|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Marcador | Tipo de marcaje | Ex/Em (nm) | Fijación | ¿Para qué se utiliza? | Mecanismo de marcaje | Otros |
| MitoTracker **Red** CMXRos | ΔΨm dependent | Ex:579  Em:599 | No afecta | -Morfología mitocondrial en confocal  -Determina-ción de ΔΨm en citometría de flujo | Catión basado en rosamina, su entrada depende de ΔΨm. | Se puede usar para experimentos de marcaje múltiple |
| MitoTracker **Green** | ΔΨm indepen-dent | Ex:490 Em:516 | Sí afecta | -Medida de la masa mitocondrial | Se une a covalente-mente a los aminoácidos con cisteínas libres de las proteínas mitocondriales | En altas concentraciones tóxico |

En resumen:

La mayoría de los artículos miran, por separado:

1. Masa mitocondrial con **MTG o NAO**
2. Morfología mitocondrial con **MTR**
3. Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) con **JC-1** o **TMRM**
   1. JC-1 compara fluorescencia verde en citoplasma con fluorescencia rojo en mitocondria
   2. TMRM se usa cuando no se fija la muestra

Sin embargo, se recomienda normalizar el potencial de membrana a algún factor, como el volumen celular, la cantidad de proteína total o mitocondrial o la masa mitocondrial.

Algún artículo hace ratio ΔΨm/masa mitocondrial comparando TMRM con MitoTracker Green para hacer un análisis más fino de la función mitocondrial (TDP-43 ALS mutant). La normalización del ΔΨm se puede hacer también con MTR.

Se recomienda, en marcajes múltiples, teñir algún pocillo solo con MTR y solo con MTG para asegurarnos de que no interfieren. También se recomienda usar un control positivo: células tratadas con FCCP, un desacoplador de membrana mitocondrial. La diferencia de fluorescencia entre nuestros controles no tratados y las células tratadas con FCCP da una medida aproximada del ΔΨm.

En este artículo ven un incremento de la masa mitocondrial sin cambios en ΔΨm en los mutantes de Mecp2. También ven más oxidación. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/3064016/>

“(a) In line with the increased total mitochondrial mass in Mecp2−/y astrocytes, also more individual organelles could be detected in these cells as compared to WT (). (b) Genotypic differences in the length of the individual mitochondria were not found. The histogram-type distribution represents the entity of all individual mitochondrial particles detected by the automated analyses in WT (9769 mitochondria) and Mecp2−/y astrocytes (21,424 mitochondria). (c) The degree of polarization did not differ either among the genotypes. Plotted is the cumulative distribution function of the ΔΨm of individual mitochondria of WT and Mecp2−/y astrocytes. It is based on the distribution of all recorded JC-1 ratios and indicates on the ordinate the probability that a WT or Mecp2−/y mitochondrion has a given ΔΨm (or less).”

“It therefore seems that the increased mitochondrial content constitutes a cell-endogenous response to compensate for the mitochondria-related deficits and their limited metabolic/respiratory capacity”

Artículos:

1.

Utilizan MTG para ver masa mitocondrial y MTR para ver morfología al microscopio

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31085166>

2.

MTR para ver morfología al microscopio y JC-1 para medir potencial de membrana mitocondrial (MMP)

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00592-019-01366-x>

JC-1 --> a bajas concentraciones (no acumulado, disperso en el citoplasma) se ve verde. A altas concentraciones (dentro de la mitocondria, acumulado) se ve rojo.

3.

MTR para ver morfología y TMRM para ver potencial de membrana, todo al confocal

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31068806>

4.

MTG para medir masa mitocondrial y JC-1 para medir potencial de membrana

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6480491/>

5.

MTG para medir masa mitocondrial. JC-1 para medir potencial de membrana. MTR para ver cambios en morfología.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30903243>

6.

Explica cómo funcionan MTR y MTG

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30881628>

7.

MTG para masa mitocondrial, JC-1 para potencial de membrana

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279709001823?via%3Dihub>

8.

Aquí sugieren usar masa mitocondrial como control cuando se mide potencial de membrana mitocondrial, pero no hacen un ratio entre ellos

<http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto4/15_apop/data/cossar1/cossariz.htm>

9.

Aquí recomiendan normalizar con varios factores, entre ellos masa mitocondrial (*r*ΔΨm)

“Mitochondrial membrane potential is often considered a measure of mitochondrial functionality, since a higher membrane potential may support a larger respiratory rate and ATP/ADP ratio [**27**](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201700001#bies201700001-bib-0027), [**28**](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201700001#bies201700001-bib-0028), as well as its role in quality control [**20**](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201700001#bies201700001-bib-0020) (although this correspondence may not hold under all conditions, since inhibiting ATP synthase can cause membrane potential to increase [**28**](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201700001#bies201700001-bib-0028), [**29**](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201700001#bies201700001-bib-0029)). It is important to distinguish between total ΔΨ, which is expected to scale with a characteristic size of the system (e.g. the size of the mitochondrial population, total cellular protein or some measure of the size of the cell itself, e.g. the radius), and a measure of ΔΨ which is normalised to account for this scaling. We denote a relative measure of ΔΨ with *r*ΔΨm, *r*ΔΨp or *r*ΔΨr for normalisations by mitochondrial mass, total cellular protein and cell radius, respectively.”

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201700001>

10.

Normalizan por tamaño celular, representan en la misma gráfica MTR y MTG para demostrar que la masa es estable pero la funcionalidad no

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5104693/>

11.

Este artículo relativiza potencial de membrana (medido con TMRM) y masa mitocondrial (medido con MTG) en modelos de ALS con mutaciones en TDP-43 (brain, fibroblasts…)

<https://www.researchgate.net/publication/316944919_Mutant_TDP-43_does_not_impair_mitochondrial_bioenergetics_in_vitro_and_in_vivo>

12.

Aquí enfrentan Rhodamine 123 con NAO para evaluar potencial vs masa en distintas fases del ciclo celular

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362021>

13. Guía para analizar mitocondrias por citometría de flujo. Habla del potencial de membrana normalizado como la razón entre la fluorescencia con un marcaje dependiente de potencial de membrana (como MitoTracker Red CMXRos) y la fluorescencia con un marcaje independiente (MitoTracker Green). Como parte de la fluorescencia emitida por el MTG puede ser absorbida por el MTR, recomiendan incluir muestras teñidas con solo uno de los fluoróforos.

“Owing to the small size of the mitochondrion, it is possible that dye molecules will bind in such a way that fluorescence resonance energy transfer may take place. Thus, it is conceivable that part of the fluorescence emission of MTG may be absorbed by CMXRos. It is therefore recommended to include samples stained with a single dye to verify that the differences between samples observed do not result from differences in efficiency of energy transfer between pairs of dyes.”

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X01640093>

13.

Aquí evalúan masa, morfología y potencial de membrana mitocondrial con NAO y JC-1 y lo validan por microscopía electrónica

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904361/>