

LA MICROESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIRM) EN EL ESTUDIO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

GUILLERMO BARRAZA-GARZA^a, LAURA A. DE LA ROSA^a, ALEJANDRO MARTÍNEZ-MARTÍNEZ^a,
HIRAM CASTILLO-MICHEL^b, MARINE COTTE^b, EMILIO ALVAREZ-PARRILLA^{a*}

(Recibido Julio 2013; Aceptado Septiembre 2013)

ABSTRACT

Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM) is a recent technique that, over the last decade, has become more popular for the study of biological systems. It is the result of the union between FTIR spectroscopy and optical microscopy. The use of synchrotron radiation offers a significant gain in terms of brightness but recent developments on optics (ATR) and detectors (FPA) allow as well an important expansion of the technique in laboratories. In both cases, micrometric resolution can be reached. The generated optical image allows studying a particular area and uses the mid-infrared radiation (2.5 to 15 μm / 4000 to 650 cm^{-1}) to detect vibrational movements from the molecular groups present in biological samples. FTIRM results allow us to observe the biochemical state of a sample, and provide us with information about all molecules present therein, allowing identification, semi-quantification and precise localization of one or more relevant molecules. In this way it is possible to identify cells from different species or in different metabolic stages, or to analyze the biochemical changes generated in the samples under diverse experimental conditions. This review aims to inform about FTIRM, giving a general prospect of the technique and citing several studies made with it in various biological systems. *www.relaquim.com*

Key words: infrared, microspectroscopy, FTIRM, spectroscopy, biological systems

RESUMEN

La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) es una técnica reciente que ha cobrado auge en el estudio de sistemas biológicos. Esta técnica es el resultado de la unión de la espectroscopia de infrarrojo (FTIR) con la microscopia óptica. El uso de la radiación de sincrotrón ofrece ventajas significa-

^aDepartamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envoltente del PRONAF y Estocolmo s/n, Ciudad Juárez, Chihuahua, CP 32310, México.

^bX-ray and Infrared Microspectroscopy Beamline ID21, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble Cedex, B.P. 220, France

*autor de correspondencia: Dr. Emilio Alvarez-Parrilla. e-mail: ealvarez@uacj.mx, tel: +52(656)6881800 ext 1562. Fax: +52(656)6881821.

tivas en términos de brillantez, pero los recientes desarrollos en óptica (ATR) y en detectores (FPA) han permitido la expansión de esta técnica en los laboratorios. En ambos casos se pueden alcanzar resoluciones en la escala de los micrómetros. La imagen óptica generada permite delimitar un área de estudio y se usa a la radiación del infrarrojo medio (2.5 a 15 μm / 4000 a 650 cm^{-1}) para detectar los movimientos vibracionales de los grupos moleculares presentes en muestras biológicas. Los resultados que se obtienen permiten observar el estado bioquímico de una muestra, además de obtener información de todas las moléculas presentes en la misma lo cual permite la identificación, semi-cuantificación y precisa localización de una o varias moléculas de interés al interior de la célula o tejido. De esta manera se pueden identificar células de diferentes especies o en diversos estados metabólicos también se pueden analizar las variaciones bioquímicas generadas bajo diversas condiciones a las que sea sometida una muestra. Esta revisión informa sobre la FTIRM, dando un panorama general de la técnica y citando a varios estudios realizados con la misma en diversos sistemas biológicos. www.relaquim.com

Palabras clave: infrarrojo, microespectroscopía, FTIRM, espectroscopia, sistemas biológicos

Generalidades de la FTIRM

El estudio de los procesos bioquímicos que ocurren en células y tejidos ha visto un avance acelerado en las últimas décadas, debido en gran parte a la creación y mejora de métodos novedosos para el estudio de sistemas biológicos, que ayudan a enriquecer y complementar la información permitiendo una mejor comprensión de los fenómenos moleculares que ocurren en los seres vivos (Miller & Dumas, 2010). Una de estas técnicas es la microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM por sus siglas en inglés), que surgió de la integración de la microscopía óptica y la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés), permite realizar un análisis global del estado bioquímico de la célula, monitoreando los niveles de las principales biomoléculas presentes en el interior de la célula (Walker *et al.*, 2009). La espectroscopia FTIR es una herramienta muy poderosa y bastante conocida. El principio básico de esta técnica se basa en la excitación de gru-

pos moleculares por un haz de luz infrarroja (2.5 a 15 μm ; equivalentes a número de onda comprendido entre 4000 a 650 cm^{-1}), que genera movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula (Carr & Williams, 1997; Kowalskaa & Gajdab, 2012). Los movimientos vibracionales se distinguen por el tipo de desplazamiento generado en los enlaces, conociéndose como vibraciones de tensión o flexión. Las tensiones provocan un estiramiento o estrechamiento del enlace y las flexiones generan una deformación del enlace (figura 1). Si el número de átomos que forman un enlace es de tres o más, los movimientos también pueden presentarse como simétricos y antisimétricos (Bonda *et al.*, 2011; Gazi *et al.*, 2005; Miller & Dumas, 2010). Los movimientos simétricos se caracterizan porque los enlaces se desplazan en direcciones contrarias y los movimientos antisimétricos se caracterizan por un movimiento en la misma dirección o sentido (Gazi *et al.*, 2005; Miller & Dumas, 2010).

El análisis de una muestra por FTIR provee como resultado un espectro de absorción de infrarrojo el cual proporciona

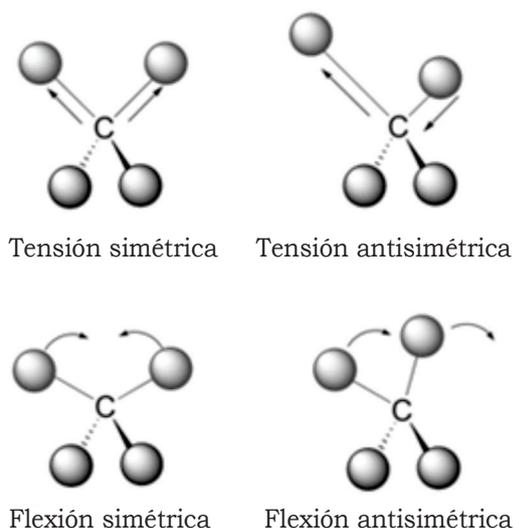


Figura 1. Movimientos vibracionales de tensión y flexión de los enlaces de un grupo metilo. (modificado de University of California Davis 2010).

información de la estructura y concentración molecular. Todas las moléculas pueden manifestar una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula, a este conjunto de señales se les conoce como la “huella dactilar” del compuesto (Colagar *et al.*, 2011; Matthäus *et al.*, 2008; Miller & Dumas, 2010). La mayoría de los componentes de un enlace químico tienen movimientos vibracionales con frecuencias dentro del infrarrojo medio (4000 a 650 cm^{-1}), moléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otras presentes en una muestra biológica tienen cada una un espectro de infrarrojo específico (Carr & Williams, 1997; Kowalskaa & Gajdab, 2012). La radiación es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional de la onda electromagnética usada es la misma que la del propio enlace, haciendo posible la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos (figura 2) (Bonda *et al.*, 2011; Didonna *et al.*, 2011). Estructuras químicas grandes

como es el caso de las biomoléculas tienen picos de absorción predecibles, los cuales pueden variar ligeramente dependiendo de las distintas interacciones moleculares y propiedades físicas de las muestras. El número de onda absorbida por un enlace vibracional depende de los átomos que forman el enlace, el tipo de enlace formado y el tipo de vibración inter e intramolecular (Bonda *et al.*, 2011; Miller & Dumas, 2010).

En muestras complejas como las biológicas el conocimiento de los distintos constituyentes permite identificar el origen de un enlace en particular en el espectro infrarrojo. Por ejemplo los enlaces C=O absorben el infrarrojo en un número de onda cercano a los 1650 cm^{-1} , las moléculas que contienen un número significativo de enlaces C=O como los presentes en los grupos amida de una proteína presentarán un pico de absorción en este número de onda. Si la muestra no fuese un tejido biológico y se observara dicha banda, esta correspondería a cualquier molécula presente en la muestra analizada, que contenga este grupo funcional, como amidas, ácidos carboxílicos, cetonas o aldehídos. Los espectros de absorción obtenidos de una muestra biológica normalmente son tomados en los números de onda comprendidos entre los 4000 cm^{-1} y 650 cm^{-1} , en donde se tienen dos principales zonas de interés, la primera abarca entre los $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ y 2800 cm^{-1} y la segunda entre los $\sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ y 900 cm^{-1} (Cuadro 1). En estos dos intervalos es donde se pueden observar la mayoría de los enlaces de interés biológico, siendo las biomoléculas las que generarán una mayor atención en los estudios con radiación infrarroja (Szczerbowska-Boruchowska *et al.*, 2007). Por ejemplo las principales bandas de absorción de los lípidos se encuentran en la región de 3000 a 2800 cm^{-1} donde las vibraciones de los enlaces C-H de los metilos se encuentran en las bandas 2956 y 2874 cm^{-1} , mientras las vibraciones de los CH₂ se encuentran en las bandas 2922 y 2852 cm^{-1} . Adicionalmente existe una

Cuadro 1. Valores de bandas de absorción de IR y los movimientos vibracionales que las provocan en los enlaces moleculares de mayor interés en estudios biológicos.

Moléculas	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de enlace	Tipo de vibración
Proteínas	3300	N-H (Amida A)	Tensión del enlace
	3100-3030	N-H (Amida B)	Tensión del enlace
	1660	C=O (Amida I)	Tensión del enlace
		C-N	Tensión del enlace
		N-H	Flexión del enlace
	1630	C=O (Amida I)	Tensión del enlace
	1545	N-H (Amida II)	Flexión del enlace
		C-N	Tensión del enlace
	1315	C-H	Vibraciones del esqueleto proteico
	1300-1230	Amida III	Mezcla compleja de desplazamientos
Lípidos	1140	C-N	Tensión del enlace
	2960	CH ₃ Asimétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2930	CH ₂ Asimétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2870	CH ₃ Simétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2850	CH ₂ Simétrico	Tensión simétrica del enlace
	1750-1720	C=O	Tensión del enlace
	1460	CH ₃ Asimétrico	Flexión asimétrica del enlace
	1440	CH ₃ Simétrico	Flexión simétrica del enlace
	1380	CH ₃ Simétrico	Flexión simétrica del enlace
	1170	COC	Flexión asimétrica del enlace
	1060	C=O	Tensión del enlace
	1035	C-H	Tensión del enlace
	Ácidos nucleicos	1240	P=O Asimétrico
1080		P=O Simétrico	Tensión simétrica del enlace
Carbohidratos	1170	COC	Flexión asimétrica del enlace
	1155	C-O	Tensión y flexión del enlace

banda de absorción entre los 1750 y 1720 cm^{-1} la cual corresponde al grupo éster presente en los lípidos. El espectro de los ácidos nucleicos también contiene grupos éster; pero las bandas correspondientes a estos se encuentran en los 1717 cm^{-1} para las purinas y los 1666 cm^{-1} en las pirimidinas, además en la región comprendida entre los 1000 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} contiene a los grupos fosfato antisimétricos (1224 cm^{-1}) y simétricos (1087 cm^{-1}) (Cuadro 1) (Miller & Dumas, 2010).

Los resultados que son obtenidos del análisis de la muestra se observan en forma de espectros de infrarrojo (figura 2). La interpretación de estos datos depende en gran medida del conocimiento de las propiedades espectroscópicas de la muestra (Jackson & Mantsch, 2000). Mientras el uso de espectros de IR para muestras puras es relativamente simple y directo, en la FTIRM, el análisis de células o tejidos biológicos es mucho más complejo, ya que

en este caso la técnica no solo detecta una sola molécula, sino que permite observar la composición química de toda la célula (Cakmak *et al.*, 2012).

La asignación de valores que indican alguna característica particular en un espectro de IR de una muestra biológica, es solo un parámetro de referencia ya que los valores de éstos varían entre las distintas muestras analizadas dependiendo de las características propias de la misma (Miller & Dumas, 2006).

Microespectrómetros

Los primeros microespectrómetros de infrarrojo para el análisis de áreas muy pequeñas, mediante el acoplamiento de un microscopio al espectrómetro, datan de mitad del siglo XX; pero la relación señal/ruido era tan baja que resultaba en una sensibilidad muy reducida, obteniéndose

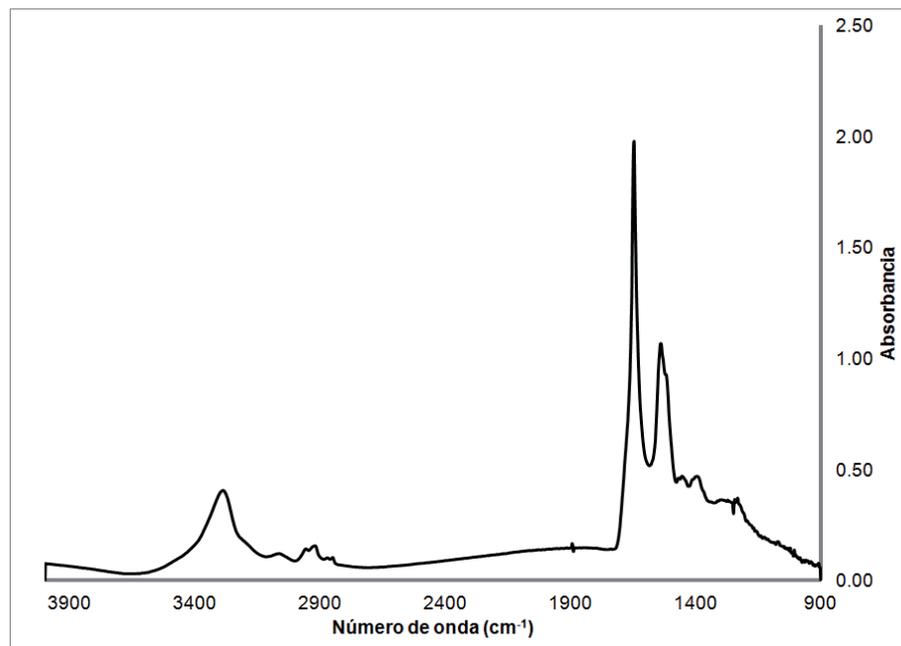


Figura 2. Espectro simple de un linfocito circular de rata, obtenido en un microscopio de IR (Thermo Nicolet Continuum) acoplado a un espectrómetro de FTIR (Thermo Nicolet Nexus). Imagen proporcionada por M. en C. Alejandra Vargas Caraveo.

espectros con muy baja resolución (Bellisola & Sorio, 2012). Sin embargo el desarrollo de nuevas fuentes de radiación infrarroja, por ejemplo la fuente de sincrotrón la cual puede dar haces de luz entre 10-3 μm^2 , nuevos desarrollos en óptica y detectores (p.ej., cristal de reflexión total atenuada con detectores de arreglo de plano focal) durante las últimas décadas permitió la unión definitiva entre la espectroscopia de infrarrojo y la microscopia convencional, permitiendo la creación de la microespectroscopia para su uso en sistemas tan complejos como las células y los tejidos de los seres vivos (Bellisola & Sorio, 2012; Miller & Dumas, 2010). La FTIRM presenta la ventaja de que la radiación emanada de estas fuentes no es ionizante, lo que permite extender los experimentos desde los milisegundos hasta varias horas de duración sin que exista una degradación del sistema estudiado (Bellisola & Sorio, 2012; Meade *et al.*, 2010; Miller & Dumas, 2010). La integración del microscopio óptico al espectrómetro FTIR, permitió el uso de una imagen para, generar un mapa a micro-escala de la muestra, permitiendo un análisis de la composición química de una muestra heterogénea como es el caso de una célula. Un espectro de FTIRM de una muestra biológica corresponde a la superposición del espectro individual de miles de constituyentes, por lo que su análisis implica serias dificultades. Sin embargo y a pesar de dicha complejidad se ha demostrado que la técnica es bastante sensible a pequeños cambios en la composición química de la célula (Bellisola & Sorio, 2012; Cakmak *et al.*, 2012; Miller & Dumas, 2010).

TÉCNICA DE FTIRM

Metodología básica

En términos generales, la FTIRM sigue los siguientes pasos: *a) análisis de la muestra, b) preparación de la muestra, c) interpretación y análisis de resultados.*

a) Análisis de las muestras.

Se realiza mediante la incidencia de un haz de luz infrarroja sobre la muestra, éste puede ser utilizado en modo de transmisión o reflexión del haz, el principal parámetro a tomar en cuenta es la relación señal/ruido. La calidad de los resultados obtenidos en estos experimentos varía dependiendo del tipo de fuente de radiación de infrarrojo utilizada y la relación señal/ruido obtenida de la fuente (Matthäus *et al.*, 2008; Miller & Dumas, 2006). Los dos tipos de fuentes de radiación de infrarrojo más comunes para los estudios de FTIRM son: la fuente termal convencional (p. ej., globar, que es una fuente de radiación de cuerpo oscuro) y la fuente de sincrotrón (Chwiej *et al.*, 2010). La principal diferencia entre estas fuentes de radiación es la divergencia, y como consecuencia la resolución espacial que se puede obtener con cada una de ellas. La resolución espacial es dependiente del número de onda utilizada y de la apertura por la cual atraviesa el haz de luz del instrumento óptico utilizado (Miller & Dumas, 2006). La apertura utilizada confina al haz de infrarrojo a explorar una zona de interés, el problema radica en generar un haz de luz que pueda generar resultados en los cuales la calidad señal/ruido sea la adecuada debido a que el número de onda del infrarrojo medio (4000 a 650 cm^{-1}) es muy cercana a las números de apertura utilizadas. La proporción señal/ruido va disminuyendo en función del tamaño de la apertura, generando un límite práctico de resolución espacial entre los 2 a 10 μm . Esto sucede debido a que la cantidad de fotones que llegan al detector disminuye conforme se aproxima al límite práctico (Miller & Dumas, 2010). Aquí es donde la radiación de sincrotrón juega un rol importante ya que a partir de la pequeña apertura (5 a 10 μm), es una fuente de 100 a 1000 veces más intensa que las fuentes convencionales, lo que permite que se puedan llevar a cabo ensayos en donde se requiere de una mejor relación señal/ruido

para obtener una mayor resolución espacial o espectral (Dumas *et al.*, 2006; Miller & Dumas, 2006). El haz de luz que se obtiene de este tipo de fuente de infrarrojo mejora de manera considerable los resultados obtenidos en estos estudios.

La radiación IR generada en un sincrotrón es emitida por electrones que son acelerados en una trayectoria circular por acción de magnetos posicionados alrededor de un anillo aislado en alto vacío. El haz extraído es de solo unos micrones y dentro de sí contiene el rango de las números de onda del espectro medio del IR, este haz después es focalizado e introducido en un espectrómetro FTIR como una fuente de radiación (Creagh *et al.*, 2006; Dumas *et al.*, 2006). En comparación una fuente IR de cuerpo oscuro (p.ej., globar) emite su radiación con una distribución de 360 grados, lo que se traduce en una menor eficiencia y brillantez de la fuente (Bellisola & Sorio, 2012). A pesar de que se puede obtener bastante información usando una fuente IR convencional, el uso de una fuente de sincrotrón mejora drásticamente los resultados que se pueden obtener en un estudio con FTIRM (Miller & Dumas, 2010).

El análisis de la muestra se completa cuando la señal es captada por un detector. Los microscopios de infrarrojo generalmente se encuentran equipados con detectores de telurio de mercurio-cadmio enfriados con nitrógeno líquido (MCT por sus siglas en inglés) (Bellisola & Sorio, 2012; Matthäus *et al.*, 2008; Miller & Dumas, 2010). Sin embargo los desarrollos más recientes en detectores de infrarrojo, han generado los detectores de arreglo de plano focal (FPA por sus siglas en inglés) que consisten de cientos de elementos detectores de infrarrojo, permitiendo obtener imágenes de grandes áreas con una alta resolución espacial significando un gran ahorro de tiempo en comparación de los detectores MCT, sin embargo en la actualidad los detectores FPA aún tienen una relación señal/ruido inferior a la de los detectores MCT (Kazarian

& Chan, 2013). Avances en el área prometen una mejora en los detectores FPA lo que permitirá tener mejores resoluciones espaciales y mayores avances técnicos en los estudios con células vivas, mejorando tanto la resolución, como los tiempos de observación (Miller & Dumas, 2010)

b) Preparación de la muestra.

Varía dependiendo del tipo de muestra utilizada, en el caso de trabajar con un tejido se llevan a cabo cortes de las muestras seleccionadas en micrótopo, estos cortes varían entre de 5 a 30 μm de grosor (Leskovjan *et al.*, 2009; Pijanka *et al.*, 2009), las muestras pueden ser usadas directamente o ser embebidas en una matriz para mantener su integridad. Sin embargo lo más recomendable es no utilizar muestras embebidas, ya que las matrices utilizadas absorben energía en la región del infrarrojo medio (2.5 a 15 μm) interfiriendo con las biomoléculas presentes en la muestra. Desafortunadamente, el uso de esta técnica de montaje es casi obligado, debido a que son pocas las muestras de tejido que pueden analizarse directamente tras el corte realizado por el micrótopo, por ello siempre es importante balancear la cantidad de ruido que generará el método de conservación de muestras en los resultados (Magne *et al.*, 2001; Miller & Dumas, 2006). Una vez obtenido el corte, la muestra será montada en un portamuestras para ser observada.

En función de su capacidad de permitir el paso de la energía, los portamuestras pueden ser de transmisión, reflexión de infrarrojo o con un cristal de reflexión total atenuada (ATR), dependiendo si permiten o no el paso de energía infrarroja. En el caso de utilizarse un método de transmisión de infrarrojo se requiere de un portamuestras el cual está fabricado con un material transparente a la radiación de infrarrojo, normalmente se usa fluoruro de calcio (CaF_2), fluoruro de bario (BaF_2), seleniuro de zinc (ZnSe), sulfuro de zinc (ZnS) o nitruro de silicio (Si_3N_4). En el caso de usar un

método de reflexión de infrarrojo se utilizan portamuestras con recubrimiento de oro o aluminio y otros cristales de baja emisión térmica (low-e). En el caso de utilizarse un cristal ATR, este permite realizar el estudio de células vivas y sin fijación, las células deben de cultivarse en placas hechas con ATR el cual permite la observación de las células en su medio con una alta resolución espacial, la única desventaja de este método es que solo se pueden observar 1 o 2 μm a partir de la superficie celular, por lo que zonas como el núcleo normalmente no pueden ser analizadas (Matthäus *et al.*, 2008; Miller & Dumas, 2010; Kazarian & Chan, 2013). Dependiendo del tipo de material se debe de tomar en cuenta el grosor de las muestras que pueden ser observadas, en el caso de transmisión el tamaño máximo recomendado es de 20 μm , cuando son usadas muestras para reflexión el tamaño es de 12 μm y si es utilizado ATR no existen límites establecidos de grosor ya que de esta manera solo pueden ser observados los primeros micrómetros que forman la muestra (Kazarian & Chan, 201; Miller & Dumas, 2010).

Cuando el experimento se realiza con células individuales en un medio acuoso, el procedimiento más utilizado es la fijación de la muestra para preservar los componentes estructurales y los constituyentes bioquímicos de las células lo más cercano posible a su estado nativo en vivo (Buriankova *et al.*, 2010; Pijanka *et al.*, 2009).

Uno de los métodos de fijación más utilizados es el secado al aire, donde la muestra se deja evaporar a temperatura ambiente, esperando la fijación de ésta en el portamuestras. Si bien el secado al aire permite tener muestras sin ninguna contaminación externa, puede causar una deslocalización de las biomoléculas como resultado de la tensión superficial asociada con la interfase aire-agua que se genera en la célula. La obtención de células de medios de cultivo con un pH estable para su posterior secado puede provocar cambios en la

presión osmótica de la célula, provocando variaciones de la estructura celular, ya que esta puede encogerse o su membrana celular se puede romper (Gazi *et al.*, 2005). Una técnica similar al secado al aire es el método de secado por centrifugación de la muestra, el cual reduce el tiempo de secado y por ende los efectos asociados con la interfase aire-agua. Sin embargo esta técnica parece modificar la localización espacial de las moléculas al interior de la célula (Tobin & Chesters, 2004).

Otros procedimientos comunes para la fijación de muestras son los procedimientos químicos, entre los que se encuentran la fijación por formalina (solución de formaldehído estabilizada con metanol), paraformaldehído y gluteraldehído-tetroxido de osmio, siendo la fijación por formalina la más común de ellas (Croxford *et al.*, 2011; Matthäus *et al.*, 2008). La formalina actúa como un fijador coagulante de proteínas, que tiende a preservar adecuadamente lípidos y proteínas, el alto contenido de agua de esta solución hace que esta técnica requiera de un secado adicional, para evitar el movimiento molecular. A pesar de que la fijación química es muy efectiva no siempre es utilizada, ya que algunos fijadores químicos absorben números de onda del infrarrojo medio afectando los resultados obtenidos. Un estudio reciente ha demostrado que el uso de la formalina como fijador no genera ruido considerable en las muestras y recomienda esta solución como fijador químico (Gazi *et al.*, 2005).

La fijación también es necesaria debido a que, una vez que son removidas de su medio de crecimiento, las células comienzan un proceso autolítico a menos que se aplique una fijación adecuada. El proceso autolítico comienza cuando las enzimas contenidas en los lisosomas inician la degradación de proteínas y la defosforilación de nucleótidos, fosfolípidos y proteínas. Este proceso también propicia la compactación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la fragmentación y condensación

citoplasmática. Los efectos de los procesos autolíticos son particularmente nocivos para aquellos estudios en los cuales se tiene el interés de estudiar una vía bioquímica específica al interior de la célula (Gazi *et al.*, 2005).

c) Interpretación y análisis de los resultados.

La interpretación de los espectros de infrarrojo requiere de un sofisticado análisis de datos el cual sigue evolucionando gracias al desarrollo de métodos de análisis multivariantes. Uno de los métodos más utilizados para el análisis de datos es conocido como análisis de componentes principales (PCA); este análisis requiere de un proceso matemático que transforma a un número de variables correlacionadas en un grupo más pequeño de variables no-correlacionadas llamadas componentes principales. Cada uno de estos componentes principales corresponde a la mayor variabilidad posible registrada en el grupo de datos analizados, siendo la primera componente la que contiene la mayor variabilidad y va disminuyendo en los subsecuentes (Bellisola & Sorio, 2012; Matthäus *et al.*, 2008; Miller & Dumas, 2010). Otro método común de análisis de datos es conocido como análisis de agrupamientos (clusters), el objetivo de este tipo de análisis es encontrar la mejor forma de agrupar datos multivariantes, lo suficiente como para encontrar agrupamientos significativamente distintos, pero que los datos al interior de cada agrupamiento sean similares. Para llevar a cabo este tipo de análisis se han desarrollado diferentes tipos de algoritmos los cuales se dividen en tres tipos: i) Los aglomerativos, en donde en cada paso del análisis se generan agrupamientos de datos; ii) Los divisorios, los cuales agrupan todos los datos obtenidos en un solo grupo inicial, el cual se va dividiendo en dos más con cada paso del análisis; iii) Los particionales, los cuales asignan los datos a distintos agrupamientos sin utilizar una jerarquización para la división (Didonna

et al., 2011; Matthäus *et al.*, 2008). La varianza observada en los datos obtenidos por estos análisis es resultado de las diferencias bioquímicas entre las muestras.

Existen ocasiones en las que algunas de estas variaciones también pueden ser resultado de efectos físicos, especialmente cuando el tamaño de las células es similar al número de onda utilizado, a este efecto se le conoce como fenómeno de dispersión de tipo Mie, el cual puede provocar distorsiones en la posición e intensidad de las bandas de absorción observadas (Miller & Dumas, 2010; Saulou *et al.*, 2010). La dispersión Mie puede resultar en una amplia oscilación sinusoidal en la línea base del espectro lo que puede llevar a distorsiones tanto en la posición como en la intensidad de la banda de absorción. Además la eficiencia de este análisis de dispersión es dependiente del índice de refracción de la muestras y cambia en el pase a través de una resonancia de absorción, en un efecto llamado “resonancia de dispersión Mie”. Por ejemplo un incremento en la dispersión Mie es observado comúnmente en células que se vuelven más redondeadas, debido a la acción de agentes citotóxicos (Bassan *et al.*, 2009; Kohler & Sule-Suso, 2008; Pijanka *et al.*, 2009).

USO DE LA FTIRM EN EL ESTUDIO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Como se ha mencionado, esta técnica genera información de utilidad en el estudio de sistemas biológicos. Debido a la mejora en la tecnología aplicada, su uso se ha diversificado. Los experimentos con FTIRM se pueden clasificar, en función del tipo de muestra analizada en el estudio, en dos grupos: estudios de tejidos (cuadro 2) y estudios celulares (cuadro 3). En los estudios de tejidos no se obtienen imágenes con las posiciones espaciales de las células analizadas, sino que se lleva a cabo un análisis estadístico de las poblaciones

celulares presentes en el tejido utilizado en el ensayo. Por otro lado, los estudios celulares tienen importantes implicaciones en la biomedicina, ya que además de evaluar el estado bioquímico de la célula, hace uso de imágenes observando la localización de moléculas de interés al interior de la misma, generando resultados de mayor precisión, los cuales son muy útiles en el estudio de vías bioquímicas e identificación de células.

En función de su objetivo, los estudios en células y tejidos podrían agruparse de la siguiente manera: i) Estudios que permiten detección de “huellas dactilares” bioquímicas y biomarcadores que permiten identificar células o tejidos con características específicas. ii) Caracterización química y estructural de una muestra en particular. iii) Identificación de variaciones bioquímicas presentes en dos o más condiciones. iv) Evolución de una ruta bioquímica. v) Mejoramiento de las capacidades metodológicas de la técnica.

Los estudios más prácticos realizados por medio de FTIRM son aquellos que buscan identificar biomarcadores o “huellas dactilares” bioquímicas; es decir, la identificación y reconocimiento de bandas espectrales específicas las cuales son constantes y corresponden a ciertas características únicas (Buriankova *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2010), esta aplicación, es una clara herencia de uno de los usos más extendidos de la FTIR, que es la identificación cualitativa de compuestos: ha permitido el uso de la FTIRM para identificar células de distintos tipos (Nakamura *et al.*, 2010) en distintas condiciones que van desde etapas celulares como la totipotencialidad y la apoptosis (Buriankova *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2010), enfermedad (Didonna *et al.*, 2011) y daño celular (Gautam *et al.*, 2012). Este tipo de análisis se usa principalmente para generar un proceso práctico y confiable que permita discriminar e identificar a una muestra específica. Mediante este tipo de estudios se han podido discriminar a levaduras pertenecientes a distintas cepas y

especies, analizando los espectros FTIRM en su conjunto, obteniendo resultados confiables en un periodo inferior a las 24 horas, en comparación con los 5 días requeridos para realizar este análisis discriminatorio con un equipo FTIR convencional (Wenning *et al.*, 2002). La identificación de “huellas dactilares” bioquímicas también ha permitido explorar los usos de la FTIRM como herramienta diagnóstica en la identificación de células cancerígenas (Bellisola & Sorio, 2012; Pijanka *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2008).

También existen estudios orientados a dilucidar cuales son los componentes químicos y estructurales específicos de células y tejidos, estos estudios no solo permiten saber la composición química de un muestra y determinar la concentración y proporcionalidad de sus componentes, en ocasiones esta información es novedosa ya que existen células y tejidos los cuales no habían sido caracterizados químicamente, como se aprecia en los cuadros 2 y 3, en estos casos se buscan moléculas que son conocidas y características de las células o tejidos de interés. Los tejidos cartilagosos han sido objeto de este tipo de estudios los cuales intentan determinar la composición y distribución de sus biomoléculas, observando el contenido y distribución del colágeno y proteoglicanos de la matriz extracelular en el tejido cartilaginoso bovino (Camacho *et al.*, 2001) y en condrocitos individuales de tejido articular canino (Yin & Xia, 2011). El conocimiento estructural obtenido se puede considerar el primer paso para una mejor comprensión del tejido y el desarrollo de estudios posteriores para profundizar en el conocimiento de tejidos cartilagosos, sus enfermedades y tratamientos (Camacho *et al.*, 2001; Yin & Xia, 2011). Así mismo se han desarrollado estudios en tejido vegetal con la finalidad de conocer su estructura, composición química y su calidad nutricional. Por ejemplo, se ha cuantificado la cantidad de polisacáridos y proteínas presentes en granos de interés

alimenticio, tales como trigo (Robert *et al.*, 2010), cebada (Saulnier *et al.*, 2009) y maíz (Walker *et al.*, 2009). En estos estudios se ha encontrado que variaciones en las concentraciones relativas de polisacáridos y proteínas influyen en la digestión en el rumen de becerros, observando que a una mayor cantidad de proteínas existe una menor absorción de polisacáridos (Saulnier *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2009). El conocimiento estructural y de componentes químicos no solo se limita a biomoléculas, existen padecimientos clínicos en los cuales participan otros componentes como los minerales. Por lo que el análisis de su nivel de oxidación y localización en un tejido puede ayudar al diagnóstico oportuno y preciso de padecimientos tales como osteoporosis y calcificación ectópica hepática (Boskey *et al.*, 2005; Dessombz *et al.*, 2011). En casos de la desmineralización ósea la concentración y composición mineral permite determinar el grado de severidad con el cual se presenta una enfermedad como la osteoporosis (Boskey *et al.*, 2005). Cuando la formación de cristales provoca daño a tejidos, el conocer la composición de los cristales presentes permite dilucidar la causa de su aparición y con ello poder generar tratamientos específicos (Dessombz *et al.*, 2011).

Algunos de los estudios más novedosos realizados por medio de FTIRM son aquellos que nos permiten comparar el estado bioquímico de células o tejidos en dos o más condiciones distintas. A diferencia de los tipos de estudios mencionados anteriormente aquí se da un gran énfasis en las variaciones de bandas de absorción IR específicas y su relación con las diversas condiciones estudiadas (Gautam *et al.*, 2012; Saulou *et al.*, 2010). Las bandas de absorción de mayor interés son las que corresponden a los grupos funcionales que forman a las principales biomoléculas: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, siendo las proteínas de particular interés. Kowalskaa y Gadjab en el 2012

estudiaron la modificación en la proporción entre hélices- α y láminas- β en ateromas de un modelo murino aterosclerótico provocado por cambios en la dieta utilizando un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina como suplemento en el alimento. El aumento en la banda de absorción correspondiente a las láminas- β también se ha visto relacionado con varios padecimientos neurodegenerativos tales como el Alzheimer (Leskovjan *et al.*, 2009), mal de Parkinson (Szczerbowska-Boruchowska *et al.*, 2007), enfermedad de Huntington (Bonda *et al.*, 2011) y enfermedades priónicas espongiiformes (Didonna *et al.*, 2011; Kretlow *et al.*, 2008). Modificaciones en el balance de estructuras secundarias se han relacionado con estados celulares como la apoptosis, en donde, en las fases iniciales del proceso, se ha observado un aumento en la proporción de proteínas con estructura de lámina- β (Buriankova *et al.*, 2010; Chio-Srichan *et al.*, 2008; Szczerbowska-Boruchowska *et al.*, 2007). Los cambios que ocurren en el conjunto de enlaces amida normalmente se encuentran asociados a variaciones en la concentración de proteína total o de algunas proteínas específicas de la muestra, debido principalmente a procesos de desnaturalización proteica (Chwiej *et al.*, 2010; Croxford *et al.*, 2011; Magne *et al.*, 2001) o a mecanismos de sustitución proteica como en el caso de la mineralización ósea, proceso que cambia la composición del tejido óseo, con un contenido proteico que disminuye conforme el hueso madura, hasta la mineralización completa del tejido (Boskey *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2008)

El análisis correspondiente a los lípidos se encuentra ligado al seguimiento del metabolismo lipídico, en particular al proceso de peroxidación lipídica el cual es un indicador del estrés oxidativo y la presencia de especies reactivas de oxígeno (Bonda *et al.*, 2011; Cakmak *et al.*, 2012; Chwiej *et al.*, 2010; Dulinska *et al.*, 2012). Existen distintas bandas de absorción que pue-

den ayudar al análisis de la peroxidación lipídica, entre las que se encuentran las bandas de 2958 cm^{-1} a 2921 cm^{-1} (Chwiej *et al.*, 2010) y 3012 cm^{-1} (Cakmak *et al.*, 2012). El proceso de peroxidación lipídica ha sido observado en tejidos ateroscleróticos (Kowalskaa & Gajdab, 2012), tejido cancerígeno (Chwiej *et al.*, 2010), tejido con daño tisular por radiación ionizante (Cakmak *et al.*, 2012), tejido con daño hepático (Gautam *et al.*, 2012) y con daño neurológico (Dulinska *et al.*, 2012).

El análisis de las números de onda correspondientes a los carbohidratos y ácidos nucleicos normalmente es usado para la cuantificación de dichas moléculas. Variaciones de estas biomoléculas normalmente se encuentran asociadas al tipo de muestra analizada, y también pueden deberse a la pérdida o fragmentación de las mismas. Como se había mencionado anteriormente las cuantificaciones de polisacáridos de membrana son importantes para determinar el valor nutritivo de una semilla como trigo (Robert *et al.*, 2010), cebada (Saulnier *et al.*, 2009) y maíz (Walker *et al.*, 2009). Kerr y colaboradores en el 2013 pudieron evaluar la pérdida de carbohidratos en la hoja de *E. camaldulensis* durante el proceso de putrefacción vegetal. Además se han estudiado carbohidratos en combinación con proteínas; observando la pérdida de proteoglicanos en matriz extracelulares, por acción de anticuerpos inductores de artritis reumatoide en ratones (Croxford *et al.*, 2011). Szczerbowska-Boruchowska y colaboradores en el 2007 asociaron la pérdida de material genético al daño sufrido por degradación y que al parecer se encuentra ligado a la desnaturalización de proteínas y oxidación de lípidos en la *substantia nigra* en casos de enfermedad de Parkinson.

A pesar de que la mayoría de los estudios se han limitado a observar condiciones puntuales, existen algunos estudios cinéticos, donde se ha llevado a cabo el seguimiento de señales específicas asociadas a

distintos procesos bioquímicos por periodos temporales extendidos, tal es el caso de los estudios de procesos de mineralización ósea (Cuadro 2) (Boskey *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2001), donde se estudiaron las concentraciones de grupos fosfato y carbonato a lo largo del tiempo. También se han estudiado procesos neurodegenerativos en los cuales el principal indicador al que se le da seguimiento, es la concentración de láminas- β en distintas etapas de un padecimiento (Kretlow *et al.*, 2008). También se han realizado este tipo de estudios en plantas, en donde se ha analizado el proceso de descomposición del follaje en presencia de hongos, monitoreando las bandas correspondientes a la amida I, a los carbohidratos y a la lignina (1530 cm^{-1} a 1480 cm^{-1}) (Kerr *et al.*, 2013).

Por último, existen diversos estudios que tienen por finalidad ampliar los conocimientos relacionados a la técnica, así como encontrar soluciones a problemas que aquejan a la FTIRM. Uno de los temas de mayor interés es el fenómeno de dispersión Mie. Ahora se sabe que el fenómeno de dispersión Mie puede generar una resonancia provocando otros artefactos de dispersión que se pensaban ajenos al fenómeno Mie, también se descubrió que el fenómeno de dispersión no solo está asociado a los bordes celulares, sino que es generado en buena medida por pequeños componentes celulares tales como el núcleo (Bassan *et al.*, 2009) y que la dispersión generada por el núcleo genera espectros de IR totalmente distintos al de toda la célula en su conjunto (Pijanka *et al.*, 2009). Este conocimiento ha permitido desarrollar estrategias adecuadas para poder separar la información generada por cambios bioquímicos de aquellos generados por fenómenos físicos por medio de soluciones matemáticas como es el caso del algoritmo RMieS-EMSC (Bassan *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2010). También se han llevado a cabo estudios para observar las ventajas y desventajas de distintos métodos de fijación, los cuales han sugerido

el uso de formalina como agente fijador es el más recomendable para los estudios realizados con FTIRM (Gazi *et al.*, 2005).

CONCLUSIÓN

La FTIRM pasó de ser una técnica con muchas limitaciones en sus inicios, para el estudio de sistemas biológicos, a una técnica que no se limita a corroborar la información experimental obtenida por otras técnicas, pero también se ha posicionado como una herramienta robusta que ha permitido el desarrollo de nuevas investigaciones. Como se ha podido observar, el uso de esta técnica para el estudio de sistemas biológicos es muy amplio, debido a su alta sensibilidad permite obtener información detallada de lo que ocurre con el estado bioquímico de células y tejidos bajo distintas condiciones, esto le permite la plasticidad suficiente para cumplir funciones desde herramienta diagnóstica y de identificación, hasta ayudarnos a dilucidar lo que ocurre en un proceso bioquímico específico a manera de estudio de punto final o en seguimiento a lo largo del tiempo. Gracias a ella podemos rastrear una multitud de moléculas sin necesidad de usar marcadores específicos, además el uso de una radiación no ionizante y por lo tanto, no destructiva, permite estudios en tiempo real con los que observamos el cambio de propiedades moleculares en el momento en que ocurren, y cómo éstos se relacionan con las distintas condiciones estudiadas.

La utilización de la fuente de sincrotrón le ha permitido superar las limitantes de resolución inherentes a la técnica FTIRM con fuente convencional (p. ej. global), la cual se enfrenta a problemas tales como la baja calidad señal/ruido. Sin embargo, el costo de llevar a cabo este tipo de experimentos con una fuente de sincrotrón aún es muy elevado, debido a los costos de mantenimiento y operación de las instalaciones utilizadas, a pesar de que con el paso del tiempo estos se han vuelto más

prácticos. Los resultados obtenidos no son fáciles de procesar ya que son una representación de todas las moléculas presentes en la muestra, la presencia de ruido en la señal y distintos artefactos (fenómeno de dispersión Mie), que, a pesar del desarrollo de herramientas matemáticas para el manejo de datos, aun representan problemas en la interpretación de los mismos. Todas estas ventajas y desventajas generan una técnica que aún se encuentra en constante crecimiento y evolución, generando nuevos estudios, aplicaciones, mejorando y optimizando los equipos y materiales utilizados, así como las técnicas para el análisis de datos. Por lo que sin duda es una técnica que vale la pena tomar en cuenta cuando se piense realizar cualquier nueva investigación que requiera del estudio de muestras biológicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONACYT, México (CB-2011-01-167932 y CB-2011-01-167164) por el financiamiento económico. Guillermo Barraza-Garza. Agradece a CONACYT (225974) por la beca para realizar sus estudios de Doctorado en Ciencias Químico Biológicas. Se agradece a M. en C. Alejandra Vargas Caraveo por la colaboración en la obtención de la figura 2.

Cuadro 2. Ejemplos aplicaciones de la técnica de FTIRM en el estudio de distintos tipos de tejidos.

Tipo de tejido	Objetivo	Tratamiento FTIRM	Fuente de sincrotrón	Números de onda estudiados (cm ⁻¹)	Referencia
Ateromas de raíz aortica murina.	Determinar las diferencias presentes en la composición bioquímica de los ateromas murinos con una dieta rica en lípidos y una dieta controlada.	Secciones de 10 µm embebidas en compuesto OCT y montadas en membrana de Mylar de 3.5 µm	Si	Bandas de lípidos: 2961 a 2929 cm ⁻¹ Banda de lámina β: 1634 cm ⁻¹ Banda de hélice α: 1656 cm ⁻¹ Bandas para detección de calcio: 1347, 957 y 718 cm ⁻¹	(Kowalskaa & Gajdab, 2012)
Capas CA3 y DG del hipocampo de cerebro de rata.	Análisis topográfico y bioquímico del daño generado al hipocampo tras ataques epilépticos inducidos por pilocarpina	Secciones de 10 µm de grosor montadas en portaobjetos Low-e	Si	Bandas de estructuras secundarias proteicas β: 1657 a 1548 cm ⁻¹ Fosfolípidos: 2958 cm ⁻¹ y 2921 cm ⁻¹	(Chwiej <i>et al.</i> , 2010)
Dentina humana	Mineralización de la dentina y composición proteica del tejido durante el proceso de mineralización	Secciones de 2 µm de grosor montada entre dos ventanas transparentes a IR (BaF ₂)	No	Bandas de los enlaces amida I, amida II, amida A y amida B de proteínas Bandas relacionadas con la apatita: 1200 cm ⁻¹ a 900 cm ⁻¹	(Magne <i>et al.</i> , 2001)
Endospermo de trigo	Determinar la calidad nutricional de los granos de trigo cuantificando los polisacáridos presentes en la pared celular del endospermo	Secciones de 50 µm de grosor cubiertas en portaobjetos transparente a IR (ZnSe)	Si	Bandas de absorción relacionadas a arabinosilanos y betaglucanos: 1160, 1070 y 1025 cm ⁻¹	(Saulnier <i>et al.</i> , 2009)
Endospermos de maíz y distintas variedades de cebada.	Composición proteica y de carbohidratos presentes en el endospermo y su correlación con la degradación en el rumen	Semillas embebidas en agua destilada, Secciones de 6 µm de grosor montadas en portaobjetos Low-e. Microespectroscopia en modo de reflectancia.	No	Banda amida I: 1710 a 1530 cm ⁻¹ Banda Almidón: 1065 a 950 cm ⁻¹ Banda de lámina β: 1630 cm ⁻¹ Banda de hélice α: 1655 cm ⁻¹	(Walker <i>et al.</i> , 2009)

Cuadro 2. *Continúa*

Tipo de tejido	Objetivo	Tratamiento FTIRM	Fuente de sincrotrón	Números de onda estudiados (cm ⁻¹)	Referencia
<i>Substantia nigra</i> (SN) de cerebro humano.	Comparación morfológica y de composición en la <i>substantia nigra</i> del cerebro de pacientes normales y con mal de Parkinson.	Secciones de 20 µm de grosor cubiertas por membranas de polímero (MOXTEK, Inc) recubiertas con aluminio transparentes a IR	Si	Bandas de los enlaces amida I, amida II, amida A y amida B de proteínas: 3300, 3100, 1655 y 1545 cm ⁻¹ Bandas de ácidos nucleicos: 1240 y 1080 cm ⁻¹ Banda de tensión del grupo éster carbonilo: 1740 cm ⁻¹	(Szczerbowska-Boruchowska et al., 2007)
Tejido cartilaginoso bovino.	Análisis de los componentes principales del cartilago articular (colágeno tipo II y proteoglicano) y su identificación por medio de FTIRM	Secciones de 6 µm embebidas en compuesto OCT en portamuestras transparentes a IR (BaF ₂) y remoción de OCT por medio de agua.	No	Bandas relacionadas al colágeno: 3300 cm ⁻¹ , 1655 cm ⁻¹ , 1550 cm ⁻¹ y 1250 cm ⁻¹ Bandas relacionadas al agregano: 1640 cm ⁻¹ , 1545 cm ⁻¹ , 1245 cm ⁻¹ , 1125 a 920 cm ⁻¹ y 850 cm ⁻¹	(Camacho et al., 2001)
Tejido cerebral murino	Observar la formación de placas amiloides en un modelo murino (PSAPP) en presencia de iones metálicos	Secciones de 30 µm de grosor cubiertas por membranas transparentes a IR	Si	Banda del enlace amida II de proteínas: 1580 cm ⁻¹ a 1490 cm ⁻¹	(Leskovjan et al., 2009)
Tejido corneo humano	Utilizar a la FTIRM como una técnica para generar nuevos biomarcadores que permitan la identificación de células madre en tejido corneo	Secciones de 10 µm de grosor montadas en portaobjetos transparentes a IR (BaF ₂)	Si	Bandas de ácidos nucleicos: 1425 a 900 cm ⁻¹ Bandas de proteínas y lípidos: 1800 a 1480 cm ⁻¹	(Nakamura et al., 2010)
Tejido estriatal de materia gris cerebral de rata	Observar el proceso de cambio bioquímico presentado en un modelo animal de enfermedad de Huntington a lo largo de un periodo de hasta 8 semanas.	Secciones de 7 µm de grosor montadas en portaobjetos low-e	Si	Bandas lipídicas: 3000 cm ⁻¹ a 2800 cm ⁻¹ Banda amida I: 1700 a 1600 cm ⁻¹ Banda de grupo fosfato asimétrico: 1240 cm ⁻¹ a 1235 cm ⁻¹	(Bonda et al., 2011)

Cuadro 2. *Continúa*

Tipo de tejido	Objetivo	Tratamiento FTIRM	Fuente de sincrotrón	Números de onda estudiados (cm ⁻¹)	Referencia
Tejido hepático humano	Caracterización química de los distintos tipos de calcificación ectópica que se presentan en el hígado.	Secciones de 5 µm embebidas en parafina en portaobjetos low-e	Si	Banda relacionada a sílica amorfa: 1102 cm ⁻¹ Bandas relacionadas al urato sódico: 3600 y 1004 cm ⁻¹ Bandas asociadas a fosfatos de calcio: 1080 y 1025 cm ⁻¹	(Dessombz <i>et al.</i> , 2011)
Tejido hepático y suero sanguíneo murino	Identificación de biomarcadores relacionados al daño tisular en hígado provocado por el acetaminofén.	Secciones de 4 µm de grosor montadas en portaobjetos low-e Muestra de 2 µl de suero sanguíneo diluido en 5 µL de agua, secado al aire y montados en un portaobjetos low-e	No	Bandas asociadas al glucógeno: 1152, 1080 y 1030 cm ⁻¹ Bandas asociadas al colesterol y fosfolípidos: 1171 y 1152 cm ⁻¹ Bandas de proporcionalidad de ácidos nucleicos: 996 y 966 cm ⁻¹	(Gautam <i>et al.</i> , 2012)
Tejido neuronal del hipocampo de cerebro de rata.	Analizar el posible rol de la creatina en el proceso epileptogénico, en función de la creatina presente en el hipocampo.	Secciones de 10 µm de grosor montadas en portaobjetos low-E.	Si	Bandas relacionadas a creatina: 2800, 1621, 1398 y 1304 cm ⁻¹	(Dulinska <i>et al.</i> , 2012)
Tejido óseo intersticial de conejo	Determinar la cantidad de tiempo requerida para que la matriz ósea alcance el límite fisiológico de maduración	Secciones de 4 µm depositadas en placas de aluminio	Si	Banda amida I: 1688 cm ⁻¹ a 1623 cm ⁻¹ Banda grupo fosfato: 650 a 500 cm ⁻¹ Banda grupo carbonato: 905 a 825 cm ⁻¹	(Fuchs <i>et al.</i> , 2008)
Tejido osteoporótico del hueso de la cresta iliaca.	Comparación de la variación espacial y temporal en la concentración de minerales en distintos casos de osteoporosis	Secciones de 3 a 5 µm de grosor embebidas en poli-metilmetacrilato (PMMA) en portamuestras transparentes a IR (BaF ₂)	No	Banda amida I: 1650 cm ⁻¹ Banda relacionada a grupo carbonato: 890 cm ⁻¹ a 855 cm ⁻¹ Bandas grupos fosfato: 1030 a 1020 cm ⁻¹ Banda relacionada al fosfato ácido: 1120 cm ⁻¹	(Boskey <i>et al.</i> , 2005)

Cuadro 2. *Continúa*

Tipo de tejido	Objetivo	Tratamiento FTIRM	Fuente de sincrotrón	Números de onda estudiados (cm ⁻¹)	Referencia
Tejidos neuronales de materia blanca y materia gris de rata	Determinar el efecto radio-protector de la aminofostina en el tejido cerebral, observando los cambios presentados en la bioquímica celular	Secciones de 12 µm de grosor montadas en portaobjetos transparente a IR (BaF ₂)	Si	Banda amida II: 1555 a 1535 cm ⁻¹ Bandas relacionadas a lípidos: 2960 a 2950 cm ⁻¹ , 2930 a 2915 cm ⁻¹ , 1745 a 1731 cm ⁻¹ , 3027 a 3000 cm ⁻¹ , 2994 a 2800 cm ⁻¹	(Cakmak <i>et al.</i> , 2012)
Hojas del árbol "River Redgum" (<i>E. camaldulensis</i>)	Determinación de la composición química de las hojas a lo largo de los procesos de descomposición en medio acuático y terrestre	Secciones de 8 µm montadas en portamuestras de CaF ₂ , recubiertas de poli-L-Lisina	Si	Bandas proteicas amida I y amida II y amida III: 1660 a 1640 cm ⁻¹ , 1550 a 1535 cm ⁻¹ y 1320 cm ⁻¹ Bandas relacionadas a pectina: 1732 y 1616 cm ⁻¹ Bandas relacionadas a lignina: 1740, 1665, 1592, 1503 y 1230 cm ⁻¹ Bandas de carbohidratos: 1180 a 950 cm ⁻¹ Bandas relacionadas a taninos: 1727, 1612 y 1513 cm ⁻¹	(Kerr <i>et al.</i> , 2013)

Cuadro 3. Ejemplos de aplicaciones de la técnica de FTIRM en el estudio de distintos tipos de células.

Tipo de célula	Objetivo	Tratamiento FTIRM	Fuente de sincrotrón	Números de onda estudiados (cm ⁻¹)	Referencia
Células Calu-1	Evaluar la contribución exacta del núcleo celular al fenómeno de dispersión Mie	Secciones de 0.5 µm de una muestra de núcleos celulares embebidos en resina Spurr y montados en portaobjetos low-e	Si	Bandas de enlaces metálicos pertenecientes a lípidos: 3000 cm ⁻¹ a 2820 cm ⁻¹ Enlaces C=O de lípidos: 1740 cm ⁻¹ y 1060 cm ⁻¹	(Pijanaka <i>et al.</i> , 2009)
Células Calu-1 y NL20	Diagnóstico de cáncer, usando líneas celulares teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) y Papanicolaou (Pap)	Secciones de 0.5 µm de una muestra de núcleos celulares embebidos en resina Spurr y montados en portaobjetos low-e	Si	Bandas relacionadas con la presencia de tintaciones: 2920 a 2850 cm ⁻¹ , 1740 cm ⁻¹ y 1530 a 1513 cm ⁻¹	(Pijanaka <i>et al.</i> , 2010)
Células cervicales humanas	Generar una "huella dactilar" bioquímica que permita identificar células premalignas de cáncer cervical	Muestra de 200 µL montada en un portaobjetos low-e y secada a temperatura ambiente	No	Banda amida II: 1540 cm ⁻¹ Banda asociada a glicoproteínas: 1380 cm ⁻¹ Banda amida III: 1260 cm ⁻¹ Banda de carbohidratos: 1155 cm ⁻¹ Bandas de grupos fosfato: 1225 y 1080 cm ⁻¹	(Walsh <i>et al.</i> , 2008)
Células de transferencia del endospermo de trigo.	Caracterización de los polisacáridos y composición de las paredes de las celulares de transferencia del endospermo	Secciones de 6 a 8 µm embebidas en parafina y depositadas en portamuestras transparente a IR (ZnS)	Si	Bandas correspondientes a polisacáridos: 1200 cm ⁻¹ a 800 cm ⁻¹	(Robert <i>et al.</i> , 2010)
Células estriales E16 de rata	Observar el proceso de cambio bioquímico presentado en un modelo animal de enfermedad de Huntington a lo largo de un periodo de hasta 8 semanas.	Células cultivadas en portamuestras transparentes a IR (CaF ₂) y fijadas con etanol	Si	Bandas lipídicas: 3000 cm ⁻¹ a 2800 cm ⁻¹ Banda amida I: 1700 a 1600 cm ⁻¹ Banda de grupo fosfato asimétrico: 1240 cm ⁻¹ a 1235 cm ⁻¹	(Bonda <i>et al.</i> , 2011)
Células del ganglio dorsal (DRG) de hámster	Caracterización proteica durante distintas etapas de la enfermedad neurodegenerativa conocida como "scrapie" o tembladera	Secciones de 10 µm de grupos cubiertas en portamuestras transparentes a IR (CaF ₂)	Si	Banda de hélice α: 1658 cm ⁻¹ a 1654 cm ⁻¹ Banda de lámina β: 1636 cm ⁻¹ a 1616 cm ⁻¹	(Kretlow <i>et al.</i> , 2008)

Cuadro 3. *Continúa*

Tipo de célula	Objetivo	Tratamiento FTIRM	Fuente de sincrotrón	Números de onda estudiados (cm ⁻¹)	Referencia
Células GT1-1 de hipotálamo sanas e infectadas	Proponer a la FTIRM como una nueva herramienta para la identificación de células infectadas con priones observando las variaciones bioquímicas generadas por estos.	Células cultivadas en un placa de nitruro de silicio (Si ₃ N ₄) y fijadas con una solución de paraformaldehído 4%	Si	Banda amida I y II: 1700 cm ⁻¹ a 1480 cm ⁻¹ Banda de lípidos: 2990 cm ⁻¹ a 2828 cm ⁻¹ Banda asociadas a fosfolípidos: 1756 a 1717 cm ⁻¹	(Didonna <i>et al.</i> , 2011)
Células HeLa	Estudio del efecto anticancerígeno generado por la hipocrelina A, en células cancerosas en función del variaciones bioquímicas al interior de la célula.	Células cultivadas en placas low-e, posteriormente fijadas por solución de formalina 4% en PBS y secadas al aire.	Si	Banda de amida I y amida II: 1650 cm ⁻¹ y 1630 cm ⁻¹	(Chio-Srichan <i>et al.</i> , 2008)
Células PC3 y adipocitos humanos WT	Detectar la traslocación lipídica que se presenta entre adipocitos y células metastásicas de cáncer de próstata	Células cultivadas en placas low-e, posteriormente fijadas por solución de formalina 4%, post-fijadas con OsO ₄ 1% y secadas al aire a temperatura ambiente	Si	Detección del ácido palmítico marcado DA-31: 2250 a 2000 cm ⁻¹	(Gazi <i>et al.</i> , 2007)
Células U87-MG	Detección del proceso apoptótico en etapas tempranas usando hipericina como inductor	Células cultivadas en portamuestra low-e, posteriormente fijadas por solución de formalina 3.8% y secadas al aire a temperatura ambiente	Si	Banda amida I: 1650 cm ⁻¹ Banda amida II: 1633 cm ⁻¹	(Buriankova <i>et al.</i> , 2010)
Condrocitos de cartilago humeral canino	Distribución química y estructural de los componentes celulares de los condrocitos	Secciones de 6 µm de grosor montadas en portaobjetos low-e.	No	Banda amida I: 1656 a 1640 cm ⁻¹ Banda amida II: 1552 a 1544 cm ⁻¹	(Yin & Xia, 2011)
Condrocitos de tejido cartilaginoso de rata.	Determinar el daño ocasionado por anticuerpos inductores de artritis en tejido cartilaginoso de rata observando la pérdida de colágeno del tejido	Células en un portamuestras de cristal de germanio con características ATR Secciones de 5 µm embebidas en parafina y depositadas en portamuestras low-e	Si	Banda de amida I: 1670 a 1640 cm ⁻¹ Banda de ácidos nucleicos: 1240 cm ⁻¹ y 1080 cm ⁻¹	(Croxford <i>et al.</i> , 2011)

Cuadro 3. Continúa

Tipo de célula	Objetivo	Tratamiento FTIRM	Fuente de sincrotrón	Números de onda estudiados (cm ⁻¹)	Referencia
Levaduras de los géneros: <i>Candida</i> , <i>Clavispora</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> y <i>Torulaspota</i>	Generar un procedimiento estándar para la identificación de levaduras a partir de una "huella dactilar" bioquímica	Microcolonias de 70 a 250 µm de diámetro montadas en portamuestras transparente a IR (ZnSe)	No	No se usaron bandas específicas para alguna biomolécula, los espectros obtenidos fueron utilizados para observar "huellas dactilares" bioquímicas, haciendo énfasis en las siguientes áreas: 3030 a 2830 cm ⁻¹ , 1350 a 1200 cm ⁻¹ y 900 a 700 cm ⁻¹	(Wenning <i>et al.</i> , 2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Observar las diferencias en la composición proteica celular de <i>S. cerevisiae</i> expuestas a nano partículas de plata	Muestra de 20 µL de células sonificadas depositadas en un portaobjetos low-e y secadas a temperatura ambiente.	Si	Banda amida I: 1700 a 1600 cm ⁻¹ Banda amida II: 1600 a 1480 cm ⁻¹ Bandas de ácidos nucleicos: 1300 a 1180 cm ⁻¹ Bandas de carbohidratos: 1200 a 900 cm ⁻¹	(Saulou <i>et al.</i> , 2010)ultrastructure

REFERENCIAS

- Bassan, P., Byrne, H. J., Bonnier, F., Lee, J., Dumas, P., & Gardner, P. (2009). Resonant Mie scattering in infrared spectroscopy of biological materials--understanding the "dispersion artefact". *The Analyst* **134(8)**: 1586–1593.
- Bassan, P., Kohler, A., Martens, H., Lee, J., Byrne, H. J., Dumas, P., Gazi, E., *et al.* (2010). Resonant Mie scattering (RMieS) correction of infrared spectra from highly scattering biological samples. *The Analyst* **135(2)**: 268–277.
- Bellisola, G., & Sorio, C. (2012). Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *American journal of cancer research* **2(1)**: 1–21.
- Bonda, M., Perrin, V., Vilenó, B., Runne, H., Kretlow, A., Luthi-carter, R., Miller, L. M., *et al.* (2011). Synchrotron infrared micro-spectroscopy detects the evolution of Huntington's disease neuropathology and suggests unique correlates of dysfunction in white versus grey brain matter. *Analytical Chemistry* **83(20)**: 7712–7720.
- Boskey, A., DiCarlo, E., & Paschalis, E. (2005). Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high-and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. *Osteoporosis Int* **16(12)**: 2031–2038.
- Buriankova, L., Nadova, Z., Jancura, D., Refregiers, M., Yousef, I., Mikes, J., & Miskovsky, P. (2010). Synchrotron based Fourier-transform infrared microspectroscopy as sensitive technique for the detection of early apoptosis in U-87 MG cells. *Laser Physics Letters* **7(8)**: 613–620.
- Cakmak, G., Miller, L. M., Zorlu, F., & Severcan, F. (2012). Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: an FTIR microspectroscopic imaging study. *Archives of biochemistry and biophysics* **520(2)**: 67–73.
- Camacho, N. P., West, P., Torzilli, P. a, & Mendelsohn, R. (2001). FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers* **62(1)**: 1–8.
- Carr, G. L., & Williams, G. P. (1997). Infrared Microspectroscopy with Synchrotron Radiation source point. In "Accelerator-Based Infrared Sources and Applications", *SPIE Conf. Proc.* **v3153**: p. 51.
- Chio-Srichan, S., Réfrégiers, M., Jamme, F., Kascakova, S., Rouam, V., & Dumas, P. (2008). Photosensitizer effects on cancerous cells: a combined study using synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Biochimica et biophysica acta* **1780(5)**: 854–860.
- Chwiej, J., Dulinska, J., Janeczko, K., Dumas, P., Eichert, D., Dudala, J., & Setkowicz, Z. (2010). Synchrotron FTIR micro-spectroscopy study of the rat hippocampal formation after pilocarpine-evoked seizures. *Journal of chemical neuroanatomy* **40(2)**: 140–147.
- Colagar, A. H., Chaichi, M. J., & Khadjvand, T. (2011). Fourier transform infrared microspectroscopy as a diagnostic tool for distinguishing between normal and malignant human gastric tissue. *Journal of Biosciences* **36(4)**: 669–677.
- Creagh, D., McKinlay, J., & Dumas, P. (2006). The design of the infrared beamline at the Australian synchrotron. *Vibrational Spectroscopy* **41(2)**: 213–220.
- Croxford, A. M., Nandakumar, K. S., Holmdahl, R., Tobin, M. J., McNaughton, D., & Rowley, M. J. (2011). Chemical changes demonstrated in cartilage by synchrotron infrared microspectroscopy in an antibody-induced murine model of rheumatoid arthritis. *Journal of biomedical optics* **16(6)**: 066004-1– 066004-9.
- Dessombz, A., Bazin, D., Dumas, P., Sandt, C., Sule-Suso, J., & Daudon, M. (2011). Shedding light on the chemical diversity of ectopic calcifications in kidney tissues: diagnostic and research aspects. *PloS one* **6(11)**: e28007.

- Didonna, A., Vaccari, L., Bek, A., & Legname, G. (2011). Infrared microspectroscopy: a multiple-screening platform for investigating single-cell biochemical perturbations upon prion infection. *ACS chemical neuroscience* **2(3)**: 160–174.
- Dulinska, J., Setkowicz, Z., Janeczko, K., Sandt, C., Dumas, P., Uram, L., Gzielo-Jurek, K., et al. (2012). Synchrotron radiation Fourier-transform infrared and Raman microspectroscopy study showing an increased frequency of creatine inclusions in the rat hippocampal formation following pilocarpine-induced seizures. *Analytical and bioanalytical chemistry* **402(7)**: 2267–2274.
- Dumas, P., Polack, F., Lagarde, B., Chubar, O., Giorgetta, J. L., & Lefrançois, S. (2006). Synchrotron infrared microscopy at the French Synchrotron Facility SOLEIL. *Infrared Physics & Technology* **49(1-2)**: 152–160.
- Fuchs, R. K., Allen, M. R., Ruppel, M. E., Diab, T., Phipps, R. J., Miller, L. M., & Burr, D. B. (2008). In situ examination of the time-course for secondary mineralization of Haversian bone using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* **27(1)**: 34–41.
- Gautam, R., Chandrasekar, B., Deobagkar-Lele, M., Rakshit, S., Kumar B N, V., Umapathy, S., & Nandi, D. (2012). Identification of early biomarkers during acetaminophen-induced hepatotoxicity by fourier transform infrared microspectroscopy. *PloS one* **7(9)**: e45521.
- Gazi, E., Dwyer, J., Lockyer, N. P., Miyani, J., Gardner, P., Hart, C., Brown, M., et al. (2005). Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers* **77(1)**: 18–30.
- Gazi, Ehsan, Gardner, P., Lockyer, N. P., Hart, C. a, Brown, M. D., & Clarke, N. W. (2007). Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *Journal of lipid research* **48(8)**: 1846–1856.
- Hughes, C., Liew, M., Sachdeva, A., Bassan, P., Dumas, P., Hart, C. a, Brown, M. D., et al. (2010). SR-FTIR spectroscopy of renal epithelial carcinoma side population cells displaying stem cell-like characteristics. *The Analyst* **135(12)**: 3133–3141.
- Jackson, M. and Mantsch, H. H. (2000). Infrared spectroscopy, ex vivo tissue analysis. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry, Vol. 1* Chichester, UK.: John Wiley & Sons Ltd. pp. 131–156.
- Kazarian S.G. and Chan K.L. (2013). ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *The Analyst* **138(8)**: 1940–1951.
- Kerr, J. L., Baldwin, D. S., Tobin, M. J., Puskar, L., Kappen, P., Rees, G. N., & Silvester, E. (2013). High spatial resolution infrared micro-spectroscopy reveals the mechanism of leaf lignin decomposition by aquatic fungi. *PloS one* **8(4)**: e60857.
- Kohler, A., & Sule-Suso, J. (2008). Estimating and correcting mie scattering in synchrotron-based microscopic fourier transform infrared spectra by extended multiplicative signal correction. *Applied spectroscopy* **62(3)**: 259–266.
- Kowalskaa, J., & Gajdab, M. (2012). Chemical Composition of Atherosclerotic Plaques of apoE/ LDLR-Double Knockout Mice by Synchrotron Radiation FTIR Microspectroscopy. *Acta physica polonica* **121(2)**: 555–560.
- Kretlow, A., Wang, Q., Beekes, M., Naumann, D., & Miller, L. M. (2008). Changes in Protein Structure and Distribution Observed at Pre- Clinical Stages of Scrapie Pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1782(10)**: 559–565.
- Leskovjan, A., Lanzirrotti, A., & Miller, L. (2009). Amyloid plaques in PSAPP mice bind less metal than plaques in human Alzheimer's disease. *Neuroimage* **73(1)**: 132–141.
- Magne, D., Weiss, P., Bouler, J. M., Laboux, O., & Daculsi, G. (2001). Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a

- calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **16(4)**: 750–757.
- Matthäus, C., Bird, B., & Miljković, M. (2008). Infrared and Raman microscopy in cell biology. *Methods in cell biology* **89**: 275–308.
- Meade, a D., Clarke, C., Byrne, H. J., & Lyng, F. M. (2010). Fourier transform infrared microspectroscopy and multivariate methods for radiobiological dosimetry. *Radiation research* **173(2)**: 225–37.
- Miller, L. M., & Dumas, P. (2006). Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. *Biochimica et biophysica acta* **1758(7)**: 846–857.
- Miller, L. M., & Dumas, P. (2010). From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Current opinion in structural biology* **20(5)**: 649–656.
- Nakamura, T., Kelly, J., & Trevisan, J. (2010). Microspectroscopy of spectral biomarkers associated with human corneal stem cells. *Molecular vision* **16**: 359–368.
- Pijanka, J. K., Kohler, A., Yang, Y., Dumas, P., Chio-Srichan, S., Manfait, M., Sockalingum, G. D., *et al.* (2009). Spectroscopic signatures of single, isolated cancer cell nuclei using synchrotron infrared microscopy. *The Analyst* **134(6)**: 1176–1181.
- Pijanka, J., Sockalingum, G. D., Kohler, A., Yang, Y., Draux, F., Parkes, G., Lam, K.-P., *et al.* (2010). Synchrotron-based FTIR spectra of stained single cells. Towards a clinical application in pathology. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **90(5)**: 797–807.
- Robert, P., Jamme, F., Barron, C., Bouchet, B., Saulnier, L., Dumas, P., & Guillon, F. (2010). Change in wall composition of transfer and aleurone cells during wheat grain development. *Planta* **233**: 393–406.
- Saulnier, L., Robert, P., Grintchenko, M., Jamme, F., Bouchet, B., & Guillon, F. (2009). Wheat endosperm cell walls: Spatial heterogeneity of polysaccharide structure and composition using micro-scale enzymatic fingerprinting and FT-IR microspectroscopy. *Journal of Cereal Science* **50(3)**: 312–317.
- Saulou, C., Jamme, F., Maranges, C., Fourquaux, I., Despax, B., Raynaud, P., Dumas, P., *et al.* (2010). Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating. *Analytical and bioanalytical chemistry* **396(4)**: 1441–1450.
- Szczerbowska-Boruchowska, M., Dumas, P., Kastyak, M. Z., Chwiej, J., Lankosz, M., Adamek, D., & Krygowska-Wajs, A. (2007). Biomolecular investigation of human substantia nigra in Parkinson's disease by synchrotron radiation Fourier transform infrared microspectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics* **459(2)**: 241–248.
- Tobin, M., & Chesters, M. (2004). Infrared microscopy of epithelial cancer cells in whole tissues and in tissue culture, using synchrotron radiation. *Faraday discuss* **126**: 27–39.
- University of California Davis. (2010). Section 4.2: Infrared spectroscopy. Retrieved May 3, 2013, from http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_4:_Structure_Determination_I/Section_4.2:_Infrared_spectroscopy
- Walker, A. M., Yu, P., Christensen, C. R., Christensen, D. a, & McKinnon, J. J. (2009). Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of the effects of cereal type and variety within a type of grain on structural makeup in relation to rumen degradation kinetics. *Journal of agricultural and food chemistry* **57(15)**: 6871–6878.
- Walsh, M. J., Singh, M. N., Stringfellow, H. F., Pollock, H. M., Hammiche, A., Grude, O., Fullwood, N. J., *et al.* (2008). FTIR Microspectroscopy Coupled with Two-Class Discrimina-

- tion Segregates Markers Responsible for Inter- and Intra-Category Variance in Exfoliative Cervical Cytology. *Biomarker insights* **3**: 179–189.
- Wenning, M., Seiler, H., & Scherer, S. (2002). Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Applied and environmental microbiology* **68(10)**: 4717–4721.
- Yin, J., & Xia, Y. (2011). Chemical visualization of individual chondrocytes in articular cartilage by attenuated-total-reflection Fourier Transform Infrared Microimaging. *Biomedical optics express* **2(4)**: 937–945.