



Revista Mexicana de Ingeniería
Biomédica

ISSN: 0188-9532

rmib.somib@gmail.com

Sociedad Mexicana de Ingeniería
Biomédica
México

Mata-Miranda, M.M.; Guerrero-Robles, C.I.; Rojas-López, M.; Delgado-Macuil, R.J.;
González-Díaz, C.A.; Sánchez-Monroy, V.; Pérez-Ishiwara, D. G.; Vázquez-Zapién, G.J.

Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de
Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a
Células Pancreáticas

Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, vol. 38, núm. 1, enero-abril, 2017, pp. 225-
234

Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61949530018>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17)

Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas

Principal Components by FTIR Spectroscopy as Innovative Characterization Technique during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells

M.M. Mata-Miranda^{1,2}, C.I. Guerrero-Robles³, M. Rojas-López², R.J. Delgado-Macui², C.A. González-Díaz^{1,3}, V. Sánchez-Monroy^{1,4}, D. G. Pérez-Ishiwara⁴, G.J. Vázquez-Zapién^{1,2}

¹SEDENA, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Escuela Médico Militar-Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Tlaxcala, México.

³Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina, México.

⁴Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México.

RESUMEN

Dos de los grandes retos en la biología de las Células Madre (CM) y la Medicina Regenerativa, son el control en la diferenciación de estas células y asegurar la pureza de las células diferenciadas, por lo que es necesario contar con técnicas rápidas, eficientes y precisas para la caracterización de CM y su diferenciación a diferentes linajes celulares. El objetivo de este trabajo fue analizar Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) mediante espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Análisis de Componentes Principales (ACP). Para ello se diferenciaron CMP a CPD, caracterizando el proceso de diferenciación a los días 0, 11, 17 y 21 mediante microscopía óptica y espectroscopia vibracional. Los espectros FTIR se analizaron con el método multivariado de ACP, utilizando su segunda derivada en las regiones de proteínas, carbohidratos y ribosas. Los resultados indican que el ACP permite caracterizar y discriminar CMP y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación en las regiones espectrales analizadas. Con lo anterior concluimos que el ACP permite caracterizar química y estructuralmente CMP y diferentes etapas de su diferenciación en una forma rápida, precisa y no invasiva.

PALABRAS CLAVE: Células Madre pluripotentes, Diferenciación, Espectroscopía FTIR, Componentes Principales.

ABSTRACT

Two of the greatest challenges in Stem Cells (SCs) biology and regenerative medicine, are differentiation control of SCs and ensuring the purity of differentiated cells. In this sense, fast, efficient and accurate techniques for SCs characterization and their differentiation into different cell lineages are needed. The aim of this study was to analyse Pluripotent Stem Cells (PSCs) and Differentiated Pancreatic Cells (DPCs) by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and Principal Component Analysis (PCA). For this purpose, we differentiated PSCs toward DPCs, characterizing the differentiation process at different stages (0, 11, 17 and 21 days) through light microscopy and vibrational spectroscopy. FTIR spectra were analysed with the multivariate method of PCA, using the second derivatives in the protein, carbohydrate and ribose regions. The results indicate that the PCA allows to characterize and discriminate PSCs and DPCs at different stages of differentiation in the analysed spectral regions. From these results, we concluded that the PCA allows the chemical and structural characterization of PSCs and the different stages of their differentiation in a fast, accurate and non-invasive way.

KEYWORDS: Pluripotent Stem Cells, Differentiation, FTIR Spectroscopy, Principal Components.

Correspondencia

DESTINATARIO: Gustavo Jesús Vázquez Zapién
INSTITUCIÓN: Centro Militar de Ciencias de la Salud,
Escuela Médico Militar
DIRECCIÓN: Cda. de Palomas S/N, Col. Lomas de Sotelo,
Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11200, Ciudad de México,
CDMX, México
TELÉFONO: (555) 540-7728, Ext. 1575 y 1577
CORREO ELECTRÓNICO: gus1202@hotmail.com

Fecha de recepción:

4 de octubre de 2016

Fecha de aceptación:

14 de diciembre de 2016

INTRODUCCIÓN

Dos de los grandes retos en la biología de las Células Madre (CM) y la medicina regenerativa, son el control en la diferenciación de CM y asegurar la pureza de las células diferenciadas [1]. Una CM, se define como aquella célula que tiene capacidad de autorenovación y potencialidad de diferenciación, y puede mantenerse en estado indiferenciado por tiempo prolongado. De acuerdo a su potencialidad, las CM se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Una propiedad esencial de las Células Madre Pluripotentes (CMP), es su capacidad de diferenciarse en más de 200 tipos de células especializadas bajo ciertas condiciones de cultivo [2]. Diversos estudios experimentales en animales y algunos ensayos clínicos empleando CM, han demostrado su potencial terapéutico en enfermedades de impacto mundial y social como la Diabetes, en las cuales los tratamientos médicos actuales son insuficientes para el control metabólico y sin opción de regenerar el órgano dañado para aumentar su función [3]. Se han propuesto diversos protocolos para la obtención de Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) a partir de CMP, caracterizándolas antes de ser implantadas en modelos diabéticos animales mediante técnicas especializadas como inmunocitoquímica, citometría de flujo y análisis de marcadores moleculares, las cuales requieren personal especializado, tiempo prolongado y en algunas ocasiones un gran número de células [4, 5]. Por estas razones, es necesario proponer técnicas eficientes, rápidas y no invasivas, que faciliten la identificación de células o etapas de maduración durante el proceso de diferenciación celular.

La espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica empleada para obtener la huella dactilar molecular de una muestra biológica que absorbe la onda infrarroja de acuerdo con los enlaces químicos y estructurales de las moléculas, proporcionando información de la estructura específica de biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y

ácidos nucleicos, a través de una serie de bandas identificables de grupos funcionales en la región electromagnética del infrarrojo medio [6]. Algunos autores han reportado el uso de la espectroscopía FTIR para aplicaciones potenciales en sistemas biológicos, los cuales incluyen estudios citológicos, histológicos y microbianos, acercándose al diagnóstico clínico en combinación con técnicas computacionales [7]. El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística que procesa las bandas espectrales FTIR y permite discriminar diferentes tipos de linajes celulares [8]. Por esta razón, la biospectroscopía comienza a ser una herramienta común en la detección o diagnóstico de laboratorio. Hasta el momento, en la literatura no existen reportes sobre el análisis espectroscópico FTIR y sus componentes principales en la diferenciación de CM a células pancreáticas. El objetivo central de éste proyecto es determinar si el ACP a partir de espectros vibracionales FTIR permite caracterizar el proceso de diferenciación de CM a CPD.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

Se sembraron CMP y se sometieron a un protocolo de diferenciación de 21 *días*. Durante el proceso de diferenciación, se caracterizaron morfológica y espectroscópicamente las CMP (*día* 0) y las CPD en diferentes etapas de diferenciación (11, 17 y 21 *días*). Finalmente, los espectros FTIR de CMP y CPD se normalizaron y se calculó su segunda derivada, la cual se utilizó para realizar el ACP. Todos los datos se realizaron por triplicado, y todos los experimentos se repitieron al menos tres veces.

Cultivos celulares

Se sembraron CMP (ATCC cat: SCRR-2010) a una densidad de 50,000 *células/cm*² sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón previamente arrestados, para mantener las CMP en un estado indiferenciado, utilizando medio basal de células madre (ATCC

cat: SCRR-2010) suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS), 2- β mercaptoetanol al 0,1 mM (Invitrogen cat: 21985023) y factor inhibidor de leucemia a razón de 1 000 U/ml (Chemicon cat: ESG1107).

Posteriormente, las CMP se separaron de la monocapa de fibroblastos y se sometieron a un protocolo de diferenciación pancreática de 21 días, sembrándose a una densidad de 50,000 células/cm², empleando 4 medios de diferenciación en tiempos específicos como sigue: medios de diferenciación 1 y 2 fueron utilizados en los días 0 y 2 de diferenciación respectivamente, mismos que contenían medio Iscove modificado por Dulbecco (IMDM) (Sigma; 51471C) suplementado con 15% de suero fetal de ternera (FCS) (Promocell; C-37350), 50 μ g/ml de ácido ascórbico (AA) (Sigma; A5960) y monoglicerol (MTG) (Sigma; M4165) a una concentración de 6 X10³ y 6 X10⁴ M para los medios de diferenciación 1 y 2 respectivamente. El medio de diferenciación 3 fue utilizado del día 6 al día 13 de diferenciación, y consistió de medio Eagle modificado por Dulbecco/F12 (DMEM/F12) (Invitrogen, 11320-033) suplementado con 15% FBS y 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico humano recombinante (FGF2) (Sigma, F0291); finalmente, del día 13 hasta el final del protocolo de diferenciación (día 21), las CPD se mantuvieron en medio de diferenciación 4, el cual contenía medio de diferenciación 3 más 10 mM de nicotinamida (Sigma, N0636), 0.1 nM de exendina-4 (American Peptide Company; 46-3-12) y 10 ng/ml de activina-B humana recombinante (Sigma; A1729). Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

Análisis morfológico

Las CMP (día 0) y las CPD a los días 11, 17 y 21 de diferenciación, fueron analizadas morfológicamente mediante microscopía directa de campo claro y contraste de fases, empleando un microscopio invertido (Ti-U Eclipse, Nikon) determinando su forma y confluencia celular.

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

El análisis por espectroscopía FTIR de las CMP y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación, fue realizado en el intervalo espectral entre 4000-400 cm⁻¹ utilizando un espectrómetro FTIR (Vertex 70, Bruker) en el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR). El instrumento cuenta con una resolución espectral fija de 4 cm⁻¹. Se prepararon tres réplicas de cada etapa de diferenciación (0, 11, 17 y 21 días) para su análisis espectroscópico FTIR. Las muestras de células fueron obtenidas y se lavaron dos veces con PBS con el fin de eliminar el medio de cultivo; se centrifugaron a 1,200 rpm durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, la muestra celular (~105 células resuspendidas en 3 μ l) fue colocada sobre la superficie del cristal ATR y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el exceso de agua, midiendo los espectros hasta que las bandas de absorción relacionadas con el agua fueran indetectables. La radiación infrarroja se propagó a través del cristal y de la muestra para obtener el espectro correspondiente a la absorción infrarroja de las células, en un promedio de 120 adquisiciones por cada medición.

Tratamiento espectral y análisis multivariado

Una vez que se adquirieron todos los espectros FTIR (espectros en crudo), se les aplicó un tratamiento de normalización de variable aleatoria normal tipificada (SNV) utilizando el programa Unscrambler X versión 10.3 (CAMO Software AS); posteriormente, se realizó el cálculo de la segunda derivada de cada espectro empleando el algoritmo Savitzky-Golay, el cual aplica un ajuste sucesivo de subconjuntos de datos puntuales adyacentes con un bajo grado polinomial por mínimos cuadrados a la aproximación lineal. Después de que los espectros fueron tratados y calculados en segunda derivada, se utilizaron como datos de entrada para la aplicación del método multivariado de ACP mediante el programa Unscrambler X 10.3. Este

método de ACP es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de dimensión (número de variables), es decir, ante un banco de datos con muchas variables (espectros FTIR), el objetivo es reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible buscando combinaciones lineales de las variables originales que representan lo mejor posible la variabilidad presente en los datos. De este modo, con unas pocas combinaciones lineales, que son los componentes principales, sería suficiente para entender la información contenida en los datos. Al mismo tiempo, la forma en que se construyen los componentes (gráficas de puntuación), sirve para entender la estructura de correlación (formando agrupaciones y/o trayectorias) inherente a los datos.

RESULTADOS

Las CMP (*día 0*) presentaron una morfología esférica y simétrica, con características adherentes y tendencia a formar colonias celulares, característica morfológica de su estado de indiferenciación en cultivo (Figura 1).

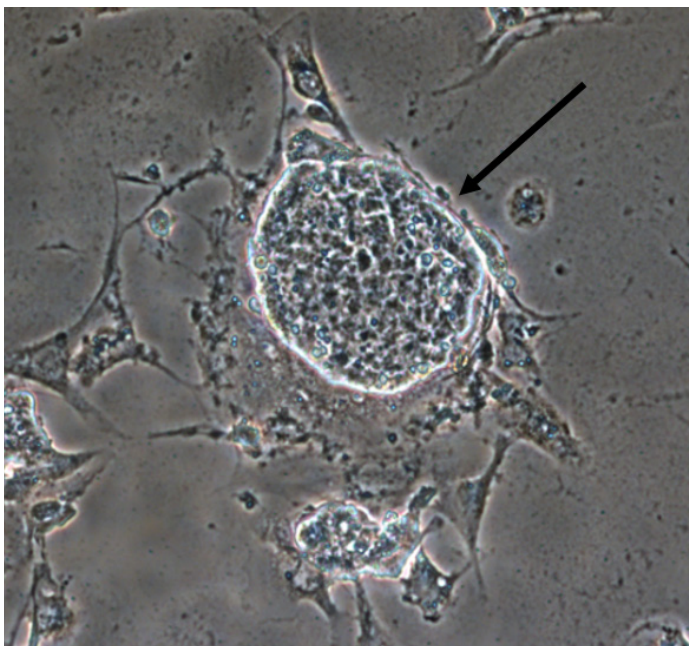


FIGURA 1. Colonia de células madre pluripotentes (↑), característica morfológica de estado de indiferenciación en cultivo (100X)

Posteriormente, una vez separadas las CMP de la monocapa de fibroblastos, se disgregaron y se sometieron al protocolo de diferenciación de 21 *días*, resultando CPD con morfología esférica y tendencia a formar agregados celulares tridimensionales denominados Cuerpos Embrionarios (CE), los cuales se observaron claramente a partir del *día 6* de diferenciación y aumentaron de tamaño conforme al tiempo de cultivo hasta presentar una tridimensionalidad al *día 21* de diferenciación (Figura 2).

Respecto a los espectros FTIR de CMP y CPD en sus diferentes etapas de maduración (0, 11, 17 y 21 *días*), se observó en los espectros en crudo normalizados, bandas de absorción asociadas con diferentes tipos de biomoléculas, encontrando diferencias en la composición estructural y bioquímica entre CMP y CPD (Figura 3).

Bandas de absorción a 1744 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de extensión del grupo éster $\text{C}=\text{O}$ de lípidos, mientras que dos bandas intensas a 1650 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} están relacionadas con los grupos funcionales amida I y amida II de proteínas respectivamente.

Las bandas a 1454 cm^{-1} corresponden a los grupos metilo y metileno de lípidos y proteínas, en tanto las bandas a 1396 cm^{-1} se deben a las vibraciones de extensión COO^- de las cadenas laterales de aminoácidos. Las siguientes bandas a 1238 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de extensión asimétricas y simétricas $\text{P}=\text{O}$ de los grupos fosfodiéster PO_2 de moléculas fosforiladas respectivamente. Enseguida, las bandas a 1030 cm^{-1} corresponden a la absorción de vibraciones $\text{C}-\text{O}$ de glucógeno.

Por último, las bandas en el intervalo $992\text{-}986\text{ cm}^{-1}$ están asociadas con la cadena principal de fosfato ribosa, mientras que las bandas a 966 cm^{-1} provienen de las vibraciones de extensión del esqueleto de DNA.

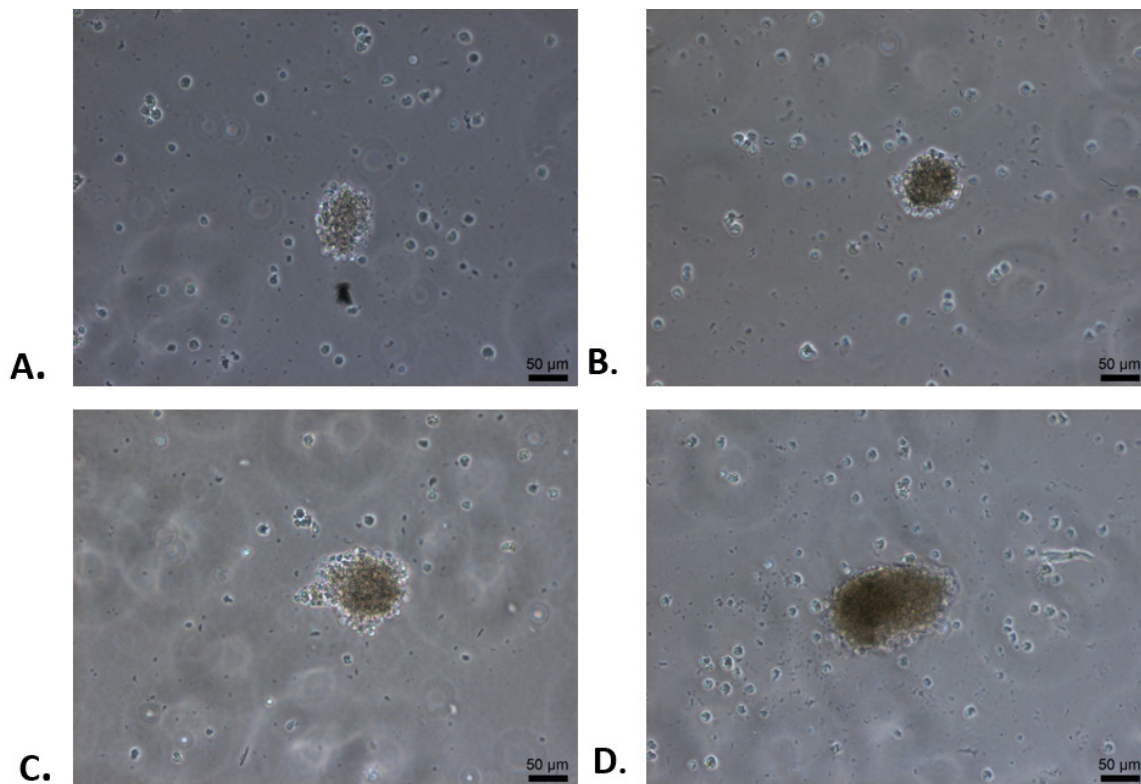


FIGURA 2. Diferenciación de células madre pluripotentes a cuerpos embrionarios (CE) conformados por células pancreáticas diferenciadas, (100X). A. Células en 6 días de diferenciación conformando un CE. B. Aumento del CE conformado por células en 11 días de diferenciación. C. CE de 17 días de diferenciación. D. CE denso conformado por células pancreáticas diferenciadas al día 21 de diferenciación.

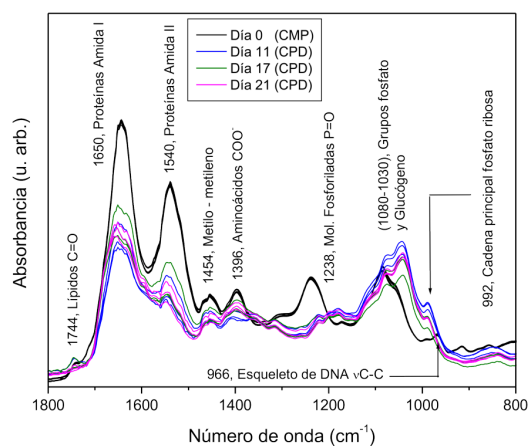


FIGURA 3. Espectros FTIR de Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) en diferentes etapas de maduración (11, 17 y 21 días) representados en la región de la huella dactilar biológica (1800-800 cm^{-1}).

Subsecuentemente, se obtuvo la segunda derivada de los espectros FTIR normalizados de CMP y CPD en las regiones de amida I de proteínas (1700-1600 cm^{-1}) y carbohidratos y ácidos nucleicos (1100-850 cm^{-1}) (Figura 4). En la Figura 4A correspondiente a la región amida I de proteínas, se observan bandas relacionadas con los componentes de la estructura secundaria de proteínas como giros β (1693 cm^{-1} y 1682 cm^{-1}), hélices α (1650 cm^{-1}) y láminas β (1634 cm^{-1}), los cuales son específicos y sensibles a cambios estructurales y conformacionales de las proteínas, apreciando un aumento en la intensidad de las bandas respectivas a giros- β y disminución en la intensidad de las bandas de hélices- α y láminas- β en las CPD respecto a las CMP. Respecto a la segunda derivada en la región de carbohidratos y ácidos nucleicos (Figura 4B), se observó un

incremento significativo en la intensidad de las bandas correspondientes a los grupos fosfato y glucógeno entre 1080 y 1030 cm^{-1} en las CPD y una disminución significativa en las bandas correspondientes a la vibración de la cadena principal de fosfato ribosa (992 cm^{-1}) y al anillo de ribosa (914 cm^{-1}) en las CMP al someterlas al proceso de diferenciación pancreática. Así mismo, también se apreció en las CPD un desplazamiento y aumento de la intensidad en las bandas correspondientes a las vibraciones de extensión del esqueleto de DNA (986 cm^{-1}) así como la banda espectral a 899 cm^{-1} correspondiente a DNA/RNA.

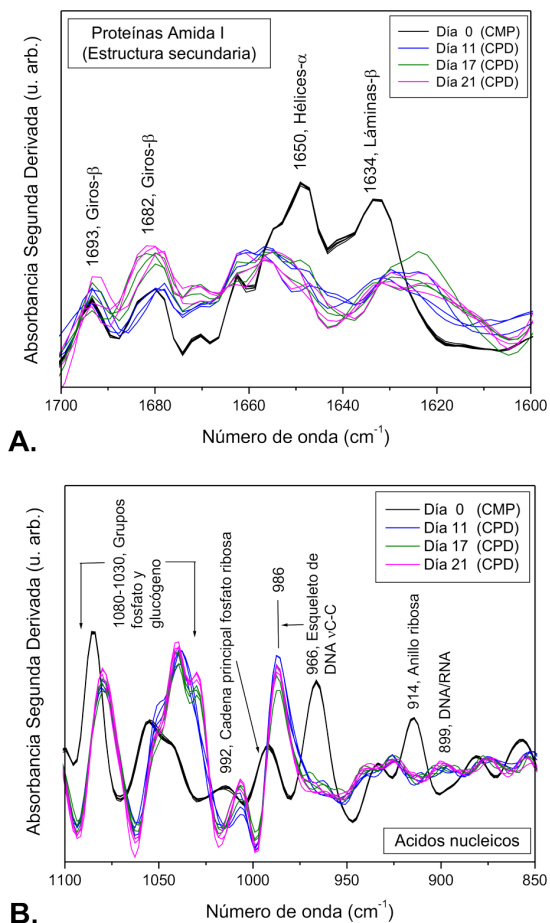


FIGURA 4. Segunda derivada de los espectros FTIR de Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) en diferentes etapas de maduración (11, 17 y 21 días), en dos regiones (N=3). A. Amida I de proteínas. B. Carbohidratos y ácidos nucleicos.

Finalmente, con los espectros tratados y calculados en segunda derivada, se utilizaron los datos espectrales de la región amida I de proteínas (1700-1600 cm^{-1}) así como de la región de carbohidratos y ácidos nucleicos (1100-850 cm^{-1}) para realizar el análisis multivariado de ACP (Figura 5). Se obtuvieron gráficas de puntuación en las siguientes regiones: región amida I de proteínas correspondiente a las hélices α (1658-1643 cm^{-1}) (Figura 5A), región de grupos fosfato y carbohidratos correspondiente al glucógeno (1068-1022 cm^{-1}) (Figura 5B), y región de ácidos nucleicos correspondiente a fosfato ribosa (1005-975 cm^{-1}) (Figura 5C). Se observa en las gráficas de puntuación de las tres regiones una clara discriminación entre datos asociados a CMP con respecto a los de CPD. Además de lo anterior, los datos asociados a CPD en las tres regiones espectrales analizadas pudieron ser agrupados en trayectorias, cuya magnitud del segundo componente principal determina la discriminación en las diferentes etapas del proceso de diferenciación de CMP a CPD. Esta discriminación resulta muy evidente en la tercera gráfica de puntuación correspondiente a la región de fosfato ribosa (1005-975 cm^{-1}).

DISCUSIÓN

De acuerdo a la espectroscopía vibracional infrarroja, el espectro FTIR obtenido de CMP, fue similar a lo reportado por Ami y cols. [8], y posterior a su diferenciación se observaron cambios notorios en las intensidades y frecuencias de las bandas de absorción de las CPD con respecto a las CMP, particularmente en las regiones espectrales de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, reflejando diferencias estructurales entre estas líneas celulares (Figura 3). Así mismo, Ami y cols. también reportaron estos cambios espectrales durante la diferenciación de CMP conformando CE, confirmando con estos resultados la obtención de CE a partir de CMP mediante espectroscopía vibracional.

Similar a otros estudios, como los reportados por Ami y cols. y Cao y cols. [8, 9], los espectros FTIR obtenidos

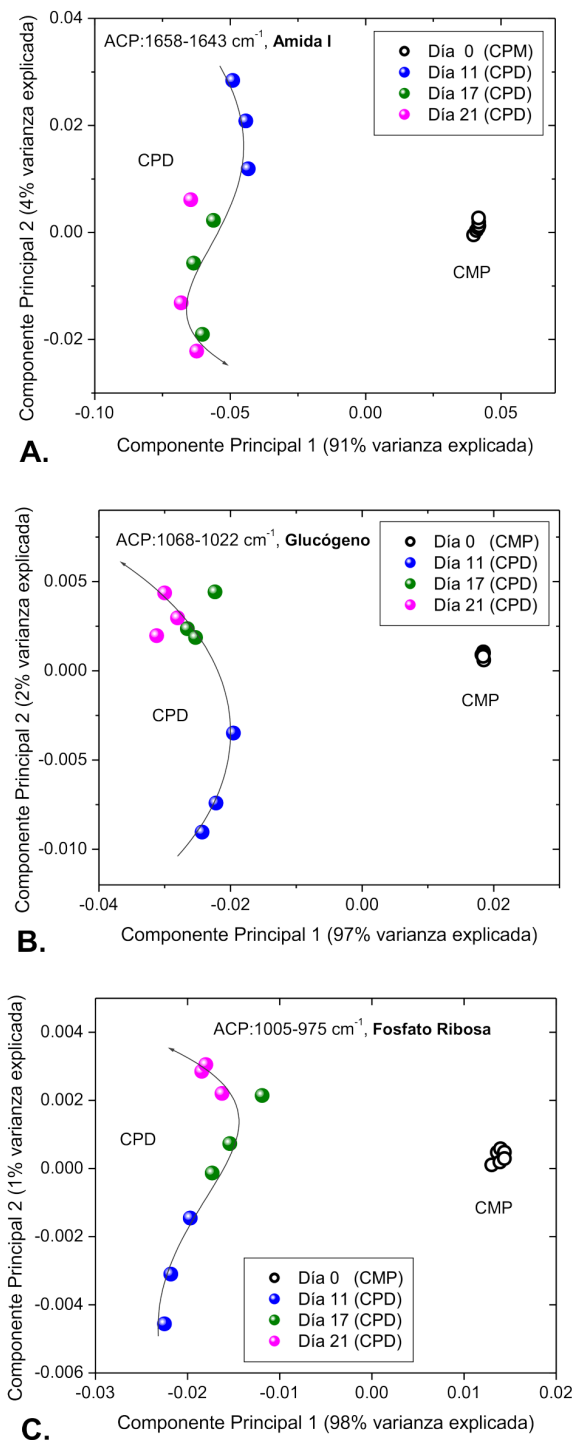


FIGURA 5. Gráficas de puntuaciones del Análisis de Componentes Principales a partir de los espectros FTIR de Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD), en tres regiones (N=3). A. Hélices α de proteínas. B. Glucógeno. C. Cadena principal de Fosfato Ribosa.

en este trabajo de CMP y CPD fueron complejos, pero el uso del análisis multivariado nos facilitó el procesamiento para identificar y evidenciar los cambios espectrales más significativos durante la diferenciación; en nuestro caso, la segunda derivada de los espectros de CMP y CPD (Figura 4), fue utilizada para proporcionar mayor precisión al ACP.

Con el análisis de la segunda derivada de los espectros FTIR, pudimos observar en la región amida I de proteínas cambios en la intensidad relativa de los componentes asociados con la estructura secundaria de las proteínas como giros β , hélices α y láminas β , lo que sugiere que proteínas específicas fueron expresadas y reorganizadas durante la diferenciación de CMP. Además, similar a lo reportado por Oyamada y cols., observamos una sobreexpresión de giros β la cual está relacionada con un aumento de las uniones gap durante la diferenciación de CMP [10].

En lo que respecta a la segunda derivada en la región de carbohidratos y ácidos nucleicos, apreciamos un aumento significativo en la intensidad de las bandas asociadas con las vibraciones de los grupos fosfato y glucógeno (1080-1030 cm^{-1}) en las CPD, lo cual se atribuye a que la autorenovación de las CMP está potenciada por la inhibición parcial de la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (Gsk3), y cuando las CMP pierden su estado de indiferenciación, ésta enzima se activa e incrementan los niveles de glucógeno en las CPD [11]. Asimismo, en esta región observamos un incremento y desplazamiento de la banda espectral 966 cm^{-1} de CMP a 986 cm^{-1} en las CPD, así como la presencia de un nuevo componente a 899 cm^{-1} en las CPD, lo cual puede ser asignado a la traslación de mRNA y a un modo vibracional que indica la presencia de un nuevo DNA/RNA híbridos una vez que ocurre el proceso de diferenciación [12].

Realizando el análisis multivariado de ACP (Figura 5), pudimos observar en el primer componente principal para las tres regiones exploradas, una clara discrimi-

nación entre CMP y CPD, evidenciando el cambio bioquímico y estructural que sufren las CM al ser diferenciadas, resultados que han sido reportados por diversos autores y nuestro grupo de investigación mediante técnicas moleculares o fenotípicas durante la diferenciación dirigida de CMP [2, 4, 5, 8, 13, 14].

Respecto al segundo componente principal en las primera y segunda regiones (proteínas y carbohidratos), este análisis nos permitió discriminar la primera fase de diferenciación (*día* 11), en la cual como se mencionó anteriormente, se ha reportado la expresión de nuevas proteínas relacionado con el aumento en la complejidad celular y en el contenido proteico, así como el aumento de las moléculas de azúcar por el metabolismo de los carbohidratos como el glucógeno durante la diferenciación de CMP [2, 8, 10]. Además, esta segunda región analizada correspondiente al glucógeno, refuerza mediante ACP lo reportado por Walsh y cols., quienes mencionan que este intervalo espectral, constituye un buen indicador de las alteraciones en la estructura secundaria del DNA y lo destacan como una región fundamental para el proceso de diferenciación [15].

Por último, el segundo componente principal en la tercera región (fosfato ribosa), es el que nos permitió discriminar efectivamente todo el proceso de diferenciación

(*días* 11, 17 y 21) y está relacionado con cambios en el contenido de RNA debido a una sobre o baja regulación de los genes y a la activación transcripcional que se lleva a cabo durante el proceso de diferenciación de CM [16].

La aplicación de esta metodología puede ser útil para caracterizar CM y su proceso de diferenciación a diversos linajes celulares en tiempos cortos, aunque se necesitan otros ensayos para caracterizar y discriminar células diferenciadas altamente especializadas.

CONCLUSIONES

El ACP a partir de la espectroscopía FTIR, permite caracterizar química y estructuralmente CMP y su proceso de diferenciación a células pancreáticas. Tales resultados infieren viabilidad técnica para proponer el ACP como una técnica no invasiva y rápida para caracterizar un proceso de diferenciación celular.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al “Programa Presupuestario A022-2016” por los apoyos otorgados en este trabajo y a la Escuela Médico Militar en su Aniversario de 100 años.

DECLARACIÓN DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses para la publicación de este artículo.

REFERENCIAS

- [1] Downes A, Mouras R, Elfick A. "Optical spectroscopy for noninvasive monitoring of stem cell differentiation", *J. Biomed. Biotechnol.*, Article ID 101864, pp. 1-10, 2010. DOI:10.1155/2010/101864
- [2] Vázquez-Zapién GJ, Sánchez-Monroy V, Chirino YI, Mata-Miranda MM. "Caracterización morfológica, génica y proteica en la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas", *Int. J. Morphol.*, vol. 31, no. 4, pp. 1421-1429, Dic. 2013. DOI:10.4067/S0717-95022013000400044
- [3] Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al., "Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo", *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 4, pp. 443-452, 2008. DOI:10.1038/nbt1393
- [4] Ku HT, Zhang N, Kubo A, O'Connor R, Mao M, Keller G, et al., "Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro", *Stem Cells*, vol. 22, no. 7, pp. 1205-1217, 2004. DOI:10.1634/stemcells.2004-0027
- [5] Chen C, Chai J, Singh L, Kuo CY, Jin L, Feng T, et al., "Characterization of an in vitro differentiation assay for pancreatic-like cell development from murine embryonic stem cells: detailed gene expression analysis", *Assay Drug. Dev. Technol.*, vol. 9, no. 4, pp. 403-419, 2011. DOI:10.1089/adt.2010.0314
- [6] Mantsch HH, Yang PW, Casal YL. "Infrared spectrometry of living systems: Current trends and perspectives", *J. Mol. Struct.*, vol. 141, pp. 237-242, 1986. DOI:10.1016/0022-2860(86)80328-3
- [7] Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, et al., "Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials", *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 8, pp. 1771-1791, 2014. DOI:10.1038/nprot.2014.110
- [8] Ami D, Neri T, Natalello A, Mereghetti P, Doglia SM, Zanoni M, et al., "Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1783, no. 1, pp. 98-106, 2008. DOI:10.1016/j.bbamcr.2007.08.003
- [9] Cao J, Ng ES, McNaughton D, Stanley EG, Elefanty AG, Tobin MJ, et al., "The characterisation of pluripotent and multipotent stem cells using Fourier transform Infrared Microspectroscopy", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 17453-17476, 2013. DOI:10.3390/ijms140917453
- [10] Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M, Oyamada M. "Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro", *Exp. Cell Res.*, vol. 229, no. 2, pp. 318-326, 1996. DOI: 10.1006/excr.1996.0377
- [11] J. Wray, T. Kalkan, S. Gomez-Lopez, D. Eckardt, A. Cook, R. Kemler et al., "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation". *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 7, pp. 838-845, 2011. DOI:10.1038/ncb2267
- [12] Banyay M, Sarkar M, Gräslund A. "A library of IR bands of nucleic acids in solution", *Biophys Chem.*, vol. 104, no. 2, pp. 477-488, 2003. DOI:10.1016/S0301-4622(03)00035-8
- [13] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S et al., "Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture", *Development*, vol. 131, no. 7, pp. 1651-1662, 2004. DOI:10.1242/dev.01044
- [14] Vázquez-Zapién GJ, Mata-Miranda MM, Sánchez-Monroy V, Delgado-Macuil RJ, Perez-Ishiwara DG, Rojas-López M. "FTIR spectroscopic and molecular analysis during differentiation of pluripotent stem cells to pancreatic cells", *Stem Cells Int*, vol. 2016, ID 6709714, pp. 1-10, 2016. DOI:10.1155/2016/6709714
- [15] Walsh MJ, Hammiche A, Fellous TG, Nicholson JM, Cotte M, Susini J, et al., "Fourier transform infrared microspectroscopy identifies symmetric PO2- modifications as a marker of the putative stem cell region of human intestinal crypts", *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, pp. 108-118, 2008. DOI:10.1634/stemcells.2007-0196
- [16] Chen YJ, Cheng YD, Liu HY, Lin PY, Wang CS. "Observation of Biochemical Imaging Changes in Human Pancreatic Cancer Tissue using Fourier-transform Infrared Microspectroscopy", *Chang Gung Med. J.*, vol. 29, no. 5, pp. 518-527, 2006.