

Maximización de la eficiencia y el rendimiento de los ensayos Seahorse XF con la plataforma de manipulación automatizada de líquidos Agilent Bravo

Autores

Lisa Winer
George W. Rogers
Sarah E. Burroughs
Brian P. Dranka
Agilent Technologies, EE. UU.

Resumen

Es bien sabido que los pasos en la preparación de muestras manual pueden afectar a la calidad de los datos de los ensayos, en especial cuando se trata de ensayos con células. La preparación manual de muestras (incluido el pipeteo) puede introducir errores y requerir mucho tiempo. Para evitar posibles errores y reducir el tiempo de preparación manual, se propone el uso de una plataforma de manipulación automatizada de líquidos para la preparación de muestras para los ensayos Agilent Seahorse XF. Al usarla en un flujo de trabajo de ensayos de rutina, la plataforma de manipulación automatizada de líquidos Agilent Bravo: 1) redujo la variabilidad debida a errores manuales; 2) mejoró la uniformidad y la reproducibilidad dentro de las microplacas y entre ellas; y 3) redujo el tiempo de preparación manual para los ensayos XF. En general, la automatización de los pasos de manipulación de líquidos de los ensayos Seahorse XF mejoró la eficiencia del flujo de trabajo de preparación de muestras y la uniformidad de los datos resultantes, en especial en el contexto de aplicaciones de descubrimiento de fármacos como la evaluación rutinaria de compuestos y los estudios de la relación dosis-respuesta.

Introducción

Los ensayos con células suelen precisar varios pasos de manipulación de líquidos que pueden afectar a la calidad de los datos. La ausencia de una preparación de muestras uniforme puede originar una variabilidad inaceptable entre pocillos, placas o réplicas de ensayos. Estos pasos de pipeteo también pueden resultar laboriosos, en especial si se realizan ensayos multiplexados o un gran número de réplicas de ensayos, como suele suceder en los proyectos de descubrimiento de fármacos.

Por ejemplo, aunque un usuario experimentado pueda realizar manualmente el lavado de células de manera uniforme, existe una elevada probabilidad de que el lavado manual de células produzca daños en la monocapa. Estos daños pueden deberse a errores habituales como los que se ilustran en la Figura 1. Entre ellos se incluyen: daños en células o pérdida de estas por arañazos en la superficie de la monocapa (panel B); desprendimiento de células adheridas débilmente debido a un pipeteo enérgico (panel C); o eliminación de una cantidad excesiva de medio, lo que expone la monocapa al aire y origina daños o desprendimiento (panel D). El pipeteo manual también puede introducir burbujas que podrían dañar las células o afectar al volumen final contenido en el pocillo.

Para solucionar estos problemas al realizar ensayos Seahorse XF, se pueden automatizar varios pasos esenciales de pipeteo manual con la plataforma de manipulación automatizada de líquidos Agilent Bravo. La ejecución de estos pasos de manipulación de líquidos mediante la plataforma Bravo aporta valor al investigador en términos de calidad de los datos y de reducción del tiempo de preparación (manual) de los ensayos. Ambas ventajas permiten aumentar la productividad gracias a la mejora de la uniformidad de los datos y al incremento del tiempo disponible para otras tareas durante los ensayos XF.

En esta nota de aplicación se presentan métodos para automatizar tres pasos fundamentales de manipulación de líquidos asociados con la preparación de los ensayos XFe96: lavado de células, preparación de soluciones de inyección y carga de estas soluciones en el cartucho de sensores XFe96. Seguidamente, se proporcionan ejemplos que ilustran cada paso de automatización (incluidos datos de ensayos), así como el incremento estimado del tiempo disponible para otras tareas.

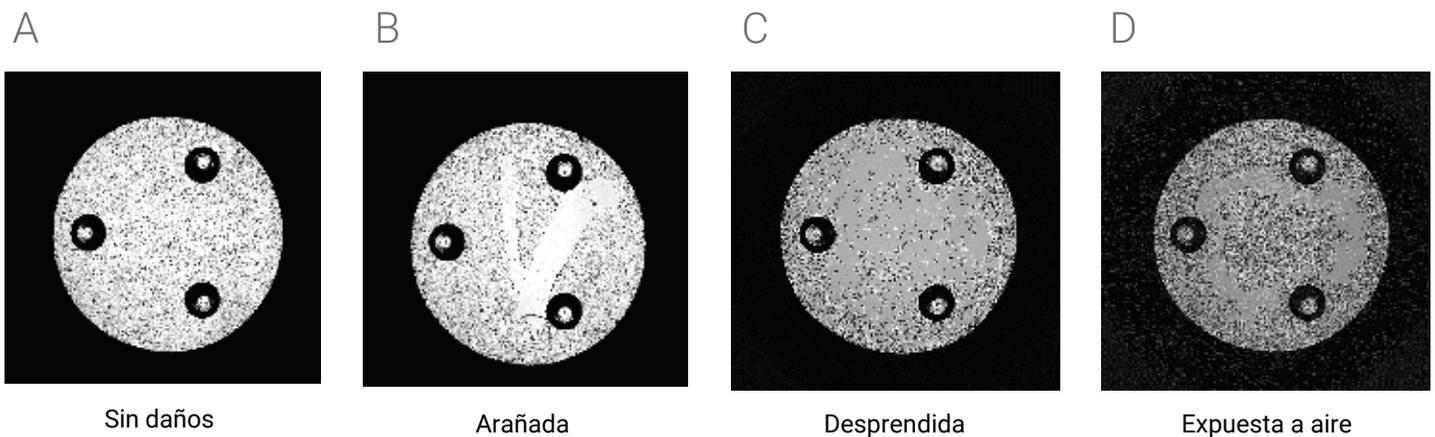


Figura 1. Imágenes de campo claro obtenidas para pocillos individuales de una microplaca XFe96 que muestran daños en la monocapa de células: A) células sin daños; B) monocapa arañada con la punta de la pipeta; C) desprendimiento durante la aspiración o dispensación; D) desprendimiento debido a la exposición al aire.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se sembraron células HEK293 o HepG2 en microplacas de cultivo celular XF96 con una densidad de $3,0 \times 10^4$ o de $1,5-2,0 \times 10^4$ células por pocillo, respectivamente; después, se incubaron durante la noche a 37 °C con un 5 % de CO₂. Como medio de cultivo para las células HEK293 se usó DMEM (Gibco, ref. 11885084) suplementado con FBS al 10 % y GlutaMAX 2 mM (Gibco, ref. 35050061). Para las células HepG2, se utilizó EMEM (ATTC, ref. 30-2003) suplementado con FBS al 10 %. Después de 24 horas, las células se prepararon para el ensayo XF.

Normalización

Se incluyó colorante nuclear Hoescht (Thermo Scientific, ref. PI62249) con la última inyección en todos los ensayos con una concentración de 20 µg/ml (2 µg/ml en el pocillo); se obtuvieron imágenes de las microplacas con un sistema BioTek Cytation 1. Se contaron los núcleos en cada pocillo y se normalizaron la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) conforme a estos recuentos de núcleos. Para consultar una descripción en profundidad del sistema de adquisición de imágenes químicas y normalización Seahorse XF, consulte el documento Normalization of Agilent Seahorse XF Data by In-situ Cell Counting Using a BioTek Cytation 5: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7908EN.pdf>.

Configuración y pruebas de rendimiento de la plataforma Bravo

Todos los ensayos se realizaron con una plataforma Bravo configurada para su uso con consumibles asociados al analizador XFe96. Esta configuración incluye bloques calentadores en las posiciones cuatro y seis de la cubierta Bravo. Los protocolos Bravo para cada elemento del flujo de trabajo, incluidas las velocidades y alturas predefinidas de aspiración y dispensación (consulte la Tabla S1, "Información suplementaria", para obtener más información), se implantaron mediante el software Bravo Seahorse Assay Workbench. Se usó material de laboratorio de Agilent (cartuchos y placas de reactivos) para los consumibles de la plataforma Bravo y el analizador XFe96, según se especifica en la Tabla 1. Todos los ensayos XF se realizaron con medios de ensayo XF formados por medios DMEM Agilent Seahorse XF (pH = 7,4) + glucosa 10 mM, piruvato 1 mM y glutamina 2 mM. Los pasos de pipeteo manual se llevaron a cabo siguiendo los métodos y prácticas recomendados para ensayos XF.

Material de laboratorio y consumibles de Agilent	Referencia	Cantidad requerida para cada ensayo XFe96		
		Lavado de células	Dilución de compuestos	Carga de cartuchos
Cartucho Agilent de 24 columnas (polipropileno, 3,25 ml/columna, geometría de base piramidal)	201296-100	–	–	1
Microplaca Agilent de almacenamiento/reacción de 96 pocillos (polipropileno de pureza ultraalta, 1 ml/pocillo cuadrado, fondo cónico)	201276-100	–	2	–
Cartucho Agilent (polipropileno, 86 ml, 96 pocillos, geometría de base piramidal)	201254-100	2	1	–
Caja de puntas Agilent, 250 µL, 96 por gradilla, compatible con el cabezal Bravo 96LT (llena)	19477-002	1	2	1
Caja de puntas Agilent, 250 µL, 96 por gradilla, compatible con el cabezal Bravo 96LT (vacía)		–	1	1
Agilent Seahorse XFe96 FluxPak	102416-100	1 placa de células (placa de células Seahorse XFe96 de 96 pocillos)	1 cartucho XFe96 con placa auxiliar (cartucho Seahorse XFe96 de 96 pocillos con placa auxiliar, 384 puertos)	
Medios DMEM Seahorse XF (pH = 7,4)	103575-100	90 ml	40 ml	20 ml
Glucosa Seahorse XF (solución 1,0 M)	103577-100	0,9 ml	0,4 ml	0,2 ml
Piruvato Seahorse XF (solución 100 mM)	103578-100	0,9 ml	0,4 ml	0,2 ml
L-glutamina Seahorse XF (solución 200 mM)	103579-100	0,9 ml	0,4 ml	0,2 ml
Prueba de provocación de mitocondrias celulares Seahorse XF Cell Mito Stress Test Seahorse XF (fuente de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A)	103015-100	–	1	1
Kit de ensayo de tasa glucolítica (fuente de 2-DG)	103344-100	–	1	1

Tabla 1. Material de laboratorio y consumibles de Agilent necesarios para cada paso de automatización.

Lavado de células

Las células HEK93 se usaron como modelo de una estirpe celular poco adherente para demostrar la capacidad de la plataforma Bravo para lavar células sin producir daños en la monocapa o pérdida de células (como se describe en la Figura 1). La configuración de la cubierta Bravo y el material de laboratorio usados para el lavado de células se muestran en la Figura 2. En resumen, las células se lavan aspirando el medio de crecimiento y sustituyéndolo por medio de ensayo dos veces, dejando un volumen final de 180 µl en el pocillo. Se realizaron tres medidas basales en un analizador Seahorse XFe96 y se evaluaron.

Carga de los puertos de inyección

Las soluciones madre de los reactivos de la Cell Mito Stress Test Seahorse XF (oligomicina, FCCP y antimicina A/rotenona) se prepararon manualmente y se dispensaron en un cartucho de 24 columnas (Agilent, ref. 201296-100). A continuación, se usó la plataforma Bravo para transferir 20, 22 o 25 µl de estas soluciones a los puertos A, B y C, respectivamente, de un cartucho de sensores XFe96. En la Figura 3 se muestra la configuración de la cubierta Bravo para la carga del cartucho de sensores XFe96. Todos los pasos de lavado de células para esta serie de ensayos se realizaron con la plataforma Bravo como se ha descrito anteriormente.

Preparación de soluciones de inyección: dilución especial de FCCP

Se hicieron diluciones en placas de almacenamiento de polipropileno de 96 pocillos (Agilent, ref. 201276-100). En la Figura 4 se muestra la configuración de la cubierta Bravo para la dilución de compuestos y la carga del cartucho de sensores XFe96. Se usó una serie especial de diez pasos de dilución de la FCCP (de 2 a 20 µM, con incrementos de 2 µM). Se preparó manualmente una solución madre de FCCP 100 µM en medios de ensayo XF y en la placa original de la biblioteca. La plataforma Bravo realizó las diluciones de FCCP directamente en la placa de dilución a partir de la solución madre 100 µM; después, se realizó la carga automatizada en los puertos B de un cartucho XFe96. Todos los tratamientos de la FCCP se llevaron a cabo en presencia de oligomicina 1 µM. Se usó la plataforma Bravo para cargar 20 µl de una solución de inyección de oligomicina 10 µM en todos los puertos A y 25 µl de una solución de rotenona/antimicina A (5,0 µM de ambas) en todos los puertos C para completar Mito Stress Test (MST) Seahorse XF estándar. Este ensayo de relación dosis-respuesta para la FCCP se repitió otro día (dos réplicas).

Preparación de soluciones de inyección: dilución en serie de antimicina A

Se preparó una solución madre de antimicina A 100 µM (AA; Sigma, ref. A8674-25) a partir de una solución de AA 50 mM en DMSO diluida con medios de ensayo XF. Las posteriores diluciones se realizaron con la plataforma Bravo en una placa de almacenamiento Agilent de 96 pocillos (ref. 201276-100). Se prepararon ocho series de diluciones idénticas e independientes de AA en paralelo en la misma microplaca. Cada serie de diluciones consistió en diez pasos de dilución a la mitad, de izquierda a derecha, originando concentraciones en el puerto de inyección de entre 10 y 0,02 µM. Las diluciones de AA se cargaron en los puertos A del cartucho XFe96 usando la plataforma Bravo. Se realizaron tres ensayos independientes.

Configuración de la cubierta

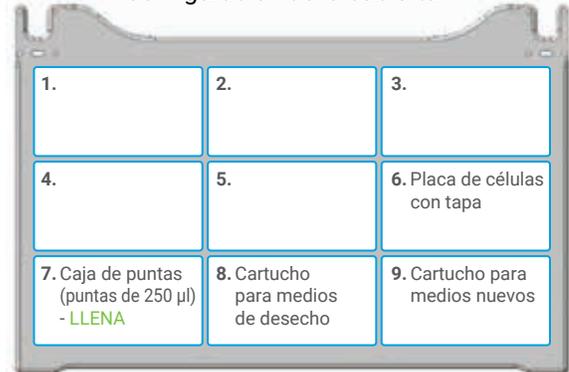


Figura 2. Configuración de la cubierta Bravo y material de laboratorio usados para el lavado de células.

Configuración de la cubierta

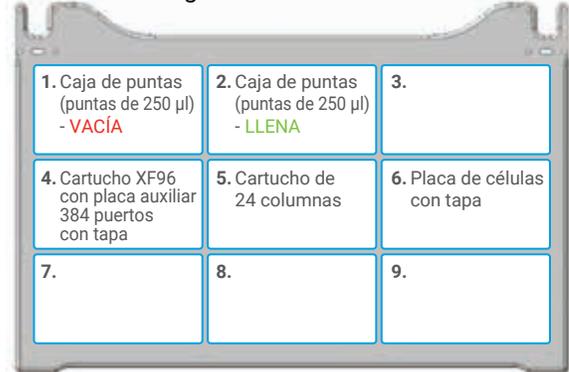


Figura 3. Configuración de la cubierta Bravo y material de laboratorio usados para la carga de los puertos de inyección.

Configuración de la cubierta

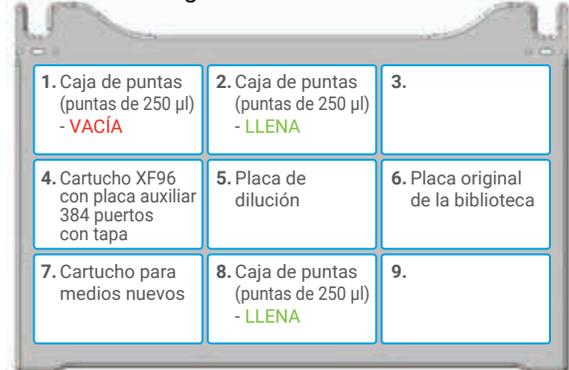


Figura 4. Configuración de la cubierta Bravo y material de laboratorio usados para la serie de diluciones.

Cribado de una biblioteca de compuestos en busca de inhibidores mitocondriales y glucolíticos

Se cribaron un total de 72 compuestos de la biblioteca Selleck-Pfizer (Selleckchem.com, ref. L2400; biblioteca de compuestos con licencia de Pfizer) en busca de inhibidores mitocondriales y glucolíticos. Para este pequeño cribado, se usó la plataforma Bravo para: 1) lavar las células; 2) realizar cien diluciones de la biblioteca de compuestos desde una placa de origen de 96 pocillos; y 3) dispensar 20 µl de las soluciones diluidas de compuestos en los puertos A del cartucho de sensores XF96. El ensayo Seahorse XFe96 constó de tres medidas de tasas (OCR y ECAR basales), seguidas de la inyección de los compuestos de la prueba (solución final de 10 µM) y de nueve medidas más de tasas. Los valores de OCR y ECAR de la medida final (la duodécima) se usaron para determinar la actividad inhibitoria.

Se realizaron tres ensayos XF en paralelo, generando microplacas que eran réplicas técnicas. Este método se repitió tres veces, obteniéndose nueve réplicas técnicas en total (es decir, nueve microplacas individuales). El valor Z' de calidad de los datos se obtuvo utilizando una mezcla de antimicina A/rotenona 0,5 µM (AA/rtn) como control positivo de inhibición de la OCR, una solución de 2-desoxiglucosa (2-DG) 50 mM como control positivo de la inhibición de la ECAR y una solución de DMSO al 0,1 % (final) como control del vehículo.

Resultados y comentarios

Los ensayos Seahorse XF con colorante nuclear Hoescht (Thermo Scientific, ref. PI62249) presentan elementos comunes de preparación de muestras independientemente de la aplicación o el kit específicos que se empleen:

- Siembra de células en la microplaca de cultivo celular XF96.
- Lavado de células (cambiando los medios de crecimiento por medios de ensayo).
- Preparación de los compuestos (diluciones).
- Carga de los puertos de compuestos en el cartucho de sensores XF96.

Estos pasos del flujo de trabajo son rutinarios, implican un pipeteo sustancial y conllevan la posibilidad de añadir errores a los ensayos; en consecuencia, son buenos candidatos para la automatización.

Este proyecto se ha centrado en los pasos b–d con el fin de evaluar la utilidad de la automatización mediante la plataforma Bravo para realizar la preparación de muestras de células vivas después del cultivo para los ensayos Seahorse XFe96. En casos previos, se demostró que la automatización de la siembra de células con la plataforma Bravo mejora la robustez de los ensayos (Gestin et al.). Aunque la plataforma Bravo permite acoplar una campana de cultivo de tejidos, tal configuración no se ha implantado en este laboratorio, por lo que no se ha evaluado el rendimiento de la siembra automatizada de células.

En la Figura 5 se ilustra un flujo de trabajo de alto nivel para el ensayo Seahorse XF.



Figura 5. Flujo de trabajo general del ensayo Seahorse XF. Los pasos de preparación de muestras automatizados con la plataforma Bravo se muestran en verde: lavado de células, preparación de las soluciones de inyección y carga de los cartuchos de sensores Seahorse XFe96. El ahorro total de tiempo de preparación manual es de entre 20 y 60 minutos por placa.

Lavado de células

En los ensayos XF con células adheridas, las células se lavan antes para eliminar los constituyentes de los medios de crecimiento y proporcionar a las células el medio de ensayo XF. Con el fin de validar que se podían lavar las células con un sistema automatizado de manera uniforme y sin dañar ni perder células, se probaron células HEK293 con un carácter adherente débil. Durante el lavado de células, es posible que se desprendan las células débilmente adheridas si los medios se dispensan demasiado rápido o se tocan accidentalmente las monocapas de células con la punta de una pipeta. La plataforma Bravo se programó para una altura específica por encima del fondo del pocillo con el fin de evitar tocar la capa de células. Además, la aspiración y la dispensación de medios de ensayo se programaron a velocidades que minimizan el riesgo de desprender células de las microplacas de cultivo celular XF96.

Para evaluar el lavado automatizado de células, se llevó a cabo un ensayo XF de medida de la respiración basal (tasa de consumo de oxígeno u OCR) y la producción de ácidos (H⁺) (tasa de acidificación extracelular o ECAR) usando células HEK293 (Figura 6). Los datos presentados muestran que la plataforma Bravo realizó el paso de lavado de células de manera uniforme. En el ejemplo mostrado, las tasas normalizadas utilizando la plataforma Bravo para el lavado no fueron significativamente diferentes en función del pocillo (Figura 6B). Además, al repetir el ensayo durante tres días, los datos mostraron valores de ECAR uniformes con un error estándar bajo para cada día. Estos datos indican que la integridad de la monocapa de células se conservó bien cuando se usó la plataforma Bravo para el lavado de células (Figura 6C). Además, la plataforma Bravo lavó bien las células en suspensión que se habían adherido a las microplacas de cultivo celular XF96 con Cell-Tak justo antes del proceso de lavado de células (no se muestran los datos).

La plataforma Bravo minimiza la probabilidad de que se produzcan daños en la monocapa de células (como se muestra en la Figura 1) mediante el control de la altura de las puntas en el pocillo y de la velocidad de aspiración o dispensación de líquidos. Esto mejora la uniformidad del volumen residual en el pocillo y evita el raspado o desprendimiento de células de la superficie de los pocillos y la formación de burbujas de aire. Además, los medios y la placa celular se conservan a 37 °C en la cubierta Bravo durante todo el lavado de células. Esto minimiza las variaciones de temperatura de las células y los medios de ensayo, lo que reduce aún más el riesgo de variaciones en los resultados del ensayo.

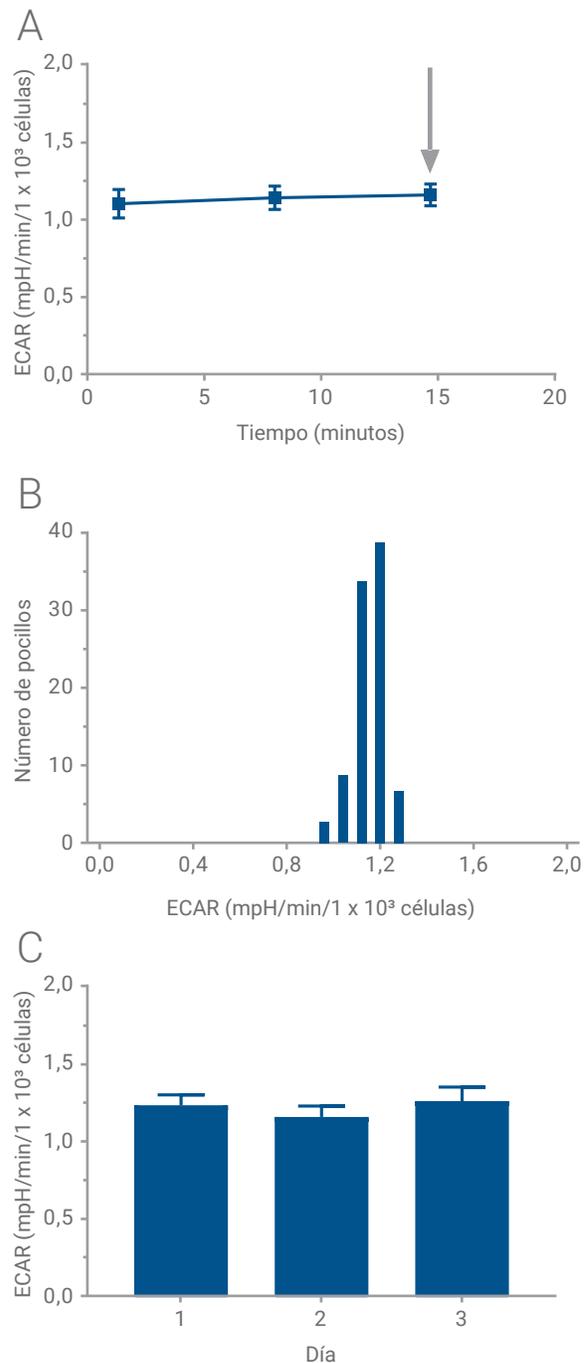


Figura 6. Prueba del protocolo de lavado automatizado de células. Las microplacas se sembraron con células HEK293 y el lavado automatizado de células se llevó a cabo con la plataforma Bravo; después, se realizó un ensayo Seahorse XF. Para la comparación de los datos se usó la tercera medida de tasas. A) Ensayo XF de ECAR basal (sin inyecciones) con normalización. La flecha indica los datos usados en los paneles B y C. B) Histograma de valores de ECAR (medida n.º 3) para una sola microplaca XF96 (n = 92 pocillos). C) Valores de ECAR (medida n.º 3) para las tres réplicas de ensayos realizadas en tres días. Los datos se presentan en forma de media \pm desviación estándar (n = 92).

Carga de los puertos de inyección

Los ensayos Seahorse XF generalmente requieren que se carguen uno o varios puertos de inyección del cartucho de sensores antes del ensayo. El volumen cargado de solución de inyección debe ser idéntico en una serie dada de puertos de inyección (p. ej., todos los puertos de inyección A) para garantizar una inyección exacta y precisa de la solución y, de esta forma, conseguir la misma concentración resultante de fármaco en cada pocillo. Además, debe tenerse cuidado de cargar los puertos con suavidad, de modo que no se fuerce el paso de líquido a través de la parte inferior del puerto de inyección.

Con el fin de validar que la carga de soluciones de inyección se realizase de forma exacta y uniforme con la plataforma Bravo, se llevó a cabo una prueba Mito Stress Test (MST) Seahorse XF, que constó de tres inyecciones secuenciales. Se analizó la respiración máxima (flecha de la Figura 7A), ya que este parámetro es sensible a pequeñas variaciones en la concentración de FCCP.

La Figura 7 muestra que la plataforma Bravo tuvo un rendimiento exacto y uniforme a la hora de cargar soluciones de inyección en los puertos del cartucho de sensores. La respuesta máxima, un indicador sensible de pequeñas variaciones en la concentración de FCCP, mostró unas tasas de respiración y unas respuestas casi idénticas para las inyecciones de la prueba MST (Figura 7B) en cada pocillo. Por último, al repetir el ensayo otro día, los datos mostraron valores de OCR uniformes con errores estándar bajos para cada día (Figura 7C). En conjunto, estos datos indican que la plataforma Bravo transfirió uniformemente la solución de inyección al puerto deseado de una forma que permite la inyección completa de la solución desde el puerto.

La carga exacta y uniforme de los puertos resulta esencial para obtener datos de calidad elevada. Aunque un usuario experimentado pueda cargar manualmente los puertos de forma exacta y uniforme, sigue existiendo la posibilidad de cometer errores; además, la destreza manual varía considerablemente de una persona a otra. La carga incorrecta de los puertos puede provocar una inyección deficiente (fallo de inyección) o la fuga de compuestos del puerto antes de que se inyecten. Una inyección parcial o un volumen incorrecto de inyección originarán una concentración inferior a la deseada en el pocillo. Las fugas provocarán una respuesta inesperada antes de lo previsto en el ensayo, lo que normalmente hará que esos puntos de datos no sirvan para el análisis. La plataforma Bravo realiza este paso de manera uniforme para cualquier ensayo XF, dispensando un volumen preciso sin crear burbujas de aire ni usar una presión excesiva. También reduce sensiblemente el riesgo de errores del usuario, como la contaminación cruzada de puntas de pipeta o puertos.

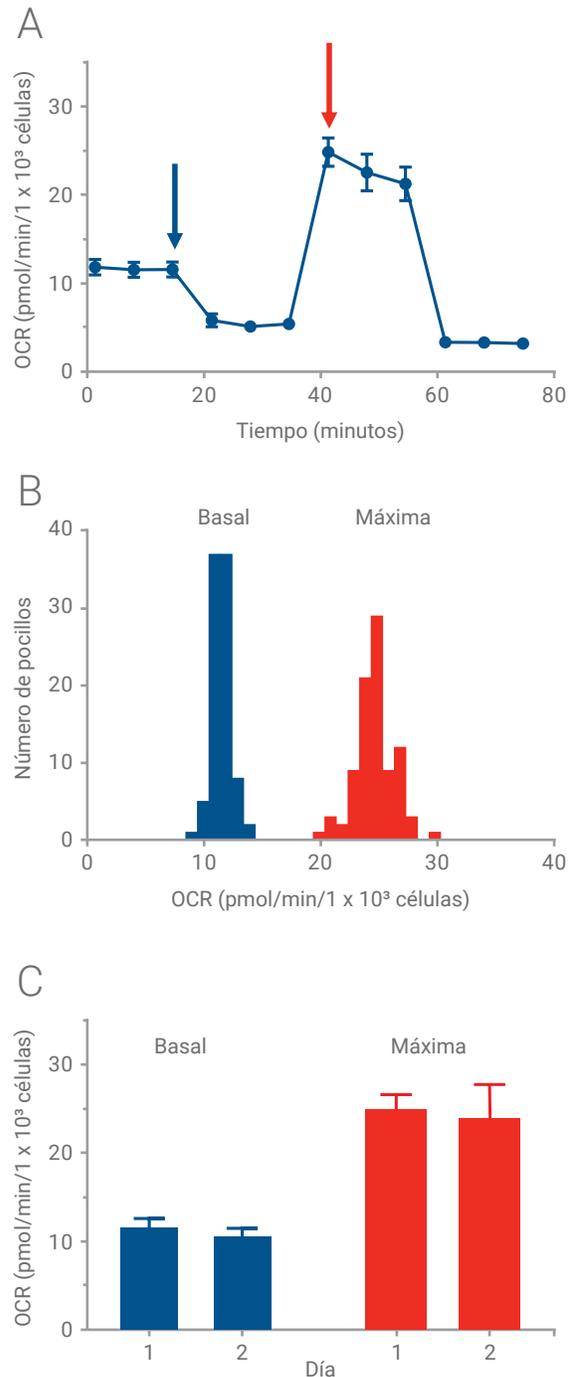


Figura 7. Evaluación de la carga automatizada de los puertos de inyección. Se sembraron células HepG2 en microplacas de cultivo celular XF96 y se analizaron tras 24 horas de crecimiento. Se prepararon y cargaron en el cartucho XF soluciones de inyección MST de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A. A) Resultados de la prueba Cell Mito Stress; las flechas designan los datos de respiración basal (flecha azul) y máxima (flecha roja) usados en los paneles B y C. B) Histograma de valores basales y máximos normalizados de OCR (medidas n.º 3 y 7) para una sola microplaca XF96 (n = 92 pocillos). C) Valores basales y máximos normalizados medios de OCR (medidas n.º 3 y 7) para dos ensayos independientes. Los datos se presentan en forma de media \pm desviación estándar (n = 92).

Diluciones en serie y ensayos de relación dosis-respuesta

A la hora de caracterizar una serie de compuestos o candidatos a fármacos, normalmente se realiza un ensayo de relación dosis-respuesta con el fin de evaluar la potencia (p. ej., CI_{50} o CE_{50}). La plataforma Bravo puede facilitar este proceso, ya que minimiza los requisitos de trabajo manual (y los riesgos asociados) de la preparación y ejecución de un ensayo complejo de matriz de dilución.

Se usaron dos diseños de ensayos para comprobar la capacidad de la plataforma Bravo para generar matrices de relación dosis-respuesta; en concreto, consistieron en: 1) réplicas técnicas dentro de una misma microplaca (Figuras 8 y 9); y 2) réplicas técnicas en varias microplacas (Figuras 10 y 11).

Como se ha indicado anteriormente, las tasas de respiración celular son sensibles a pequeñas variaciones en la concentración de FCCP, en especial a concentraciones inferiores a la máxima. Por lo tanto, un ensayo de relación dosis-respuesta dentro de un margen estrecho de concentraciones de FCCP es una prueba robusta de la precisión de la plataforma Bravo para la preparación de ensayos de relación dosis-respuesta.

Con el fin de probar las réplicas técnicas dentro de una misma placa (Figura 8), se midió la respiración de las células HepG2 en respuesta a concentraciones de FCCP de 0,0 a 2,0 μM , con incrementos de 0,2 μM , mediante un ensayo MST. La respiración máxima (flecha de la Figura 9A) aumenta linealmente dentro de este rango estrecho, alcanzándose la OCR máxima para una concentración 1 μM de FCCP; dicho valor disminuye ligeramente para una concentración 2 μM de FCCP (Figura 9B). Cada concentración provoca una respuesta específica con coeficientes de variación (CV) bajos, lo que demuestra la precisión de la plataforma Bravo a la hora de preparar esta serie especial de diluciones. Al realizar el ensayo durante varios días (N = 2), los datos resultantes muestran respuestas uniformes a la concentración de FCCP y los CV para todas las dosis son < 10 % (Figura 9B, C).

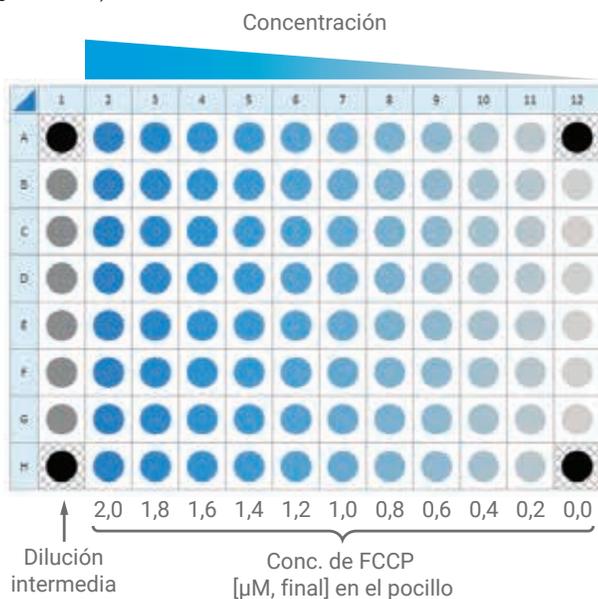
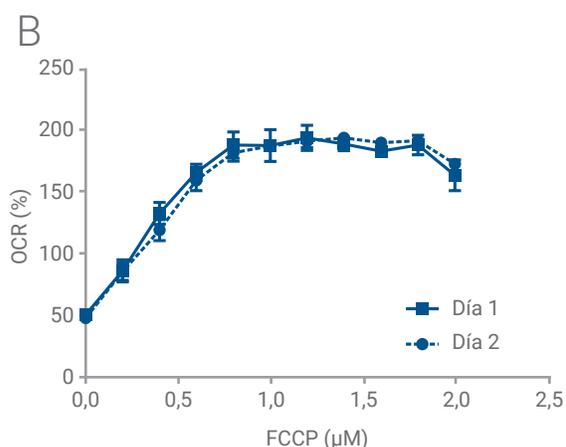
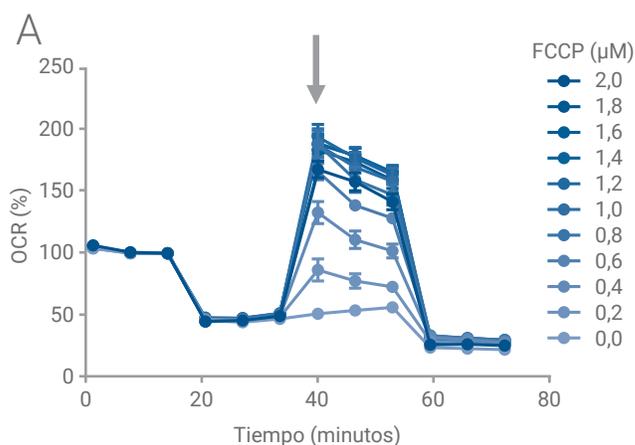


Figura 8. Configuración de la placa para la prueba de réplicas técnicas dentro de una misma microplaca. Diseño del ensayo XF de relación dosis-respuesta usando un solo compuesto (FCCP). El ensayo consta de una dilución en 10 pasos para obtener concentraciones finales de FCCP de 0,0 a 2,0 μM , con ocho réplicas técnicas para cada concentración.



C

Día 1			μM FCCP	Día 2		
% OCR	Desv. est.	% CV		% OCR	Desv. est.	% CV
51,0	2,1	4,2	0,0	48,2	1,8	3,8
86,7	9,1	10,5	0,2	86,0	7,1	8,2
133,3	9,1	6,8	0,4	119,7	8,6	7,2
166,5	6,7	4,0	0,6	160,0	8,4	5,3
188,9	10,6	5,6	0,8	182,5	7,0	3,9
188,4	13,0	6,9	1,0	187,9	3,8	2,0
194,7	10,3	5,3	1,2	192,0	5,3	2,7
189,8	5,4	2,9	1,4	194,7	1,9	1,0
183,9	4,6	2,5	1,6	190,6	3,2	1,7
188,9	7,9	4,2	1,8	192,5	4,2	2,2
164,3	12,6	7,6	2,0	173,5	5,0	2,9

Figura 9. Réplicas técnicas dentro de una microplaca. Se realizó una valoración de FCCP en las células HepG2 para un rango estrecho de concentraciones (de 0 a 2 μM , con incrementos de 0,2 μM). Las soluciones de inyección de FCCP se prepararon y cargaron en el cartucho usando la plataforma Bravo. A. Gráfica cinética de la valoración de FCCP y la respuesta relativa de OCR. B. Curva de relación dosis-respuesta de las valoraciones de FCCP, que muestra dos experimentos relacionados de forma independiente (N = 8; 8 filas x 1 placa por línea de datos). C. Valores de OCR (%), desviación estándar y CV (%) para todas las concentraciones analizadas, comparados por día.

También se evaluó la uniformidad de las determinaciones de potencia para la generación de réplicas en varias microplacas. Se usó la plataforma Bravo para realizar una serie de diez pasos de dilución de AA a la mitad (Figura 10A) y cargar las soluciones resultantes en los puertos A del cartucho de sensores XF96. Cada dilución en serie se hizo de manera independiente; es decir, el contenido de una placa original con ocho pocillos con solución madre de AA se diluyó en paralelo con ocho puntas diferentes de la plataforma Bravo, dando lugar a las series de diluciones independientes AA1–AA8.

Se llevó a cabo un ensayo XF: se registraron tres medidas basales, se inyectó AA y, a continuación, se efectuaron tres medidas de tasas adicionales (Figura 10B). La respuesta se calculó como la relación entre las tasas de las medidas séptima y tercera (a la que se otorgó un valor del 100 %) y se representó en un gráfico la OCR (%) frente a la concentración de AA (μM) para generar valores CI_{50} para cada serie de diluciones (Figura 10C). Los resultados indican que las respuestas en las series individuales de AA son uniformes para las muestras preparadas por la plataforma Bravo;

además, los valores medios de CI_{50} presentan una excelente concordancia tanto dentro de cada placa como entre las distintas placas en cada uno de los días.

En general, los datos de los ensayos de relación dosis-respuesta del modelo muestran que la plataforma Bravo puede preparar de forma reproducible series complejas de diluciones de compuestos. Esta reproducibilidad aumenta la probabilidad de que una placa de réplica proporcione una respuesta fiable, permitiendo que los datos de los ensayos de relación dosis-respuesta se puedan combinar para varias microplacas de réplica. Como se ha indicado anteriormente, la dilución manual puede aumentar el riesgo de que haya pequeñas diferencias en la transferencia de volumen (que se pueden propagar a lo largo de los pasos de dilución) y la probabilidad de contaminación cruzada de compuestos. La plataforma Bravo garantiza que los volúmenes pequeños se transfieran de manera exacta y precisa, sin contaminación cruzada de las muestras. Por último, la plataforma Bravo puede cargar puertos de cartuchos XF en un solo paso automatizado, en lugar de los múltiples pasos manuales que tendría que llevar a cabo un usuario, lo que reduce aún más la variabilidad o los errores asociados a dichas tareas manuales.

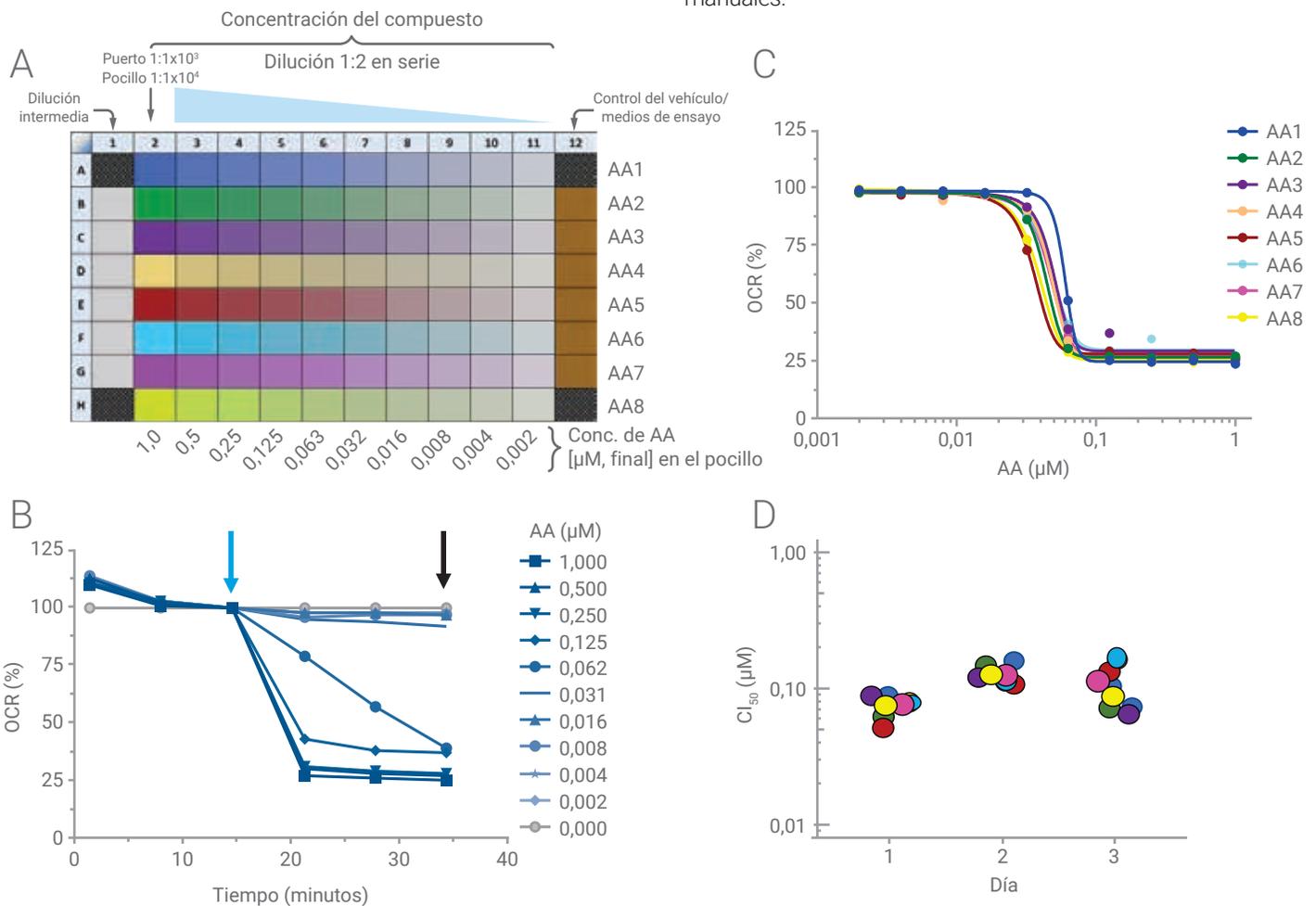


Figura 10. Ensayo A de relación dosis-respuesta para el compuesto de interés. Ocho series de diluciones de AA preparadas individualmente se etiquetaron como AA1, AA2... AA8. Cada serie específica constó de diez pasos de dilución en serie a la mitad para obtener concentraciones finales de AA de entre 0,002 y 1,0 μM . La concentración final se muestra en la parte inferior de la placa. B. Datos cinéticos del ensayo XF para una sola serie de diluciones (AA1). C. Curvas de relación dosis-respuesta (AA1-AA8) obtenidas en una sola placa. D. Resultados de la valoración de antimicina A. Los valores de CI_{50} se calcularon para cada fila, según el diseño del ensayo indicado en el panel A. Cada punto representa un valor de CI_{50} calculado a partir de una sola serie de diluciones (fila de la placa). Los valores son uniformes entre filas y de un día a otro.

Cribado de una biblioteca de compuestos: ensayo de inhibición aguda

Se llevó a cabo un pequeño cribado de una biblioteca de compuestos en busca de inhibidores mitocondriales y glucolíticos, con el fin de ilustrar el flujo de trabajo automatizado completo. En concreto, se cribaron setenta y dos compuestos de la biblioteca L2400 de Selleck-Pfizer (Figura 11, parte superior) para detectar actividad inhibitoria mitocondrial y glucolítica. La plataforma Bravo diluyó los compuestos de prueba de modo que la concentración final en el pocillo fuera 10 μM y cargó los compuestos de prueba y los controles en los puertos de inyección.

En el analizador Seahorse XFe96, se determinaron las tasas basales de las células HepG2 como se hizo anteriormente; después, se inyectaron los compuestos de la biblioteca y se registraron las respuestas agudas de OCR y ECAR durante 1 hora (Figura 11, parte inferior). Las respuestas se calcularon como la relación entre la tasa después de 80 minutos (flecha azul) y la tasa justo antes de la inyección del compuesto (flecha naranja), y se expresaron como porcentaje de la tasa antes de la inyección del compuesto. Este ensayo se repitió tres veces al día durante tres días para generar nueve réplicas de placas de cribado.

El valor Z' es una medida estándar del rendimiento del ensayo, y se calculó para ambos resultados primarios de cada placa de réplica (Figura 12). Para la inhibición mitocondrial, se usó la mezcla de compuestos AA/rtn como control positivo. Para la inhibición de la glucólisis, el compuesto usado como control positivo fue la 2-desoxiglucosa (2-DG). Los valores Z' promedio obtenidos fueron los siguientes: 0,88 para el ensayo de inhibición mitocondrial y 0,77 para el de inhibición de la glucólisis. Dichos valores indican que el diseño y la ejecución del ensayo son robustos.

Para la biblioteca de compuestos, las respuestas se representaron como valores relativos de OCR o ECAR (%) (Figura 13). Como evidencian las bajas barras de error que representan la desviación estándar de la respuesta para cada compuesto, los ensayos de inhibición son muy reproducibles entre placas y de un día a otro. Esta reproducibilidad y los datos de Z' indican que el uso de la plataforma de manipulación automatizada de líquidos Bravo y el analizador Seahorse XFe96 es un método robusto para detectar inhibidores mitocondriales y glucolíticos.

En el diseño del ensayo, que se ilustra en la Figura 11, se contempló la evaluación de las células antes de la inyección del compuesto y 1 hora después de esta dentro del mismo pocillo. Esta plataforma también facilita el diseño y la ejecución de ensayos en los que las células se traten con compuestos antes del análisis XF (exposición crónica), con el fin de conocer los efectos cinéticos a mayor plazo de los tratamientos con compuestos. En ese caso, la plataforma Bravo se usaría para dispensar compuestos directamente en la microplaca de cultivo celular XF que contenga las células de interés en momentos predeterminados antes del ensayo XF (p. ej., 24 horas).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	AM	2-DG	BKG
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	AM	2-DG	BKG
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	AM	2-DG	Sin células
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	AM	2-DG	Sin células
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	VEH	AA/rtn	Sin células
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	VEH	AA/rtn	Sin células
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	VEH	AA/rtn	BKG
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	VEH	AA/rtn	BKG

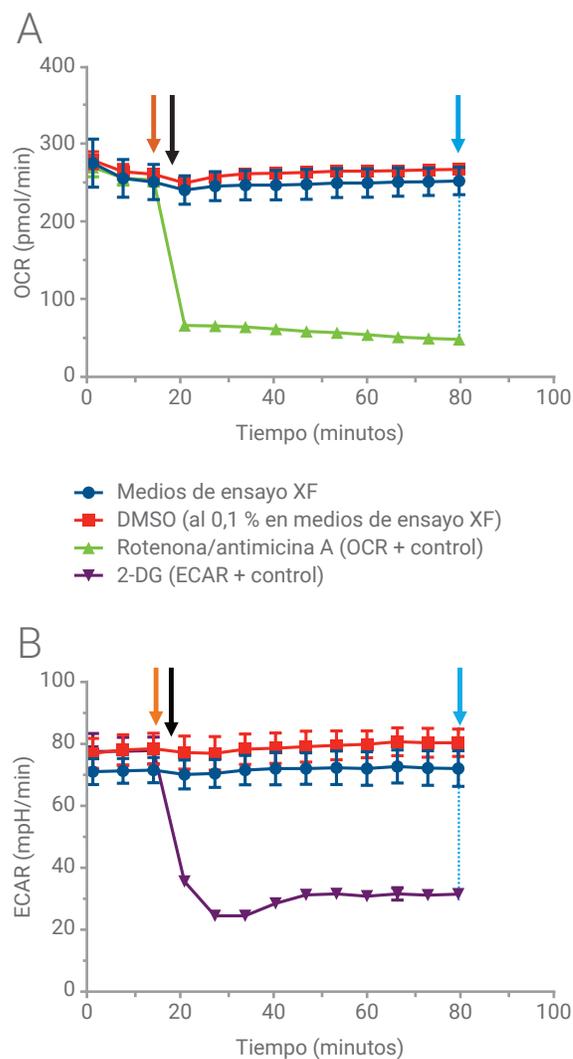


Figura 11. Cribado de la biblioteca de compuestos. Parte superior: representación de la placa XFe96. Los compuestos están etiquetados por número (1–72); AM: medios de ensayo; VEH: control de DMSO; 2-DG: control positivo de ECAR; AA/rtn: control positivo de OCR. Parte inferior: representaciones de la OCR (A) y la ECAR (B) para el ensayo XF, en las que se muestra el momento de la inyección (flechas negras). Los puntos de datos usados para el cálculo de los valores porcentuales de respuesta se indican con flechas naranjas (100 %) y azules, respectivamente.

Día-placa	Z' OCR	Z' ECAR
1-A	0,92	0,84
2-A	0,87	0,72
3-A	0,83	0,29
1-B	0,89	0,87
2-B	0,88	0,86
3-B	0,88	0,84
1-C	0,88	0,84
2-C	0,86	0,77
3-C	0,90	0,88
Z' PROMEDIO	0,88	0,77

Resumen

Esta nota de aplicación ilustra los métodos y el rendimiento de la manipulación automatizada de líquidos para la preparación de muestras para el ensayo XF. El uso de la plataforma Bravo para automatizar los pasos de lavado de células, preparación de la solución de inyección y carga de los puertos del cartucho de sensores proporcionó resultados precisos y uniformes. La plataforma Bravo también aportó las siguientes ventajas adicionales: 1) reducción de los errores manuales asociados a los pasos repetidos de pipeteo manual; 2) aumento de la uniformidad y la fiabilidad de la calidad de los datos en una misma microplaca y entre microplacas; y 3) disminución del tiempo de preparación manual del ensayo XF. Por consiguiente, la automatización de los pasos manuales esenciales de manipulación de líquidos del ensayo XF mejora la eficiencia del flujo de trabajo del ensayo XF y la calidad de los datos obtenidos.

Figura 12. Valores Z' para réplicas de ensayos de inhibición aguda. Valores Z' del control de inhibición de la OCR (rotenona/AA) y del control de inhibición de la ECAR (2-DG) para tres réplicas de ensayos realizadas en tres días distintos (n = 9 por compuesto).

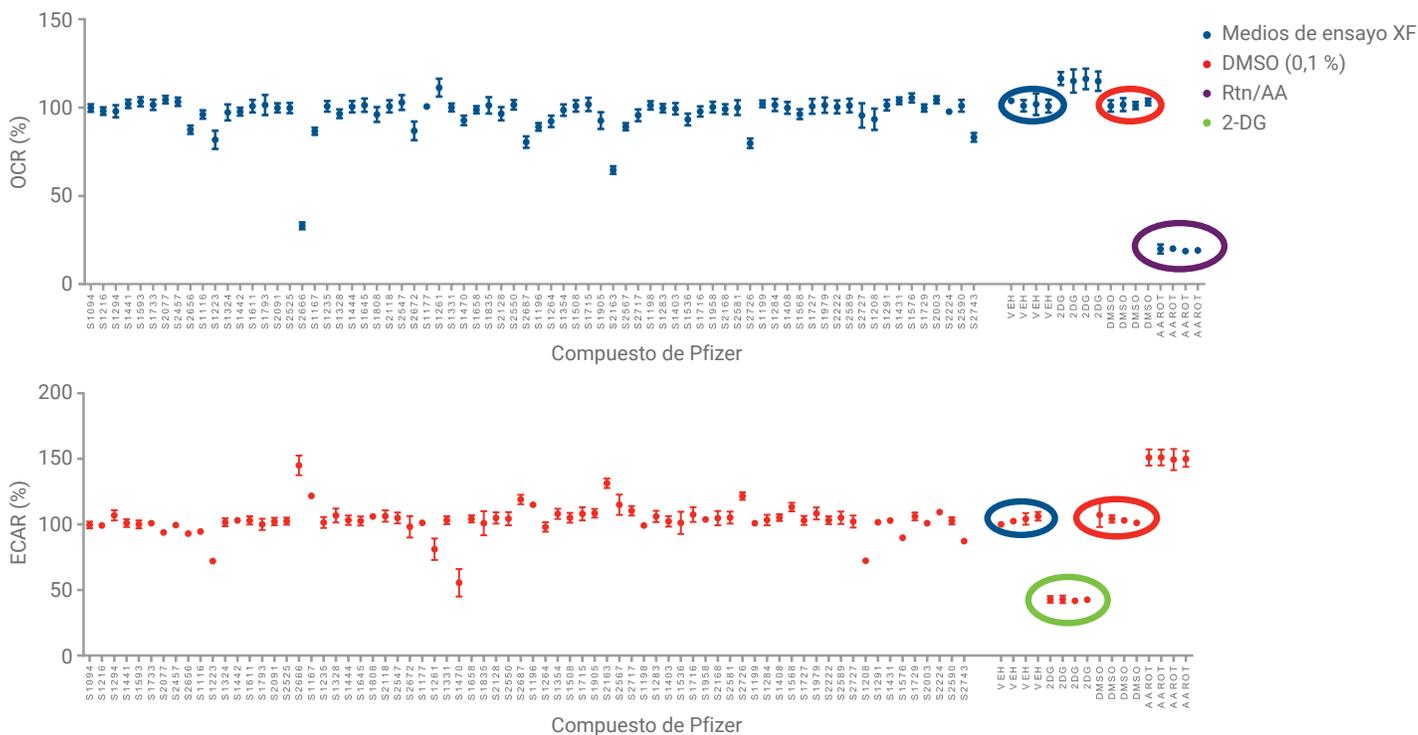


Figura 13. Resultados de ejemplo del ensayo de inhibición aguda usando la biblioteca de compuestos L2400 de Selleck-Pfizer. Las respuestas de actividad mitocondrial (% OCR) se muestran en la parte superior y las de glucólisis (% ECAR), en la parte inferior. También se muestran las respuestas de los compuestos de control positivo: rotenona/antimicina A (inhibidor de la OCR, en morado) y 2-DG (inhibidor de la ECAR, en verde). Las respuestas de OCR y ECAR al control del vehículo (DMSO al 0,1 %) aparecen dentro de un círculo rojo.

Información suplementaria

Especificaciones de la plataforma de manipulación automatizada de líquidos Agilent Bravo para su uso con analizadores XFe96 y XF96 (todas las alturas se miden respecto al fondo de la placa o superficie especificadas)	
Altura de aspiración en la placa de células	3 mm
Velocidad de aspiración:	
Placa de células XF96	Punta fija de 51-200 µl
Cartucho (86 ml)	Predeterminada
Placa de almacenamiento (96 pocillos)	Predeterminada
Cartucho de 24 columnas	Predeterminada
Altura de dispensación:	
Cartucho (86 ml)	2 mm
Cartucho XF96	0,5 mm
Velocidad de dispensación:	
Placa de células XF96	Lavado lento de punta fija
Cartucho (86 ml)	Predeterminada
Cartucho XF96	Punta desechable 384 de 10-50 µl

Tabla S1. Especificaciones de la plataforma de manipulación automatizada de líquidos Agilent Bravo para su uso con analizadores Agilent Seahorse XFe96.

www.agilent.com/chem/discoverxf

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, 4 de marzo de 2019
5994-0717ES