



TRABAJO FIN DE GRADO

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES LIPÍDICOS DE NEUROINFLAMACIÓN EN INFARTOS ISQUÉMICOS MEDIANTE IMAGEN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

MEMORIA PRESENTADA POR IBAI CALVO IRAETA

FECHA DE MATRICULACIÓN Y DEFENSA: 17/07/21 Y 08-10/09/21

DIRECTOR: JOSÉ ANDRÉS FERNÁNDEZ GONZÁLEZ

DEPARTAMENTO: QUÍMICA FÍSICA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ACCIDENTE CEREBROVASCULAR ISQUÉMICO (ACI)	1
1.2. IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTIC (MRI)	2
1.3. LIPIDÓMICA	3
1.3.1. Ácidos grasos (FA)	4
1.3.2. Glicerofosfolípidos (GP)	5
1.3.3. Esfingolípidos (SP)	6
1.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)	7
1.5. FUENTES DE IONES	8
1.5.1. Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI)	8
1.5.2. MALDI-IMS	9
1.6. ANALIZADOR DE MASAS	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE RATÓN	12
3.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	13
3.2.1. Sublimación de la matriz	14
3.3. ANÁLISIS MALDI-IMS	15
3.4. TINCIÓN DE NISSL	16
3.5. PROCESADO DE DATOS	16
3.5.1. Obtención del espectro	17
3.5.2. Segmentación	17
3.5.3. Asignación lipídica	19

3.5.4. Análisis estadístico	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. ELECCIÓN DE LA SECCIÓN DE TEJIDO	20
4.2. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SANAS	21
4.3. COMPARATIVA DEL CONTRALATERAL DEL HEMISFERIO INFARTADO CON EL HEMISFERIO IZQUIERDO DE LAS MUESTRAS SANAS	23
4.4. IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES	25
5. CONCLUSIONES	33
6. PERSPECTIVAS	34
7. BIBLIOGRAFÍA	35

1. INTRODUCCIÓN

La Metabolómica se define como el estudio, identificación y cuantificación de compuestos de bajo peso molecular en células, tejidos o fluidos biológicos, producto de reacciones metabólicas de los seres vivos, de un organismo o muestra biológica.¹ Uno de los principales objetivos de esta ciencia es la identificación de cambios sutiles en los perfiles metabólicos entre sistemas biológicos, ya sea en estados fisiológicos o patológicos. Los componentes del metaboloma, tales como metabolitos, hormonas y moléculas señalizadoras, pueden entenderse como los productos finales de la expresión génica, definiendo así el fenotipo bioquímico de una célula, organismo o tejido.²

Los avances en la resolución espacial de técnicas como la imagen por resonancia magnética (MRI) y la espectrometría de masas (MS), junto al desarrollo de software quimiométrico, permiten determinar y comparar, simultáneamente, miles de componentes químicos, produciendo una expansión de los estudios bioquímicos de moléculas pequeñas en bacterias, plantas y mamíferos en los últimos años. Esto ha permitido integrar las moléculas de bajo peso molecular en el estudio de los sistemas biológicos.¹ Además, la revolución de la manera en la que se visualizan y se estudian los procesos biológicos está facilitando el estudio y diagnóstico de distintas enfermedades como accidentes cerebrovasculares isquémicos (ACV isquémico).

1.1. ACCIDENTE CEREBROVASCULAR ISQUÉMICO (ACV ISQUÉMICO)

El ACV, comúnmente conocido como infarto cerebral, es una de las enfermedades más comunes. A lo largo de su vida, una de cada cuatro personas se verá afectada por esta enfermedad. Es la segunda causa mortal y la tercera causa principal de discapacidad en adultos.³ Se trata de un déficit neurológico relacionado con una lesión focal aguda del sistema nervioso central (SNC), causado por un proceso vascular.⁴ La mayoría de los infartos, un 85%, se producen por isquemia; es decir, por la reducción del flujo sanguíneo resultado de la oclusión arterial, aunque también pueden

sucederse infartos hemorrágicos si se produce la ruptura de arterias cerebrales.⁵

En la década de los años 70, fue posible identificar la sombra (o *core*) isquémica como parte del cerebro eléctricamente no funcional; presentando los estados de hipoperfusión, por reducción del flujo sanguíneo, y de hibernación, como respuesta de autopreservación ante esta situación.⁶ Esta sección dañada se convierte progresivamente y, de forma irreversible, en tejido lesionado. No obstante, es posible recuperar el funcionamiento normal de la sección cerebral afectada si se realiza una reperfusión precoz, restaurando el suministro sanguíneo al tejido.⁷ Gracias a este descubrimiento ha sido posible tratar a multitud de pacientes a partir de la primera reperfusión exitosa, cuyo ensayo fue publicado en 1995.⁸

Se ha demostrado, experimental y clínicamente, que el cerebro responde a la lesión producida por un infarto cerebral isquémico con un agudo y prolongado proceso neuroinflamatorio.⁹ Este mecanismo está caracterizado por la activación de las células presentes en la materia blanca (WM), principalmente microglía. Siendo un proceso dependiente del tiempo, se va produciendo la activación de células inflamatorias, incluyendo neutrófilos, células T y macrófagos.¹⁰

1.2. IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA (MRI)

La Imagen por Resonancia Magnética (MRI) ha sido considerada durante años como el patrón de oro (*gold standard*) en las investigaciones de lesiones de WM (WML), permitiendo definir la sección de la lesión con gran sensibilidad, y evaluar diferentes características estructurales del tejido cerebral.¹¹ Los daños de las fibras mielinizadas pueden observarse como una lesión de la materia blanca gracias a esta técnica. No solo eso, debido al potencial del MRI para visualizar e identificar procesos biológicos complejos y movimientos celulares a lo largo del espacio/tiempo, en zonas localizadas de un tejido, su uso en la identificación de especies fosfolipídicas en tejidos neuronales ha aumentado.¹²

Se ha observado un aumento de las señales provenientes de los ácidos grasos en pacientes que han sufrido infartos cerebrales, así como en distintos modelos de lesión cerebral en animales. Esta observación puede estar reflejando la degradación de la membrana de las células que toman parte en la neuroinflamación. Los productos de degradación de la membrana son generados en momentos posteriores a la lesión isquémica, por lo que el aumento de la presencia de fosfolípidos poco frecuentes en tejido cerebral sano podría emplearse como biomarcador de fagocitación de macrófagos, células de microglía y células muertas.¹³

A pesar de ello, el uso de lípidos como biomarcadores para la detección del infarto cerebral y evaluación de su gravedad, permitiendo así la prescripción del tratamiento adecuado, no se ha investigado. Esto puede deberse a la imposibilidad del MRI de identificar distintas especies lipídicas en una muestra, lo que hace que no sea una buena opción para la identificación de posibles biomarcadores lipídicos.

No obstante, gracias a los avances que se están produciendo alrededor de técnicas como la espectroscopia de masas, el interés por describir el lipidoma completo de distintas enfermedades está en auge, pues estos metabolitos se encuentran en multitud de procesos biológicos.^{1, 14}

1.3. LIPIDÓMICA

Los lípidos son metabolitos esenciales que pueden proporcionar multitud de información acerca del estado metabólico celular.¹⁴ El estudio a gran escala de las especies lipídicas en un sistema biológico o en una única célula se denomina lipidómica.¹⁵ Implica la determinación y posterior cuantificación de lípidos que interaccionan entre sí y con distintas especies moleculares, como proteínas y otros metabolitos. Esta ciencia estudia el metabolismo celular cuantificando los cambios significativos entre clases lipídicas individuales, subclases e incluso familias.¹⁴

Los lípidos, formados principalmente por cadenas hidrocarbonatadas, son biomoléculas hidrófobas o anfipáticas. Son los componentes básicos de la estructura y funcionalidad de las células vivas.¹⁶ Actúan como membrana

celular, delimitando la célula en el medio extracelular, su oxidación genera gran cantidad de energía y participan en procesos reguladores autocrinos, paracrinos y endocrinos. Con ello, sus funciones más importantes son estructurales, de almacenamiento energético y señalización.¹⁷ Son moléculas dinámicas, cuya expresión puede variar considerablemente cuando se exponen a factores endógenos y exógenos, a causa de la ingesta o exposición a drogas, factores genéticos, enfermedades e inflamación, entre otros.¹⁸

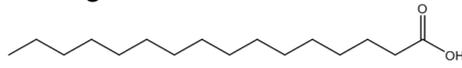
Debido a la importancia de la presencia de estas biomoléculas en multitud de procesos celulares, hay que tener en cuenta su involucración en la formación, prolongación y resolución de muchas enfermedades. Entre ellas destacan la diabetes, el cáncer, inflamaciones crónicas y trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos, motivo por el que presentan un gran potencial como biomarcadores e indicadores de pronóstico; su identificación y posterior cuantificación se está convirtiendo en una necesidad en estudios biomédicos.¹⁹

Los lípidos se clasifican en ocho grupos primarios en función de su estructura química: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, prenoides, sacarolípidos y policétidos.²⁰ El presente estudio está enfocado a las membranas lipídicas, por lo que los lípidos de mayor interés son los ácidos grasos, los glicerofosfolípidos y esfingolípidos.

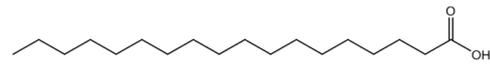
1.3.1. Ácidos grasos (FA)

Los ácidos grasos (FA) son el componente principal de los lípidos complejos.²¹ Clasificados en 14 subcategorías, la más común en la naturaleza comprende aquellos ácidos compuestos por un ácido carboxílico unido a una larga cadena alifática, saturada o insaturada, hidrofóbica y que no presenta ramificaciones. En mamíferos, concretamente, el número de carbonos que forma la cadena suele ser par, presentando entre 0 y 6 insaturaciones.²² En la Figura 1 pueden verse algunos de los FA más significativos en mamíferos.

A. Ácidos grasos saturados

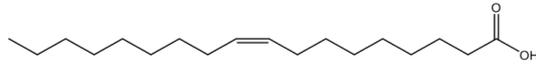


Ácido palmítico
C:16

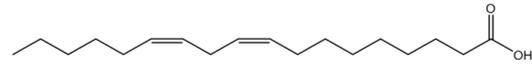


Ácido esteárico
C:18

B. Ácidos grasos mono y diinsaturados

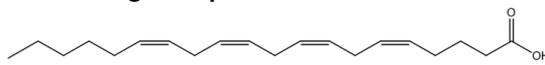


Ácido oleico
C18:1

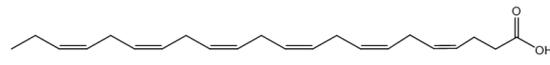


Ácido linoleico
C18:2

C. Ácidos grasos poliinsaturados



Ácido araquidónico
C20:4



Ácido docosahexaenoico
C22:6

Figura 1.- Algunos de los ácidos grasos más comunes en células mamíferas. A.- FA saturados. Ácido palmítico (C:16) y esteárico (C:18). B.- FA mono y diinsaturados. Ácido oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). C.- FA poliinsaturados. Ácido araquidónico (C20:4) y docosahexaenoico (C22:6). Tomando este último como ejemplo, la nomenclatura C22:6 se refiere a que su cadena hidrocarbonatada tiene 22 átomos de carbono y que presenta 6 insaturaciones.

1.3.2. Glicerofosfolípidos (GP)

Los glicerofosfolípidos (GP) forman las bicapas fosfolipídicas de las células, por lo que no es de extrañar que sean los lípidos con mayor abundancia en la naturaleza. Están compuestos por un esqueleto de glicerol que presenta, por lo general, cadenas saturadas en la posición sn-1, cadenas mono o poliinsaturadas en la posición sn-2 y una cabeza hidrofílica en sn-3.²³ Hay que tener en cuenta que la unión en la posición sn-1 puede darse mediante un enlace éster, éter (O) o un enlace vinil éter (P). El grupo principal unido en la posición sn-3 indica la subclase de glicerofosfolípido, tal y como puede observarse en la Figura 2.

Los glicerofosfolípidos más abundantes presentes en las membranas celulares de los mamíferos son las glicerofosfocolinas (PC), glicerofosfoetanolaminas (PE), glicerofosfoinositoles (PI),

glicerofosfoglicerol (PG), y glicerofososerinas (PS). Entre estas, las PC son la subclase más abundante, constituyendo el 50% de la masa total de los glicerofosfolípidos.²³

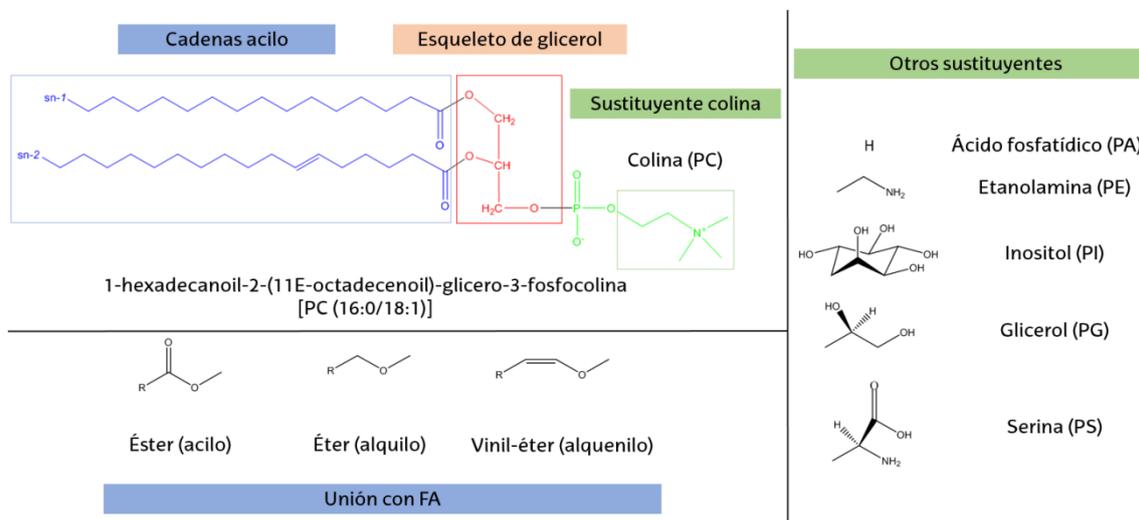


Figura 2.- Tomando como ejemplo una glicerofosfocolina, estructura de los glicerofosfolípidos. Puede observarse el esqueleto principal de glicerol (rojo), al que se han unido dos ácidos grasos, en la posición sn-1 (16:0) y sn-2 (18:1) (color azul) y un grupo colina en la posición sn-3 (verde). En función del sustituyente se forman distintos GP. Si, además, se tienen en cuenta las tres posibles uniones entre los ácidos grasos y el esqueleto del glicerol, aumenta la diversidad de este tipo de lípidos.

1.3.3. Esfingolípidos (SP)

Los esfingolípidos son capaces de regular procesos de expresión génica, modulando la fosforilación y acetilación de proteínas transcriptoras, como pueden ser proteínas represoras y reguladoras de la transcripción. Por ello, son imprescindibles para el reconocimiento celular y transducción de señales. Con una base esfingoide, en mamíferos destacan la esfingosina y la esfinganina (dihidroesfingosina), con cadenas de 18 carbonos. La diferencia entre ambas es la presencia o no de una insaturación en la posición 2.²⁴

Cuando un ácido graso se une por un enlace amina en la posición sn-2, se obtiene una ceramida (Cer), conocida como la precursora de las distintas especies esfingolípicas. Su fosforilación y posterior unión con grupos

principales como la colina o azúcares forma esfingomielinas (SM), los esfingolípidos más abundantes en la membrana celular, y cerebrósidos (HexCer),²⁵ respectivamente, como puede observarse en la Figura 3.

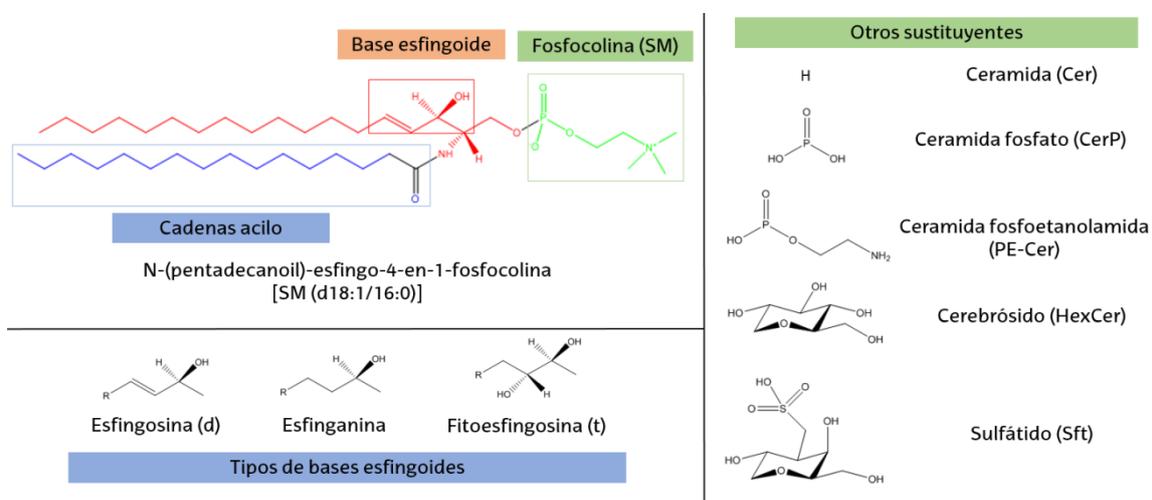


Figura 3.- Tomando como ejemplo una esfingomielina, estructura de los esfingolípidos. La base esfingoide (rojo) depende del tipo de hidroxilación que presenten. En función del sustituyente en la cabeza se forman distintos esfingolípidos.

En vista de la importancia que presentan los lípidos en multitud de procesos celulares, es necesaria la búsqueda de técnicas que permitan un estudio exhaustivo de los mismos. En los últimos años, el estudio de la lipidómica mediante la espectrometría de masas ha aumentado debido a los avances, en la resolución espacial, que se están produciendo alrededor de esta técnica.^{1, 13}

1.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica que permite identificar distintas especies a partir de su relación masa/carga (m/z). La muestra se transfiere a fase gas, convirtiendo las moléculas en especies gaseosas ionizadas, que pueden sufrir fragmentaciones o no, para posteriormente ser detectadas y cuantificadas mediante su relación m/z . Como resultado, se genera un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de cada ion respecto a su relación m/z .²⁶ Los espectrómetros de masas están constituidos por cinco componentes (Figura 4), aunque los principales son la fuente de iones, donde se ioniza la

muestra y el analizador de masas, donde se obtienen las relaciones m/z de los iones generados.

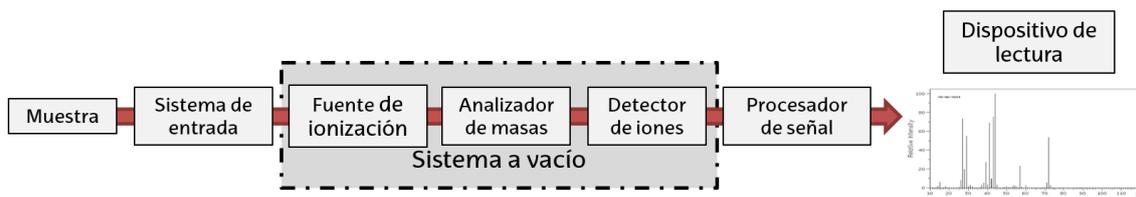


Figura 4.- Esquema de un espectrómetro de masas, todos ellos presentan, al menos, un sistema de entrada, una fuente de ionización, un analizador de masas, un detector de iones y un procesador de señal.

1.5. FUENTE DE IONES

Son varios los métodos de ionización empleados en MS. La elección de la fuente de ionización determinará la resolución espacial del experimento, así como las biomoléculas que podrán ser identificadas.²⁷ El empleo de fuentes de ionización duras, como impacto electrónico, transfieren energías elevadas a los iones formados, obteniendo una gran cantidad de fragmentos que, en última instancia, generarán un espectro de masas de gran complejidad. Para evitarlo, en este estudio se ha trabajado con una fuente de ionización débil: el método de desorción/ionización mediante laser asistida por matriz (MALDI), que permite identificar biomoléculas de bajo y alto peso molecular.²⁸

1.5.1. Desorción/ionización mediante laser asistida por matriz (MALDI)

La desorción/ionización por láser (LDI) es un método de ionización que emplea radiación del espectro ultravioleta (UV) o infrarrojo (IR) para desorber, *in situ*, los componentes de la superficie de una muestra, ionizándola durante el proceso. Normalmente, la muestra se mezcla con alguna sustancia que favorezca la absorción de fotones²⁷.

MALDI es el método LDI con mayor desarrollo y uso. Consiste en la co-cristalización de una matriz orgánica junto con la muestra (Figura 5). Gracias a ello, se facilita la transferencia de iones a la fase gaseosa, evitando la fragmentación de las biomoléculas en la medida de lo posible.

El haz del láser no incide directamente sobre la muestra, sino que se produce una transferencia desde la matriz, por lo que se trata de un método de ionización suave. Esta ionización carga las moléculas mediante la generación de especies aductas (protonadas, sodiadas o potasiadas).²⁸

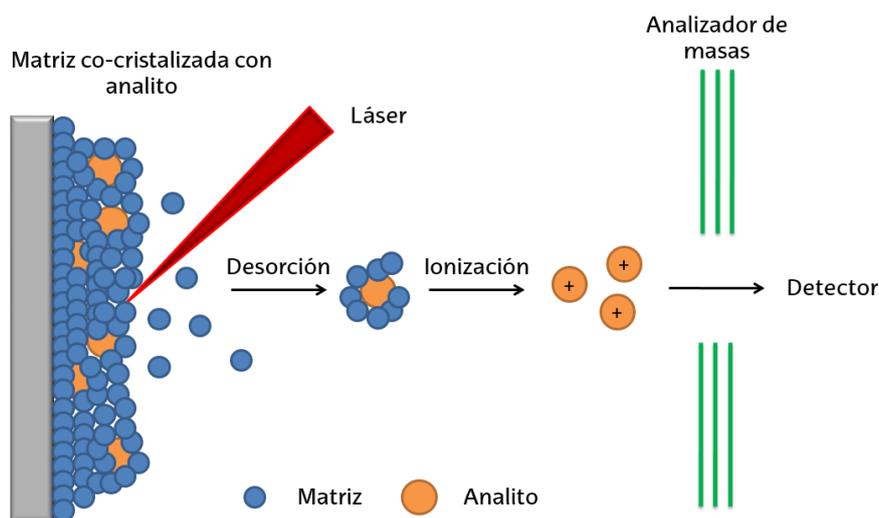


Figura 5.- Esquema de la ionización por MALDI

A diferencia de otras fuentes de ionización suave, como la ionización por electrospray (ESI), en MALDI es poco frecuente que los analitos ionizados presenten más de una carga, sea positiva o negativa, por lo que la complejidad del espectro de masas obtenido se reduce. Sin embargo, la matriz orgánica empleada tendrá su propia fragmentación, pudiendo darse una supresión iónica que enmascare la señal de los analitos de interés.²⁸

1.5.2. MALDI-IMS

En este trabajo se ha hecho uso de uno de los avances más innovadores de la MS, la llamada Imagen por Espectrometría de Masas (IMS). Esta técnica permite identificar biomoléculas *in situ*, en un tejido, aportando datos sobre su disposición espacial con un análisis de masas altamente específico, con una resolución espacial en un intervalo comprendido entre tres y 200 μm .²⁸ Es decir, convierte la espectrometría de masas en una técnica de resolución espacial capaz de alcanzar resoluciones subcelulares.^{28,29} Una de sus ventajas respecto a otras técnicas de imagen,

como pueden ser análisis inmunohistoquímicos, es que no requiere de de marcado previo. Además, su preparación de muestra es relativamente mínima en comparación con otras técnicas más tradicionales empleadas en bioanálisis.²⁷

Se puede aprovechar la capacidad de MALDI de obtener el espectro *in situ* de una muestra, para reconstruir la distribución de los analitos de interés a lo largo de la sección estudiada, añadiendo una nueva dimensión a la información generada durante el experimento. Así, MALDI-IMS se muestra como la evolución del método MALDI. Es posible generar un mapa de la distribución de todas las moléculas detectadas en el área explorada durante el experimento. Si esto se expande a toda la muestra, respetando una separación espacial entre espectros, es posible obtener una distribución espacial, en dos dimensiones, de las distintas especies moleculares a lo largo de la muestra, generalmente una sección de tejido, como es el cerebro en este estudio (Figura 6).

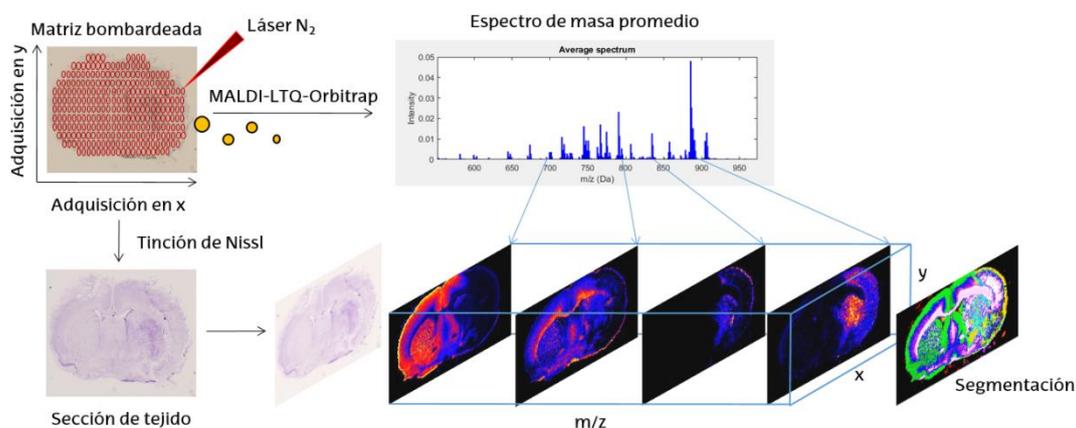


Figura 6.- Extracción de datos a lo largo de un experimento de MALDI-IMS. Una vez depositada la matriz sobre la muestra, se define el área que va a bombardearse con el haz láser, así como la separación entre disparos. A partir del espectro generado, se extraen las imágenes moleculares de las distribuciones lipídicas, correspondientes a cada pico. Finalmente, la sección de tejido se tiñe y, mediante la información óptica y el análisis estadístico realizado a lo largo del experimento, se identifican y comparan las distintas regiones de interés de la muestra. Un análisis más exhausto permite identificar biomarcadores e, incluso, generar modelos de clasificación.

1.6. ANALIZADOR DE MASAS

Los analizadores de MS identifican los iones generados durante el proceso en función de su relación m/z . Los primeros detectores empleados en MALDI-IMS fueron los de tiempo de vuelo (TOF),³⁰ que han sido complementados con la aparición de analizadores de trampa iónica, como son la Resonancia Ciclotrónica de Iones por Transformada de Fourier (FT-ICR) y Orbitrap. Uno de los inconvenientes de MALDI-IMS es la presencia de iones de bajo peso molecular (<500 Da) de la matriz, que interfieren con la detección de los iones. Los detectores FT-ICR y Orbitrap son capaces de solventar este inconveniente, gracias a su gran poder de resolución de masa, por lo que son ampliamente usados en estudios de lípidos.³¹

La gran diferencia entre los detectores TOF y el Orbitrap y FT-ICR es la forma de determinar los ratios m/z . En el segundo caso, los iones pasan a una trampa iónica donde se les mantiene en orbitación. En función de la m/z de los iones formados, su oscilación axial alrededor del electrodo inerte variará, presentando distintas frecuencias orbitales, proporcionales a $(m/z)^{1/2}$, que son registradas, obteniéndose así un espectro de frecuencias del que se extraen los ratios m/z de los espectros obtenidos mediante FT.³²

En el presente estudio se hará uso de un Orbitrap. Este analizador se compone de tres electrodos, uno inerte que se encuentra rodeado por dos electrodos cóncavos (Figura 7). Una vez los iones se encuentran en la trampa, se genera un campo eléctrico entre los electrodos.

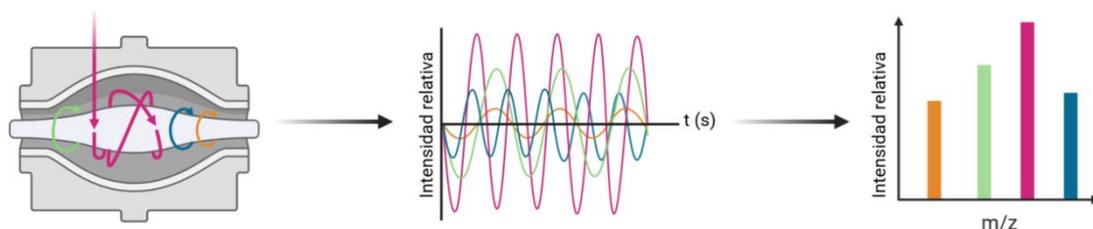


Figura 7.- Esquema de un analizador FT Orbitrap. Los iones entran tangencialmente en la trampa iónica: Las frecuencias detectadas son proporcionales a la m/z de los iones. Mediante la FT es posible obtener el espectro de masas.

2. OBJETIVOS

Identificar la huella lipídica del hemisferio sano e infartado de cerebro, mediante IMS, en modelos de isquemia en rata. Determinar, en dicha huella, la existencia de posibles biomarcadores de la gravedad de la lesión y su evolución, de manera que se facilite la prescripción del tratamiento más conveniente en cada caso.

El estudio se va a realizar sobre regiones de interés (ROI) que han sido previamente analizadas mediante MRI en otros estudios³³. La hipótesis es que, ciertas señales del espectro de resonancia magnética, obtenidas de esas ROI, pueden deberse a lípidos que participan en el proceso de neuroinflamación tras el infarto isquémico. La identificación de dichos lípidos mediante MALDI-IMS podría suponer un antes y un después en la búsqueda de la medicina personalizada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE RATÓN

A lo largo del estudio se han empleado 7 cerebros de rata distintos, 2 de ellos sanos y 5 infartados. Las ratas, todas ellas machos, tenían 8 semanas de edad y un peso medio de 304 ± 7.1 g (J'anvier, Francia). Los protocolos de experimentación y bienestar animal fueron aprobados por el comité institucional de uso y cuidado de animales (IACUC), así como por las autoridades locales (Diputación Foral de Guipúzcoa), siguiendo las directrices de Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) y las directivas de la Unión Europea (EU) sobre ética y bienestar animal.³³

Los cerebros entregados, por el Doctor en Neurociencia Abraham Martín (Achucarro Basque Center for Neuroscience), han seguido el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), que puede verse en la Figura 8.

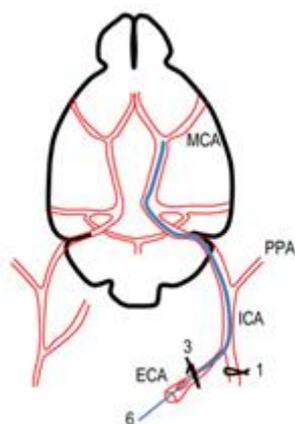


Figura 8.- Esquema de la MCAO usando un monofilamento de nylon. Se introduce a través de la arteria carótida externa (ECA) para ocluir la base de la arteria cerebral media (MCA), provocando el infarto; arteria carótida interna (ICA), arteria esfenopalatina (PPA).³⁴

3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La preparación de la muestra es un paso esencial a la hora de obtener una imagen experimental adecuada. En este caso, es importante emplear una matriz que permita obtener la máxima intensidad de señal, a la vez que dé lugar a una deposición uniforme en forma de cristales con tamaños en el rango de micras para alcanzar gran resolución espacial.

El 1,5-diaminonaftaleno (DAN, Sigma-Aldrich Chemie, Dteinheim, Germany, Figura 9) ha demostrado, en estudios previos, ser una matriz óptima para la detección de lípidos en el modo de ionización negativo;³⁵ permitiendo la detección de multitud de familias lipídicas con poco ruido de fondo, alta resolución y dotando a las muestras de la estabilidad necesaria para soportar prolongados tiempos de adquisición de datos.

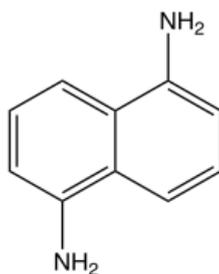


Figura 9.- Estructura de la matriz empleada en este TFG, 1,5-diaminonaftaleno; masa exacta: 158.0844 Da.

Los dos métodos más populares para la deposición de matriz son el esprayado y la sublimación. Estudios previos realizados por el grupo de Espectroscopia de la UPV/EHU han demostrado que el segundo método permite optimizar de forma mucho más controlada la cantidad total de matriz depositada en la muestra.³⁶ Además, permite alcanzar resoluciones espaciales mucho más elevadas, ya que evita las posibles interacciones no deseadas entre la muestra y el solvente empleado, como migraciones de biomoléculas.³⁷

3.2.1. Sublimación de la matriz

El sublimador que se ha empleado es un diseño interno, creado por el grupo de Espectroscopia de la UPV/EHU.³⁸ La matriz se introduce dentro del sublimador, sobre una placa calefactora unida a un termopar. El portaobjetos con la muestra, se coloca sobre una placa en contacto con una célula Peltier, que mantendrá la temperatura de la muestra en 5°C, de modo que al cerrar el sublimador la muestra queda sobre la matriz, a menos de 1 cm de distancia. A continuación, el sistema se conecta a vacío (Pfeiffer Vacuum, model DUO 2.5, Germany) y se fija una presión de 0.1 mbar. Se conecta el sistema de calor y se selecciona una temperatura de 123°C, que se mantiene durante ocho minutos.

En estas condiciones se consiguen depositar, aproximadamente, 0.15mg/cm² de DAN sobre las muestras, cantidad optima requerida para obtener la mayor resolución espacial, según han demostrado estudios internos previos.³⁶ En la Figura 10 puede observarse el sublimador empleado.

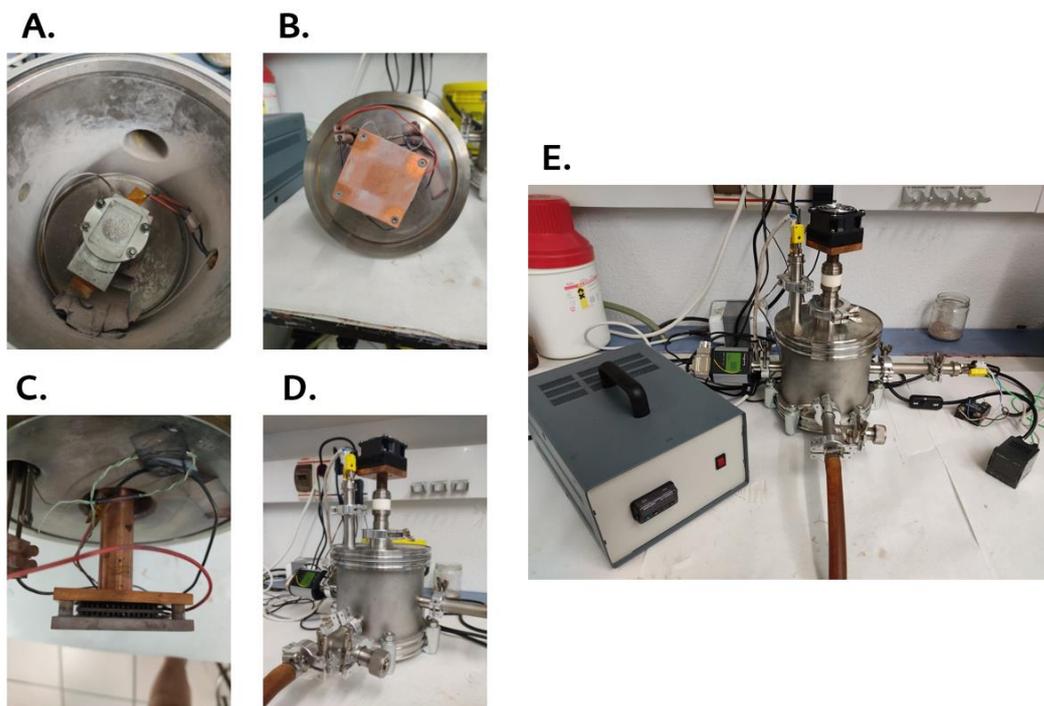


Figura 10.- Componentes del sublimador: A.- Placa calefactora sobre la que se deposita la matriz; por debajo de ella se encuentra el termopar que controlará su temperatura. B.- Placa sobre la que se sujeta la muestra con el tejido que desea sublimarse. C.- Vista lateral de la placa observada en B, está unida a dos células Peltier que enfriarán la muestra; están conectadas a un segundo termopar que indicará la temperatura de la muestra. D.- Imagen del sublimador cerrado. E.- Sistema completo, el sublimador está unido al sistema Peltier, a una bomba de vacía y al sistema de calefacción, respectivamente.

3.3. ANÁLISIS MALDI-IMS

Los análisis MALDI-IMS se llevaron a cabo empleando un MALDI-LTQ-Orbitrap XL (ThermoFischer, Figura 11) equipado con un láser de N_2 .³⁹ Se trabajó con el espectrómetro en modo Orbitrap y polaridad negativa. La adquisición de datos se realizó con una resolución de 60000 a $m/z = 400$ Da en un intervalo comprendido entre los 550-1000 Da, empleando una resolución espacial de 100 μm . El registro de medidas se hizo con dos microescáneres de 10 disparos láser (20 disparos en total) para cada pixel, con una energía de 80 μj y un tamaño de 100 μm .



Figura 11.- MALDI-LTQ-Orbitrap XL desarrollado por Thermo Fisher Scientific empleado, para la adquisición de datos.

3.4. TINCIÓN DE NISSL

Tras el análisis de MALDI-IMS, las muestras fueron procesadas para realizar una tinción con violeta de cresilo. Es comúnmente utilizada en secciones de tejido nervioso⁴⁰. La obtención de las imágenes de tinción es imprescindible para identificar y comparar las distintas áreas del tejido en un estudio histológico.

3.5 PROCESADO DE DATOS

Si bien es cierto que el tratamiento de muestra es relativamente mínimo en comparación con otras técnicas, MALDI-IMS genera una cantidad ingente de datos que requiere de tratamiento. Es necesario reducir su tamaño, extrayendo la información más relevante, para lo que se utiliza una rutina que extrae la posición de los picos.⁴¹ Una de las ventajas de los detectores Orbitrap es que, gracias a su gran resolución másica, son capaces de obtener la composición elemental de los iones detectados. Como contrapartida, los archivos de datos, generados en los experimentos, pueden aumentar considerablemente de tamaño, dependiendo de la resolución y el rango de masas del experimento.

El procesado de datos comienza con la obtención del espectro promedio; seguido de la segmentación de las distintas regiones del tejido; la asignación lipídica, junto a sus distribuciones a lo largo de la sección y, finalmente, el tratamiento estadístico de los datos generados.

3.5.1. Obtención del espectro

Los espectros generados han sido procesados empleando un software propio, desarrollado sobre Matlab (MathWorks, Natick, USA). Primero se extrae la información de cada uno de los píxeles obtenidos durante el análisis, que se corresponden con los picos de los que estará formado el espectro final. Estos picos serán seleccionados empleando el método *Simple Peak Finding* (SPF).⁴²

Se ha utilizado una ventana de 20 mDa para la separación entre picos y el alineamiento de los espectros. El procesado continúa con la disminución de tamaño de los datos generados, mediante la eliminación de aquellos picos con intensidades inferiores al 0.5%, respecto al más intenso, para cada uno de los espectros. Seguidamente, los espectros se alinean, permitiendo una desalineación máxima de 20 mDa.⁴³ Finalmente, los espectros se normalizan empleando un algoritmo de corriente total de iones (TIC).

3.5.2 Segmentación

Además de representar las distintas especies detectadas, resulta especialmente útil agrupar los píxeles en base a su huella lipídica, formando segmentos que reproducen la arquitectura del tejido. Los algoritmos de agrupamiento jerárquico permiten organizar los píxeles generados en función de la similitud de los correspondientes espectros. Por su parte, el método de segmentación *k-means* permite agrupar el conjunto de datos en un número prefijado de segmentos (clústeres). En este trabajo se ha empleado una variante de algoritmo de segmentación, el análisis divisivo jerárquico de rango completo (HDC-RC),⁴⁴ desarrollado por el Grupo de Espectroscopia. De este modo, se consigue agrupar los

píxeles en regiones con una huella lipídica similar, lo que permite asignar una huella lipídica a cada área histológica.

El algoritmo divide el experimento en dos segmentos distintos, a partir de los píxeles con menor correlación entre sí. El proceso se repite sucesivamente hasta alcanzar el número de segmentos seleccionado para cada experimento, asignando un color distinto a cada uno. En la Figura 12 puede observarse la alta resolución que se obtiene al emplear este algoritmo, capaz de mostrar la complejidad y heterogeneidad del tejido cerebral, debido a que cada área tiene una composición celular diferente. Una vez alcanzado el nivel de segmentación deseado, se enmascaró el segmento correspondiente a la zona externa del tejido, pues sólo contiene picos debidos a la matriz, que perturban significativamente el resto del análisis.

La correlación de los segmentos viene determinada por la diferencia de color entre ellos, cuanto más alejados están dos colores, entre sí, en la escala, menor correlación existe entre las huellas lipídicas de las regiones, y viceversa.

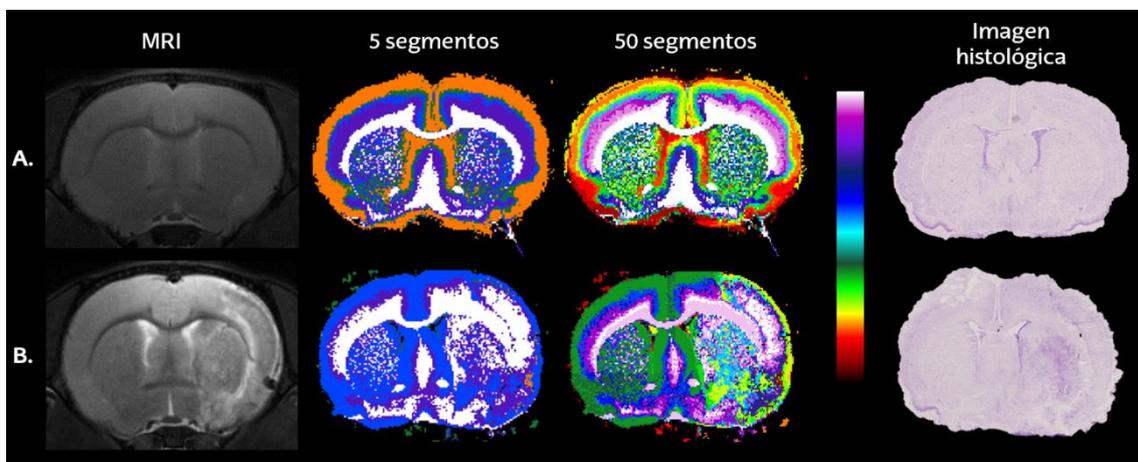


Figura 12.- Comparación entre las imágenes de resonancia magnética, 5 y 50 niveles de segmentación, de los correspondientes experimentos de IMS, e imagen histológica de un cerebro de rata sano (A) e infartado (B). A medida que aumenta el nivel de segmentación se obtienen nuevas regiones con distintas composiciones celulares. Se aprecia, claramente, que la zona infartada aparece como un nuevo conjunto de segmentos, cuya composición es similar a la de la sustancia blanca.

3.5.3 Asignación lipídica

La asignación de los lípidos se ha realizado comparando los valores de m/z experimentales con las especies contenidas en el software desarrollado por el Grupo de Espectroscopia, que cuenta con una base de datos generada *in silico* de más de 33000 especies lipídicas y sus correspondientes aductos; y por comparación con la base de datos de LIPIDS MAPS (www.lipidsmaps.org). La precisión de la masa depende, en cierto modo, de la intensidad de los picos, siendo mayor en aquellos valores m/z con mayor intensidad.

Hay que tener en cuenta que los lípidos son especies que tienden a formar aductos sodiados y potasiados. Además, son moléculas lábiles que se fragmentan con facilidad, pudiendo generar distintos aductos menos evidentes. La presencia de los aductos puede interferir con las señales de lípidos de interés, por lo que en ocasiones es necesario realizar espectrometrías de masas en tándem (MS/MS o MS^2). La técnica consiste en fragmentar un ion concreto del espectro de masas, en una sección del tejido, para obtener un segundo espectro que da información acerca de la composición del ion precursor, permitiendo así su correcta identificación.

A pesar de la alta resolución de MALDI-IMS y de MS/MS, no es posible diferenciar entre los enlaces éter y vinil-éter que presentan los glicerofosfolípidos. Lo mismo ocurre con la asignación de las PE y las PC, especies isobaras (en este caso es necesario realizar un MS^3). Estudios previos realizados por el Grupo de Espectroscopia⁴⁵ han concluido que las especies PE se detectan con mayor intensidad cuando se emplea el modo de ionización negativo. Por otra parte, se ha decidido que, para aquellas especies cuya m/z pueda asignarse a especies PE-O/P (éter/vinil-éter), se va a asumir que se tratan de PE-P,⁴⁶ mientras que las que pudieran asignarse como PC-O/P, serán PC-O.⁴⁷ Esta decisión se fundamenta en que se trata de la especie con mayor abundancia relativa en mamíferos, respecto a los dos tipos de enlaces. Independientemente del caso, no puede descartarse, completamente, la presencia de las otras especies.

3.5.4. Análisis estadístico

Para evitar en la medida de lo posible la variabilidad intermuestral, se ha trabajado exclusivamente con las especies de lípidos reproducibles. Éstas han sido seleccionadas empleando la regla del 80%: sólo se incluyeron aquellas especies que estuviesen presentes en al menos un 80% de las muestras. Tras obtener los lípidos reproducibles, se eliminan del estudio los fragmentos aductos con la matriz (DAN), y aquellas especies con asignaciones dudosas. Teniendo en cuenta que el presente TFG busca la obtención de posibles biomarcadores, que puedan usarse en un futuro para la detección del infarto y su posterior evaluación de gravedad, de manera que se pueda prescribir el tratamiento más adecuado para cada paciente, se han buscado, especialmente, aquellas especies cuya abundancia relativa experimente mayor cambio entre los cerebros infartados y los sanos. Es decir, se han seleccionado aquellos lípidos cuya variación en la abundancia relativa es estadísticamente significativa (valores de $p < 0.05$ en un análisis ANOVA).

Los valores de estos lípidos se han representado como los valores promedio de todas las muestras, utilizando como error la desviación estándar (SEM).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la búsqueda por encontrar posibles lípidos biomarcadores de infarto cerebral, el estudio se ha centrado en determinar la composición lipídica de los cerebros durante la respuesta inflamatoria. Empleando el modelo MCAO, el pico de inflamación se consigue a la semana de producirse el infarto, por lo que el estudio se ha centrado en ese punto temporal.³³

4.1. ELECCIÓN DE LA SECCIÓN DE TEJIDO

El cerebro presenta una estructura heterogénea y compleja; además, la sombra isquémica generada por el infarto abarca casi todo el hemisferio afectado. Es por ello que se ha decidido trabajar ROIs en lugar de con segmentos individuales. Al igual que con el espectro que se obtendría de

una sola sección, seleccionando un ROI se obtendrá un espectro promedio de todos los segmentos que estén delimitados por el área seleccionada. El ROI se ha seleccionado de forma que coincida con la zona donde se han realizado estudios de espectroscopia de resonancia magnética (MRS),³³ además de ser una zona que incluye la corteza y el estriado del cerebro de rata. En la figura 13 puede apreciarse, con mayor detalle, la alta resolución que es posible obtenerse mediante el algoritmo HDC-RD.

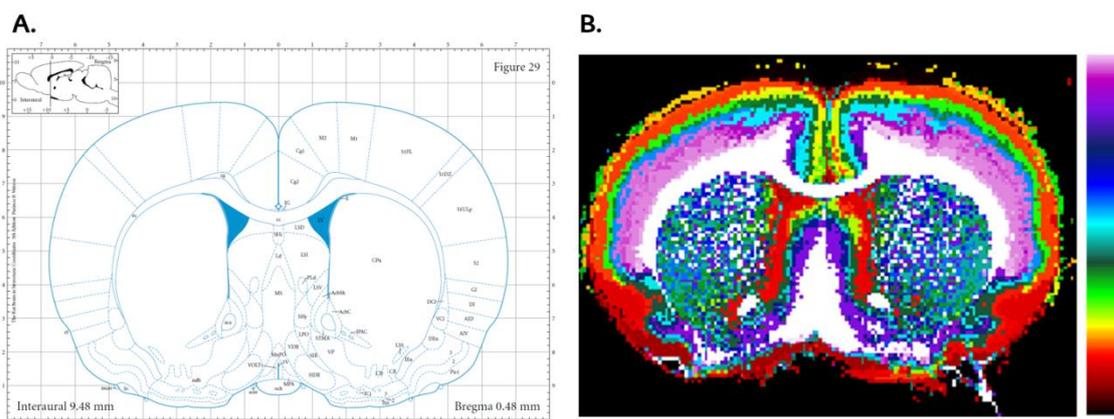


Figura 13.- A. Imagen de un corte transversal de cerebro de rata, extraído del Atlas del cerebro de rata.⁴⁸ B. Sección de cerebro de una muestra sana a un nivel de segmentación de 100. Como puede apreciarse, el algoritmo no solo es capaz de diferenciar las distintas regiones del cerebro, sino que, además, puede diferenciar entre distintas subcapas. En el caso del córtex cerebral (sustancia gris), el programa de segmentación es capaz de detectar sus 6 subcapas estructurales: la capa más externa, la molecular, con un segmento de color naranja; la capa granular externa, de color amarilla; la capa piramidal externa, de color verde claro; la capa granular interna, de color azul claro; la capa piramidal interna, de color morado y la capa multiforme, de color lila. La escala de colores indica la correlación entre las distintas regiones: cuanto más se alejan los colores entre sí, más difiere la huella lipídica de dos segmentos.

4.2. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SANAS

Si se comparasen los ROI de los cerebros sanos con los de los cerebros infartados, aumentaría la variación de los resultados obtenidos, debido a

que se estarían usando hemisferios de cerebros distintos en una misma comparativa. Una posible solución es comparar el hemisferio sano y el infartado de un mismo cerebro. Sin embargo, para ello es necesario demostrar que el lado no infartado, el contralateral, presenta la firma lipídica de un cerebro sano.

Hay que tener en cuenta que el contralateral sano de los cerebros infartados corresponde al hemisferio izquierdo. Por ello, inicialmente se compara la variabilidad entre huellas lipídicas en ambos hemisferios de los cerebros sanos, "calibrando", así, la técnica de las ROI. Las ROI seleccionadas se muestran en la Figura 14. Puesto que se va a trabajar con el promedio del área, el nivel de segmentación empleado es indiferente.

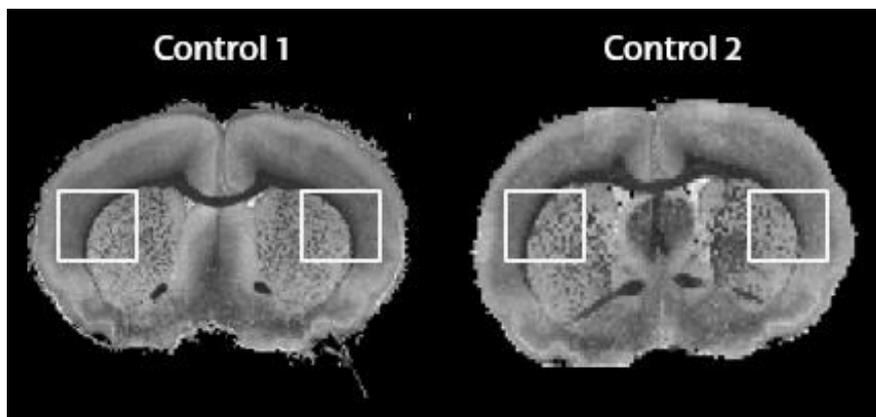


Figura 14.- ROIs seleccionados, ambos hemisferios, para la primera muestra sana (A) y la segunda (B). Se ha seleccionado, en cada experimento, la misma área y posición para ambos hemisferios.

Tras realizar un análisis de la varianza (ANOVA) de los datos obtenidos se ha determinado que no existen diferencias significativas, ni entre los hemisferios de los cerebros sanos ($p > 0.9999$), ni entre los cerebros ($p > 0.9999$). La Figura 15 muestra, de una forma visual, estos resultados a modo de *HeatMap*.

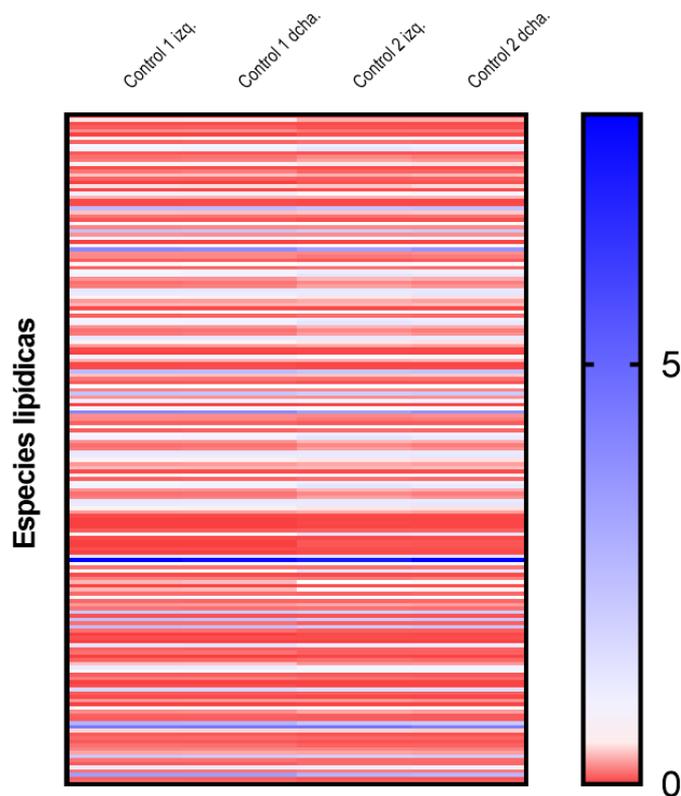


Figura 15.- HeatMap de los hemisferios de las muestras sanas. Se observa una gran reproducibilidad de la huella lipídica, tanto entre hemisferios de un mismo cerebro, como entre ambos cerebros. A medida que aumenta la abundancia relativa de las especies, el color se aleja del rojo hacia tonos más azules.

4.3. COMPARATIVA DEL CONTRALATERAL DEL HEMISFERIO INFARTADO CON EL HEMISFERIO IZQUIERDO DE LAS MUESTRAS SANAS

Una vez determinado que los hemisferios de las muestras sanas no presentan diferencias significativas en su distribución lipídica, se han comparado con los contralaterales de los cerebros infartados. La Figura 16 muestra los ROI seleccionados para las muestras infartadas, tanto en el hemisferio infartado como en el contralateral.

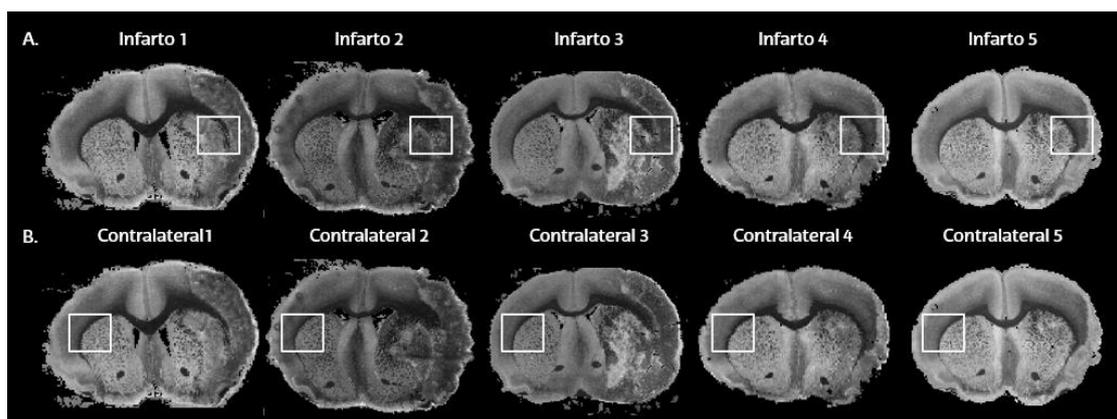


Figura 16.- ROIs seleccionados para el análisis de la distribución lipídica del cerebro en el hemisferio infartado y en el contralateral. El tamaño de los ROI es el mismo para todas las muestras.

Al igual que en el caso anterior, el análisis ANOVA permite concluir que no existen diferencias significativas entre las distribuciones lipídicas de los hemisferios izquierdos de los cerebros sanos y los contralaterales de los cerebros infartados ($p > 0.9999$). Por ello, se ha decidido emplear exclusivamente las muestras de los ratones infartados en el estudio. De este modo, se reduce el número de animales requeridos para el estudio. Se ha realizado un *HeatMap* con las especies lipídicas de los ROI extraídos de cada experimento (Figura 17).

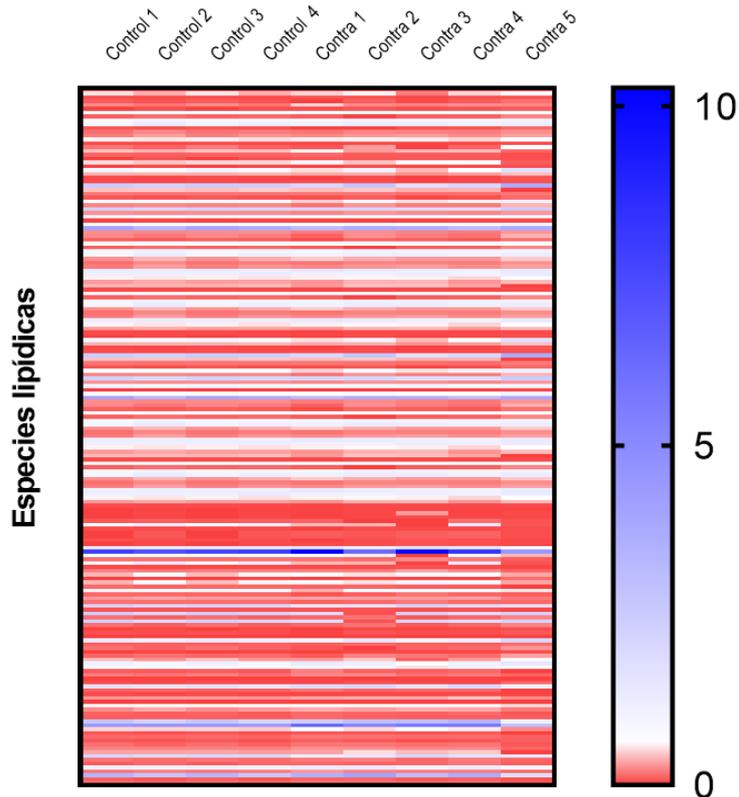


Figura 17.- HeatMap de los hemisferios izquierdos de las 7 muestras analizadas. Se ha obtenido un valor $p > 0.9999$, por lo que las señales obtenidas no son significativamente diferentes. Es decir, existe una buena reproducibilidad entre individuos.

4.4. IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES

Se detectaron y asignaron 506 especies que, tras ser filtrados siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos, se redujeron a 182. Una vez realizado el tratamiento estadístico, se identificaron 35 lípidos con variaciones estadísticamente significativas en su abundancia relativa. Las distribuciones de los mismos a lo largo del cerebro se muestran en la Figura 18.

También se ha generado un *HeatMap* comparando los 35 lípidos significativos en los hemisferios infartados y los contralaterales. A diferencia de los dos casos anteriores, sí existen diferencias significativas entre los hemisferios. Dentro de cada grupo, las diferencias que pueden observarse son debidas a pequeñas diferencias entre especímenes, en cualquier caso, son mucho menores que las debidas al infarto (Figura 19).

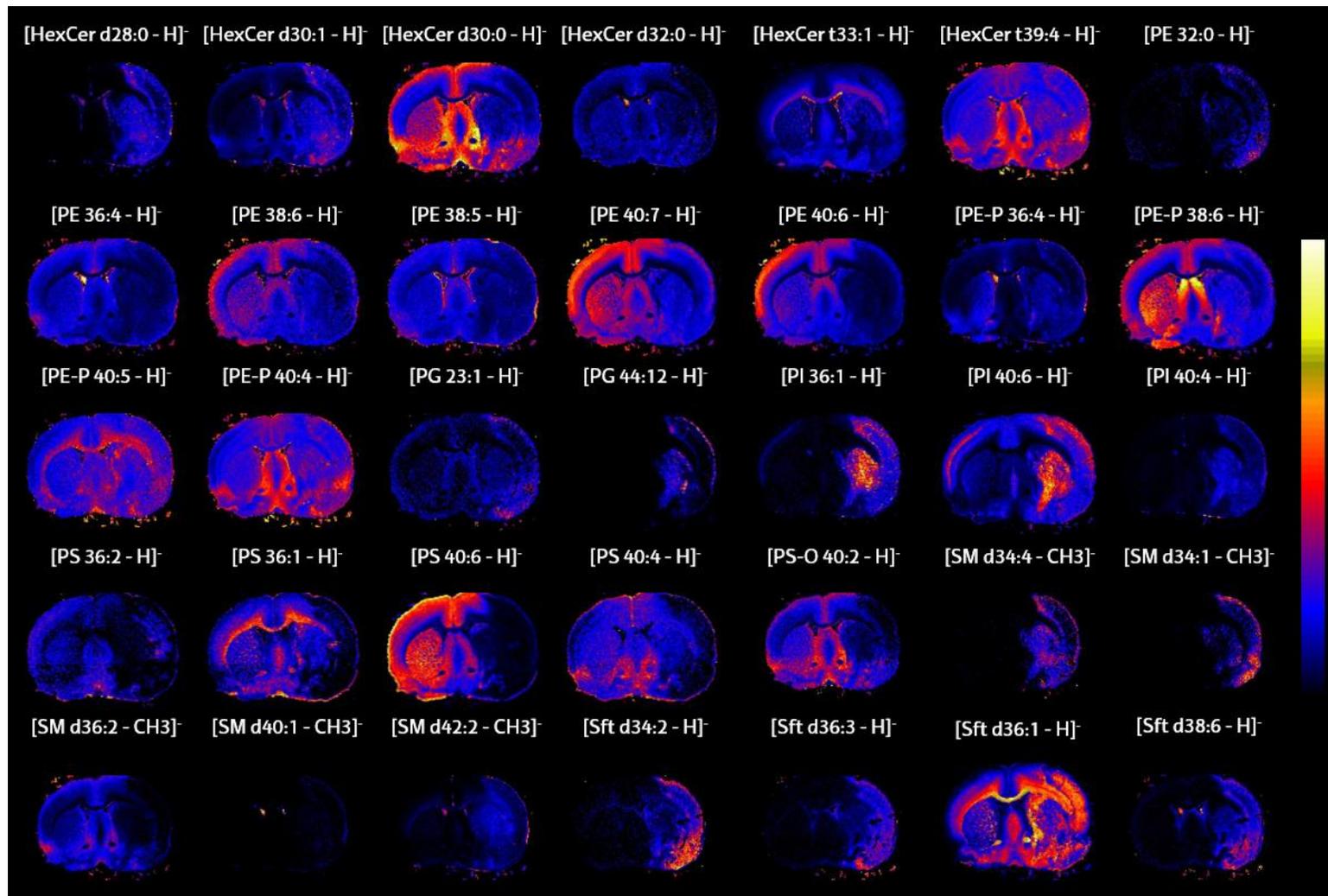


Figura 18.- Distribución de los 35 lípidos significativos detectados en los 5 cerebros infartados de rata.

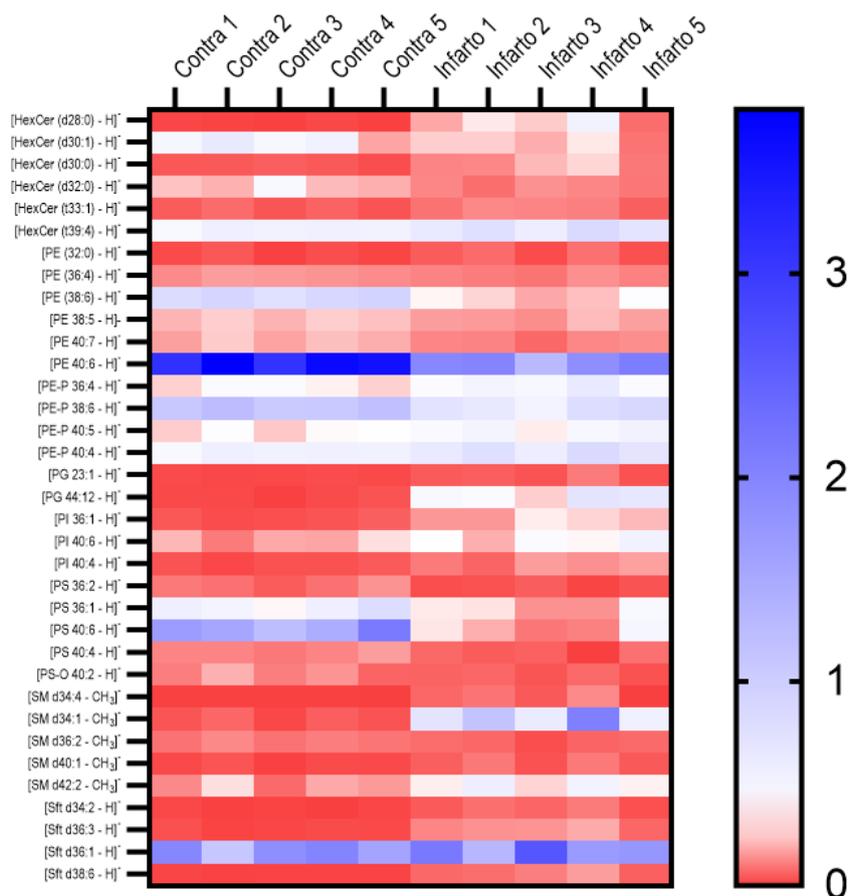


Figura 19.- HeatMap de las especies lipídicas significativas. Se aprecian dos regiones diferenciadas, correspondientes a los hemisferios infartados (derecha) y sus contralaterales (izquierda).

También se ha realizado un estudio de PCA, exclusivamente con los lípidos significativos para evitar las posibles variaciones intermuestrales (Figura 20) en la medida de lo posible. Se ha realizado un modelo de clasificación con un diseño de dos clases, infartado para los hemisferios con la lesión, y contralaterales para el hemisferio izquierdo. La clasificación molecular se generó empleando 4 métodos diferentes: máquinas de vectores de soporte (SVM), regresión logística, *NaiveBayes* y *RandomForest*. Cada uno de los métodos emplea distintas combinaciones de las variables que contribuyen a la clasificación de las muestras. Todas ellas alcanzan una clasificación perfecta (Figura 20 B). Esto se pone de manifiesto en la matriz de confusión, donde todas las muestras se clasifican correctamente (20 C).

En todos los casos se han empleado 10 niveles de variación cruzada, obteniéndose una exactitud de 1 en la diferenciación de los dos grupos, como puede verse en la columna de exactitud de clasificación (CA) de la Figura 20 B.

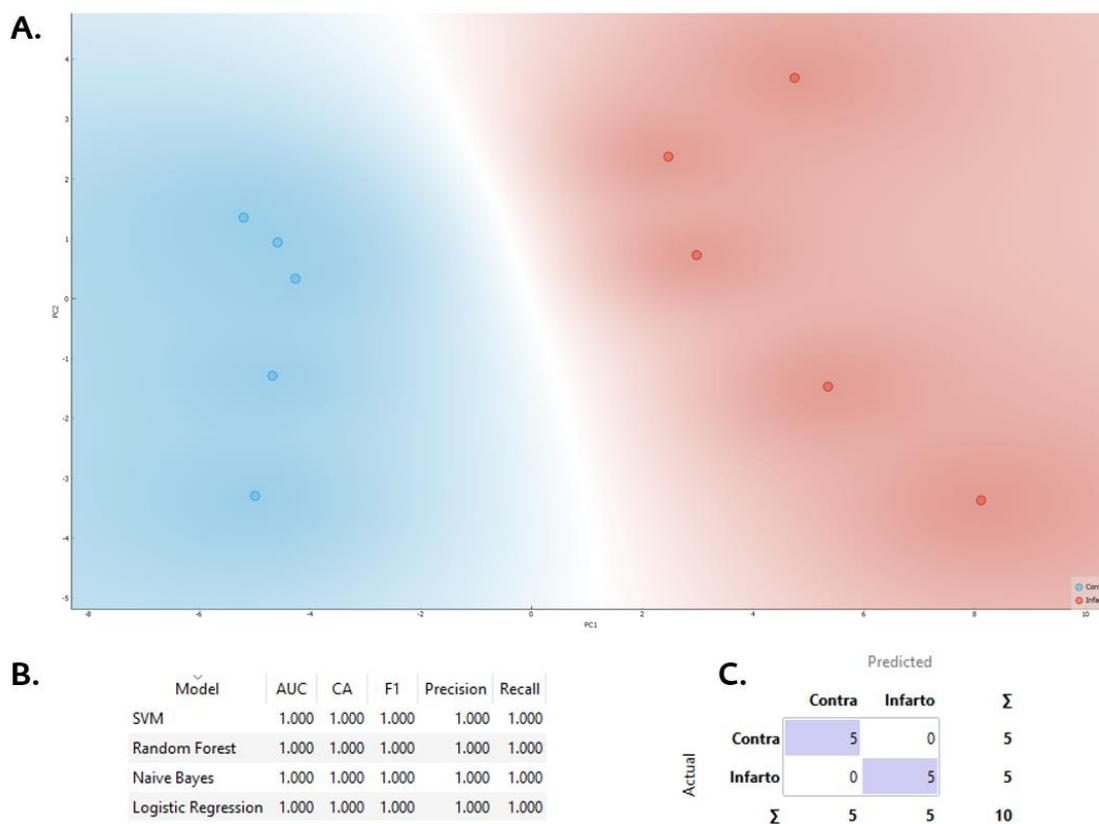


Figura 20.- **A.-** PCA en el que se observa la separación completa entre los hemisferios infartados (rojo) y contralaterales (azul). **B.-** Resumen de los resultados generados por los distintos modelos de clasificación. **C.-** Ejemplo de matriz de confusión obtenida para el modelo SVM; en todos los casos se obtuvo una clasificación perfecta.

La Figura 21 muestra la comparación entre la abundancia relativa de las especies lipídicas que experimentan cambios significativos y, por tanto, pueden servir como biomarcadores de infarto.

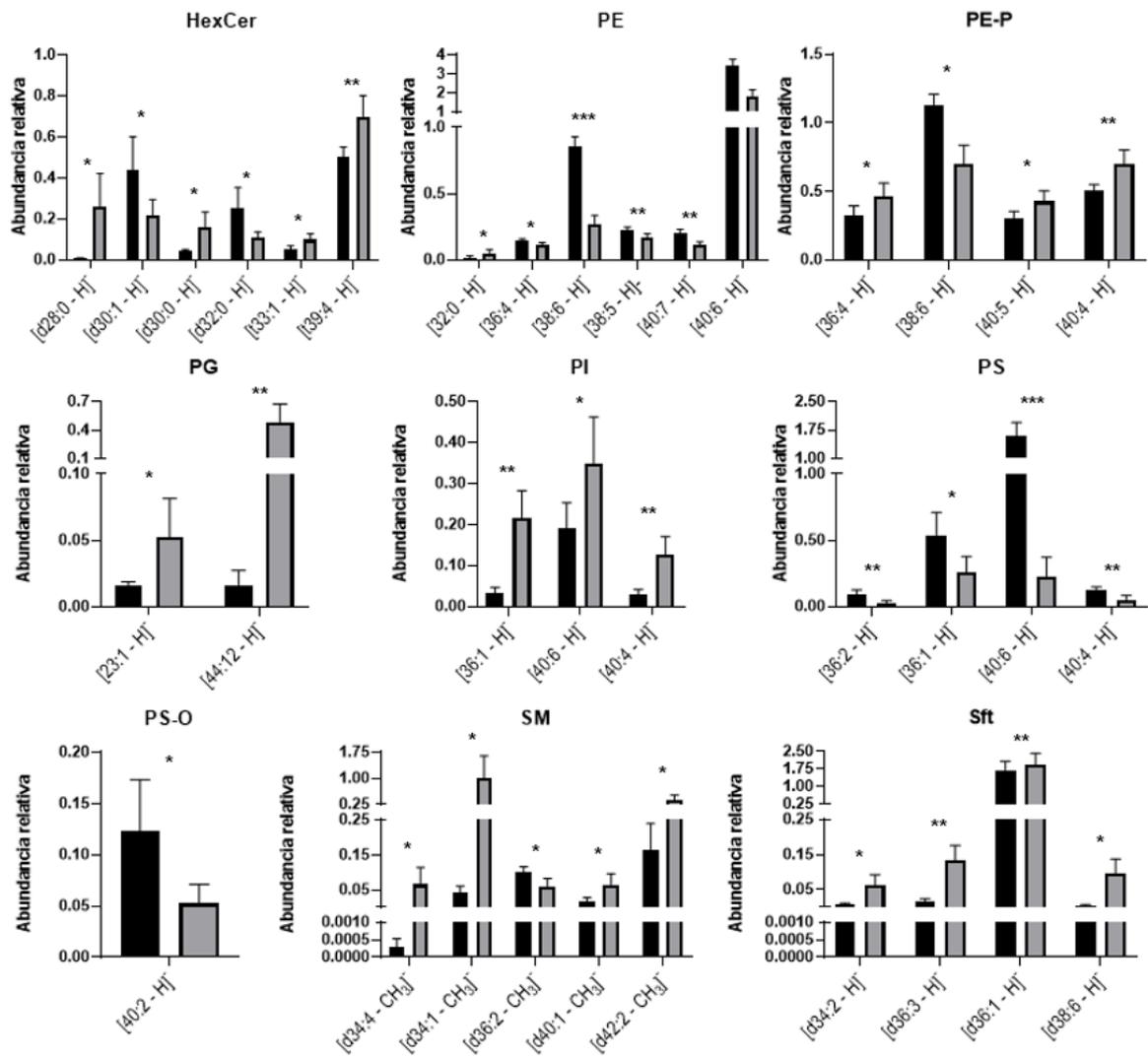


Figura 21.-Lípidos para los que se ha detectado un cambio significativo en su abundancia relativa en el hemisferio infartado, respecto al contralateral, con un nivel de significancia de *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$. En color negro se muestran los resultados obtenidos de los contralaterales, mientras que en color gris, los obtenidos a partir del hemisferio infartado.

Hay que tener en cuenta que se han seleccionado, como significativas, aquellas especies cuya abundancia relativa experimenta mayor cambio entre los hemisferios infartados y contralaterales. No obstante, el análisis ANOVA no permite estudiar la distribución de esas especies en el tejido. Es decir, especies que no han presentado una variación significativa en su abundancia relativa han podido ver alterada su disposición dentro del tejido, lo que conllevaría un cambio que sí es significativo. Esta observación

demuestra que, para este tipo de estudios, no es suficiente realizar un análisis estadístico, sino que se requiere, además, de un análisis visual más exhaustivo.

La tendencia que sigue la familia de los sulfátidos es un claro ejemplo de ello. Cabe destacar que la abundancia relativa de las 24 especies de sulfátidos detectadas aumenta en el hemisferio infartado, respecto al contralateral. Sin embargo, tras realizar el análisis ANOVA solamente 3 de ellos parecen ser significativos, algo que contrasta con lo que puede deducirse de un análisis más visual. La Figura 22 muestra las distribuciones de algunos de los sulfátidos detectados a lo largo del cerebro infartado de rata.

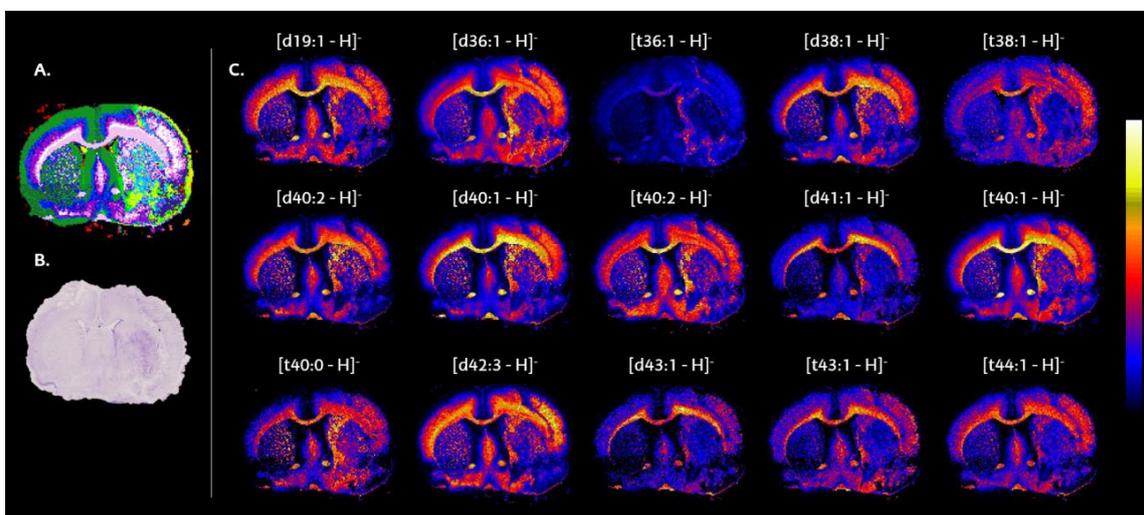


Figura 22.- Distribución lipídica de algunos sulfátidos. A.- Segmentación a 100 niveles de uno de los cerebros de rata infartados. B.- Imagen histológica del cerebro de rata tras teñir la muestra con violeta de cresilo. C.- Distribución, de algunos sulfátidos, a lo largo del cerebro; se ve un claro cambio en la composición del hemisferio infartado, respecto al contralateral: los sulfátidos parecen estar desplazándose hacia la materia gris del cerebro.

Los esfingolípidos son fundamentales en todas las células eucariotas.⁴⁹ Son indispensables en la regulación de la señalización, crecimiento y muerte celular; además, esfingolípidos complejos como las SM son necesarias para la correcta estructura y funcionalidad de las membranas celulares.⁵⁰ La mielina es particularmente rica en este tipo de lípidos, cuya alteración

metabólica está asociada, a menudo, con enfermedades neurodegenerativas.⁵¹

Sobre estas líneas, los sulfátidos juegan un papel crucial, pues son los encargados de mantener la integridad del SNC.⁵⁰ Son necesarios para la correcta localización de proteínas específicas, y son características de las membranas gliales.⁵² En concreto, sulfátidos con ácidos grasos de cadena larga, son abundantes en las vainas de mielina.⁵³ La mayoría de ellos están presentes en las células mielinizantes, oligodendrocitos y células de Schwann, encargadas de su síntesis.⁵⁴ Particularmente, los sulfátidos están implicados en los procesos de inflamación en enfermedades del SNC. La neuroinflamación genera la activación de las células gliales, muy sensibles a estímulos patológicos.⁵⁵

La abundancia relativa de las 24 especies de sulfátidos, que han sido analizadas en este TFG, ha aumentado en el hemisferio infartado, respecto al contralateral. Que las células de Schwann y los oligodendrocitos sinteticen sulfátidos, y éstas se activen tras estímulos como la inflamación, parece explicar el aumento descrito. También se ha evidenciado el aumento en la abundancia de los sulfátidos en el hemisferio infartado, respecto a un cerebro control, en otras enfermedades neurodegenerativas inflamatorias, como en la encefalomiелitis autoinmune y el Parkinson.⁵⁵

No obstante, como puede verse, para todos los sulfátidos recogidos en la Figura 22, existe una distribución anómala en el hemisferio infartado. Al parecer, se produce una infiltración desde la materia blanca hacia la materia gris. Un mismo comportamiento, pero inverso, se ha visto en los fosfatidilinositoles (Figura 23).

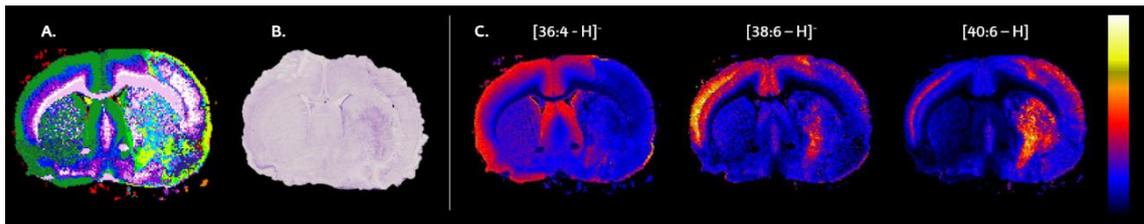


Figura 23.- **A.**-Segmentación a 100 niveles de uno de los cerebros de rata infartados. **B.**-Imagen histológica del cerebro de rata tras teñir la muestra con violeta de cresilo. **C.**-Distribución lipídica de algunos de los PI identificados en los experimentos de MALDI-IMS. El [PI 36:4 -H]⁻ muestra una distribución normal, en la que la especie es predominante en la materia gris del cerebro. Sin embargo, para las especies [PI 38:6 -H]⁻ y [PI 40:6 -H]⁻ se observa un aumento considerable de su abundancia relativa en el estriado del hemisferio infartado, materia blanca.

Los fosfatidilinositoles (PI) desempeñan una función fundamental para el correcto funcionamiento del cerebro, son moléculas señalizadoras que actúan en la liberación intracelular del calcio.⁵⁶ Es decir, regulan la concentración de calcio en el citosol.⁵⁷ Estudios anteriores realizados sobre la corteza cerebral han demostrado que, tras la MCAO, se produce una alteración en la homeóstasis de los PI, induciendo una acumulación de Ca^{2+} , provocando necrosis de las neuronas del hipocampo.⁵⁸ Sin embargo, estas observaciones no explican la infiltración de las PIs desde la materiagrís hacia la blanca.

A pesar de existir estudios que explican la infiltración de células inflamatorias, como los neutrófilos, células T y macrófagos, hacia la zona infartada del cerebro,⁵⁹ no se han estudiado las infiltraciones de lípidos, como los sulfátidos y los fosfatidilinositoles en este caso.

5. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo el estudio, por MALDI-IMS, de muestras de cerebros infartados, obteniendo la huella lipídica del hemisferio infartado y de su contralateral. Pese a ser un tejido muy heterogéneo, no es compleja la selección de los segmentos que se corresponden con las áreas histológicas del infarto, aunque, en este caso, se ha decidido trabajar con regiones de interés para simplificar el análisis de los resultados.

Se encontraron diferencias drásticas en el perfil lipídico, correlacionando con el proceso inflamatorio. Al menos 35 especies lipídicas presentan cambios estadísticamente significativos en el contexto de la isquemia. De ellos, dos familias de lípidos, sulfátidos y fosfatidilinositales, presentan alteraciones muy significativas, y su distribución espacial define perfectamente la lesión. En el caso de los sulfátidos, son lípidos que en cerebro sano se encuentran exclusivamente en sustancia blanca. Sin embargo, en cerebro isquémico, presentan una alta abundancia en la zona de la lesión, indicando una posible infiltración de células de materia blanca. Este mismo comportamiento ha sido observado en los fosfatidilinositales, pero inverso. Un estudio más exhaustivo sobre estas familias podría arrojar nueva información sobre el papel de los lípidos en enfermedades neurodegenerativas, ayudando a conocer mejor el perfil metabólico del cerebro. Actualmente, se está intentando correlacionar los cambios observados por IMS con los espectros de MRI.

En definitiva, el empleo de MALDI-IMS en estudios multimodales puede abrir nuevos caminos, desconocidos hasta el momento, que permitan desarrollar una medicina más personal y específica para con los pacientes.

6. PERSPECTIVAS

La búsqueda de una medicina personalizada, más específica y que permita un diagnóstico y pronóstico adaptado a cada paciente ha propiciado el desarrollo de nuevas tecnologías, capaces de aportar información relevante sobre el metabolismo celular. Gracias a los avances que se están produciendo alrededor de la espectroscopia de masas, el interés por describir el lipidoma completo de distintas enfermedades está en auge. Además, la información que aporta la IMS sobre la distribución, de los metabolitos, a lo largo de los tejidos, permite comprender mejor la complejidad de los sistemas biológicos. Es decir, se trata de una nueva histología molecular, digital, que podría llegar a sustituir a la histología tradicional.

No obstante, aunque MALDI-IMS se presenta como una técnica atractiva, con gran potencial y de alto rendimiento para el ámbito bioquímico, la implantación de esta técnica en la investigación clínica no está exenta de problemas. A pesar de tener una sencilla preparación de muestra, que además no requiere de marcado previo, el análisis experimental de la gran cantidad de datos generada, y, sobre todo, el pretratamiento de datos requerido, sigue siendo muy complejo. Es por ello que el desarrollo de nuevos softwares que permitan automatizar el análisis y tratamiento de datos es imprescindible para que, en un futuro, esta técnica pueda implementarse en la rutina diaria de diagnóstico clínico.

En lo que respecta al trabajo realizado, queda pendiente un estudio más exhaustivo de la infiltración observada, en el pico de inflamación a los 7 días del infarto isquémico, en los sulfátidos y los fosfatidilinosítoles. Un ensayo inmunohistoquímico, comprendido entre el día cero tras el infarto isquémico y el séptimo día, ayudaría a comprender y estudiar los mecanismos que entran en juego durante esta infiltración. También podría realizarse un estudio lipidómico durante dicho periodo de tiempo, para ver cómo evoluciona la distribución lipídica del cerebro.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Idle, J. R.; Gonzalez, F. J. Metabolomics. *Cell Metab.* 2007, 6 (5), 348-351
- ² Fiehn, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002, 48 (1-2), 155-171
- ³ GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators. Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *N. Engl. J. Med.* 2018, 379 (25), 2429-2437
- ⁴ Correction to: An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* 2013, 44, 2064-2089
- ⁵ GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019, 18 (5), 439-458
- ⁶ Astrup, J.; Siesjö, B. K.; Symon, L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke* 1981, 12 (6), 723-725
- ⁷ Campbell, B. C.; De Silva, D. A.; Macleod, M. R.; Coutts, S. B.; Schwamm, L. H.; Davis, S. M.; Donnan, G. A. Ischaemic stroke. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2019, 5 (1), 1-3
- ⁸ The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 1995, 333 (24), 1581-1587
- ⁹ McColl, B. W.; Allan, S. M.; Rothwell, N. J. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke. *Neuroscience* 2009, 158 (3), 1049-1061
- ¹⁰ Jin, R.; Yang G.; Li, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J. Leukoc. Biol.* 2010, 87 (5), 779-789
- ¹¹ Sharma, R.; Sekhon, S.; Cascella, M.; White Matter Lesions (actualizado el 15 de febrero de 2021) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562167/>. StatPearls [Internet]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021* (accedido el 14/06/21)

¹² Gasparovic, C.; Rosenberg, G. A.; Wallace, J. A.; Estrada, E. Y.; Roberts, K.; Pastuszyn, A.; Ahmed, W.; Graham, G. D. Magnetic resonance lipid signals in rat brain after experimental stroke correlate with neutral lipid accumulation. *Neurosci. Lett.* 2001, 301(2), 87-90

¹³ Nielsen, M. M.; Lambertsen, K. L.; Clausen, B. H.; Meyer, M.; Bhandari, D. R.; Larsen S. T.; Poulsen, S. S.; Spengler, B.; Janfelt, C.; Hansen, H. S. Mass spectrometry imaging of biomarker lipids for phagocytosis and signalling during focal cerebral ischaemia. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1-12

¹⁴ Han, X. Lipidomics for studying metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016, 12 (11), 668-679

¹⁵ Spener, F.; Lagarde, M.; Gélouën, A.; Record, M. Editorial: What is lipidomics? *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2003, 105, 481-482

¹⁶ Laganowsky, A.; Reading, E.; Allison, T. M.; Ulmschneider, M. B.; Degiacomi, M. T.; Baldwin, A. J.; Robinson, C. V. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature.* 2014, 510,172-175

¹⁷ Bou Khalil, M.; Hou, W.; Zhou, H.; Elisma, F.; Swayne, L. A.; Blanchard, A. P.; Yao, Z.; Bennett, S. A.; Figeys, D. Lipidomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrom. Rev.* 2010, 29 (6), 877-929

¹⁸ Gross, R. W.; Han, X. Lipidomics at the interface of structure and function in systems biology. *Chem. Biol.* 2011, 18 (3), 284-291

¹⁹ Wenk, M. R. The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4 (7), 594-610

²⁰ Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; Van Meer, G.; VanNieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 2005, 46,839-861

²¹ Glatz, J. F. Challenges in fatty acid and lipid physiology. *Front. Physiol.* 2011, 2, 1-3

- ²² Bond, L. M.; Miyazaki, M.; O'Neil, L. M.; Ding, F.; Ntambi, J. M. Chapter 6 - Fatty acid desaturation and elongation in mammals. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 2016, sexta edición, 185-208
- ²³ Yamashita, A.; Hayashi, Y.; Nemoto-Sasaki, Y.; Ito, M.; Oka, S.; Tanikawa, T.; Waku, K.; Sugiura, T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog. Lipid Res.* 2014, 53, 18-81.
- ²⁴ Futerman A. H. Chapter 10 - Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 2016, sexta edición, 297-326
- ²⁵ Ingólfsson, H. I.; Melo, M. N.; Van Eerden, F. J.; Arnarez, C.; Lopez, C. A.; Wassenaar, T. A.; Periole, X.; De Vried, A. H.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J. lipid organization of the plasma membrane. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 14554-14559
- ²⁶ McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2007, 26 (4), 606-643
- ²⁷ Spraker, J. E.; Luu, G. T.; Sanchez, L. M. Imaging mass spectrometry for natural products discovery: a review of ionization methods. *Nat. Prod. Rep.* 2020, 37 (2), 150-162
- ²⁸ Norris, J. L.; Caprioli, R. M. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research. *Chem. Rev.* 2013, 113 (4), 2309-2342
- ²⁹ Chunghtai, K.; Heeren, R. M. Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chem. Rev.* 2010, 110 (5), 3237-3277
- ³⁰ Wolff, M. M.; Stephens, W. E. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Rev. Sci. Instrum.* 1953, 24 (8), 616-617
- ³¹ Djambazova, K. V.; Klein, D. R.; Migas, L. G.; Neumann, E. K.; Rivera, E. S.; Van De Plas, R.; Caprioli, R. M.; Spraggins, J. M. Resolving the Complexity of Spatial Lipidomics Using MALDI TIMS Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2020, 92 (19), 13290-13297

- ³² Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G. The Orbitrap: A new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 2005, 40 (4), 430-443
- ³³ Joya, A.; Ardaya, M.; Montilla, A.; Garbizu, M.; Plaza-García, S.; Gómez-Vallejo, V.; Padro, D.; Gutiérrez, J. J.; Rios, X.; Ramos-Cabrera, P.; Cossío, U.; Pulagam, K. R.; Higuchi, M.; Domercq, M.; Cavaliere, F.; Matute, C.; Llop, J.; Martín, A. In vivo multimodal imaging of adenosine A1 receptors in neuroinflammation after experimental stroke. *Theranostics.* 2021, 11 (1), 410-425
- ³⁴ Rousselet, E.; Kriz, J.; Seidah, N. G. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J. Vis. Exp.* 2012, 69, 1-5
- ³⁵ Thomas, A.; Charbonneau, J. L.; Fournaise, E.; Chaurand, P. Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition. *Anal. Chem.* 2012, 84 (4), 2048-2054
- ³⁶ Garate, J.; Fernández, R.; Lage, S.; Bestard-Escalas, J.; Lopez, D. H.; Reigada, R.; Khorrami, S.; Ginard, D.; Reyes, J.; Amengual, I.; Barceló-Coblijn, G.; Fernández, J. A. Imaging mass spectrometry increased resolution using 2-mercaptobenothiazole and 2,5-diaminonaphthalene matrices: application to lipid distribution in human colon. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 4697-4708
- ³⁷ Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Zemski Berry, K. A. MALDI imaging of lipids after matrix sublimation/deposition. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011, 181 (11), 70-75
- ³⁸ Fernández, R.; Garate, J.; Martín-Saiz, L.; Galetich, I.; Fernández, J. A. Matrix Sublimation Device for MALDI Mass Spectrometry Imaging. *Anal. Chem.* 2019, 91 (1), 803-807
- ³⁹ Strupat, K.; Kovtoun, V.; Bui, H.; Viner, R.; Stafford, G.; Horning, S. MALDI produced ions inspected with a linear ion trap-orbitrap hybrid mass analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20 (8), 1451-1463

- ⁴⁰ Kádár, A. Wittmann, G.; Liposits, Z.; Fekete, C. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J. Neurosci. Methods*. 2009, 184 (1), 115-118
- ⁴¹ McDonnell, L. A.; Van Remoortere, A.; de Velde, N.; van Zeijl, R. J.; Deelder, A. M. Imaging mass Spectrometry data reduction: Automated feature identification and extraction. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21 (12), 1969-1978
- ⁴² Coombes, K. R.; Fritsche, H. A.; Clarke, C.; Chen, J. N.; Baggerly, K. A.; Morris, J. S.; Xiao, L. C.; Hung, M. C.; Kuerer, H. M. Quality control and peak finding for proteomics data collected from nipple aspirate fluid by surface-enhanced laser desorption and ionization. *Clin. Chem.* 2013, 49 (10), 1615-23
- ⁴³ Xiong, X.; De La Torre, F. Supervised descent method and its application to face alignment. *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. 2013.
- ⁴⁴ Fernández, R.; Garate, J.; Tolentino-Cortez, T.; Herraiz, A.; Lombardero, L.; Ducrocq, F.; Rodríguez-Puertas, R.; Trifilieff, P.; Astigarraga, E.; Barreda-Gomez, G.; Fernández, J. A. Mycroarray and Mass Spectrometry-Based Methodology for Lipid Profiling of tissues and Cell Cultures. *Anal. Chem.* 2019, 91 (24), 15967-15973
- ⁴⁵ Garate, J.; Lage, S.; Martín-Sainz, L.; Perez-Valle, A.; Ochoa, B.; Boyano, M. D.; Fernández, R.; Fernández, J. A. Influence of Lipid Fragmentation in the Data Analysis of Imaging Mass Spectrometry Experiments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2020, 31 (3), 517-526
- ⁴⁶ Braverman, N. E.; Moser, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys Acta*. 2012, 1822 (9), 1442-1452
- ⁴⁷ Magnusson, C. D.; Haraldsson, G.G.; Ether lipids. *Chem. Phys. Lipids*. 2011, 164 (5), 315-340
- ⁴⁸ Watson, C.; Paxinos, G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates – *The New Coronal Set*. 2004, quinta edición, figura 29

- ⁴⁹ Clarke, B. A.; Majumder, S.; Zhu, H.; Lee, Y. T.; Kono, M.; Li, C.; Khanna, C.; Blain, H.; Schwartz, R.; Huso, V. L.; Byrnes, C.; Tuymetova, G.; Dunn, T. M.; Allende, M. L.; Proia, R. L. The Ormdl genes regulate the sphingolipid synthesis pathway to ensure proper myelination and neurologic function in mice. *Elife*, 8, 1-17
- ⁵⁰ Giussani, P.; Prinetti, A.; Tringali, C. The role of Sphingolipids in myelination and myelin stability and their involvement in childhood and adult demyelinating disorders. *J. Neurochem.* 2019, 156 (4), 403-414
- ⁵¹ Hussain, G.; Wang, J.; Rasul, A.; Anwar, H.; Imran, A.; Qasim, M.; Zafar, S.; Kamran, S. K. S.; Razzaq, A.; Aziz, N.; Ahmad, W.; Shabbir, A.; Iqbal, J.; Baig, S. M.; Sun, T. Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis.* 2019, 18 (1), 1-12
- ⁵² McGonigal, R.; Barrie, J. A.; Yao, D.; McLaughlin, M.; Cunningham, M. E.; Rowan, E. G.; Willison, H. J. Glial sulfatides and neuronal complex gangliosides are functionally interdependent in maintaining myelinating axon integrity. *J. Neurosci.* 2019, 39 (1), 63-77
- ⁵³ Hirahara, Y.; Bansal, R.; Honle, K.; Ikenaka, K.; Wada, Y. Sulfatide Is a Negative Regulator of Oligodendrocyte Differentiation: Development in Sulfatide-Null Mice. *Glia.* 2004, 45 (3), 269-277
- ⁵⁴ Takahashi, T.; Suzuki, T. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J. Lipid Res.* 2012, 53 (8), 1437-1450
- ⁵⁵ Jeon, S.; Yoon, H. J.; Park, S.; Kim, I.; Park, E. J. Sulfatide, A major Lipid Component of Myelin Sheath, Activates Inflammatory Responses As an Endogenous Stimulator in Brain-Resident Immune Cells. *J. Immunol.* 2008, 181 (11), 8077-8087
- ⁵⁶ Fu, C.; Xu, J.; Cheng, W.; Rojas, T.; Chin, A. C.; Snowman, A. M.; Harraz, M. M.; Snyder, S. H. Neuronal migration is mediated by inositol hexakisphosphate kinase 1 via α -actinin and focal adhesion kinase. *PNAS.* 2017, 114 (8), 2036-2041

⁵⁷ Lee, S.; kim, M. G.; Ahn, H.; Kim, S. Inositol pyrophosphates: Signaling molecules with pleiotropic actions in mammals. *Molecules*, 2020, 25 (9), 1-15

⁵⁸ Tsubokawa, H.; Oguro, K.; Robinson, H. P.; Masuzawa, T.; Rhee, T. S.; Takenawa, T.; Kawai, N. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a mediator of neuronal death in ischemic hippocampus. *Neuroscience*. 1994, 59 (2), 291-297

⁵⁹ Jian, Z.; Liu, R.; Zhu, X.; Smerin, D.; Zhong, Y.; Gu, L.; Fang, W.; Xiong, X. The Involvement and Therapy Target of Immune Cells After Ischemic Stroke. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1-15