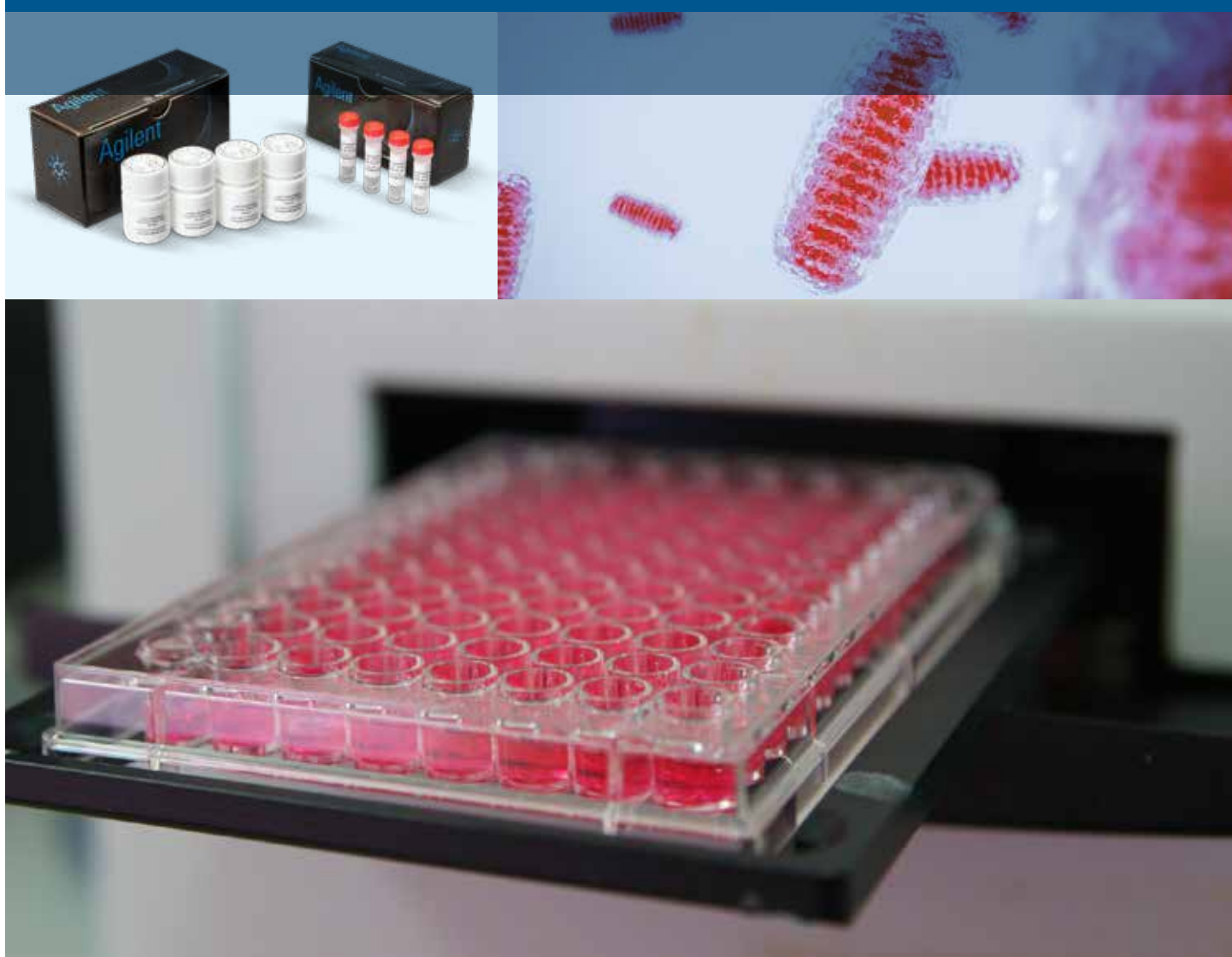


Soluciones de Agilent para la medida del metabolismo celular en su lector de placas



Saque el máximo partido a su lector de placas



Descubra cómo el ensayo de consumo de oxígeno Agilent MitoXpress Xtra, el ensayo de glicólisis Agilent pH Xtra y el ensayo de oxígeno intracelular Agilent MitoXpress pueden ayudarle a:

- Medir la actividad mitocondrial y la glicólisis en células vivas.
- Pasar de los ensayos indirectos de punto final con células a evaluaciones directas e informativas con productos que solamente requieren mezclar y medir para analizar la función mitocondrial, la actividad glicolítica y la oxigenación celular.
- Realizar un multiplexado con otros ensayos relevantes.
- Ir más allá de la monocapa a la hora de medir cultivos de células en suspensión, microbianos y específicos en 3D.
- Mejorar la productividad gracias a los sencillos ensayos metabólicos en microplacas estándar, que solamente requieren mezclar y medir.
- Llevar a cabo medidas en mitocondrias aisladas de forma cómoda y en un alto número de muestras.
- Estudiar la relación entre la disponibilidad de oxígeno y las alteraciones del metabolismo celular.

Ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress Xtra

Medida del consumo celular de oxígeno



La medida del consumo de oxígeno es un indicador funcional básico del metabolismo celular y, en concreto, de la función mitocondrial. El uso de este tipo de medidas para estudiar el metabolismo de las células vivas aporta importantes conocimientos del mecanismo de la función celular y el papel de las alteraciones metabólicas en el progreso de las enfermedades.

El ensayo de consumo de oxígeno MitoXpress Xtra es una valiosa herramienta para investigar el metabolismo. Ofrece una sencilla medida cinética del metabolismo aeróbico usando microplacas estándar y lectores de placas de fluorescencia. La respiración provoca que la concentración de oxígeno en la muestra disminuya. Esto hace que la señal del sensor MitoXpress Xtra aumente y proporcione una medida del consumo de oxígeno.

La Figura 1 muestra un estudio del consumo de oxígeno de cardiomiocitos humanos derivados de iPSC (Cor.4U, de NCardia) mediante el ensayo MitoXpress Xtra. En células tratadas con un desacoplador (FCCP), la tasa de cambio de la señal aumentó debido al incremento de la respiración. En cambio, el tratamiento con un inhibidor de la respiración mitocondrial (antimicina A) tuvo el efecto contrario. La tasa de cambio de la señal disminuyó debido al menor consumo de oxígeno. Estas medidas pueden realizarse para una amplia variedad de formulaciones de medios, lo que facilita el diseño flexible de ensayos.

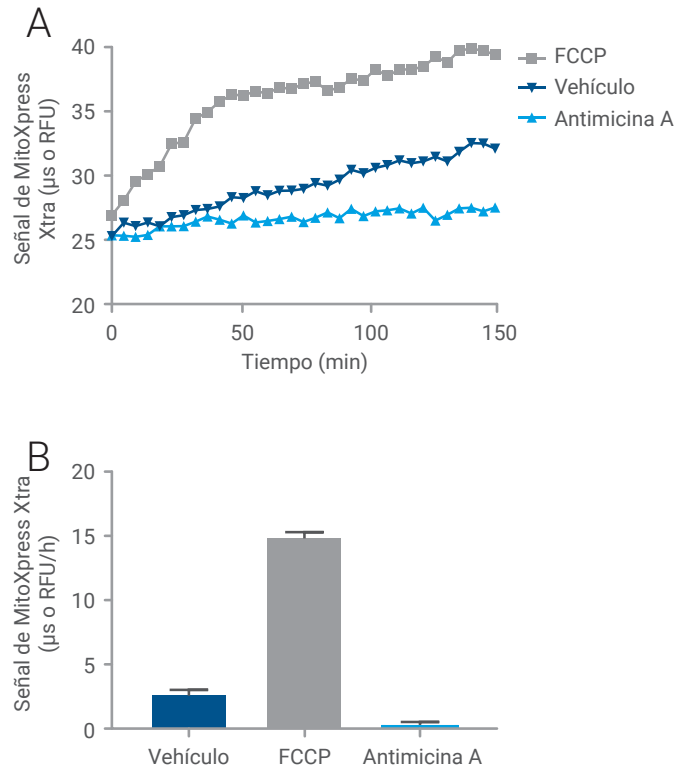


Figura 1. (A) Estudio del consumo de oxígeno de Cor.4U (NCardia), medido con el ensayo Agilent MitoXpress Xtra. La respiración celular consume el oxígeno disuelto, lo que provoca un aumento de la señal de la sonda MitoXpress Xtra. El tratamiento con antimicina A (un inhibidor de la respiración mitocondrial) inhibe el consumo de oxígeno y, por consiguiente, reduce la tasa de cambio de la señal de la sonda. El tratamiento con FCCP (un desacoplador) incrementa el consumo de oxígeno, lo que a su vez hace aumentar la tasa de cambio de la señal de la sonda. (B) Estos efectos metabólicos pueden evaluarse mediante el análisis de la tasa de cambio de la señal de la sonda MitoXpress Xtra: cuanto menor sea dicha tasa de cambio, menor será la actividad metabólica aeróbica.

Soluciones MitoXpress Xtra para toxicología

Cribado de toxicidad farmacológica

La disfunción mitocondrial farmacológica es un problema asociado a diversas clases de fármacos y se ha comprobado que contribuye de forma significativa a la toxicidad para el hígado, el corazón, los riñones, los músculos y el sistema nervioso central.

Gracias al formato de microplaca y al excelente rendimiento, el ensayo MitoXpress Xtra es una práctica solución para el cribado temprano de la sensibilidad mitocondrial a los fármacos y la elaboración de curvas de relación dosis-respuesta (Figura 2). Estos estudios pueden llevarse a cabo con diversos modelos *in vitro* adecuados, como hepatocitos primarios o cardiomiocitos y hepatocitos derivados de hiPSC.

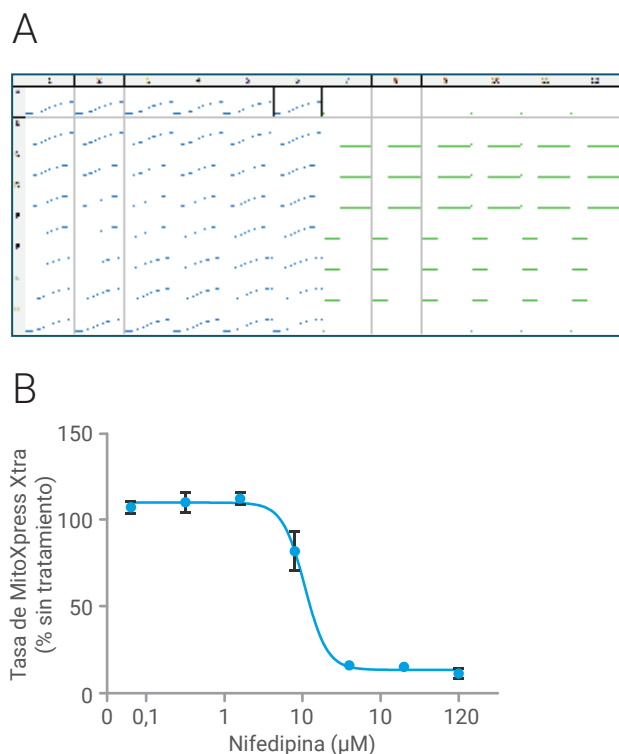


Figura 2. (A) Medida del consumo de oxígeno de células hiPS-HEP (Clontech) con el ensayo Agilent MitoXpress Xtra, en la que el factor Z' tuvo un valor de alrededor de 0,7. (B) Curva de relación dosis-respuesta de la nifedipina (un bloqueador de los canales del calcio) en un ensayo de respiración mitocondrial con cardiomiocitos Cor.4U. Los valores se obtuvieron a partir de pendientes normalizadas respecto al control del vehículo.

Medida de la respiración en mitocondrias aisladas

La medida de la respiración en mitocondrias aisladas resulta ahora más sencilla que nunca gracias al ensayo MitoXpress Xtra. Este ensayo permite evaluar la actividad de la cadena de transporte electrónico (ETC) de forma directa y cómoda, con una alta productividad y usando microplacas y lectores de placas de fluorescencia convencionales (Figura 3A). Esto facilita el cribado de compuestos y el análisis de la relación dosis-respuesta (Figura 3B). Además, el uso de combinaciones específicas de sustratos e inhibidores posibilita una evaluación mecanicista más detallada para los complejos individuales de la ETC y las proteínas mitocondriales asociadas. En comparación con los planteamientos polarográficos convencionales, el volumen de muestra relativamente bajo que requiere el ensayo MitoXpress Xtra permite realizar más réplicas por aislamiento. El bajo volumen de muestra requerido incrementa sensiblemente la cantidad de datos que pueden obtenerse a partir de una única preparación mitocondrial, sobre todo si se usan placas de 384 pocillos.

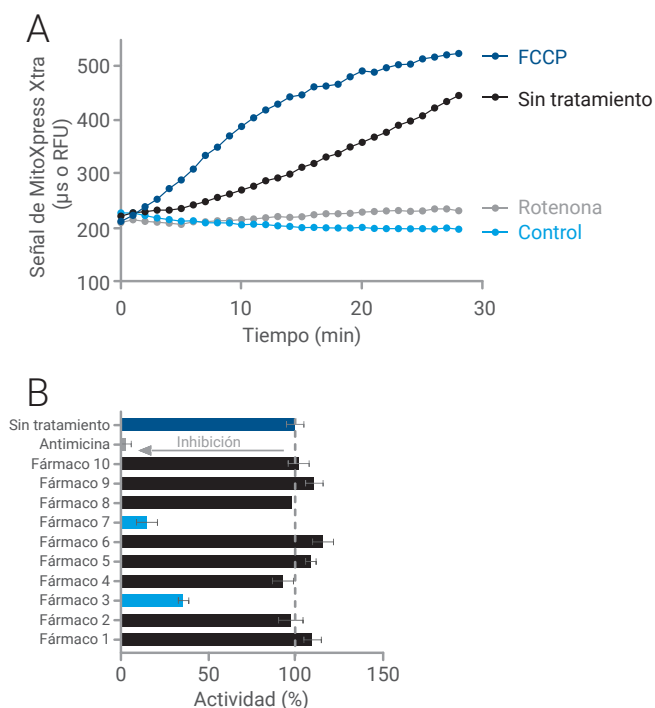


Figura 3. Análisis de la respiración de mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata con el ensayo Agilent MitoXpress Xtra. (A) Inhibición y desacoplamiento posteriores al tratamiento con moduladores mitocondriales convencionales. (B) Cribado con un panel de fármacos desconocidos usando mitocondrias de hepatocitos de rata para identificar la disfunción mitocondrial farmacológica (fármacos 3 y 7).

Soluciones MitoXpress Xtra de multiplexado

Evaluación multiparámetrica y multiplexada de la función mitocondrial

Los conocimientos sobre la respuesta celular pueden ampliarse combinando los ensayos MitoXpress Xtra o pH Xtra con la medida de otros parámetros relevantes y compatibles con los lectores de placas, como el potencial de la membrana mitocondrial (MMP), las especies oxigenadas reactivas (ROS) o el contenido celular de ATP. Esto permite a los investigadores mejorar la caracterización de los efectos de los tratamientos o los cambios en las condiciones de la función celular. También contribuye a contextualizar las perturbaciones metabólicas observadas sin tener que llevar a cabo tratamientos en paralelo o usar distintas plataformas tecnológicas.

Un ejemplo es la medida multiplexada de la viabilidad celular (Calcein AM) y la respiración mitocondrial (MitoXpress Xtra) para comprender mejor los efectos colaterales del tratamiento farmacológico sobre la función celular (Figura 4).

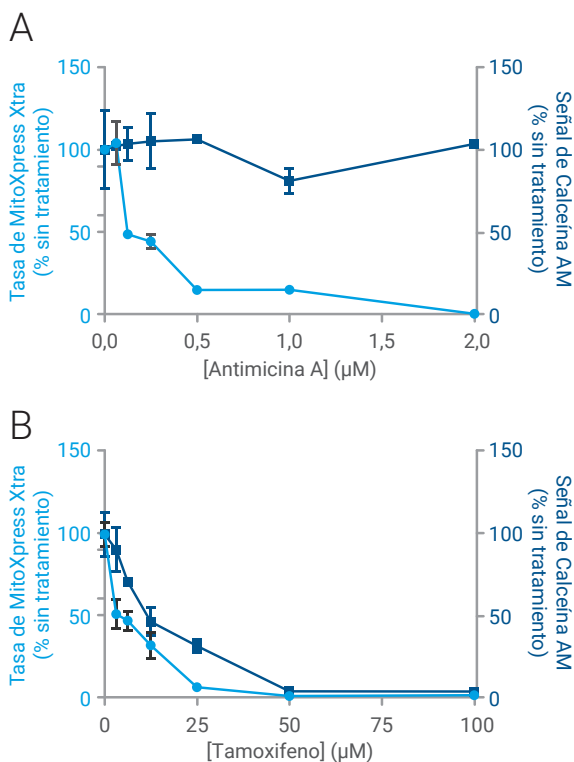


Figura 4. Medida multiplexada con Agilent MitoXpress Xtra y Calcein AM en células HepG2 tratadas con: (A) anticimicina A; y, (B) tamoxifeno durante 24 horas. Ambos fármacos reducen la respiración mitocondrial (línea azul clara). El tamoxifeno mostró un efecto significativo sobre la viabilidad, mientras que el tratamiento con anticimicina A no conllevó una reducción sensible de la viabilidad celular (línea azul oscura). Esto indica que los efectos de la anticimicina A sobre la respiración están asociados a un mecanismo mitocondrial más directo.

Los indicadores de la función mitocondrial, como el MMP y la generación de ROS, también pueden evaluarse en paralelo al consumo de oxígeno. Estos parámetros resultan de especial interés a la hora de investigar el papel de la mitocondria en la fisiología celular.

La Figura 5 muestra la medida multiplexada de la señal de MitoXpress Xtra y el MMP (usando JC-1) en células HepG2 tratadas con dos moduladores metabólicos: FCCP y anticimicina A. Ambos compuestos reducen el potencial de la membrana; sin embargo, producen distintos efectos en el consumo de oxígeno, lo que demuestra que la medida de varios parámetros relevantes puede mejorar los conocimientos adquiridos.

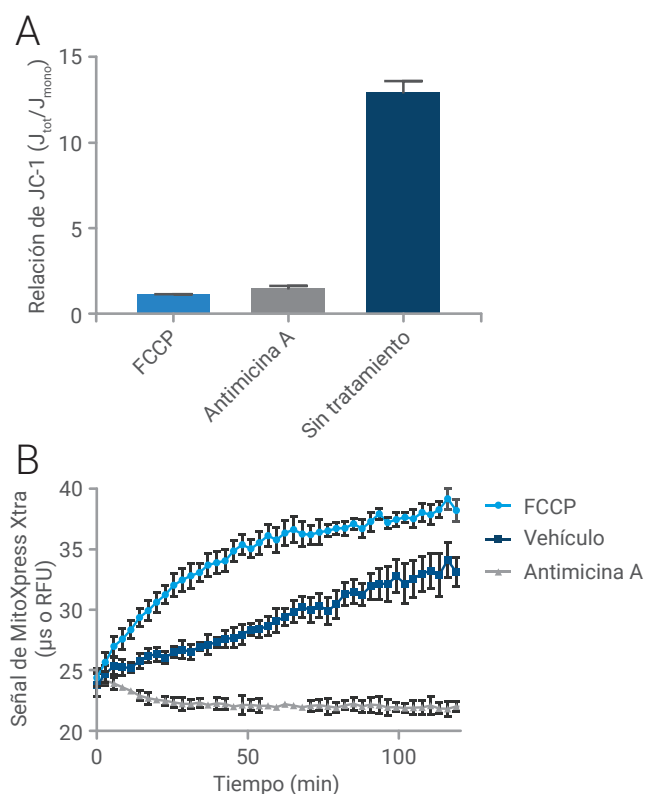


Figura 5. Medida con Agilent MitoXpress Xtra y JC-1 en el mismo pocillo. Las células HepG2 se trataron con anticimicina A o FCCP. Ambos compuestos redujeron el valor del MMP: (A) el FCCP provocó un aumento característico en el consumo de oxígeno; y, (B) la anticimicina A inhibió la respiración.

Soluciones MitoXpress Xtra para la medida del metabolismo microbiano

Medida de la proliferación, el metabolismo y la respuesta a los antibióticos de los microbios

El ensayo MitoXpress Xtra es un método sencillo y de alta sensibilidad para realizar análisis con un lector de placas y medir el crecimiento de las células procariotas o llevar a cabo un cribado de compuestos antibióticos sin necesidad de llevar a cabo múltiples diluciones de las muestras o laboriosos estudios con cultivos en agar. También resulta muy útil para estudiar el metabolismo microbiano.

El formato de ensayo con lector de placas ofrece la productividad y la resolución necesarias para hacer cribados y obtener de forma cómoda datos de CI_{50} o concentración mínima inhibitoria (CMI). La Figura 6 muestra cómo se aplicó este método para estudiar la proliferación microbiana, generar datos de la relación dosis-respuesta y evaluar los efectos metabólicos específicos del tratamiento de un hongo con dos compuestos distintos.

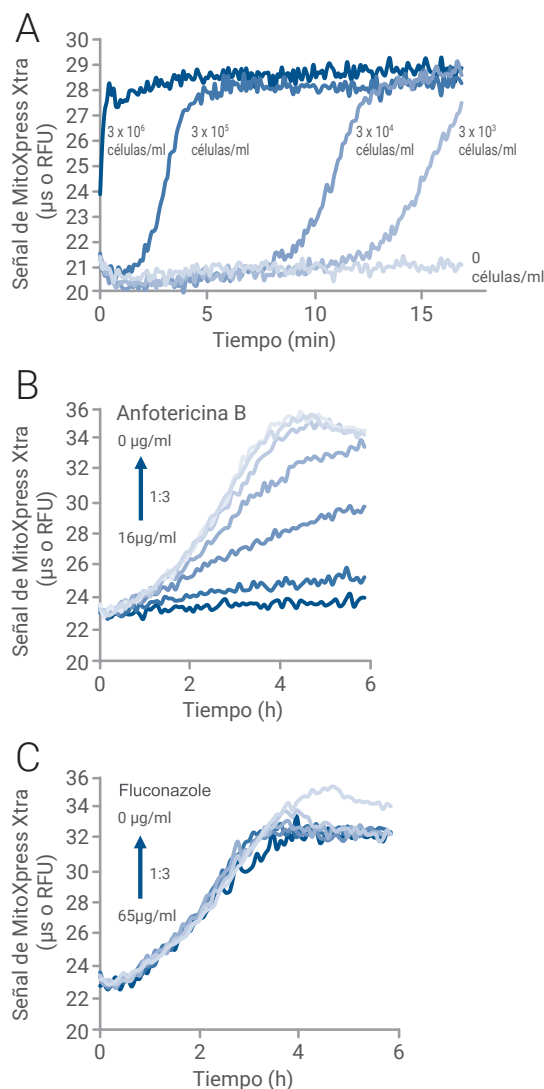


Figura 6. Perfiles de consumo de oxígeno de *C. albicans* medidos con concentraciones decrecientes de siembra. Las muestras de *C. albicans* se trataron con concentraciones crecientes de: (A) anfotericina B; y, (B) fluconazol. (C) La anfotericina B provocó una reducción dependiente de la dosis en el consumo de oxígeno, mientras que el fluconazol no causó ningún tipo de disminución en el consumo de oxígeno. Estas observaciones guardan relación con el modo de actuación de los fármacos.

Ensayo de glicólisis pH Xtra

Medida de la actividad glicolítica



La medida de la acidificación extracelular es un método muy útil para estudiar la actividad glicolítica y se puede llevar a cabo con comodidad en lectores de placas de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) con el ensayo de glicólisis pH Xtra. La acidificación extracelular se debe, en gran medida, a la transformación del piruvato en lactato, que hace disminuir el pH del tampón del ensayo. La sonda pH Xtra detecta con una elevada sensibilidad esta reducción del pH y la transforma en un incremento de la señal de la sonda.

La medida del pH aporta importante información sobre el papel crucial que desempeñan las alteraciones de la actividad glicolítica en una amplia variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como el cáncer y la adaptación celular a la hipoxia.

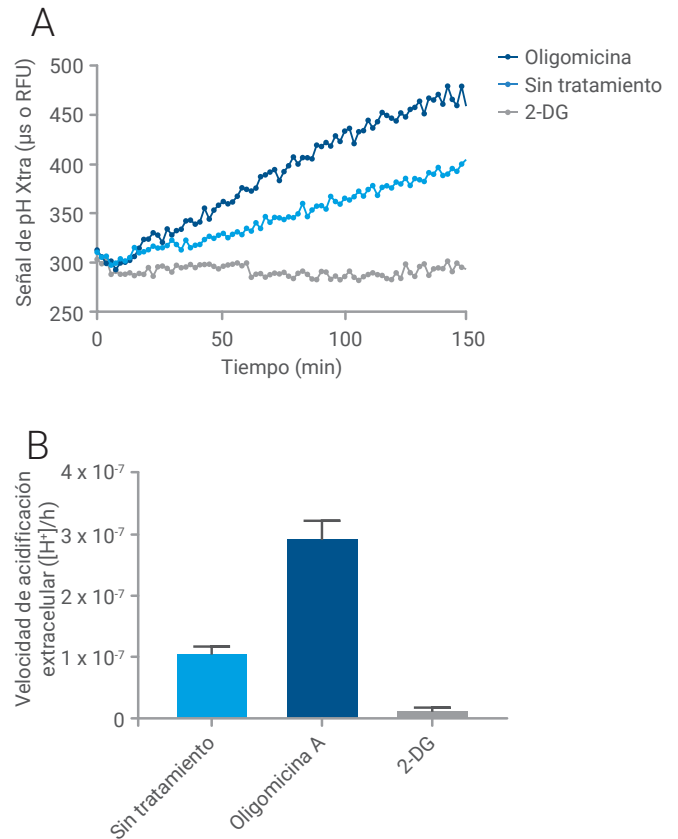


Figura 7. (A) Estudio de la actividad glicolítica de células A549 con el ensayo de glicólisis Agilent pH Xtra. El tratamiento con 2-desoxiglucosa (2-DG), un inhibidor de la hexoquinasa, inhibe la acidificación extracelular, lo que se indica mediante una reducción de la señal de la sonda. El tratamiento con oligomicina A, un inhibidor de la generación de ATP mitocondrial, produce un incremento de la producción de ATP glicolítico para mantener la homeostasis energética celular. (B) Los cambios en la acidificación extracelular pueden evaluarse de forma cómoda mediante la representación del pH o la concentración de protones $[\text{H}^+]$ frente al tiempo.

Soluciones MitoXpress Xtra y pH Xtra

Medida del metabolismo celular en cultivos en 3D

La medida del metabolismo celular con un lector de placas también puede realizarse con cultivos en suspensión y sistemas de cultivos en 3D específicos (por ejemplo, RAFT, Mimetix o Alvetex). Los cultivos celulares en 3D facilitan el desarrollo de interacciones intracelulares complejas, lo que ayuda a reducir la brecha entre los sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*. La Figura 8 muestra cómo se usaron los ensayos MitoXpress Xtra y pH Xtra para medir el metabolismo celular en matrices en 3D (RAFT, Lonza) sin alterar la integridad de la estructura en 3D.

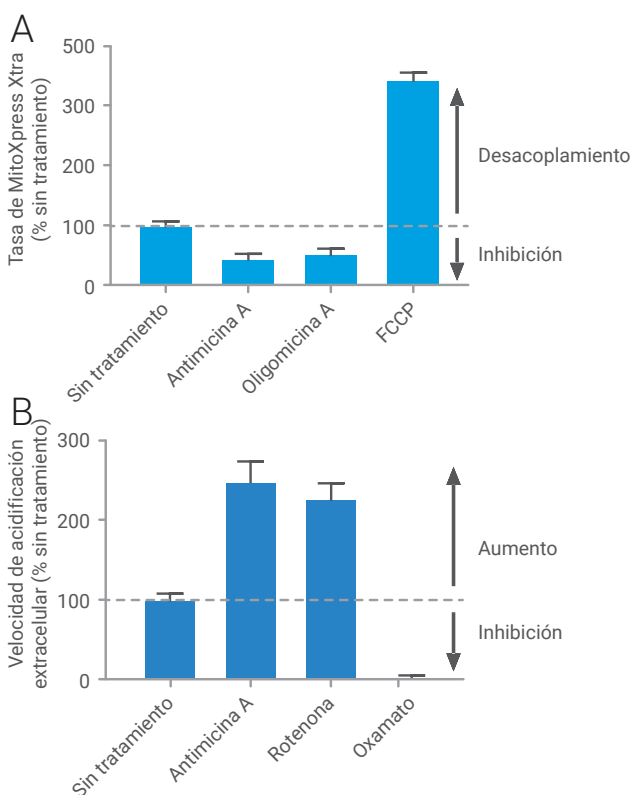


Figura 8. (A) Efecto relativo del tratamiento farmacológico sobre el consumo de oxígeno en cultivos en 3D de células A549 (RAFT), medido con el ensayo Agilent MitoXpress Xtra. (B) Efecto relativo del tratamiento farmacológico sobre la velocidad de acidificación extracelular de cultivos de células HepG2 (RAFT), medido con el ensayo de glicólisis Agilent pH Xtra.

Medida combinada de la glicólisis y el consumo de oxígeno

El uso combinado de los ensayos MitoXpress Xtra y pH Xtra permite evaluar la estabilidad del metabolismo celular como línea base para posteriores estudios metabólicos. La Figura 9 muestra cómo se pueden combinar estos ensayos para estudiar el equilibrio entre el consumo de oxígeno y la glicólisis en diversos tipos de células. La figura también muestra cómo se puede modular dicho equilibrio metabólico mediante la variación de la disponibilidad del sustrato.

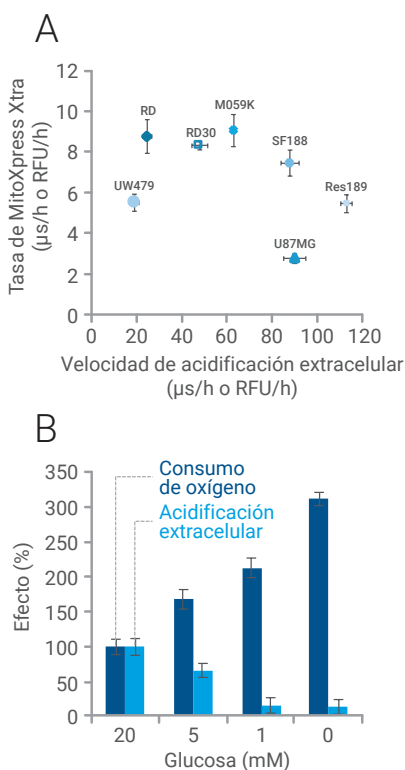


Figura 9. (A) Análisis combinado de glicólisis y respiración mitocondrial en estirpes de células cancerosas con los ensayos Agilent MitoXpress Xtra y Agilent pH Xtra. (B) Efecto de la disponibilidad de glucosa sobre el metabolismo de las células U87MG. El aumento de la disponibilidad de glucosa produjo una disminución de la respiración y un incremento de la glicólisis. Datos por cortesía del Dr. Karl Morten, de la Universidad de Oxford (Reino Unido).

Ensayo de oxígeno intracelular MitoXpress Intra

Oxygenación intracelular e hipoxia



La disponibilidad de oxígeno a nivel celular tiene una importante influencia en la fisiología, la transducción de señales y el metabolismo de las células. Por este motivo, se están usando concentraciones de oxígeno más bajas y fisiológicamente relevantes en los estudios *in vitro*, sobre todo en campos como el metabolismo de las células cancerosas, el descubrimiento de fármacos y la investigación cardiovascular y neuronal. Sin embargo, un elemento esencial de dichos modelos *in vitro* es la capacidad de monitorizar la oxigenación celular, ya que las fluctuaciones de este parámetro dinámico pueden afectar a la interpretación de los datos. Por lo tanto, comprender la profundidad y la duración de la oxigenación experimentada por el modelo celular es un aspecto de gran importancia.

El ensayo MitoXpress Intra constituye una solución para la medida de la concentración intracelular de O_2 en células vivas. La célula absorbe el reactivo y este puede monitorizarse usando lectores de placas de fluorescencia que dispongan de la capacidad de hacer medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo (TRF) con lectura doble. La sonda responderá en tiempo real a los cambios que puedan producirse en la concentración intracelular de oxígeno y estén causados por variaciones de las condiciones ambientales o la respiración celular.

Además de ser una herramienta informativa de monitorización, el ensayo también permite a los investigadores establecer relaciones entre las respuestas metabólicas y los niveles de oxígeno disponibles. Estos parámetros son extremadamente importantes para la isquemia, el metabolismo de las células cancerosas y la hipoxia. La Figura 10 muestra cómo puede utilizarse el ensayo MitoXpress Intra para determinar importantes diferencias entre los niveles de oxígeno reales y aplicados en las células. Estas diferencias dependen del número, la proliferación, el tipo y la sensibilidad metabólica de las células; por lo tanto, la magnitud de la hipoxia experimentada por las células no puede inferirse de la concentración ambiental de oxígeno.

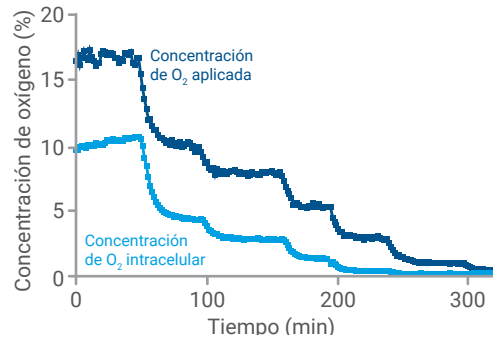


Figura 10. Monitorización de las concentraciones de O_2 en muestras que contienen células HepG2 en un cultivo en 3D (RAFT, Lonza) en respuesta a una concentración ambiental decreciente de O_2 . Con la concentración atmosférica de O_2 , las células presentan unos niveles de oxigenación de alrededor del 10 %, mientras que con una concentración ambiental del 5 % O_2 dichos niveles están próximos al 0 % de O_2 .

Esta reducción de la oxigenación puede tener importantes consecuencias fisiológicas y, si no se mide, puede dar lugar a la interpretación errónea de los datos debido a la falta de información sobre los niveles de oxigenación experimentados por el modelo celular que se esté estudiando. Esto resulta evidente en la Figura 11, donde se observa una estabilización del HIF del 40 % con un nivel de oxigenación celular de alrededor del 1,5 % de O_2 . Sin embargo, si no se hubiese medido la oxigenación, se habría asumido que este nivel de estabilización correspondería a una concentración de aproximadamente el 5 % de O_2 .

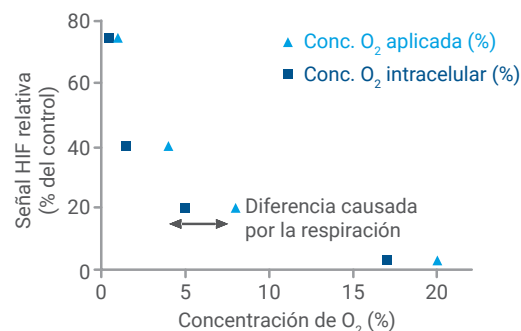


Figura 11. Estabilización del HIF medida con un marcador luminiscente del HIF en células HT-1080 con concentraciones decrecientes de oxígeno. La estabilización del HIF está relacionada con la concentración aplicada de oxígeno (línea azul clara) y los niveles reales de oxigenación experimentados por las células, medidos con Agilent MitoXpress Intra (línea azul oscura). Estos datos muestran que, salvo que se mida la oxigenación celular, se llegará a conclusiones erróneas acerca de la relación entre la disponibilidad de oxígeno y la estabilización del HIF. Datos por cortesía del Dr. Karl Morten, de la Universidad de Oxford (Reino Unido).

Soluciones MitoXpress Intra

Estudio del metabolismo de las células cancerosas en condiciones de hipoxia

La monitorización en tiempo real de la oxigenación celular con MitoXpress Intra permite a los investigadores determinar de forma precisa la magnitud de la hipoxia experimentada por un modelo celular. Al igual que el ensayo MitoXpress Xtra, MitoXpress Intra puede combinarse con otros ensayos para lectores de placas, incluyendo medidas de viabilidad, MMP y ROS. Esto resulta especialmente relevante en la investigación del metabolismo de las células cancerosas, donde la relación entre el ambiente hipóxico del tumor, la flexibilidad metabólica y el fenotipo del cáncer adquiere especial importancia.

Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 12, que recoge las medidas multiplexadas de la oxigenación celular y la actividad glicolítica obtenidas con MitoXpress Intra y el ensayo de glicólisis pH Xtra. Las medidas se llevaron a cabo en condiciones de hipoxia y también con la concentración atmosférica de oxígeno, y los datos obtenidos ponen de manifiesto la influencia de la oxigenación sobre la actividad glicolítica.

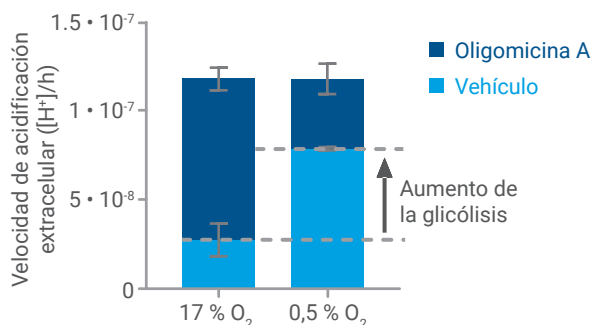
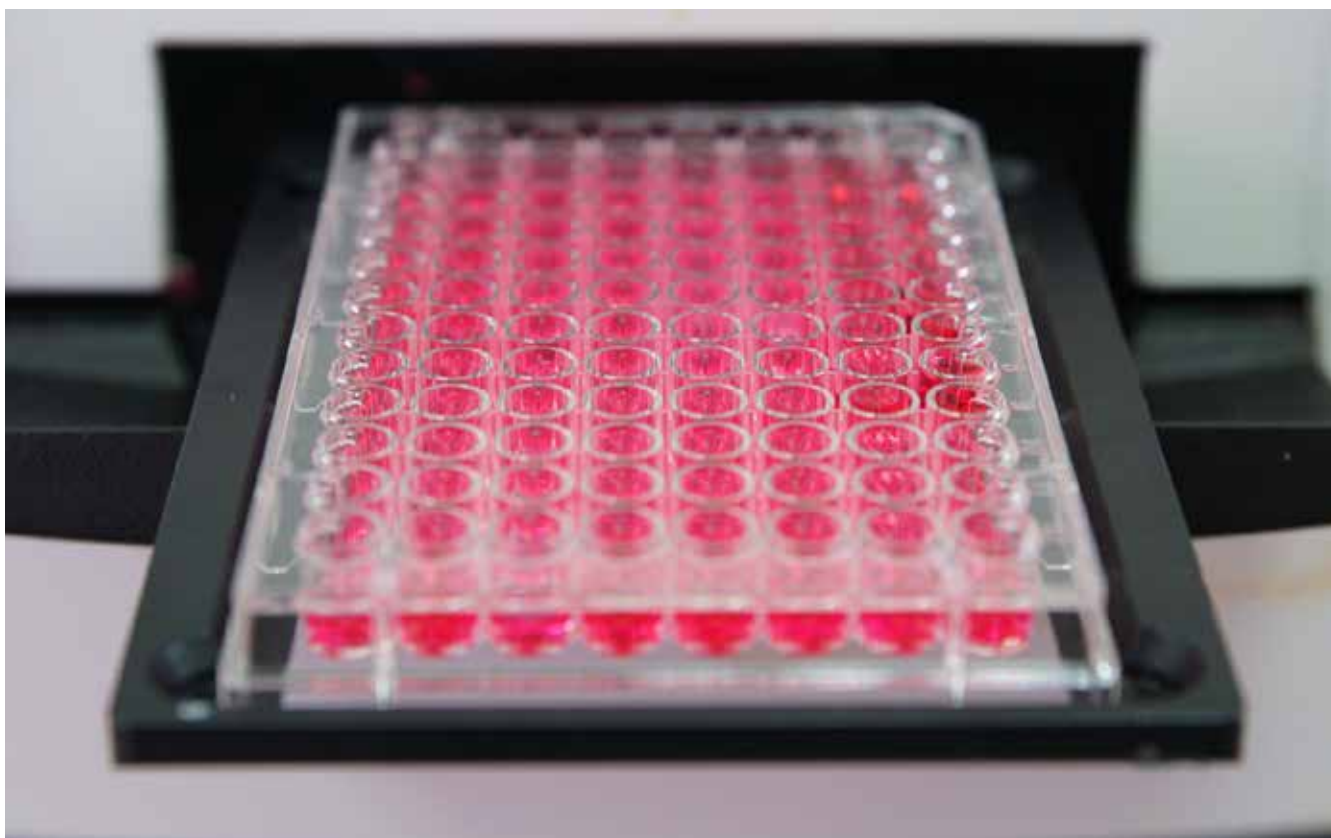


Figura 12. Acidificación extracelular de células A549, medida con el ensayo de glicólisis Agilent pH Extra multiplexado con el ensayo Agilent MitoXpress Intra para determinar las concentraciones intracelulares de oxígeno en condiciones de hipoxia impuestas por la unidad de control atmosférico del lector de placas. La velocidad de acidificación extracelular basal de las células tratadas con vehículo aumentó aproximadamente hasta el triple en condiciones de hipoxia (línea azul clara), mientras que la capacidad glicolítica, medida mediante el tratamiento con oligomicina (un inhibidor de la generación de ATP mitocondrial; línea azul oscura), permaneció constante.

La ventaja de Agilent

El metabolismo sustenta todas las respuestas celulares y, por lo tanto, es una medida funcional esencial en el campo de la biología celular. Gracias a la gama de sondas metabólicas compatibles con lectores de placas de fluorescencia, Agilent pone ahora a su disposición un conjunto completo de soluciones para estudios *in vitro* del metabolismo celular. Las aplicaciones que se muestran en este documento son ejemplos de cómo usar estos ensayos para analizar el metabolismo y la función celulares. Para obtener recursos adicionales, protocolos más detallados y más información sobre cómo utilizar nuestras sondas metabólicas solubles para dar respuesta a sus necesidades de investigación, visite www.agilent.com o contacte con nosotros directamente en cellanalysis.support@agilent.com.



Gama de análisis celular de Agilent

Nuestras tecnologías de análisis de células vivas en tiempo real son una auténtica referencia en el mercado y han ayudado a los investigadores a rebasar los límites establecidos en numerosos campos de investigación.

Para obtener más información sobre nuestra gama completa de soluciones, visite nuestra página web:

www.agilent.com/chem/discoverxf.

Más información

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables

Base de datos de publicaciones

www.agilent.com/publications-database/

Base de datos de referencias sobre análisis celular

www.agilent.com/cell-reference-database/

Seminarios web

www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series

Asistencia técnica a nivel mundial

cellanalysis.support@agilent.com

EE. UU. y Canadá

1-800-227-9770 (seleccione primero la opción 3 y, después, la opción 8)

Europa

Reino Unido: 0500 096 7632

Alemania: 0800 180 66 78

Otros países de la UE: +45 3236 9878

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

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Publicado en EE. UU., 16 de abril de 2019
5994-0683ES