga de la placa con mitocondrias y sustratos

Microplaca de 96 o 384 pocillos

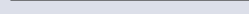


Mitocondrias, sustrato, MitoXpress Xtra, \pm ADP, + compuesto



Adición de MitoXpress + aceite mineral

Aceite mineral



Compatible con la manipulación de líquidos multicanal



Medida + análisis

Lector de placas de fluorescencia

PC



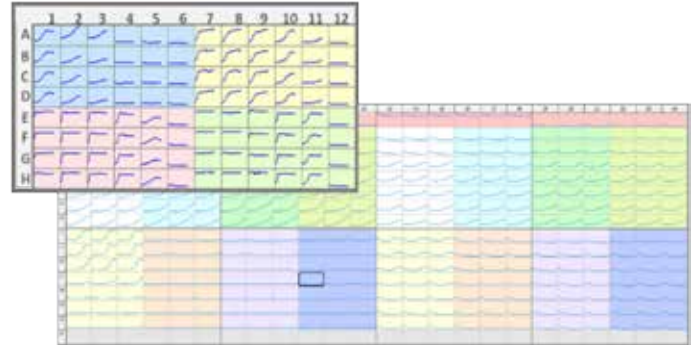
Optimización de los ensayos

Optimización de la concentración de proteínas mitocondriales

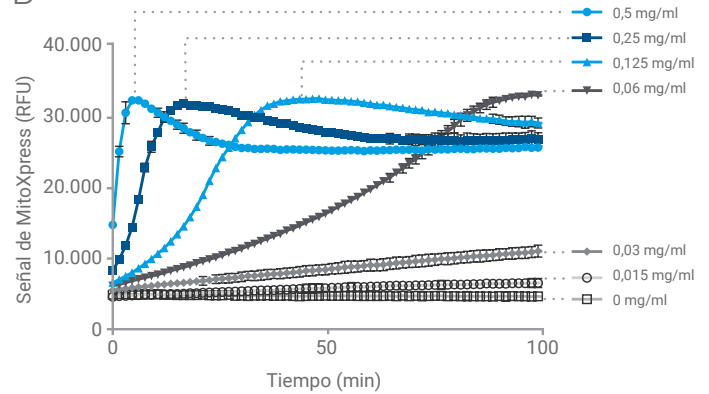
El consumo de oxígeno por mg de proteína mitocondrial es específico de cada tejido y puede verse afectado por el procedimiento de aislamiento usado. El consumo de oxígeno también se ve afectado por los sustratos respiratorios proporcionados y por la disponibilidad de ADP. Con el fin de garantizar un análisis robusto, es necesario cribar los compuestos con concentraciones de proteínas que hayan sido optimizadas de forma que se observen cambios intensos en la señal para las muestras sin tratar, para poder detectar de forma fiable el aumento y la disminución de la actividad. A diferencia de los análisis polarográficos tradicionales, los distintos formatos de microplacas (de 96 y 384 pocillos) usados aquí mejoran la productividad y facilitan la optimización.

En la Figura 1 se presentan los datos de las muestras; las diluciones de proteínas se evalúan con sustratos respiratorios de interés, en presencia y en ausencia de ADP. El aumento de la concentración de proteínas mitocondriales produce un agotamiento más rápido del oxígeno, lo que se detecta en tiempo real como un aumento más rápido de la señal de la sonda. Como se hace evidente en la Figura 1A, la productividad que aporta el planteamiento basado en el uso de microplacas permite evaluar múltiples condiciones en una sola placa.

A



B



C

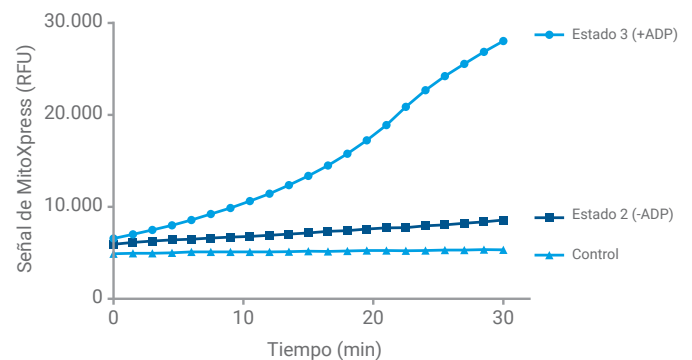


Figura 1. (A) Ejemplos de configuraciones de placas y curvas de señal resultantes para formatos de 96 y 384 pocillos. Cada grupo del ejemplo de 96 pocillos incluye una valoración de proteínas con los siguientes sustratos: glutamato/malato (azul), succinato (amarillo), glutamato/malato + ADP (rosa) y succinato + ADP (verde). (B) Ejemplo de curvas de señal de valoración de proteínas para la respiración estimulada por ADP con succinato (desde 0 hasta 0,5 mg/ml). (C) Influencia de la adición de ADP en el consumo mitocondrial de oxígeno.

Las concentraciones óptimas típicas de proteínas son las siguientes:

- Glutamato/malato de respiración basal: 1 mg/ml
- Respiración estimulada por ADP con glutamato/malato: 0,125 mg/ml
- Respiración basal con succinato: 0,5 mg/ml
- Respiración estimulada por ADP con succinato: 0,25 mg/ml

La Figura 1B muestra un ejemplo de cambios en la señal para la optimización de proteínas de la respiración estimulada por ADP con succinato (pocillos E7-H12). Para una concentración de 0,25 mg/ml, el cambio de la señal es rápido, pero medible, lo que resulta idóneo para la investigación de compuestos sospechosos de inhibir el complejo II-IV de la ETC.

Esta optimización también facilita la evaluación del acoplamiento mitocondrial, que indica la calidad de la preparación mitocondrial. Esto se evalúa determinando la relación entre la velocidad estimulada por ADP (estado 3) y la velocidad usando únicamente sustrato (estado 2). Cuanto mayor sea esta relación de control respiratorio (RCR), mejor será el acoplamiento de la actividad de la ETC con la producción de ATP; en cambio, los valores bajos indicarán daños en las membranas mitocondriales. En la Figura 1C se proporcionan datos de las muestras que ilustran el aumento de actividad provocado por la adición de ADP.

Medida de la disfunción mitocondrial

En la Figura 2 se muestran datos típicos que ilustran la disfunción mitocondrial. La antimicina A bloquea el complejo III de la cadena respiratoria, inhibiendo así el consumo de oxígeno, mientras que el desacoplador clásico (FCCP) disipa el potencial de la membrana mitocondrial, provocando un aumento del consumo de oxígeno.

Para el cribado de compuestos, las medidas suelen realizarse en el estado 2 (sin ADP), si se trata de desacopladores, o en el estado 3 (con adición de ADP), si se trata de inhibidores. Los distintos formatos de microplacas facilitan una elevada productividad, ya que las medidas pueden hacerse en formatos de 96 o 384 pocillos. Esto contrasta enormemente con los planteamientos polarográficos tradicionales de baja productividad.

La Figura 3 ilustra cómo se pueden cribar 46 compuestos por duplicado en una sola placa de 96 pocillos; los compuestos se añaden en pocillos en paralelo en cada mitad de la placa. Las disminuciones significativas de la respiración se identifican con facilidad (aparecen marcadas en verde).

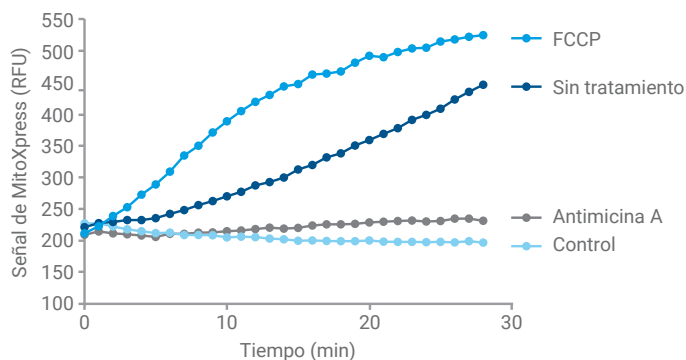


Figura 2. Representación típica de datos que ilustra la detección de la disfunción mitocondrial mediante el uso del ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress Xtra de Agilent.

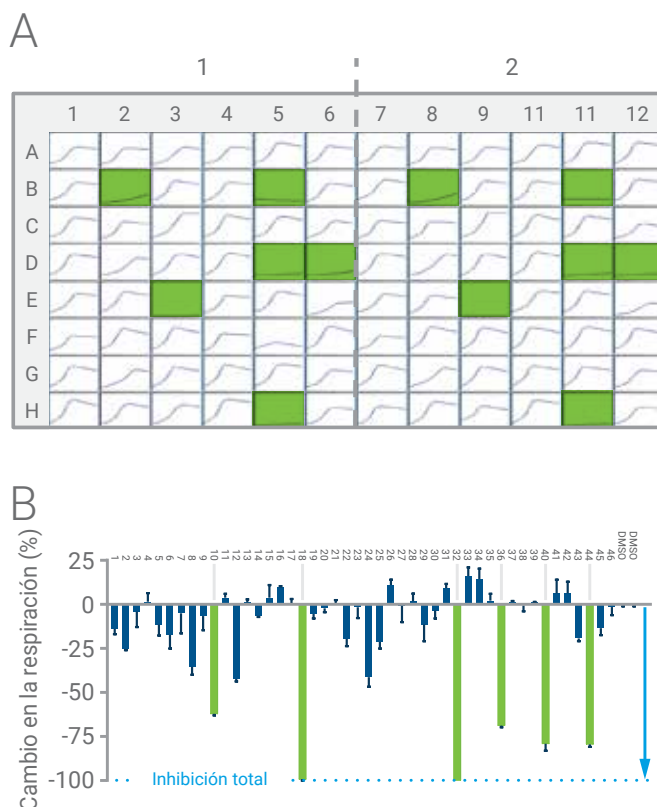


Figura 3. La configuración de placa que se presenta en la parte A permite cribar 46 compuestos por duplicado en una sola placa. La placa incluye dos controles vehiculares (DMSO). Los datos se presentan en forma de cambio porcentual de la inhibición (B). Los compuestos que presentan una inhibición significativa se marcan y los datos se transforman para el análisis de la relación dosis-respuesta (aparecen marcados en verde).

También pueden realizarse prácticas evaluaciones de la relación dosis-respuesta para múltiples compuestos en una sola placa, transformando los datos con facilidad en valores IC_{50}/UC_{50} ; los datos de velocidad de las curvas de señal se han representado frente a las concentraciones usadas para determinar la relación dosis-respuesta (Figura 4B). Posteriormente, los resultados pueden compararse con datos internos o existentes en la literatura de referencia.

Aumento de la productividad

Las medidas de mitocondrias aisladas obtenidas con el ensayo MitoXpress Xtra son compatibles con los formatos de placas de 384 pocillos, lo que permite aumentar la productividad hasta cuatro veces. La productividad se puede aumentar aún más mediante abordajes de manipulación de líquidos que incluyan pipetas de 384 canales de un solo paso y sistemas de automatización básicos. El ensayo permite usar mitocondrias directamente después del aislamiento, sin necesidad de preparar las placas; la duración típica del ensayo es de unos 30-45 minutos, lo que permite realizar varios experimentos al día o por preparación.

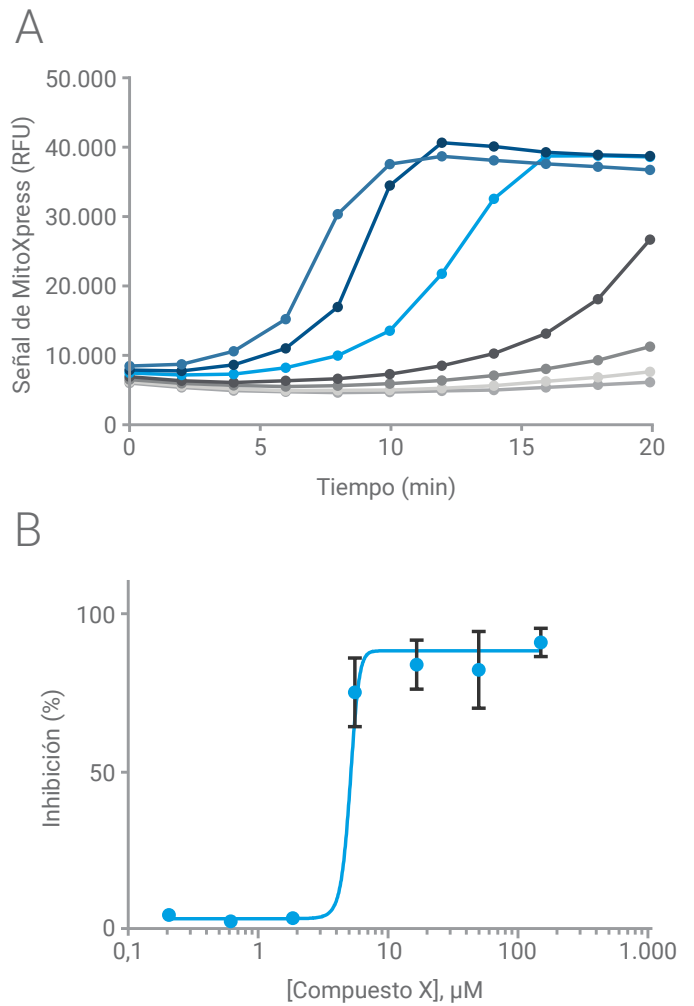


Figura 4. (A) Curvas de señal representativas obtenidas a partir de la relación dosis-respuesta de un compuesto de interés. (B) Curva IC_{50} representativa obtenida a partir de un inhibidor mitocondrial y basada en las pendientes medidas. Los datos se normalizaron tomando como referencia las velocidades de controles sin tratar.

Materiales y métodos (protocolo)

Preparación de las placas de 96 pocillos

- Prepare las placas en un calentador de placas equilibrado a 30 °C.
- Reconstituya la sonda MitoXpress Xtra en 1 ml de H₂O. Efectúe una dilución 1:10 en tampón de medida (sacarosa 250 mM, KCl 15 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM y K₂HPO₄ 30 mM; pH = 7,4) y añada 100 µl a cada pocillo.
- Para el análisis de compuestos, añada 1 µl de compuesto en un disolvente adecuado a los pocillos de prueba.
- Diluya las mitocondrias en tampón de medida hasta obtener la concentración deseada y añada 50 µl al pocillo de prueba. Disuelva el sustrato (succinato o glutamato/malato) y ADP (si es necesario) en tampón de medida y añada 50 µl de esta solución a los pocillos de prueba, para obtener una concentración final de sustrato de 25 mM (succinato) o 12,5/12,5 mM (glutamato/malato) y una concentración final de ADP de 1,65 mM.
- Añada 100 µl de aceite mineral (precalentado a 30 °C) a cada pocillo. Esto aumentará la sensibilidad del ensayo al minimizar las interferencias debidas al oxígeno ambiental.

Nota: La preparación de las placas debe realizarse en el menor tiempo posible. Si se usa una placa de 384 pocillos, deberán ajustarse los volúmenes según corresponda (consulte el apartado "Recursos técnicos adicionales").

Medida

- Inserte la placa preparada en un lector de placas de fluorescencia preajustado a 30 °C.
- Mida la señal del sensor a intervalos de 1,5 minutos durante 10-30 minutos usando las longitudes de onda de excitación y emisión (380 nm y 650 nm, respectivamente), según lo especificado en el manual del usuario.
- La intensidad de fluorescencia de la sonda MitoXpress Xtra se midió cinéticamente con un lector de placas de fluorescencia (la configuración para determinados lectores se puede solicitar a cellanalysis.support@agilent.com; también está disponible en la guía del instrumento [11]).
- A continuación, se representó la intensidad de la señal (RFU) frente al tiempo, como se describe en la referencia [10], usando en este caso la plantilla de análisis de datos BMG preconfigurada (puede solicitarse a cellanalysis.support@agilent.com).

Si el modo de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) está disponible, deberá utilizarse para maximizar el rendimiento de la medida. En el manual del usuario de MitoXpress Xtra se proporciona la configuración recomendada de medida para el modo TRF. Los protocolos instrumentales están disponibles en agilent.com (consulte el apartado "Recursos técnicos adicionales").

Nota: Las mitocondrias deben prepararse en fresco según el protocolo del usuario y no deben dejarse en hielo más tiempo que el recomendado en la literatura [9] (normalmente, < 4-6 h para mitocondrias de hepatocitos de rata). Los tampones de medida deben prepararse en fresco el día de la medida.

Análisis de datos

Los datos suelen analizarse de forma semicuantitativa, determinando la velocidad de aumento de la señal del sensor MitoXpress Xtra. Esta velocidad se usa a continuación para comparar las muestras tratadas con aquellas sin tratar y para generar relaciones dosis-respuesta.

Las velocidades pueden obtenerse tomando las pendientes de las partes lineales de las curvas cinéticas. La actividad, expresada de forma porcentual, puede calcularse mediante la normalización respecto a los valores de controles sin tratar:

$$\text{Actividad (\%)} = \left(\frac{\text{Velocidad de la muestra tratada}}{\text{Velocidad del control sin tratar}} \right) \times 100.$$

Las curvas IC₅₀/UC₅₀ representan la actividad, expresada en forma porcentual, frente a la concentración de compuestos (en el eje X se emplea una escala logarítmica decimal).

Aunque normalmente no es necesario, puede llevarse a cabo una evaluación más cuantitativa mediante la transformación de los datos de fluorescencia en concentraciones de oxígeno [9].

Conclusión

El ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress Xtra facilita un análisis cómodo, sensible y directo de la función mitocondrial. Dado que este ensayo de fluorescencia es compatible con placas de 96 y 384 pocillos, proporciona la productividad requerida para el cribado de compuestos y la evaluación de las relaciones dosis-respuesta. Todas las condiciones se preparan en paralelo, de modo que no se precisan intervenciones adicionales durante la medida, proporcionando así un flujo de trabajo sencillo y escalable para los ensayos. Además, los reducidos tiempos de medida (< 30 min), la alta productividad y los bajos volúmenes de medida (< 150 µl) maximizan la cantidad de datos que pueden obtenerse a partir de una sola preparación mitocondrial. El lanzamiento de estas soluciones coincide con el incremento en la adopción de estos reactivos en instalaciones universitarias y de descubrimiento de fármacos, lo que permite en última instancia el cribado de fármacos en busca de posibles sensibilidades mitocondriales, lo que facilita el diseño de ensayos y evita la toxicidad.

Recursos técnicos adicionales

- Publicaciones de interés: [6-9].
- Manual del usuario del ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress Xtra [10].
- Protocolo de aislamiento mitocondrial y medida con el ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress.
- Guía de preparación del instrumento: fichas técnicas [11].
- Seminario web: Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery (Desafíos en la evaluación de la toxicidad y la sensibilidad mitocondriales en el descubrimiento de fármacos) [12].

Referencias

1. Wallace, K. B., *Mitochondrial off targets of drug therapy*. Trends in Pharmacological Sciences, 2008. **29**(7): págs. 361-366.
2. Mattson, M. P. y G. Kroemer, *Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection*. Trends in Molecular Medicine, 2003. **9**(5): págs. 196-205.
3. Sullivan, P. G. y M. R. Brown, *Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 2005. **29**(3): págs. 407-10.
4. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. Nat. Genet., 2006. **38**(5): págs. 515-7.
5. Lin, M. T. y M. F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**: pág. 787.
6. Hynes, J., et al., *Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes*. Toxicol. Sci., 2006. **92**(1): págs. 186-200.
7. Will, Y., et al., *Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes*. Nature Protocols, 2007. **1**: pág. 2563.
8. Hynes, J., R. L. Swiss e Y. Will, *High-Throughput Analysis of Mitochondrial Oxygen Consumption*. (1940-6029 (formato electrónico)).
9. Hynes, J., C. Carey e Y. Will, *Fluorescence-Based Microplate Assays for In Vitro Assessment of Mitochondrial Toxicity, Metabolic Perturbation, and Cellular Oxygenation*. Curr. Protoc. Toxicol., 2016. **70**: pág. 2 16 1-2 16 30.
10. *MitoXpress Xtra Oxygen Consumption User Manual*. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/MitoXpress_Xtra_Oxygen_Consumption_Assay.pdf.
11. *Instrument Set-up Guide*. Disponible en: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoxpress-ph-xtra-consumables/mitoxpress-xtra-oxygen-consumption-assay#literature>.
12. *Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery*. Disponible en: https://seahorseinfo.agilent.com/acton/fs/blocks/showLandingPage/a/10967/p/p-0182/t/page/fm/0?utm_term=Register%20Now&&utm_content=landing+page&utm_source=Act-On+Software&utm_medium=landing+page&sid=TV2:1Z6zBff8C#register.

www.agilent.com/chem/cell-analysis

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

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Impreso en EE. UU., 8 de marzo de 2019
5994-0784ES

