

Medición del calcio con los kits CytoCHECK SPChip[®] Calcium Single-Detection

Análisis de la Respuesta del Calcio Intracelular en Células Vivas de Distintos Tipos Mediante Nuevos Dispositivos Lab-in-a-Cell Basados en la Tecnología Spachip[®].

BACKGROUND

Los iones de calcio (Ca^{2+}) desempeñan un papel vital en el funcionamiento de las células vivas. Intervienen en una amplia gama de procesos fisiológicos, como la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la secreción de insulina [1]. Es necesario poder analizar los procesos de señalización intracelular del Ca^{2+} desde milisegundos hasta horas o días. Por este motivo, el análisis de células individuales vivas necesita ensayos dinámicos en tiempo real que se asemejen a las condiciones naturales de la célula y que mantengan sus condiciones fisiológicas a lo largo del tiempo [2].

Los kits de ensayo CytoCHECK SPChip[®] son novedosos ensayos de fluorescencia desarrollados por A4Cell que aúnan los campos de la nanotecnología y la biología celular. Los kits CytoCHECK SPChip[®] están compuestos por micropartículas de silicio -SPChip[®][3]- que pueden ser internalizadas en el citosol de células cultivadas y monitorizar los cambios durante largos periodos de tiempo. Los kits CytoCHECK SPChip[®] están optimizados para su uso con microscopios de fluorescencia y plataformas HCS/HCA con capacidad confocal, aunque también pueden utilizarse microscopios de epi-fluorescencia y sistemas de imagen con filtros de longitud de onda fija.

Los reactivos de celómica pueden utilizarse en campañas de descubrimiento de fármacos para analizar los niveles de calcio intracelular. La información relevante sobre el papel de la señalización del calcio puede ayudar a dilucidar el Mecanismo de Acción de diferentes moléculas. El CytoCHECK SPChip[®] Calcium Single-Detection Kit permite realizar ensayos dinámicos basados en células en tiempo real mediante medidas de intensidad de fluorescencia, lo que permite un estudio más exhaustivo de los procesos de fisiología celular en los que está implicada la señalización de Calcio y maximiza el rendimiento de los analizadores de imagen.

OBJETIVO

Demostrar la monitorización dinámica del Calcio en células individuales vivas bajo diferentes condiciones de tratamiento (curvas dosis-respuesta) mediante el uso de nanodispositivos SPChip[®] siguiendo el procedimiento CytoCHECK SPChip[®].

MATERIALES

- CytoCHECK SPChip[®] Calcium Single-Detection Kit
- Placas de imagen de 384 pocillos tratadas para cultivo de tejidos (PerkinElmer)
- Células Mia PaCa-2 (CRL-1420, ATCC), células SHSY5Y (CRL-2266, ATCC)
- Medio de cultivo celular DMEM (Gibco) suplementado con FBS, gentamicina, L-Glutamina.
- Operetta CLS (PerkinElmer)

MÉTODOS

1. **Preparación del CytoCHECK SPChip[®] Calcium-Detection Kit:** Los SPChips de ensayo se disolvieron en el tampón de ensayo contenido en el kit, se centrifugaron, se precipitaron y se resuspendieron de nuevo en tampón de ensayo siguiendo el procedimiento de A4cell.
2. **Cultivo celular:** Las células Mia PaCa-2 y SHSY5Y se sembraron independientemente por duplicado en una placa de 384 pocillos añadiendo 2500 células en 30 μ l de medio y se dejaron adherir durante 24h.
3. **Adición del SPChip[®]:** se añadió a cada pocillo una proporción SPChip[®]-célula de 2:1 diluyendo 5000 SPChips en 20 μ l de medio fresco. Las células se incubaron durante la noche para permitir que internalizaran los SPChips.
4. **Tratamiento con fármacos:** Se prepararon curvas de dosis-respuesta con Doxorubicina mediante dilución en serie (1:10) desde 0,05 nM hasta 5 μ M.
5. **Obtención de imágenes:** Se tomaron imágenes de la placa multipocillo en un Operetta CLS con un objetivo de inmersión en agua 40x de 6 campos por pocillo. La fluorescencia del SPChip[®] se visualizó en un canal GFP estándar (Ex: 488 nm, Em: 520 nm). Se utilizó contraste de fase digital para identificar las células. Todas las muestras se analizaron a las 24h, 48h y 5 días después del tratamiento.

RESULTADOS

Se analizaron y segmentaron imágenes de microscopía de fluorescencia de células de cáncer de páncreas Mia PaCa-2 y neuroblastoma SYHY5Y utilizando GFP y canales digitales de contraste de fase para localizar SPAchips intracelulares y medir sus unidades de intensidad de fluorescencia relativa (RFU). Los datos de las muestras se normalizaron con respecto a las condiciones de control de las células no tratadas a las 24h, 48h y 5 días después del tratamiento farmacológico (**Fig.1 A**)

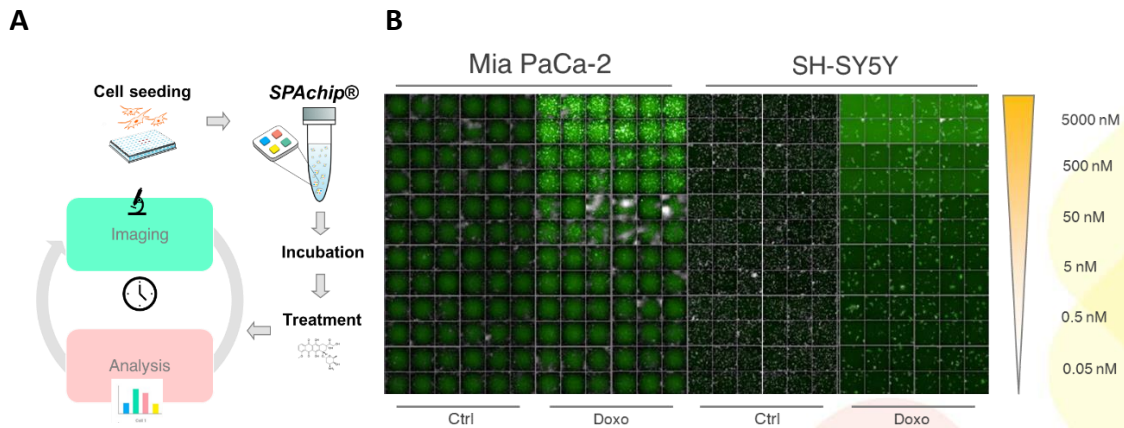


Fig 1: Uso del CytoCHECK SPAchip® Calcium Single-Detection en aplicaciones de descubrimiento de fármacos. A) Diagrama que muestra el procedimiento de ensayo celular para realizar análisis dinámicos en tiempo real mediante microscopía de fluorescencia. **B)** Diseño de placa multipocillo que muestra montajes de 6 campos de cada pocillo para células Mia PaCa-2 y SH-SY5Y a 40 aumentos, incluyendo imágenes fusionadas de canal verde-fluorescente y contraste de fase digital. Los tratamientos con doxorubicina se aplicaron en diluciones de 10 veces de 0,05 nM a 5 μ M.

La respuesta de la señal de calcio oscila entre 0,05 nM y 5 μ M en condiciones fisiológicas. Aquí, observamos cómo concentraciones más altas de Doxorubicina indican un aumento de la concentración de calcio tras el tratamiento en ambas líneas celulares. Hubo un efecto acumulativo del tratamiento en las señales de calcio de las células Mia PaCa-2 y SYHY5Y, alcanzando un incremento del 50% y 80% respectivamente a los 5 días post-tratamiento (**Fig. 2**).

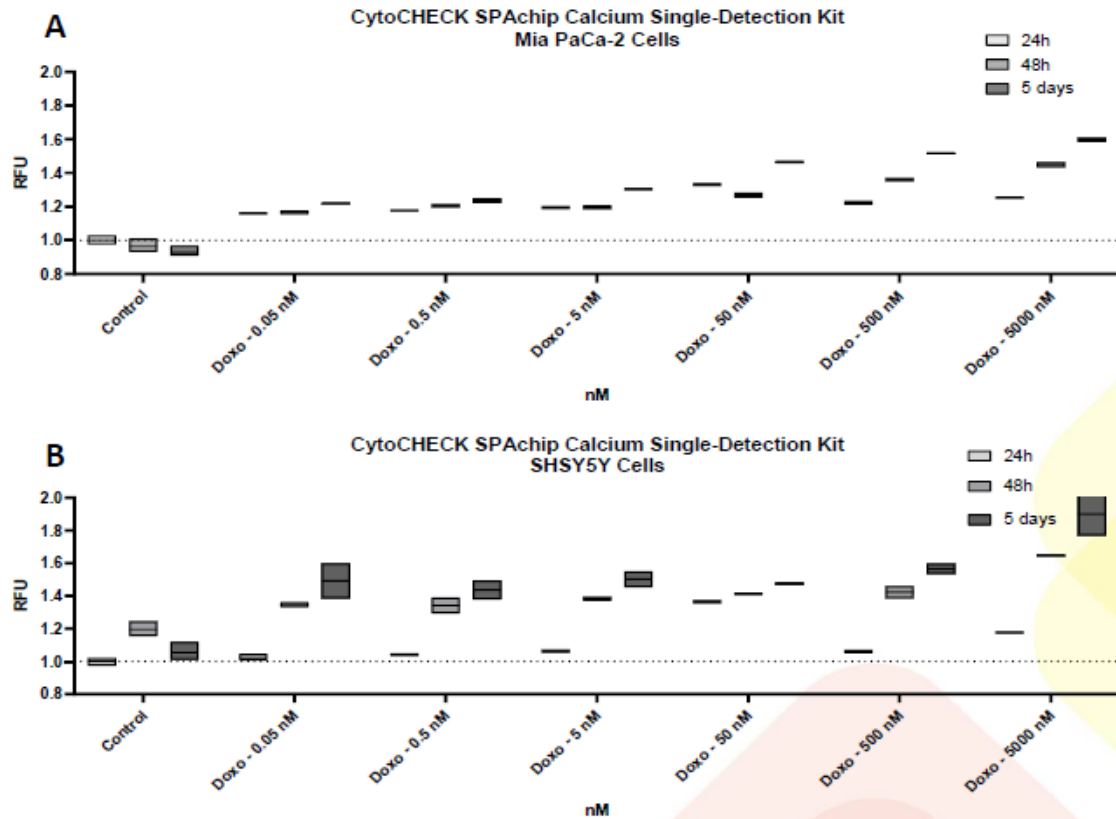


Fig. 2. Análisis del kit CytoCHECK SPachip® Calcium Single-Detection mediante microscopía de fluorescencia.

Efecto del tratamiento con Doxorubicina sobre los niveles normalizados de Calcio intracelular de concentraciones crecientes a las 24h, 48h y 24h y 5 días después del tratamiento en A) células Mia PaCa-2 y B) células SHSY5Y medidas por microscopía de fluorescencia.

CONCLUSIONES

Se necesitan herramientas novedosas para el análisis de células vivas que ofrezcan la posibilidad de una monitorización continua. Los kits CytoCHECK SPachip® han sido diseñados para permanecer en el citosol sin producir efectos citotóxicos, permitiendo así el análisis celular dinámico en tiempo real. En combinación con imágenes de microscopía de fluorescencia, podemos obtener información celular básica que incluye parámetros morfológicos, así como lecturas de calcio intracelular. El CytoCHECK SPachip Calcium Single-Detection kit ha sido validado como una poderosa herramienta para ser utilizada como un dispositivo lab-in-a-cell en células. Esta información puede utilizarse para arrojar luz sobre el mecanismo de acción de compuestos durante las campañas de descubrimiento de fármacos.

REFERENCIAS

- [1] R. Bagur and G. Hajnóczky, "Intracellular Ca²⁺ sensing: role in calcium homeostasis and signaling," *Mol Cell*, vol. 66, no. 6, pp. 780–788, 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.028. Intracellular.
- [2] J. T. Lock, I. Parker, and I. F. Smith, "A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells," *Cell Calcium*, vol. 58, no. 6, pp. 638–648, 2015, doi: 10.1016/j.ceca.2015.10.003.
- [3] N. Torras et al., "Suspended Planar-Array Chips for Molecular Multiplexing at the Microscale," *Adv. Mater.*, vol. 28, pp. 1449–1454, 2016, doi: 10.1002/adma.201504164.

La tecnología SPChip® es la mejor herramienta disponible para detectar Calcio mediante análisis de microscopía de fluorescencia en plataformas HCS tras varios días en cultivo en diferentes puntos temporales durante los primeros procesos de descubrimiento de fármacos