

## Medición del pH por citometría de flujo mediante CytoCHECK SPChip® pH Single-Detection Kit

*Análisis del pH intracelular en células vivas mediante nuevos dispositivos Lab-in-a-Cell basados en la tecnología Spachip®.*

### BACKGROUND

Muchos procesos celulares, como los que regulan el metabolismo o la proliferación, son muy sensibles a los cambios de pH. Por ejemplo, las actividades enzimáticas suelen ser óptimas en un estrecho margen de pH y disminuyen mucho por encima y por debajo de él [1]. En este sentido, la carga neta y la estructura de las macromoléculas también dependen de la concentración de protones y el mantenimiento de los flujos intracelulares de protones es crucial para el metabolismo energético [2][3]. Por otro lado, las alteraciones en el metabolismo celular también inducen cambios en el pH citosólico y extracelular. Así, el efecto Warburg en las células cancerosas conduce a un aumento de la captación de glucosa y de la producción de ácido láctico, lo que a su vez altera el pH extracelular e intracelular. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas herramientas para medir los flujos de protones en las células resulta atractivo para comprender mejor la fisiología celular.

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® [4]- 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 citómetros de flujo y microscopios de fluorescencia.

Aquí presentamos el **CytoCHECK SPChip® pH Single-Detection Kit** para la medición simultánea del pH citosólico y extracelular en **microscopía de fluorescencia** y **citometría de flujo (FC)**. Los SPChip® son pequeños chips de óxido de silicio (3x3x1 µm) funcionalizados con una sonda fluorescente de detección de pH.

Los reactivos de celómica pueden utilizarse en experimentos de citometría de flujo para analizar los niveles de pH intracelular. La información relevante sobre el papel del estado energético celular puede ayudar a dilucidar el efecto metabólico de diferentes compuestos en las vías de señalización celular. El CytoCHECK SPChip® pH Single-Detection Kit permite realizar ensayos dinámicos basados en células en tiempo real mediante mediciones de citometría de flujo, lo que permite un estudio más exhaustivo de los procesos de fisiología celular en los que intervienen flujos de protones y maximiza el rendimiento de los citómetros de flujo.

## OBJETIVO

Demostrar la monitorización del pH intracelular en células individuales vivas bajo diferentes condiciones de tratamiento (curvas de dosis-respuesta) que afectan la fosforilación oxidativa mediante el uso de nanodispositivos SPACHIP<sup>®</sup> en citometría de flujo.

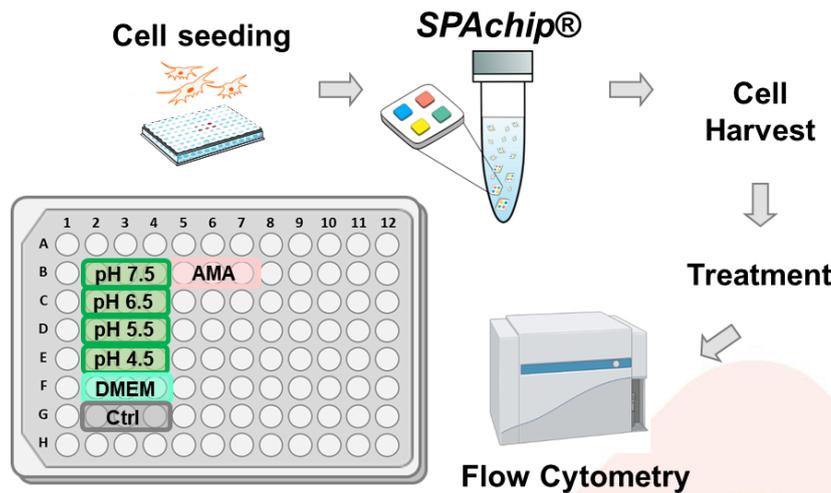
## MATERIALES

- CytoCHECK SPACHIP<sup>®</sup> pH Single-Detection Kit
- Placas de 96 pocillos tratadas para cultivo de tejidos (Falcon)
- Células 293T (CRL-, ATCC)
- Medio de cultivo celular DMEM (Gibco) suplementado con FBS, gentamicina, L-Glutamina.
- TrypLE (Gibco)
- Intracellular pH Calibration Buffer Kit (Invitrogen)
- Antimicina A
- CytoFlex (Beckman Coulter)

## MÉTODOS

1. **Preparación del CytoCHECK SPACHIP<sup>®</sup> pH Single-Detection Kit:** Los SPACHIPS 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 protocolo de A4cell.
2. **Cultivo celular:** Las células 293T se sembraron independientemente por triplicado en una placa de 96 pocillos añadiendo 70 000 células en 100 µl de medio y se dejaron adherir durante 24h.
3. **Adición de SPACHIP<sup>®</sup>:** se añadió una proporción SPACHIP<sup>®</sup>-célula de 2:1 a cada pocillo indicado diluyendo 140000 SPACHIPS en 100 µl de medio fresco. Las condiciones de control adicionales sin SPACHIPS se complementaron con 100 µl de medio fresco. Las células se incubaron durante la noche para permitir que internalizaran los SPACHIPS.
4. **Recogida de células:** se retiró el medio y se utilizaron 100 µl de TrypLE para recoger las células de la placa. Las células se recogieron en tubos de citometría de flujo y se utilizaron 100 µl de medio fresco para bloquear la acción de TrypLE.
5. **Tratamientos:** Las células en suspensión se trataron con Nigericina/Valinomicina (10µM) preparada en el Buffer de Calibración Intracelular de pH apropiado para las condiciones de control, tal como se representa en la Fig. 1. La antimicina A (10 µM) diluida en DMEM se incubó en las muestras indicadas durante 15 min antes del análisis por citometría de flujo.

6. **Citometría de flujo:** Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo. La fluorescencia de SPACHIP® se analizó utilizando la detección FITC estándar (Ex: 488 nm, Em: 520 nm) en los citómetros de flujo. Se utilizaron FSC y SSC para identificar las células y los SPACHIPS extracelulares.

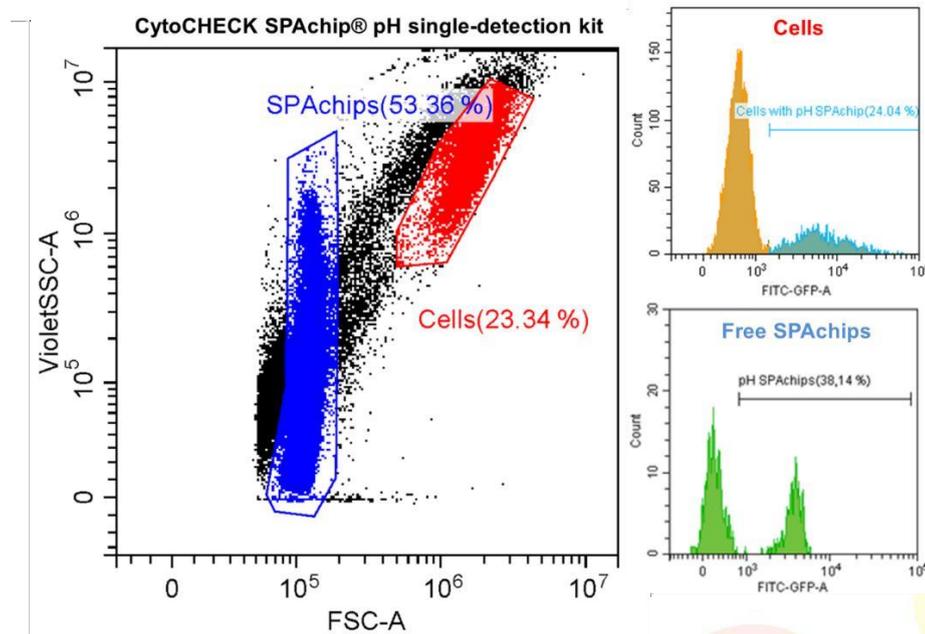


**Fig.1. Uso de CytoCHECK SPACHIP® pH Single-Detection en citometría de flujo.**

Diagrama que representa el diseño experimental de la citometría de flujo. Se utilizó una placa de 96 pocillos para sembrar 70000 células 293T en cada pocillo. Después de la adhesión celular (24 horas), se añadieron SPACHIP® a los pocillos indicados en una proporción de 2:1 SPACHIP® por célula. Las muestras incluyeron controles de calibración del pH intracelular (pH 4,5 a 7,5), células en medio DMEM, células tratadas con Antimycin A (AMA) y condiciones de control sin SPACHIPS. Las células se cosecharon con TrypLE, se trataron cuando fue necesario y se analizaron en el citómetro de flujo.

## RESULTADOS

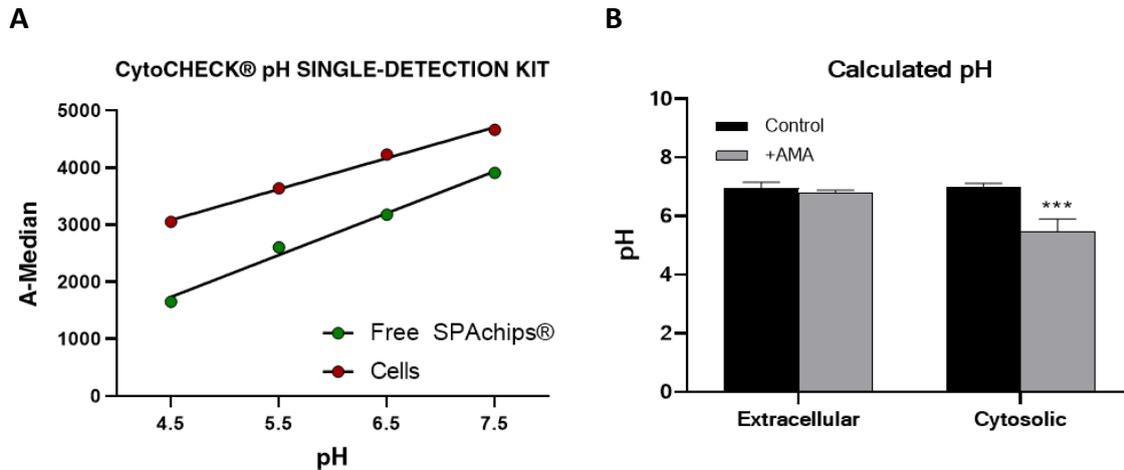
Las poblaciones extracelulares de SPACHIP® pueden identificarse fácilmente mediante citometría de flujo en una suspensión de cultivo celular por tamaño y complejidad (FSC vs SSC) (**Fig.2**). Los SPACHIP se caracterizan por tener una distribución muy definida en términos de tamaño debido al estricto control de fabricación. Las células de control pueden utilizarse para identificar las poblaciones celulares (**Fig. 3A**). Una vez que el SPACHIP® extracelular y las poblaciones celulares se han separado, es posible discriminar los rangos de intensidad de fluorescencia del SPACHIP® extracelular y citosólico para interpolar los valores de pH en el canal FITC.



**Fig. 2. Datos de detección única de CytoCHECK SPACHIP® pH a partir de citometría de flujo.**

Gating poblacional basado en canales FSC y SSC para definir SPACHIPs extracelulares y células. Distribución de la intensidad de fluorescencia en los canales FITC para células y SPACHIPs extracelulares "libres".

El CytoCHECK SPACHIP® pH Single-Detection kit detectó una disminución significativa del pH citosólico en las células tratadas 15 minutos con Antimycin A, con cambios menores en el medio celular, probablemente debido al impulso glucolítico y a la producción de piruvato tras la inhibición del transporte de electrones (**Fig. 3B**). Las barras representan la media  $\pm$  DE de dos experimentos por triplicado. Comparación estadística frente a Control \*\*\* $p < 0,001$  (test de Sidak). Esta novedosa técnica permite comparar los valores de pH intracelular con las condiciones de cultivo celular para estudiar los flujos de protones en células individuales vivas como nunca antes se había hecho.



**Fig. 3. Resultados de CytoCHECK SPACHIP® pH Single-Detection kit por citometría de flujo.**

**A)** Curva de interpolación obtenida a partir de las condiciones de control de calibración del pH intracelular adaptadas a los SPACHips extracelulares y a las señales citosólicas.

**B)** pH calculado de SPACHips extracelulares mostrando un valor de 7 sin diferencia significativa entre células en DMEM y tratadas con Antimycin A. SPACHIP® permitió mostrar cómo el pH intracelular descendía significativamente por debajo de un valor de 6 cuando se trataba con Antimycin A. \*\*\* $p < 0,001$

## CONCLUSIONES

La tecnología de CytoCHECK SPACHIP® pH Single-Detection es una nueva herramienta fiable y precisa para realizar análisis celulares en citometría de flujo. Su capacidad para detectar simultáneamente cambios de pH en el citosol y en el entorno celular hace de nuestra tecnología una valiosa herramienta para:

- Estudios básicos de biología celular y fisiología celular.
- Control de calidad en procesos bioindustriales basados en cultivos celulares, donde el control del pH extracelular afecta al rendimiento del producto, como la producción de anticuerpos recombinantes o AAV.

## REFERENCIAS

- [1] J. R. Casey, S. Grinstein, and J. Orlowski, "Sensors and regulators of intracellular pH," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 50–61, 2010, doi: 10.1038/nrm2820.
- [2] A. V. Berezhnov *et al.*, "Intracellular pH modulates autophagy and mitophagy," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 16, pp. 8701–8708, 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.691774.
- [3] W. F. Boron, "Regulation of intracellular pH," *Am. J. Physiol. - Adv. Physiol. Educ.*, vol. 28, no. 4, pp. 160–179, 2004, doi: 10.1152/advan.00045.2004.
- [4] 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 SPACHip<sup>®</sup> ofrece nuevas perspectivas en el análisis de la concentración intracelular de protones mediante citometría de flujo. Los kits SPACHip<sup>®</sup> son la herramienta única para caracterizar los niveles diferenciales de pH entre el citosol y el medio extracelular para estudiar los flujos de protones