PHCbi

LiCellMo™

Nota de aplicación

Solo con fines de investigación

Control del cambio metabólico de las células inmunitarias durante la diferenciación

Introducción

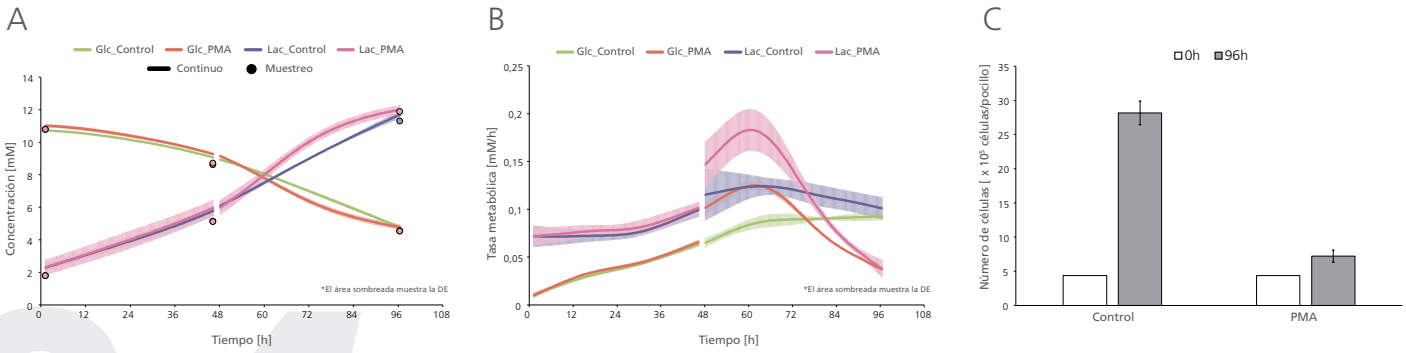
Los monocitos y macrófagos desempeñan un papel esencial en el sistema inmunitario natural del organismo. Los monocitos se producen en la médula ósea y se desplazan por el organismo a través de la sangre, diferenciándose en macrófagos e infiltrándose en los tejidos. Los macrófagos activados se vuelven dependientes de la vía glucolítica para la producción de energía, incluso en presencia de oxígeno; este perfil metabólico, denominado efecto Warburg, es una característica bien conocida de las células cancerosas.[1] El efecto Warburg se ha estudiado ampliamente en las células inmunitarias, pero se ha informado de que cumple diferentes funciones en las células cancerosas y en las inmunitarias. En las células cancerosas, el efecto Warburg favorece la supervivencia y la proliferación, mientras que en las células inmunitarias es un signo de envejecimiento y muerte celular.[2,-4] En los monocitos y otras células inmunitarias en las que puede observarse el efecto Warburg, el perfil metabólico difiere para cada estado de actividad inmunitaria. Por ejemplo, los monocitos y los macrófagos M2 muestran un aumento de la oxidación de ácidos grasos y de la fosforilación oxidativa, mientras que los macrófagos M0 y M1 muestran un aumento de la glucólisis. Además, se sabe que el microambiente y el perfil metabólico de los macrófagos M0 intervienen en el control de la polarización de los macrófagos M1 y M2.[5] Esto significa que investigar el perfil metabólico de las células inmunitarias puede permitir hacer inferencias sobre su estado de diferenciación.[6,7] En este estudio, se realizó un seguimiento cronológico de los cambios metabólicos en las células THP-1, una línea celular de monocitos, cuando se diferenciaron en macrófagos M0 como resultado de la exposición a PMA.

Materiales y métodos

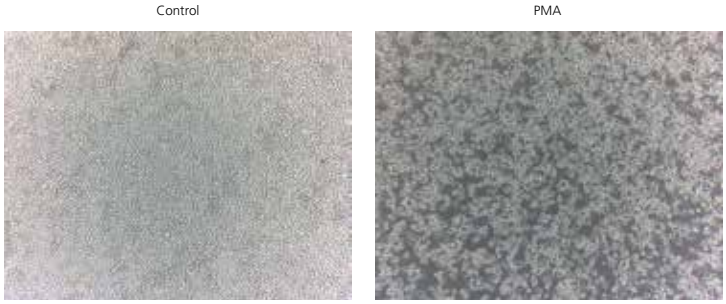
Células THP-1 (JCRB0112.1, obtenidas del Banco de células de la colección japonesa de recursos biológicos de investigación: JCRB), una línea celular de leucemia monocítica aguda. El cultivo se realizó en medio RPMI 1640 con adición de 10 % de FBS durante 96 horas, durante las cuales se midieron continuamente las concentraciones de glucosa y lactato en el medio de cultivo utilizando un analizador metabólico de células vivas. La medición continua comenzó inmediatamente después de la siembra de las células, y se añadió PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) a una concentración final de 10 ng/mL (0,001 % DMSO) 48 h después de la siembra. En el grupo de control, se añadió únicamente vehículo (0,001 % DMSO). Se recogió el medio de cultivo para medir las concentraciones de glucosa y lactato cuando se añadió el reactivo y al final del cultivo. Además, se examinó la morfología celular con un microscopio de contraste de fases y se midió el nivel de expresión de CD11b en la superficie celular mediante citometría de flujo.

Resultados

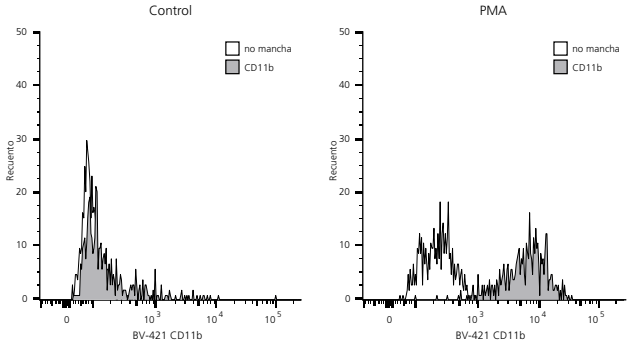
En primer lugar, se comprobó la precisión de los valores medidos por el analizador metabólico de células vivas comparando los valores del analizador para las concentraciones de glucosa y lactato en el medio de cultivo en el momento de la adición del reactivo y al final del cultivo con los valores del método colorimétrico. La desviación máxima fue del 14 %, por lo que se concluyó que los valores medidos con el analizador metabólico de células vivas eran suficientemente precisos (Fig. A). A continuación, se calcularon la tasa de consumo de glucosa y la tasa de producción de lactato a partir de los cambios continuos en las concentraciones de glucosa y lactato (Fig. B). La comparación de estos valores mostró que la tasa de consumo de glucosa y la tasa de producción de lactato aumentaron inmediatamente después de la adición de PMA. El número de células al final del cultivo fue mayor en el grupo de control, lo que sugiere que el consumo de glucosa por célula y la producción de lactato aumentaron como resultado de la adición de PMA (Fig. C). Además, las imágenes microscópicas confirmaron que los monocitos, que son células no adherentes, se transformaron en células adherentes como resultado de la adición de PMA (Fig. D). El nivel de expresión de CD11b, un marcador de macrófagos, en la superficie de las células se midió mediante citometría de flujo, y los resultados mostraron que el nivel de expresión de CD11b aumentaba como consecuencia de la adición de PMA (Fig. E). Estos resultados confirman que los monocitos se diferenciaron en macrófagos debido a la adición de PMA.



D



E



Debate

Comparando las tasas metabólicas analizadas mediante un analizador metabólico de células vivas y el número de células, fue posible demostrar que los monocitos, que tienen una mayor oxidación de ácidos grasos y fosforilación oxidativa, muestran una vía glucolítica mejorada a medida que se diferencian en macrófagos. Sin embargo, a las 60 h de cultivo, 12 h después de la adición de PMA, la tasa metabólica de los macrófagos empezó a descender. Se produce la supresión de la glucólisis y la reducción de la función de las células inmunitarias en respuesta a la concentración de lactato del entorno celular, y se ha notificado que esta es una de las razones de la falta de respuesta inmunitaria en el microentorno tumoral.[8] Además, se ha notificado que los macrófagos M1 cultivados en un medio con 5-20 mM de lactato tienden a reducir la captación de glucosa.[2] En el presente experimento, la concentración de lactato había alcanzado aproximadamente 8 mM en el momento en que la tasa metabólica comenzó a disminuir, lo que sugiere que la supresión de la glucólisis debida al aumento de la concentración de lactato en el medio se reflejó en la reducción de la tasa metabólica.

Conclusión

Utilizando un analizador metabólico de células vivas, se realizó la medición cronológica del cambio metabólico durante el proceso de diferenciación de monocitos en macrófagos. El perfil metabólico de las células inmunitarias está íntimamente relacionado con su estado de diferenciación, y la observación del perfil metabólico de las células inmunitarias en diferentes estados de diferenciación, como en el presente experimento, contribuirá a la evaluación de la diferenciación de las células inmunitarias. El analizador metabólico de células vivas mide las concentraciones de glucosa y lactato mientras se cultivan las células, lo que permite observar cronológicamente el cambio metabólico durante el proceso de diferenciación celular. El uso de esta técnica en estudios en los que se hace que las células inmunitarias se diferencien en una amplia variedad de fenotipos puede aportar nuevos conocimientos en la investigación metabólica.

Referencia

1. Warburg O. On the origin of cancer. Science. 1956;123(3191):309-314.
2. Dietl K, Renner K, Dettmer K, et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. J Immunol. 2010;184(3):1200-1209.
3. Kempner W. THE NATURE OF LEUKEMIC BLOOD CELLS AS DETERMINED BY THEIR METABOLISM. J Clin Invest. 1939;18 (3):291-300.
4. Nagy C, Haschemi A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: The process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. Front Immunol. 2015;6(164):1-8.
5. Cao J, Zeng F, Liao S, Cao L, Zhou Y. Effects of glycolysis on the polarization and function of tumor-associated macrophages (Review). Int J Oncol. 2023;62(70):1-12.
6. Abuawad A, Mbadugha C, Ghaemmaghami AM, Kim DH. Metabolic characterisation of THP-1 macrophage polarisation using LC–MS-based metabolite profiling. Metabolomics. 2020;16(33):1-14.
7. Palmer CS, Cherry CL, Sada-Ovalle I, Singh A, Crowe SM. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. EBioMedicine. 2016;6:31-41.
8. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood. 2007;109(9): 3812-3819.

*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