PHCbi

LiCellMo™

Nota de aplicación

Solo con fines de investigación

Monitorización de la tasa metabólica de células iPS indiferenciadas y análisis de la expresión de marcadores de diferenciación

Introducción

La reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes inducidas (iPSC) requiere un cambio en la principal vía metabólica de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) a la glucólisis.[1) 2)] Este cambio metabólico tiene lugar en una fase temprana de la reprogramación, antes de la autorrenovación y la expresión de los genes de pluripotencia, y las iPSC indiferenciadas muestran un metabolismo glucolítico significativamente mayor que las células somáticas.[3)] Por lo tanto, se deduce una estrecha relación entre la pluripotencia y la glucólisis.

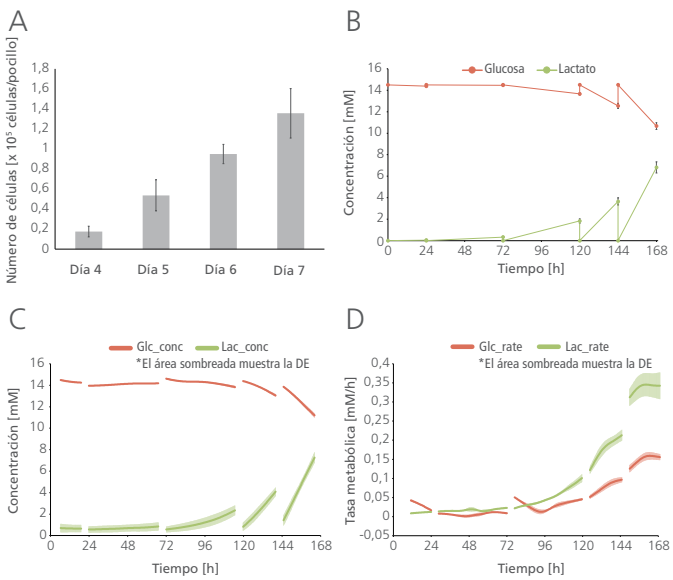
Dado que el estado de las iPSC indiferenciadas es un factor importante para la calidad y la eficacia de los procesos posteriores, como la congelación del stock y la inducción de la diferenciación, es necesario comprender el estado en constante cambio de las células para llevar a cabo las operaciones de cultivo en el mejor momento posible. En el cultivo celular general, los juicios cualitativos suelen basarse en la experiencia del profesional, lo que supone un problema para garantizar una calidad uniforme. Un método para la evaluación cuantitativa del estado de las células consiste en evaluar el metabolismo celular mediante el análisis del medio de cultivo,[4)] pero no es posible conocer con precisión el estado de las células tomando muestras varias veces al día. Aunque existen métodos de evaluación que utilizan el muestreo automatizado, esto es difícil para los cultivos en placas de pocillos múltiples que se utilizan en los laboratorios. Por lo tanto, PHCbi desarrolló el analizador metabólico de células vivas, que puede medir continuamente las concentraciones de glucosa y lactato en el medio de cultivo en placas de 24 pocillos comunes, disponibles comercialmente, a través de la monitorización en línea. Esto permite cuantificar los cambios en el estado de las células a lo largo del tiempo.

Método

Las iPSCs 1231A3 (HPS0381 fue proporcionada por el RIKEN BRC a través del Proyecto Nacional de BioRecursos del MEXT, Japón.) se cultivaron durante 7 días (168 h) en placas de 24 pocillos de acuerdo con el protocolo estándar,[5)] y las concentraciones de glucosa y lactato se midieron continuamente utilizando el analizador metabólico de células vivas. El medio de cultivo fue StemFit® AK02N (Ajinomoto Healthy Supply). Se añadió Y-27632 a las 24 h del cultivo de pasaje, y el medio de cultivo se sustituyó a las 24, 72, 120 y 144 h. Se recogió el medio cada vez que se sustituyó, y las concentraciones de glucosa y lactato se midieron por colorimetría. El estado celular se evaluó mediante qRT-PCR para medir los niveles de expresión de marcadores indiferenciados (NANOG, OCT3/4) y diferenciadas (PAX6 en el ectodermo, Brachyury en el mesodermo, GATA4 en el endodermo).

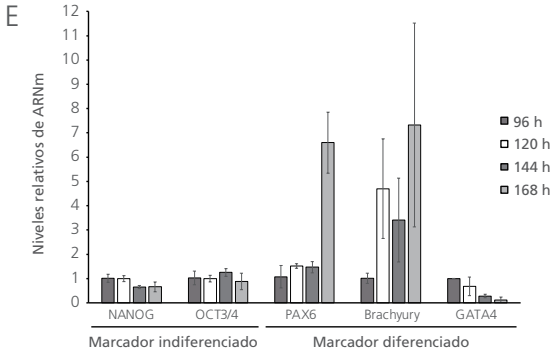
Resultado 1

Las células siguieron aumentando durante los 7 días de cultivo (Fig. A). Las mediciones colorimétricas del medio que se recogieron al sustituirlo mostraron que, con el tiempo, la concentración de glucosa disminuía y la de lactato aumentaba (Fig. B). Las mediciones continuas realizadas con el analizador metabólico de células vivas permitieron visualizar los cambios continuos en las concentraciones de glucosa y lactato de una forma que no sería posible con las mediciones realizadas al sustituir el medio (Fig. C). Además, la comparación de las mediciones de concentración obtenidas a partir del sensor electroquímico del analizador metabólico de células vivas y las mediciones colorimétricas de concentración del medio que se recogió cuando se sustituyó mostró que las mediciones de concentración de glucosa en el intervalo de 1-27 mM divergían en -2 - +4 %, y las mediciones de concentración de lactato en el intervalo de 1-15 mM divergían en +11 - +18 %, de lo que se concluyó que la precisión era suficiente. La tasa de consumo de glucosa y la tasa de producción de lactato se calcularon a partir de los datos de medición continua de la concentración, y los resultados indicaron que había un punto en el que el aumento se convertía en disminución a las 130 h, tras la sustitución del medio a las 120 h, y a las 155 h, tras la sustitución del medio a las 144 h (Fig. D).



Resultado 2

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo a las 96 h, 120 h, 144 h y 168 h para evaluar las células durante la segunda mitad del cultivo, cuando la tasa de consumo de glucosa y la tasa de producción de lactato se reducen (Fig. E). No se observaron cambios en la expresión de NANOG ni de OCT3/4, que son marcadores de iPSC indiferenciadas, mientras que aumentaron las expresiones de PAX6 y Brachyury, que son marcadores de diferenciación temprana. La expresión de GATA4 disminuyó.



Debate

En este experimento, las iPSC se cultivaron utilizando el protocolo de cultivo estándar durante 7 días. A medida que las células seguían proliferando durante los 7 días, la tasa a la que disminuyó el consumo de glucosa y de producción de lactato puede replantearse como una disminución de la tasa por célula de consumo de glucosa y de producción de lactato. Este resultado sugiere que la glucólisis se suprime a las 130 h y 155 h del inicio del cultivo. La glucólisis es más activa en las iPSC que en las células somáticas, pero se ha notificado que la glucólisis se suprime en las iPSC en las que la diferenciación se induce mediante ácido retinoico.[6] Además, se ha notificado que las iPSC cultivadas en medio sin bFGF e inducidas a diferenciarse espontáneamente no muestran ninguna disminución en la expresión de marcadores indiferenciados y un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación temprana.[7] Por lo tanto, dado que existe una estrecha relación entre la pluripotencia de las iPSC y la glucólisis, puede haber una correlación entre la tendencia a la supresión de la glucólisis y el aumento de la expresión de marcadores de diferenciación temprana en la última etapa del cultivo.

Conclusión

El analizador metabólico de células vivas permite la medición continua de la concentración de glucosa y de lactato durante el cultivo en una placa de múltiples pocillos. Con este dispositivo, fue posible visualizar cambios en la glucólisis de las iPSC entre sustituciones de medio que no podían verse con el método convencional de muestreo varias veces al día. Además, se demostró que los resultados de la medición continua de la concentración tenían una precisión equivalente a los resultados de la medición por el método habitual de colorimetría.

Esperamos que los cambios en la tasa de consumo de glucosa y la tasa de producción de lactato como marcadores cuantitativos de los cambios de estado que tienen lugar dentro de las células permitan realizar juicios objetivos, lo que también garantizará la producción de células de alta calidad.

Referencia

1) Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Brief Report Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell. 2009;5(3):237-241.

2) Zhou W, Choi M, Margineantu D, et al. HIF1 a induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC / hESC transition. EMBO J. 2012;31(9):2103-2116.

3) Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-fernandez A, et al. Somatic Oxidative Bioenergetics Transitions into Pluripotency-Dependent Glycolysis to Facilitate Nuclear Reprogramming. Cell Metab. 2011;14(2):264-271.

4) Lees JG, Rathjen J, Sheedy JR, Gardner DK, Harvey AJ. Distinct profiles of human embryonic stem cell metabolism and mitochondria identified by oxygen. Reproduction. 2015;150(4):367-382.

5) Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, et al. A novel efficient feeder-Free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Sci Rep. 2014;4:1-7.

6) Gu W, Gaeta X, Sahakyan A, et al. Glycolytic Metabolism Plays a Functional Role in Regulating Human Pluripotent Stem Cell State. Stem Cell. 2016;19(4):476-490.

7) Moussaieff A, Rouleau M, Aberdam D, et al. Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells. Cell Metab. Publicado en línea 2015:392-402.

*Los datos son el resultado de la verificación de PHC y no constituyen una garantía de los datos del cliente.

PHC Europe
A Member of PHC Group

Eikdonk 1 | 4825 AZ Breda | Netherlands
T: +31 (0) 76 543 3833 | biomedical.nl@eu.phchd.com

www.phchd.com/eu/biomedical

Versión: 291124