



Mapeo Bioquímico mediante Micro-espectroscopía FTIR como Técnica Rápida y No destructiva para Detección de Biomoléculas en Condrocitos Cultivados.

Carla Ivonne Guerrero-Robles^{1,2}, Gustavo Jesús Vázquez-Zapién², Adriana Martínez-Cuazitl^{1,2}, Juan Salvador García-Hernández², Laura Susana Rangel Cova² y Mónica Maribel Mata-Miranda^{2*}

¹ Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-Escuela Superior de Medicina, México.

² Secretaría de la Defensa Nacional, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Escuela Médico Militar, México.

* Correspondencia: mmcmaribel@gmail.com

Resumen — El cartilago articular es un tejido que proporciona una superficie lubricada y de fricción a la carga mecánica que soporta; está formado únicamente por condrocitos, los cuales generan y mantienen la matriz extracelular. Debido a su poca capacidad regenerativa, los tratamientos para las enfermedades articulares son poco eficaces, pero la terapia con implante de condrocitos autólogos (ICA) se está postulando como la mejor opción. Para ello es necesario caracterizarlos antes de implantarlos, siendo la espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) una opción no destructiva y versátil que puede detectar biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. El objetivo de este trabajo fue analizar las características morfológicas, bioquímicas y la distribución biomolecular en condrocitos cultivados, empleando microscopía óptica y técnicas de análisis bioquímico mediante micro-espectroscopía FTIR y su función de mapeo IQ. Se obtuvieron espectros característicos de condrocitos y se detectaron mediante el mapeo bioquímico diferentes biomoléculas, destacando lípidos, proteínas amida I, glicosaminoglicanos, colágeno tipo II y agregano, cuya absorbancia coincide con su actividad metabólica reportada, demostrando así la capacidad de la micro-espectroscopía FTIR para caracterizar células bioquímicamente y analizar su distribución biomolecular de manera rápida, precisa y no invasiva.

Palabras clave — Biomoléculas, Condrocitos Cultivados, Mapeo bioquímico, Micro-espectroscopía FTIR.

I. INTRODUCCIÓN

El cartilago articular es un tejido conectivo que carece de aporte sanguíneo, tejido nervioso y vasos linfáticos. Proporciona una superficie lubricada de unión y de fricción resistente a la carga mecánica que soporta [1]. Los condrocitos son el único tipo de células presentes en el cartilago articular, y se encargan de la producción y mantenimiento de la matriz extracelular (MEC) al sintetizar colágeno tipo II, glicosaminoglicanos (GAGs), hialuronano y proteoglicanos (PGs), principalmente el agregano [2]. La pérdida de cartilago es la principal causa de disfunción articular y discapacidad en humanos, siendo la osteoartritis (OA) la enfermedad crónica articular más común [3]. Los defectos del cartilago articular no se regeneran, por lo que las intervenciones terapéuticas solo tienen como objetivo retrasar

o prevenir la progresión a OA [4]. Si bien no existe cura, las nuevas terapias incluyen enfoques como la terapia génica, biomatrices [5] y el implante de condrocitos autólogos (ICA), los cuales se extraen del cartilago del paciente y se cultivan *in vitro* para obtener un mayor número de células que serán implantadas [1]. Por lo tanto, es necesaria su caracterización previa al implante, siendo utilizadas técnicas moleculares y fenotípicas como PCR, RT-qPCR, inmunocitoquímica, citometría de flujo, entre otras, las cuales requieren de una estandarización exhaustiva para asegurar la ausencia de falsos negativos y/o la competición entre cebadores, ensayos para analizar variables independientes, preparaciones específicas en relación a la molécula a evaluar, algunas proveen poca información morfológica sin proporcionar información de la localización celular en el tejido, consumen demasiada muestra celular, así como la necesidad de procedimientos largos y costosos por personal y equipos especializados [6]. En este sentido, la espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) podría representar una herramienta útil en el estudio de sistemas biológicos al proporcionar información de la estructura molecular de materiales orgánicos e inorgánicos. En esta técnica, la absorción de la radiación IR se produce cuando un fotón es transferido a una molécula y la excita a un estado de mayor energía, dando lugar a vibraciones de enlaces moleculares (estiramiento, flexión, torsión, oscilación, movimiento y deformación fuera del plano), que se producen a diferentes frecuencias en la región IR del espectro de luz. Entre sus ventajas está su versatilidad y su propiedad no destructiva [7]. En materiales biológicos, se pueden detectar biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, que tienen estructuras químicas únicas [8]. Además, se ha vinculado la espectroscopía FTIR con la microscopía óptica, resultando la micro-espectroscopía FTIR, obteniendo imágenes de alta definición, lográndose caracterizar muestras pequeñas, como el análisis de una sola célula [9]. Hasta el momento, nuestro grupo de investigación ha realizado la comparación morfológica, genética y fenotípica entre condrocitos articulares humanos y condrocitos cultivados autólogos mediante RT-qPCR, microscopía óptica de campo claro y de fluorescencia, reportando una técnica de cultivo adecuada que evita la desdiferenciación de los condrocitos *in vitro* [3]; desafortunadamente, estas técnicas consumieron la mayoría de la muestra y demasiado tiempo. Debido a que la micro-espectroscopía FTIR es una técnica

rápida y no destructiva, y además proporciona información bioquímica, morfológica y distributiva molecularmente, el objetivo central de este proyecto fue analizar las características bioquímicas y la distribución biomolecular en condrocitos cultivados, empleando técnicas de análisis bioquímico mediante micro-espectroscopía FTIR y su función de mapeo IQ, con el fin de tener una amplia caracterización antes de un posible implante celular.

II. METODOLOGÍA

A. Diseño experimental

Previo consentimiento informado, se obtuvieron 9 muestras de cartilago articular de rodilla de pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos en el Hospital Central Militar de la Secretaría de la Defensa Nacional, para el protocolo de investigación "Obtención y expansión de condrocitos humanos", aprobado por el Comité de Ética en Investigación de ese nosocomio. Cada muestra se disgregó enzimáticamente para la obtención de condrocitos, los cuales se cultivaron y expandieron *in vitro*. Una vez que se alcanzaron 21 días de cultivo, se analizaron morfológica y bioquímicamente mediante microscopía óptica y micro-espectroscopía FTIR junto con su función de mapeo IQ.

B. Recolección y disgregación del cartilago articular.

Se obtuvieron nueve muestras de cartilago articular de rodilla de pacientes entre 20 a 45 años. Los principales criterios de inclusión fueron pacientes con daño articular sometidos a cirugía artroscópica de rodilla o procedimiento quirúrgico abierto para diagnóstico y/o tratamiento. Después de la limpieza articular y antes del procedimiento quirúrgico, se obtuvo una muestra osteocondral de 10 mm² de la superficie articular, realizando una incisión en el área medial o lateral de la muesca intercondilar. La muestra se retiró usando una pinza laparoscópica tipo *grasper*, se irrigó con solución de amikacina al 0.4% y se mantuvo en esta solución en frío hasta su transporte al laboratorio. Las muestras se incubaron a 4°C en amikacina al 0.4% durante 6 horas. Posteriormente se fragmentaron e incubaron en solución de tripsina al 0.25% (Invitro; 140349) y penicilina-estreptomina al 3% (10,000UI/ml–10,000µg/ml) (Invitrogen; 15140) por 30 minutos a 37°C. Al concluir, los fragmentos se enjuagaron con solución amortiguadora de fosfato (PBS) y se digirieron con 2 mg/ml de colagenasa en medio Eagle's modificado por Dulbecco (DMEM) (ATCC; 30-2002) durante 8 horas a 37°C bajo agitación continua (1500 revoluciones por minuto). Una vez que se completó la digestión, la solución celular obtenida se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, obteniendo un sedimento de células que se lavó con DMEM complementado con Suero Fetal Bovino (FBS) (ATCC; 30-2020) al 15%.

C. Cultivo de condrocitos y descripción morfológica.

Las células obtenidas se resuspendieron y sembraron a una densidad de 10⁴ células/cm² usando DMEM con FBS al 15%, penicilina-estreptomina al 1% (10,000 UI/ml – 10,000

µg/ml) y L-alanina-L-glutamina 2mM (ATCC; 30-2111); las cajas de cultivo se incubaron a 37°C en una incubadora húmeda (5% de CO₂, 95% de aire) durante 21 días. El medio se reemplazó cada 4 días.

Los condrocitos cultivados fueron observados durante el tiempo de cultivo mediante microscopía óptica de campo claro y contraste de fases con un microscopio invertido (Ti-U Eclipse, Nikon), evaluando su morfología y confluencia celular.

D. Micro-espectroscopía FTIR y tratamiento espectral.

El análisis de micro-espectroscopía FTIR en los condrocitos cultivados se realizó en el intervalo espectral de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando un microscopio FTIR (IRT-5200, Jasco) acoplado a un espectrómetro FTIR (6600, Jasco), en modo de reflectancia, resolución espectral de 4 cm⁻¹ y empleando un objetivo cassegrain de 32X.

Para analizar los condrocitos cultivados, se tripsinizaron y se centrifugaron a 1200 rpm por 3 minutos, se lavaron dos veces con solución salina, se decantó el sobrenadante y del sedimento celular se tomaron 3 µl realizando un frotis sobre un portaobjetos recubierto de oro, dejándose secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos para eliminar el exceso de agua. Cada espectro correspondió al promedio de 120 adquisiciones y cada muestra por triplicado. 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 X10.3 (CAMO).

E. Mapeo bioquímico.

Las imágenes bioquímicas de los condrocitos cultivados se obtuvieron mediante el mapeo automatizado de múltiples puntos (mapeo IQ) del microscopio FTIR, el cual está equipado con un detector MCT (Mercurio-Cadmio-Telurio), analizando los condrocitos con un objetivo cassegrain de 32X. La óptica del microscopio permitió amplificar la imagen 1:2 y los espectros de absorbancia se adquirieron en modo de reflectancia a una resolución espectral de 4 cm⁻¹, promediando 80 adquisiciones en cada espectro.

Se realizó el mapeo bioquímico en los intervalos espectrales correspondientes a lípidos, proteínas amida I, GAGs, PGs y agregano, representándose en imágenes correspondientes a la distribución de cada tipo de biomolécula con el programa Microscope Measurement (Jasco).

III. RESULTADOS

Los condrocitos cultivados mostraron una morfología similar a los condrocitos del cartilago articular, así como a los condrocitos cultivados reportados en trabajos previos donde se ha estandarizado una técnica de cultivo adecuada que evita la desdiferenciación celular, expresando genes (*colágeno 1, 2 y 10*) y proteínas (*colágeno 2* y *SOX9*) propios de los condrocitos [3], demostrándose que los condrocitos en cultivo mantienen sus características genéticas y proteicas. Estos condrocitos cultivados presentaron una forma

redondeada, apreciándose un núcleo grande con cromatina condensada y citoplasma claro, aspecto similar al condrocito *in situ*. Así mismo, se observaron condrocitos aislados y condrocitos agrupados dentro de una estructura similar a una condrona, apreciando que la distribución topográfica de las células en expansión era inespecífica, sin seguir una polaridad y presentando una interfase coloidal (Figura 1).

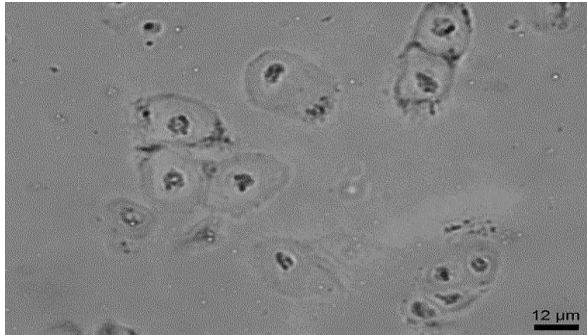


Fig. 1. Morfología de los condrocitos cultivados (400x).

Posteriormente, todas las muestras fueron analizadas mediante micro-espectroscopía FTIR en modo reflectancia. La Figura 2 muestra el espectro FTIR en crudo normalizado y promediado, donde se observan bandas de absorción asociadas con diferentes tipos de biomoléculas.

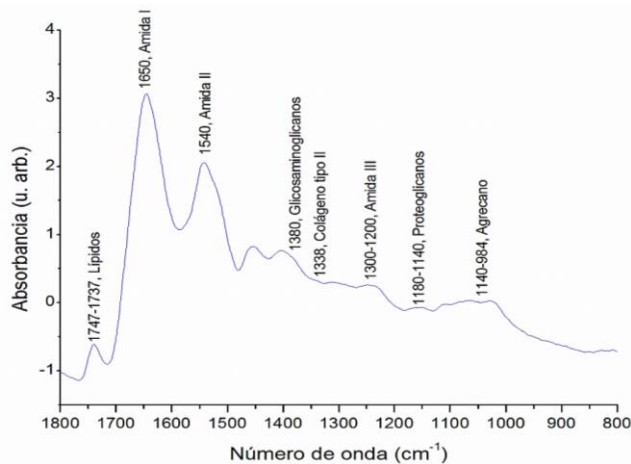


Fig. 2. Espectro FTIR normalizado y promediado de los condrocitos cultivados, representado en la región de la huella dactilar biológica (1800-800 cm^{-1}). Se observan bandas de absorción relacionadas con lípidos, proteínas, glicosaminoglicanos, colágeno tipo II, proteoglicanos y agregano.

Primero, se observa una banda de absorción entre 1747-1737 cm^{-1} , la cual está relacionada con las vibraciones de extensión del grupo éster C=O de lípidos. En seguida, se muestra una banda de absorción a 1650 cm^{-1} y otra a 1540 cm^{-1} , las cuales están relacionadas con los grupos funcionales de proteínas amida I (extensión C=O) y amida II (extensión C-N + flexión N-H) respectivamente. Posteriormente, se observa una banda a 1380 cm^{-1} relacionada con las vibraciones simétricas de flexión correspondientes a los GAGs. La siguiente banda a 1338 cm^{-1} surge de las vibraciones de la cadena lateral CH_2 y

es sensible a la estructura helicoidal del colágeno tipo II. A continuación, el intervalo espectral entre 1300-1200 cm^{-1} está relacionado con la vibración del grupo funcional amida III del colágeno. En seguida, la banda de absorción entre 1180-1140 cm^{-1} , está relacionada con las vibraciones de extensión C-O de los residuos de carbohidratos correspondientes a los PGs. Finalmente, la banda de absorción en el intervalo de 1140-984 cm^{-1} , está asociada con las vibraciones de extensión C-O de los residuos de carbohidratos en colágeno y PGs, principalmente el agregano [10, 11].

Por otra parte, en la Figura 3 podemos observar las imágenes obtenidas en el mapeo bioquímico mediante micro-espectroscopía FTIR. La Figura 3A muestra la imagen visible de un condrocito, en el cual se analizaron las imágenes FTIR. El total de las imágenes de absorbancia a partir de los espectros FTIR, están presentes en las Figuras 3B-3F, en las que se observan los mapas bioquímicos de lípidos (1747-1737 cm^{-1}), amida I (1675-1624 cm^{-1}), GAGs (1380 cm^{-1}), colágeno tipo II (1338 cm^{-1}) y agregano (1140-984 cm^{-1}). Cada imagen representa la absorbancia integrada de una banda específica del espectro IR para cada píxel del detector MCT, y los colores rojo y azul representan una absorción fuerte y débil respectivamente del haz IR.

El área de mayor absorbancia para lípidos se encuentra dentro de la célula, en el área citoplásmica (Figura 3B), mientras que la absorbancia de amida I, está concentrada en la MEC próxima al condrocito y con menor intensidad en la membrana celular del condrocito (Figura 3C). De la misma forma, los GAGs (Figura 3D), el colágeno tipo II (Figura 3E) y el agregano (Figura 3F), mostraron una mayor absorbancia en la MEC y una menor intensidad intracelularmente.

IV. DISCUSIÓN

Mediante micro-espectroscopía FTIR, fue posible caracterizar bioquímicamente los condrocitos cultivados autólogos, al obtener espectros de absorción característicos de tejido cartilaginoso, observando bandas correspondientes a macromoléculas como proteínas, colágeno tipo II y PGs (principalmente agregano) [10], resultados que concuerdan con Yin y Xia en el 2011 [11], los cuales estudiaron las distribuciones químicas y estructurales de los componentes celulares que rodean a los condrocitos en el cartílago humeral canino, observando bandas relacionadas con amida I, II y III, colágeno tipo II y carbohidratos. Así mismo, nuestros resultados son similares a los reportados por Rieppo y cols. (2017), quienes analizaron el cartílago articular humano [12], pero ninguno de los estudios previos ha reportado la banda correspondiente a lípidos.

Respecto al mapeo bioquímico, en la región de lípidos (Figura 3B) observamos mayor intensidad intracelularmente, lo cual concuerda con Villalba y cols. (2013), quienes refieren que estas moléculas están sobrerreguladas durante la condrogénesis y que la biosíntesis de colesterol es necesaria para este proceso en la placa de crecimiento ósea normal [13]. Así mismo, en la región amida I la cual está relacionada con

el colágeno maduro [12], se detectó mayor absorbancia en la MEC (Figura 3C), lo cual es congruente con la mayor actividad metabólica de los condrocitos cultivados [3] y con el colágeno total que se encuentra en la MEC reportado por Camacho y cols. (2001) [14].

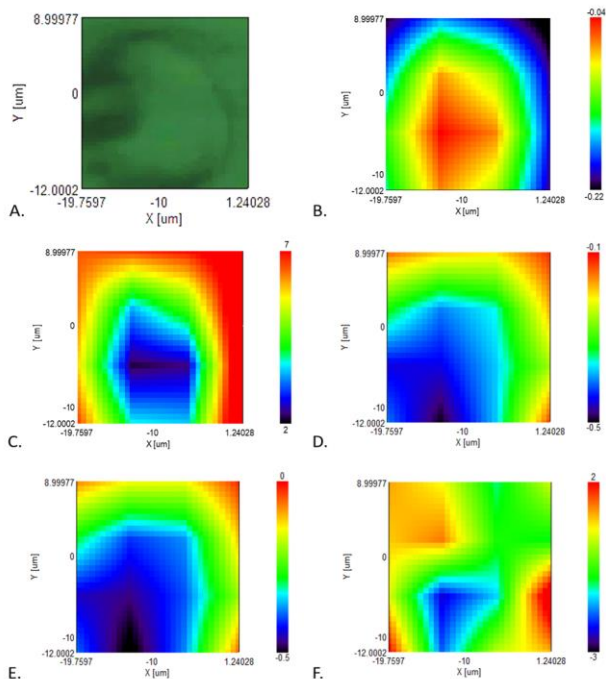


Fig. 3. Imágenes de absorbancia a partir de los espectros FTIR de un condrocito cultivado (A), en las que se observan los mapas bioquímicos. **B.** Lípidos ($1747\text{-}1737\text{ cm}^{-1}$) **C.** Amida I ($1675\text{-}1624\text{ cm}^{-1}$) **D.** Glicosaminoglicanos (1380 cm^{-1}) **E.** Colágeno tipo II (1338 cm^{-1}) **F.** Agrecano ($1140\text{-}984\text{ cm}^{-1}$).

De la misma manera, para la región de GAGs (hialuronano, queratán y condroitín sulfato) los cuales son componentes principales de las fibras de colágeno y de la MEC, así como para la región del colágeno tipo II, se observa mayor absorbancia extracelularmente (Figura 3D y 3E), lo cual reitera la actividad metabólica de los condrocitos cultivados y la presencia de estas biomoléculas en la MEC. Finalmente, la región del agrecano (Figura 3F) muestra mayor absorbancia en la MEC en relación a los GAGs y al colágeno, y esto se correlaciona con lo reportado por Sophia Fox y cols. en el 2009, quienes reportan que el agrecano es el proteoglicano más grande y abundante, con más de 100 cadenas de sulfato de condroitina y de queratina que se caracterizan por su capacidad para interactuar con el hialuronano para formar grandes agregados de PGs por enlaces proteicos [15], reforzando la capacidad de los condrocitos cultivados para producir estas biomoléculas.

V. CONCLUSIÓN

La micro-espectroscopía FTIR y su función de mapeo IQ, permiten caracterizar bioquímicamente y analizar la distribución biomolecular en condrocitos cultivados, infiriendo viabilidad técnica para caracterizar de una forma

rápida y no destructiva, células cultivadas previo a un implante celular. Requiriéndose más ensayos con otros linajes celulares y tejidos para fortalecer su aplicación biológica.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al “Programa Presupuestario A022-2017” y a los Doctores en Ciencias Raúl Jacobo Delgado Macuil y Marlon Rojas López por los apoyos otorgados en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.M. Mata-Miranda, L.E. Paredes-González, C.M. Martínez-Martínez, G.J. Vázquez-Zapién, “Implante de condrocitos autólogos con potencial regenerativo en lesiones articulares”, *Rev Colomb Ortop Traumatol*, vol.29, no. 1, pp. 28-35, 2015.
- [2] N. Okumura, S. Imai, F. Toyoda, E. Isoya, K. Kumagai, H. Matsuura, Y. Matsusue, “Regulatory role of tyrosine phosphorylation in the swelling-activated chloride current in isolated rabbit articular chondrocytes”, *J Physiol*, vol. 587, no.15, pp. 3761–3776, 2009.
- [3] M.M. Mata-Miranda, C.M. Martínez-Martínez, J.E. Noriega-González, L.E. Paredes-González, G.J. Vázquez-Zapién, “Morphological, genetic and phenotypic comparison between human articular chondrocytes and cultured chondrocytes”, *Histochem Cell Biol*, vol.146, no. 2, pp. 183-189, 2016.
- [4] A. Tekari, R. Luginbuehl, W. Hofstetter, R.J. Eglil, “Chondrocytes expressing intracellular collagen type II enter the cell cycle and co-express collagen type I in monolayer culture”, *J Orthop Res.*, vol. 32, no. 11, pp. 1503-1511, 2014.
- [5] E.A. Noyszewski, K. Wroblewski, G.R. Dodge, S. Kudchodkar, J. Beers, A.V.S. Sarma, R. Reddy, “Preferential incorporation of glucosamine into the galactosamine moieties of chondroitin sulfates in articular cartilage explants”, *Arthritis Rheum.*, vol. 44, no. 5, pp. 1089–1095, 2001.
- [6] M.J. Lammi, J. Häyriinen, A. Mahonen, “Proteomic analysis of cartilage- and bone associated samples”, *Electrophoresis*, vol. 27, no.3, pp. 2687–2701, 2006.
- [7] Y. Chen, C. Zou, M. Mastalerz, S. Hu, C. Gasaway, X. Tao, “Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences”, *Int J Mol Sci.*, vol. 16, No. 12, pp. 30223-30250, 2015.
- [8] G.J. Vázquez-Zapién, M.M. Mata-Miranda, V. Sánchez-Monroy, R.J. Delgado-Macuil, D.G. Pérez-Ishiwara, M. Rojas-López. “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.
- [9] H. Sreedhar, V.K. Varma, P.L. Nguyen, B. Davidson, S. Akkina, G. Guzman, S. Setty, A. Kajdacsy-Balla, M.J. Walsh, “High-definition Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic imaging of human tissue sections towards improving pathology”, *J Vis Exp.*, vol. 95, pp. 1-10, 2015.
- [10] Y. Zhang, F. Wang, H. Tan, G. Chen, L. Guo, L. Yang, “Analysis of the mineral composition of the human calcified cartilage zone”, *Int J Med Sci.*, vol. 9, no.5, pp. 353–360, 2012.
- [11] J. Yin, Y. Xia, “Chemical visualization of individual chondrocytes in articular cartilage by attenuated-total-reflection Fourier Transform Infrared Microimaging”, *Biomed Opt Express*, vol.2, no.4, pp. 937–945, 2001.
- [12] L. Rieppoa, J. Töyräs, S. Saarakkalaa, “Vibrational spectroscopy of articular cartilage”, *Appl Spectrosc Rev*, vol, 52, no. 3, pp. 249-266, 2017.
- [13] A. Villalvilla, R. Gómez, R. Largo, G. Herrero-Beaumont, “Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage”, *Int J Mol Sci.*, vol. 14, no.10, pp. 20793–20808, 2013.
- [14] N.P. Camacho, P. West, P.A. Torzilli, R. Mendelsohn, “FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage”, *Biopolymers*, vol. 62, no.1, pp. 1–8, 2001.
- [15] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S. A. Rodeo, “The basic science of articular cartilage structure, composition and function”, *Sports Health.*, vol. 1, no. 6, pp. 461–468, 2009.