

## Análisis de Células Madre Pluripotentes Indiferenciadas y Fibroblastos a través de Espectroscopía de Impedancia.

Carla I. Guerrero-Robles<sup>1,3</sup>, Gustavo J. Vázquez-Zapién<sup>2,3</sup>, Mónica M. Mata-Miranda<sup>2,3</sup>, Jesús G. Silva-Escobedo<sup>2</sup>, Lucila M. Lozano-Trenado<sup>2</sup> y César A. González-Díaz<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Lic. En Biología en Universidad Juárez Autónoma de Tabasco-División Académica de Ciencias Biológicas, Vhsa, Tabasco, México.

<sup>2</sup>Universidad del Ejército y Fuerza Aérea-Escuela Médico Militar, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, D.F., México

<sup>3</sup>Instituto Politécnico Nacional-Escuela Superior de Medicina, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. México

\* Correspondencia: cgonzalezd@ipn.mx

**Resumen**— Las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en distintos linajes celulares, lo cual tiene relevancia en la ingeniería de regeneración de tejidos. La identificación y caracterización de células diferenciadas requiere de técnicas complejas tales como la citometría de flujo, inmunocitoquímica y la caracterización génica por medio de técnicas moleculares; tales técnicas demandan infraestructura y personal especializado. Por ello el objetivo de éste trabajo fue analizar el uso de mediciones de Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE) como técnica alterna de identificación de células diferenciadas. Las mediciones de EIE en poblaciones de células madre pluripotentes indiferenciadas y fibroblastos fueron realizadas y comparadas. Los resultados indican que la EIE tiene sensibilidad a frecuencias bajas e intermedias para discriminar entre ambos tipos de poblaciones celulares. Se recomiendan estudios adicionales con diferentes concentraciones y tipos celulares a fin de evaluar cuantitativamente la sensibilidad y especificidad de la técnica propuesta.

**Palabras clave**—Células madre, Pluripotentes, Espectroscopía, Impedancia.

### I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cultivo de células madre (troncales) ha tenido un gran auge debido a su capacidad de originar distintos linajes celulares (potencialidad) bajo ciertas condiciones en cultivo [1]. Esta capacidad de diferenciación celular es la tendencia en la ingeniería médica para su uso en la terapia de regeneración de tejidos [2], [3]. Para poder identificar las células ya diferenciadas es necesario el uso de técnicas como la citometría de flujo, la cual se basa en un haz de luz láser para la detección de ciertos marcadores fluorescentes unidos a anticuerpos específicos [4]; la inmunocitoquímica, en la que las células son permeadas con el fin de que los anticuerpos (inmunoglobinas) marcados conjugados con un fluorocromo, como la fluoresceína, se unan al antígeno dentro de la célula y se observen mediante un microscopio de fluorescencia [5]. Finalmente para la caracterización génica se utiliza la PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa), en la cual se extrae RNA y se cuantifican los niveles de expresión génica relativa de genes específicos para el desarrollo celular [6]. Las técnicas citadas son muy eficientes pero costosas y

requieren de infraestructura y personal especializado, por lo que resulta pertinente proponer técnicas emergentes que pudiesen facilitar la identificación de células diferenciadas. En ese sentido, en un estudio reportado por Arum Han *et al.* en el 2007 se mostró la viabilidad de diferenciar distintas líneas celulares tumorales a través de la caracterización de sus propiedades eléctricas medidas con Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIE) [7]. Hasta donde conocemos, en la literatura no existen reportes sobre biosensores de células madre indiferenciadas y células especializadas basados en mediciones de EIE. El objetivo central de éste trabajo fue analizar el uso de la EIE como técnica alterna para diferenciar poblaciones de células madre pluripotentes indiferenciadas de aquellas diferenciadas a fibroblastos, siendo la idea central evaluar la factibilidad técnica de proponer mediciones de EIE como técnica simple para identificar células madre diferenciadas.

### II. METODOLOGÍA

#### A. Diseño experimental.

El concepto biofísico de mediciones de EIE en células en suspensión se muestra en la figura 1. Dos tipos de células son evaluadas: Células Madre Pluripotentes indiferenciadas y Fibroblastos Embrionarios de ratón (MEF), aproximadamente 200,000 células de cada tipo fueron suspendidas en 200  $\mu$ l de PBS y depositadas sobre una superficie de cuarzo con electrodos de oro embebidos, tales electrodos representan la interfase eléctrica-iónica que fundamentan las bases de nuestra propuesta de biosensor de células madre diferenciadas basado en mediciones de EIE. Espectros de bioimpedancia a múltiples frecuencias para cada tipo de células fueron realizadas por triplicado.

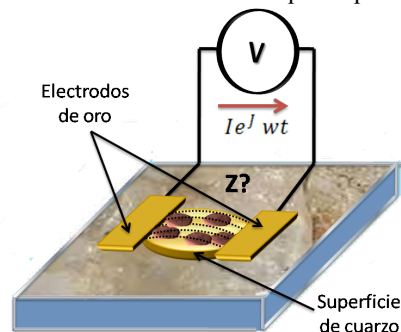


Fig. 1. Esquema biosensor de células madre basado en mediciones de EIE.

### B. Cultivos Celulares.

Las células madre pluripotentes (ATCC cat: SCRR-2010) se sembraron a una densidad de 50,000 células/cm<sup>2</sup> sobre una monocapa de MEF previamente arrestados para mantenerlas en estado indiferenciado, para lo que se suplementó el medio basal de células madre (ATCC cat: SCRR-2010) con 15% de suero fetal bovino FBS, 2-β mercaptoetanol al 0,1 mM (Invitrogen cat: 21985023) y factor inhibidor de leucemia (LIF) a razón de 1 000 U/ml (Chemicon cat: ESG1107). Los MEF de la línea celular STO (S, SIM; T, 6-resistente a la tioguanina; O, resistente a la ouabaina), se sembraron en un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (ATCC cat: 30-2002), suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS) (ATCC cat: 30-2020) y 1% de Penicilina 10,000 UI/ml/ Estreptomina 10,000 mg/ml (Invitrogen, cat: 15140). Ambas poblaciones celulares fueron incubadas a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

### C. Mediciones experimentales de impedancia.

Se llevó a cabo un sistema de medición experimental de impedancia basándose en un espectrómetro de impedancia de alta precisión (Agilent; Modelo 4294A), que suministra una señal  $I \cos(\omega t)$  en el rango de 100 MHz. El sistema del biosensor consiste en dos electrodos colocados de manera que se cierre el circuito eléctrico a través de la muestra de células. Ambos electrodos fueron fabricados en oro, embebidos en una superficie de cuarzo de radio  $r=9$  mm (Figura 2). Las mediciones se desarrollaron en el rango de frecuencia de 100 Hz a 100 MHz a 181 pasos logarítmicamente espaciados. El concepto detrás del sistema es que las mediciones representan los cambios de conductividad y permitividad eléctrica; lo que significa que la bioimpedancia compleja  $Z$  varía con las diferentes muestras de poblaciones celulares.

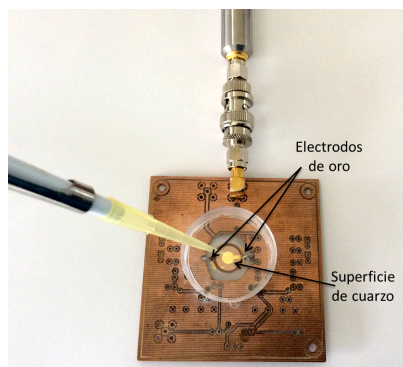


Fig. 2. Biosensor de células madre basado en mediciones de EIE.

### III. RESULTADOS

La observación microscópica de la morfología en los cultivos celulares evidenció que las células madre pluripotentes son redondas con una tendencia a agruparse formando colonias celulares (Figura 3A), característica típica de esta línea celular, a diferencia de los MEF, cuya

morfología es más compleja, fusiforme y no forman conglomerados (Figura 3B).

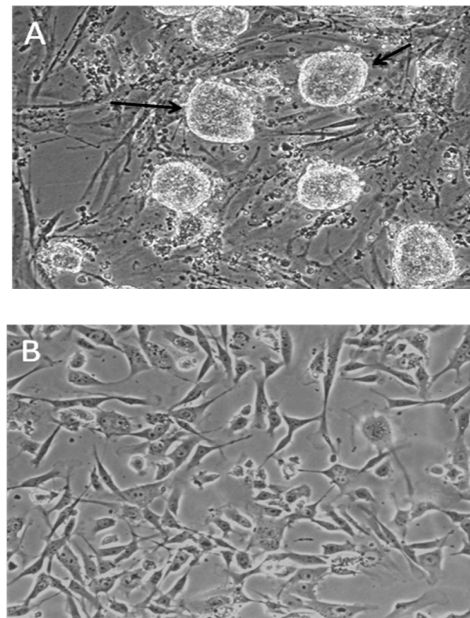


Fig. 3. Morfología de los cultivos celulares (100x). A. Células madre pluripotentes conformando colonias sobre fibroblastos embrionarios de ratón (flecha). B. Fibroblastos embrionarios de ratón.

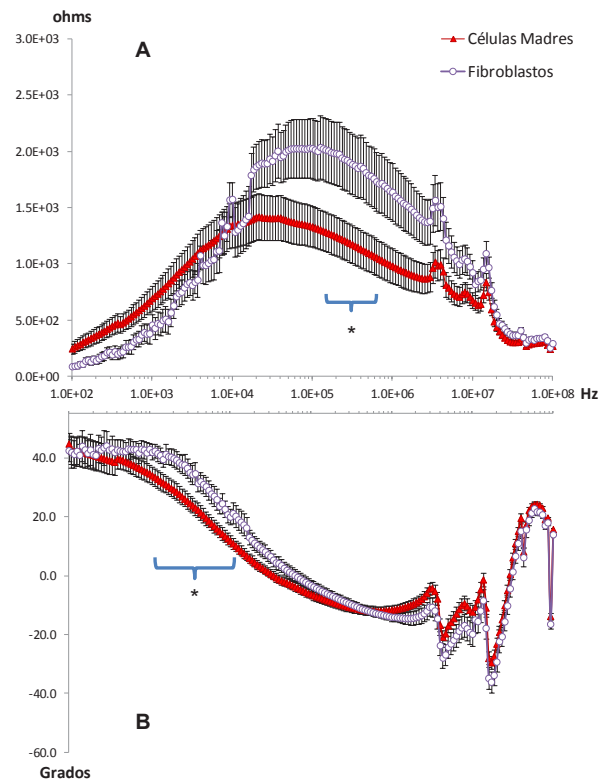


Fig. 4. Espectros de Impedancia en Magnitud (A) y Fase (B) obtenidos en poblaciones de células madre y fibroblastos. \* $p < 0.05$ , Prueba U-Mann-Whitney.

Referente a los resultados del análisis de la EIE (Figura 4), se aprecian diferencias entre las células madre pluripotentes y los MEF entre los rangos de  $1.0E+04$ - $1.0E+07$  Hz en la magnitud, mientras que en la fase, las mayores variaciones se aprecian en el rango de  $1.0E+03$ - $1.0E+05$  Hz. Lo que demuestra que la magnitud y fase de la bioimpedancia de los MEF es mayor.

#### IV. DISCUSIÓN

Las mediciones de bioimpedancia reflejan las propiedades eléctricas de materiales biológicos, la sensibilidad observada con mediciones de EIE en los dos tipos de poblaciones celulares evaluadas se centra en el ancho de banda de dispersión alfa, por lo que tales cambios en la bioimpedancia observada deberán atender a la estructura celular. Los fibroblastos tienden a tener patrones de diferenciación estructuralmente complejos, tal como se puede observar en la figura 3B, de ahí que presenten magnitud de bioimpedancia superior a las observadas en la población de células madre indiferenciadas, las cuales se consideran que poseen componentes estructurales más simples, como se aprecia en la figura 3A, resultado similar a lo analizado mediante citometría de flujo en trabajos previos (no mostrados en este estudio). El comportamiento descrito también resulta evidente en el desfase observado entre ambas poblaciones celulares, por lo que se asume que los componentes reactivos entre ambos tipos de estructuras celulares es evidentemente diferente.

#### V. CONCLUSIÓN

Mediciones de EIE permiten identificar poblaciones de células madre indiferenciadas y células especializadas probablemente debido a diferencias en sus componentes reactivos asociados a su estructura celular, tal como lo mencionan Ivorra [8], Aberg [9] y López [10]. Se recomiendan estudios adicionales con diferentes concentraciones y tipos celulares a fin de evaluar cuantitativamente la sensibilidad y especificidad de la técnica propuesta.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Academia Mexicana de Ciencias y a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por los apoyos otorgados a CIGR para la estancia en la que se realizó este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Guerrero, *Células madre: la madre de todas las células*. Madrid: Editorial Hélice, 2003, pp. 14.
- [2] J. A. Arévalo Romero, D. M. Páez Guerrero, V. M. Rodríguez Pardo, "Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas". *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, vol. 5, no. 8, pp. 177-184, 2007.
- [3] M. Magallanes Fabián, B. Carmona Rodríguez, M. A. Álvarez Pérez, "Aislamiento y caracterización parcial de células madre

de pulpa dental". *Revista Odontológica Mexicana*, vol. 14, no. 1, pp. 15-20, 2010.

- [4] C. Macías Abraham, L. O del Valle Pérez, C. J. A. Galván, B. K. de la Cuétara, F. B. B. Socarrás, R. P. Hernández, S. J. M. Ballester, "Caracterización fenotípica de células madre mesenquimales humanas de médula ósea y tejido adiposo. Resultados preliminares". *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, vol. 30 no.2, pp. 162-170, 2014.
- [5] A. L. Kierszenbaum, *Histología y Biología celular: Introducción a la anatomía*. España: Elsevier Mosby, 2008, pp. 21.
- [6] G. J. Vázquez-Zapién, V. Sánchez Monroy, Y. I. Chirino López, M. M. Mata Miranda, "Caracterización morfológica, génica y protéica en la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas tempranas. *International Journal of Morphology*, vol. 31, no. 4, pp. 1421-1429, 2013.
- [7] H. Lily Yang, A. Bruno Frazier, "Quantification of the heterogeneity in breast cancer cell lines using whole-cell impedance spectroscopy". *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 1, pp.139-43, Ene. 2007.
- [8] A. Ivorra, "Bioimpedance Monitoring for physicians: an Overview". Diplomado en Medicine for non physicians. Hospital de Barcelona, España, Jul. 2002.
- [9] P. Aberg, I. Nicander, U. Holmgren, P. Geladi, S. Ollmar, "Assessment of skin lesions and skin cancer using simple electrical impedance indices". *Skin Research Technology*, vol. 9, no. 3, pp. 257-261, Aug. 2003.
- [10] C.A. López Ostos, "Estudio de las respuestas a diferentes esquemas de tratamiento de radioterapia en tumores de cuello uterino mediante espectroscopia de impedancia eléctrica". Master en Ciencias, Fis. Programa de Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2012.