

DESCIFRANDO LA ANATOMÍA MOLECULAR DE UN TEJIDO MEDIANTE ANÁLISIS LIPIDÓMICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

UNRAVELING THE MOLECULAR ANATOMY OF A TISSUE BY MASS SPECTROMETRY LIPID PROFILING

EHUN BATEN ANATOMIA MOLEKULARRAREN AZTERKETA MASA-ESPEKTROMETRIA BIDEZKO ANALISI LIPIDOMIKOA EGINEZ

Antonio Veloso (1), Egoitz Astigarraga (1), Olatz Fresnedo (2), Lino Arisketa (2), Gabriel Barreda-Gómez (3), Laura Lombardero (3), María Teresa Giralt (3), Rafael Rodríguez-Puertas (3), Begoña Ochoa (2), José A. Fernández (1)

(1) Departamento de Química Física, Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco, Leioa. Bizkaia. Euskadi. España UE.

(2) Departamento de Fisiología; Universidad del País Vasco, Leioa. Bizkaia. Euskadi. España UE.

(3) Departamento de Farmacología; Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco, Leioa. Bizkaia. Euskadi. España UE.

RESUMEN

La lipidómica está emergiendo como una ciencia imprescindible para la comprensión del funcionamiento de células y tejidos, dado que complementa el conocimiento obtenido mediante la genómica y la proteómica. La caracterización de los lípidos que componen una muestra biológica es una tarea compleja, debido a su enorme variedad y variabilidad, y por tanto necesita del empleo de técnicas de alto rendimiento para su consecución. La espectrometría de masas está demostrando ser la técnica ideal para llevar a cabo dicha tarea, especialmente desde el desarrollo de la imagen por espectrometría de masas. En el presente trabajo se presentan los resultados del empleo de una nueva matriz, 2-mercaptobenzotiazol, en el análisis lipidómico de extractos de hígado quiescente y regenerante de roedor mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La buena reproducibilidad entre individuos, permite la observación de diferencias en las especies lipídicas mayoritarias del hígado normal y el afectado de esteatosis. Se muestran además imágenes de la disposición anatómica de ciertas moléculas en el cerebro de rata, obtenidas representando la distribución de las concentraciones de diversas especies de lípidos a lo largo de los cortes de tejido. Por último, se discute la aplicación de estas técnicas a la investigación experimental y clínica. Palabras Clave: Lipidómica, espectrometría de masas, imagen, enfermedades hepáticas, técnicas de alto rendimiento.

Correspondencia:

José A. Fernández

Departamento de Química Física, Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco.

Bº Sarriena s/n. 48940 Leioa. Bizkaia. Euskadi. España UE.

Correo electrónico: josea.fernandez@ehu.es

Begoña Ochoa.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco.

Bº Sarriena s/n. 48940 Leioa. Bizkaia. Euskadi. España UE.

Correo electrónico: begona.ochoa@ehu.es

Rafael Rodríguez-Puertas

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco.

Bº Sarriena s/n, 48940 Leioa, España.

Rafael.rodriguez@ehu.es

SUMMARY

Lipidomics is emerging as an essential science to understand the functioning of cells and tissues, as it complements the knowledge obtained by genomics and proteomics. The characterization of lipid components in a biological sample is a complex task, due to its enormous variety and variability, and therefore requires of high throughput techniques. The employment of mass spectrometry is becoming the reference technique to carry out such task, specially since the development of the imaging mass spectrometry. In the present work, we present the results obtained using a new matrix: 2-mercaptobenzothiazole, in the lipidomic analysis of rodent quiescent and regenerating liver extracts. The good reproducibility between individuals allows the observation of differences in the main lipidic species in normal and steatotic liver. In addition, images of the distribution of several species in rat brain are shown, representing the distribution of some lipid species across tissue slices. Finally, the applicability of these techniques to experimental and clinical research is discussed.

Keyword: Lipidomics, Mass spectrometry, imaging, hepatic diseases, high-throughput techniques

LABURPENA

Lipidomika zelula eta ehunen funtzionamenduaren ulerpenerako ezinbesteko zientzia bezala erretzen ari da, genomikaren eta proteomikaren bidez lortutako ezagutza osatzen baitu. Lipidoen aniztasun eta aldakortasunarengatik, mota honetako biomolekulen karakterizazioa zeregin konplexua da lagin biologikoetan, eta horretarako errendimendu handiko teknikak erabili behar dira. Zeregin hau betetzeko masen espektrometria teknika hobe ezina suertatzen ari da, bereziki masen espektrometria bidezko irudikapenaren garapenarekin. Lan honetan matrize berri batekin lortutako emaitzak aurkezten ditugu: 2-merkaptobenzotiazola erabili dugu birsorkuntzan eta egoera geldikorrean dauden gibelen erauzkien azterketa lipidomikoa egiteko karraskarietan. Indibiduen arteko errepikakortasun onak, gibel normalaren eta esteatosia duenaren arteko desberdintasunak behatu ahal izatea ahalbidetzen du lipidoen espezie nagusietan. Gainera, arratoi-garuneko zenbait molekularen kokapen anatomikoak erakusten dira, ehunaren ebaketa histologikotan zeharreko lipidoen espezie desberdinen kontzentrazioen banaketa adieraziz lorturikoak. Azkenik, teknika hauek ikerkuntza experimentalean eta klinikoan eduki ditzaketen aplikazioak eztabaidatzen dira.

Hitz gakoak: Masa-espektrometria, irudi-eraikuntza, gaixotasun hepaticoak, errendimendu handiko teknikak

INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas es una herramienta analítica que se emplea para determinar el peso molecular de los componentes de una muestra. Sus raíces se extienden a lo largo de más de cien años, desde los experimentos de mitad del siglo 19 sobre descargas en gases, que dieron lugar al descubrimiento de los rayos anódicos y catódicos(1,2). La historia de la espectrometría de masas ha sido galardonada con cinco premios Nobel en Física y Química: J. J. Thompson (1906), F. W. Aston (1922), W. Paul (1989), J. B. Fenn (2002) y K. Tanaka (2002). Pero fueron estos dos últimos, el de Fenn por el desarrollo del espectrómetro ESI (electrospray ionization)(3,4) y el de Tanaka, por la introducción de la técnica de MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization)(5), basados en los denominados métodos de ionización blandos, los que condujeron a un crecimiento exponencial en el empleo de la espectrometría de masas, al permitir el análisis e identificación de péptidos. El impulso cobrado por la espectrometría de masas en los últimos quince años, está íntimamente relacionado con su capacidad para analizar muestras que contienen docenas o incluso cientos de proteínas, participando así en el desarrollo de la proteómica(6).

Sin embargo, las aplicaciones de la espectrometría de masas van mucho más allá, extendiéndose a campos relevantes para el desarrollo científico y sanitario: ómicas (metabolómica, lipidómica, genómica), Farmacología (desarrollo de nuevos fármacos, detección de sustancias dopantes en deportistas de élite, farmacocinética, metabolismo de los fármacos), Química Orgánica (determinación de masa exacta para análisis de compuestos de nueva creación, Medicina Clínica (screening neonatal, análisis de hemoglobina, test de fármacos), Medio Ambiente (calidad del agua, contaminación alimentaria) y Geología (composición del crudo), entre otros.

Todas estas aplicaciones nacen de las propiedades intrínsecas de la espectrometría de masas: precisión en la determinación de la masa (dependiendo del diseño del aparato se pueden conseguir precisiones de 5 ppm o mejores), enorme rango dinámico que permite detectar compuestos en una misma muestra en concentraciones muy diferentes, tolerancia a las impurezas, gran velocidad de análisis, fácil automatización de las medidas y bajo coste por análisis(6), aunque este último punto no es evidente, dado el elevado coste de un espectrómetro de masas de última generación y del personal altamente cualificado que requiere.

Cada año aparecen nuevos campos de aplicación para la espectrometría de masas(7,8). Los nuevos modelos de espectrómetros no aportan únicamente la masa de las moléculas presentes en la muestra, sino que suministran además información estructural mediante métodos de fragmentación (MS/MS) o movilidad iónica(9). Una de las

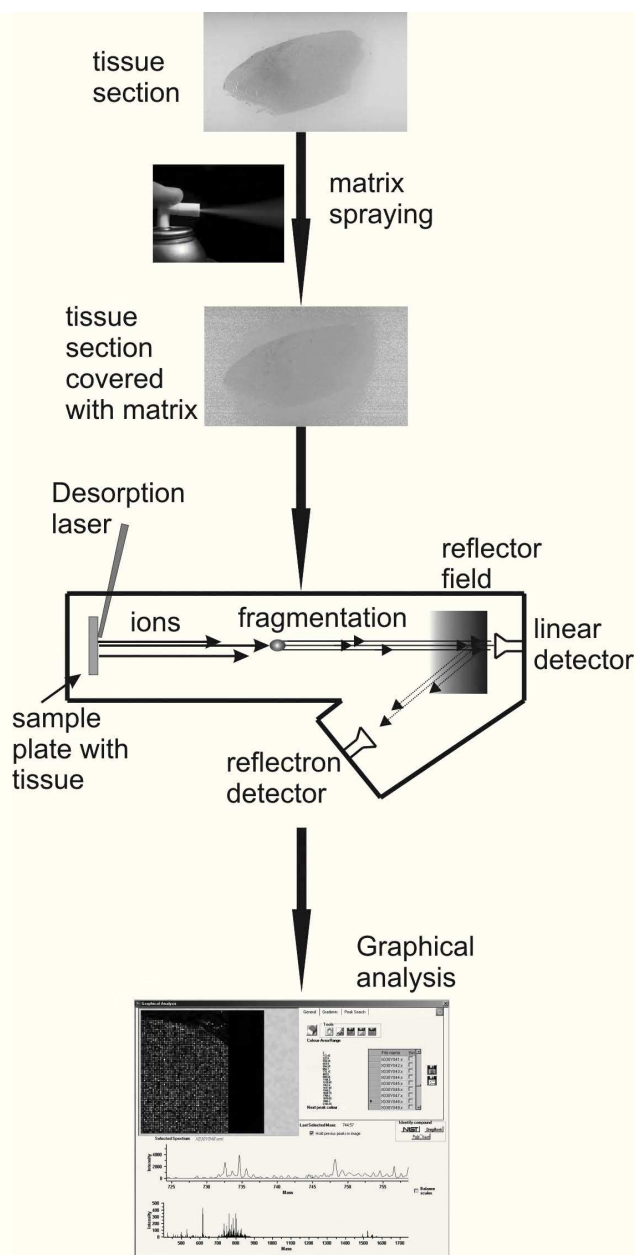


Figura 1. Esquema del proceso de preparación de cortes de tejido para los experimentos de imagen por espectrometría de masas MALDI-TOF. Tissue section (sección de tejido); matrix spraying (deposición de la matriz); tissue section covered with matrix (corte de tejido cubierto por la matriz); desorption laser (láser de desorción); sample plate with tissue (placa de muestra con el tejido); ions (iones); fragmentation (fragmentación); reflector field (campo reflector); linear detector (detector lineal); reflectron detector (detector del reflector); graphical analysis (análisis gráfico). La identificación de cada componente se basa en su tiempo de vuelo (time of flight, TOF) en el tubo del espectrómetro en condiciones de vacío extremo.

aplicaciones más recientes y que está abriendo un campo completamente nuevo, es la imagen por espectrometría de masas (IMS), que permite el análisis directo de tejidos, obteniendo mapas de concentración de proteínas, lípidos, metabolitos y cualquier otra molécula presente en el corte de tejido (Figura 1). Se recupera así una información que

Figura 2. Relación del análisis global de los lípidos (lipidoma) con el genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma. Los lípidos, además, regulan la función de proteínas y la transcripción de genes, como parte del interactoma dentro de la célula.

hasta ahora se perdía en el proceso de extracción y preparación de las muestras: la localización anatómica de los analitos.

Las posibilidades de esta técnica, desarrollada a partir de la técnica de MALDI, son inmensas e incluye la localización de marcadores relacionados con enfermedades, estudios in situ de las diferencias entre tejidos sanos y enfermos, estudios comparativos entre distintos tipos de tejidos, localización de los lugares de acción de fármacos, ... etc. Actualmente, las técnicas de IMS ofrecen resoluciones de hasta ~25 μm , aunque se puede bajar a ~3 μm con el empleo de bombardeo por iones, o incluso mejores.

En este contexto, una de las ómicas de más reciente creación es la lipidómica, que se define de forma genérica como el estudio a escala de sistema de las especies lipídicas, su abundancia, actividad biológica y localización subcelular y distribución en tejidos (**Figura 2**)(10). Para su descripción se impone la necesidad de emplear técnicas de análisis masivo, capaces de identificar el mayor número de especies lipídicas en una muestra, asociadas a técnicas de separación.

El análisis del lipidoma es más complejo que el proteoma o el genoma, donde las unidades básicas inherentes resultan en una composición más uniforme, lo que equivale a protocolos estandarizados de detección, identificación y cuantificación. La diversidad en los grupos funcionales de los lípidos hace que mientras algunos de ellos sean fáciles de detectar, como por ejemplo, los que presentan una carga neta permanente, como la PC de la **Figura 3**, sin embargo, otros sea muy esquivos, debido por ejemplo a fragmentación, o a que aparezcan en canales másicos oscurecidos por los fragmentos de la matriz, o por otras especies más abundantes. Normalmente, la identificación unívoca de un lípido requiere, además del valor de su masa exacta (precisión en torno a 5 ppm) otro dato que aporte información sobre su composición (movilidad iónica, patrón de fragmentación, ... etc).

Uno de los puntos clave en el análisis de lípidos por espectrometría de masas MALDI-TOF es el empleo de una matriz cuyas características físico-químicas permitan la detección del mayor número de especies posibles. La

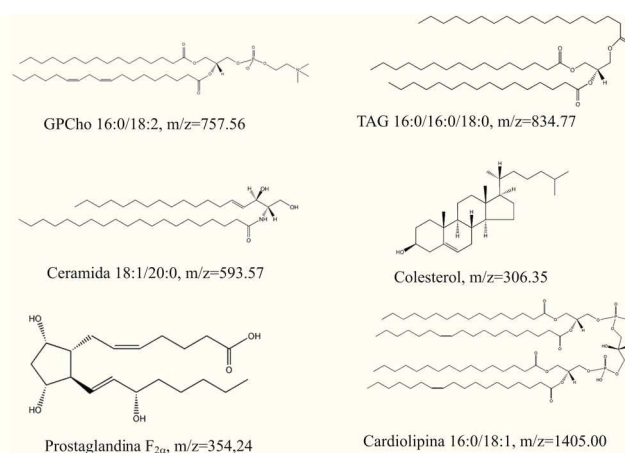


Figura 3. Algunos ejemplos de lípidos. Se observa su variedad estructural, lo que dificulta el desarrollo de una metodología única para la detección simultánea de todos los tipos de lípidos.

matriz debe ser capaz de co-cristalizar con la muestra y absorber luz en la longitud de onda de emisión del láser de desorción. Durante su vaporización, la matriz debe donar protones a la muestra, para que quede cargada y así pueda viajar hacia el tubo de vuelo, empujada por los campos eléctricos aplicados en la zona de extracción. Dependiendo de la acidez de la matriz, se potencia la detección de especies distintas. Por último, la matriz debe ser estable en las condiciones de alto vacío a las que se realizan las medidas en el interior del espectrómetro.

Nuestro grupo ha comenzado recientemente a emplear una nueva matriz: 2-mercaptobenzotiazol (MBT), con la que hemos obtenido unos resultados excelentes en la detección de lípidos mediante IMS ya que, por una parte, su acidez permite la detección de un elevado número de especies, tanto en modo positivo como negativo, y por otra, su estabilidad en las condiciones de alto vacío a las que opera el espectrómetro permite la recogida de datos durante horas, requisito para la realización de los experimentos de IMS. Como muestra, en el presente trabajo, se presentan los resultados del empleo de MBT en el análisis de extractos de hígado quiescente y regenerante de roedor. La buena reproducibilidad entre individuos, permite la observación de diferencias en las especies lipídicas mayoritarias del hígado normal y del afectado de esteatosis.

Se muestran además imágenes de masas de cerebro de rata, obtenidas representando la distribución de las concentraciones de diversas especies de lípidos a lo largo de los cortes de tejido. Por último, se discute la aplicación de estas técnicas en casos médicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Todos los experimentos se realizaron en ratas adultas Sprague-Dawley. El cuidado y tratamiento de los animales se llevó a cabo siguiendo las directivas nacionales (RD 1201/2005) e internacionales (86/609/EEC) y la aprobación del Comité Ético de la UPV/EHU.

Preparación de cortes de tejido y de extractos de lípidos

A animales anestesiados con éter dietílico se les practicó una hepatectomía parcial (70%) siguiendo el método descrito previamente(12). El tejido extirpado se empleó como tejido normal en quiescencia y el tejido en regeneración se extrajo 24 h después. Las piezas se lavaron con solución salina y se procesaron de inmediato: se utilizaron alícuotas para la extracción de lípidos y el resto del tejido se fijó en formaldehído al 10% durante 24 horas, siendo posteriormente embebido en parafina para su posterior corte y tinción con Hematosilina-eosina (HE), realizándose todo ello mediante procedimientos histológicos convencionales.

Piezas de hígado se homogeneizaron en una disolución tampón fosfato (4 °C, pH 7,0) y se determinó la concentración total de proteína en el homogenado mediante el procedimiento del ácido bicinonínico. Los cuerpos lipídicos se aislaron mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad. Los lípidos se extrajeron utilizando un procedimiento Bligh–Dyer modificado(13). El disolvente se eliminó con un concentrador-evaporador Savant Speed-Vac y los lípidos se disolvieron en cloroformo y se almacenaron a -80 °C en atmósfera de N₂ hasta el momento del análisis.

Para la obtención del cerebro los animales se anestesiaron con monohidrato de tricloroacetaldehído (400 mg/kg) y decapitaron. El cerebro fue inmediatamente extraído, diseccionado a 4 °C y conservado a -80 °C.

Patrones Lipídicos

Se emplearon patrones de las clases mayoritarias de lípidos. De Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EE.UU) fueron glicerofosfocolinas (fosfatidilcolina, PC), esfingomielinas (SPM) y glicerofosfoserinas (fosfatidilserina, PS) de cerebro porcino, glicerofosfoetanolaminas (fosfatidiletanolamina, PE) y glicerofosfoinositoles (fosfatidilinositol, PI) de hígado bovino, cardioplipina (glicerofosfoglicerofoglicerol, CL) de corazón bovino, lisoglicerofosfocolinas sintéticas (lisofosfatidilcolina, LysoPC), dioleína (diacilglicerol, DAG) y L-glicerofosfogliceroles (fosfatidilglicerol, PG), de huevo. De Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU) fueron colesterol (Ch), trioleína (triacilglicerol, TAG) y oleato de colesterol (ChE).

Preparación de muestras para su análisis mediante espectrometría de masas

En todos los experimentos se empleó MBT como matriz, suspendida en metanol, procesándose para el análisis de patrones y extractos de lípidos, muestras líquidas, de forma diferente que para el análisis de cortes de tejido.

Para el análisis de patrones y extractos, se realizó una disolución saturada de MBT; del sobrenadante se depositó 1 µl en un cubreobjetos de cristal dejando secar la gota hasta cristalización de la matriz por evaporación del disolvente. Los patrones de lípidos se diluyeron en cloroformo y se mezclaron en proporción 1:1 (v/v) con la disolución de la matriz, mientras que los extractos lipídicos, con una concentración total en lípidos de ~10 mg/ml se mezclaron con la disolución de matriz en proporción 1:10 (v/v) con el fin de ajustar la concentración lipídica total a ~1 mg/ml. De cada disolución resultante se depositó 1 µl en la placa de muestras hasta cocrystalización por evaporación del disolvente.

De cerebros congelados se obtuvieron cortes sagitales de 12 µm de espesor a -25 °C en un microtomo criostático (Microm, HM550). Las secciones de tejido se depositaron sobre cubreobjetos de microscopio (24 x 40 mm, Menzel-Glaser) y se almacenaron a -25 °C hasta su montaje sobre la placa metálica de muestras MALDI. Para recubrir las secciones de tejido con una capa uniforme de matriz se aplicó una disolución saturada MBT en metanol mediante un nebulizador (DESAGA, SG1B). Se emplearon 20 ciclos de nebulización/secado, con una distancia del nebulizador al tejido de 50 cm, exponiendo el tejido únicamente cuando el nebulizador alcanza el régimen estacionario. Esta etapa de aplicación de la matriz es crucial para la obtención de espectros con la resolución necesaria para la identificación de analitos en zonas espaciales diferenciadas.

Los espectros se adquirieron en modo reflectrón positivo y negativo, utilizando los parámetros instrumentales adecuados para la polaridad y rango de masas utilizados.

La identificación de los picos de los espectros se realizó mediante comparación con una base de datos de lípidos, específica para cada tejido. En la asignación de los lípidos se indica la composición total, pero no se puede especificar ni la longitud ni el número de dobles enlaces de cada una de las cadenas acílicas que lo componen.

Adquisición de imágenes y procesado de datos de IMS

Para definir el área de tejido escaneada se generaron mediante el software CreateTarget los archivos de geometría necesarios que indican al espectrómetro Bruker Reflex IV los parámetros espaciales de la imagen (localización sobre la placa de muestras, dimensiones, número de puntos/píxeles, espaciado entre puntos/píxeles). En cada píxel se obtuvo un espectro (30 disparos acumulados), con un tiempo total de adquisición de 2 a

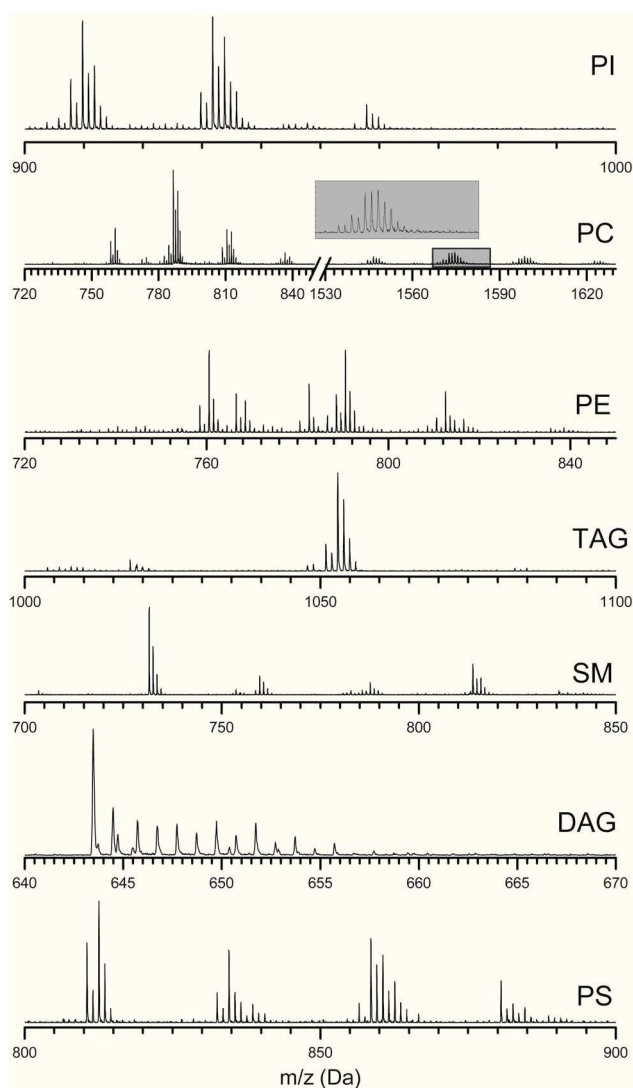


Figura 4. Espectros de masas en modo reflectrón de patrones de PI (fosfatidilinositol), PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina), TAG (triglicéridos), SM (esfingomielina), DAG (diacilglicerol), PS (fosfatidilserina). Obsérvese la profusión de picos y la coincidencia en el rango de masas entre muchos de ellos. Todas las muestras están en concentración de 0.1 mg/ml. Se emplearon 0.5 µl de disolución para realizar los espectros. Cada espectro es el promedio de 900 disparos a lo largo del blanco.

9 h. en función del tamaño del área barrida. La resolución espacial de todas las imágenes mostradas en este trabajo es de 100 µm.

Con objeto de poder comparar las intensidades relativas de punto a punto y describir correctamente la distribución de las masas en el tejido se normalizaron todos los espectros de acuerdo con su corriente iónica total, dividiendo cada punto del espectro por la integral del espectro correspondiente. Las imágenes se crearon con el software Histomass (<http://www.noraybio.com/es/histomass.asp>).

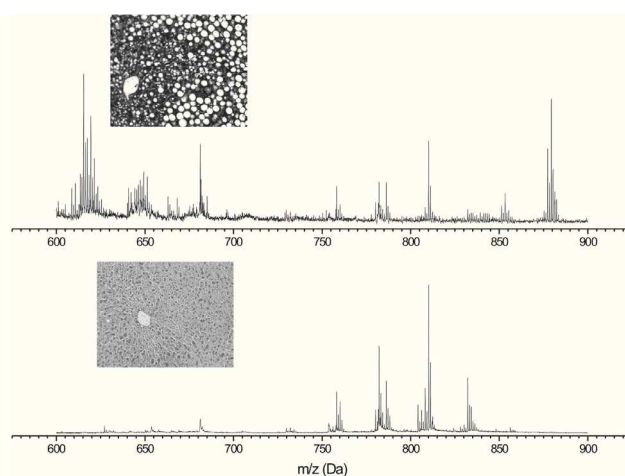


Figura 5. Espectro de masas de un extracto de lípidos de cuerpos lipídicos procedentes de un hígado esteatótico, tras 24 horas de proliferación inducida por una hepatectomía de un 70% (arriba), y de su control quiescente (Go) (abajo). Las correspondientes tinciones con hematoxilina y eosina se muestran en los insertos.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Como se ha comentado en la introducción, las distintas especies lipídicas tienen propiedades de detección muy diferentes. Dichas propiedades nacen principalmente de la cabeza polar, ya que las cadenas alifáticas no tienen apenas influencia en el proceso de desorción. La **Figura 4** muestra los espectros de diferentes patrones lipídicos comerciales, tomados en modo reflectrón. Se observa una gran abundancia de especies y solapamiento de los canales másicos de algunas de ellas, de lo que se desprende la complejidad del análisis de las muestras de lípidos. Debe tenerse en cuenta, además, que los patrones de lípidos presentan una variedad limitada de especies, mucho menor de la observada en muestras biológicas. En el mejor de los casos, realizando una calibración externa del espectro mediante un polímero, procedimiento por el que se obtienen precisiones ~5-10 ppm, es posible asignar la mayor parte de las especies. Sin embargo, en el caso de especies isobáricas, es necesario disponer de información adicional, proporcionada por el empleo de una etapa previa de separación (es habitual el empleo de la cromatografía HPLC), la separación durante el tiempo de vuelo (empleo de espectrómetros de movilidad iónica) o el uso de técnicas de fragmentación en vuelo (MS/MS) que permiten obtener el patrón de fragmentación de cada uno de los picos del espectro.

La **Figura 5** muestra una comparación entre un espectro de masas de un extracto de lípidos de cuerpos lipídicos aislados del hígado del mismo animal en estado quiescente (panel inferior) y regenerante, 24 horas de regeneración tras una hepatectomía parcial (panel superior). El hígado de mamíferos tiene capacidad para regenerar. Tras

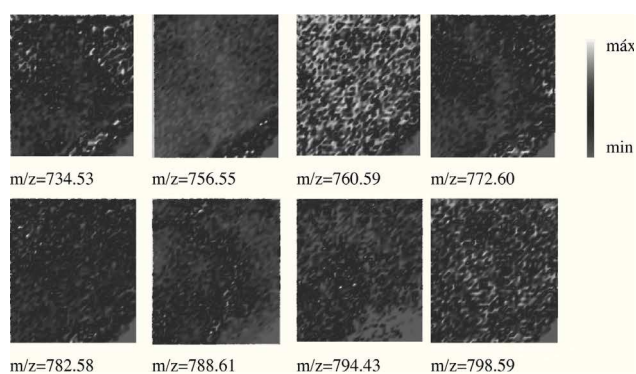


Figura 6. IMS de un corte sagital de cerebro de rata de 5 x 5 mm centrado en el área del cerebelo, donde se han tomado espectros cada 100 μm , resultando en un total de 2500 espectros. Cada imagen representa la distribución de la especie correspondiente a cada canal másico indicado debajo, a lo largo de todo el tejido, siguiendo la escala que se indica en la barra de la esquina superior derecha. Se observa que la distribución de las diferentes especies lipídicas varía considerablemente. Se ha empleado el software *Histomass* (www.noraybio.com/es/histomass.asp) para la confección de las imágenes.

una hepatectomía de un 70%, un modelo experimental de proliferación y esteatosis hepática, los hepatocitos comienzan sincrónicamente a responder a las señales que inician y mantienen un complejo e integrado proceso de proliferación. Después, y secuencialmente, entran en ciclo y proliferan células ductuales, células de Kupffer y células endoteliales. Todo ello va acompañado de una acumulación de cuerpos lipídicos en el citoplasma hepatocitario que permanece hasta que la regeneración se completa. Se aprecia en la **Figura 5** que la abundancia relativa de las especies lipídicas es muy diferente en hígado quiescente y regenerante, siendo destacable sobre todo el aumento de la concentración de diacilgliceroles (DAG) (rango de masas 600-650) y triacilgliceroles (TAG) (rango 850-900) respecto a las especies de fosfolípidos, cuya abundancia relativa desciende. En particular aumentan 7 especies de DAG, y 4 especies de TAG. Por el contrario especies tan abundantes y relevantes como la PC 34:1, 34:2, 36:2, 36:4, 38:4 descienden respecto a los controles. Estos datos sugieren que la maquinaria esteatogénica emplea preferentemente una determinada identidad de ácidos grasos para la esterificación del glicerol, lo que proporciona información de cuáles son los componentes moleculares necesarios para elaborar lípidos complejos en una situación en la que se frenan procesos secretores y se acumulan combustibles energéticos necesarios para la reparación de la lesión.

No es aventurado especular que la restricción en el suministro de estas especies demandadas podría derivar en un bloqueo del proceso de formación y almacenamiento de grasa en otras situaciones ajenas a la restauración fisiológica, como podría ser el caso de una esteatosis hepática asociada a la obesidad o a la resistencia a la insulina y diabetes.

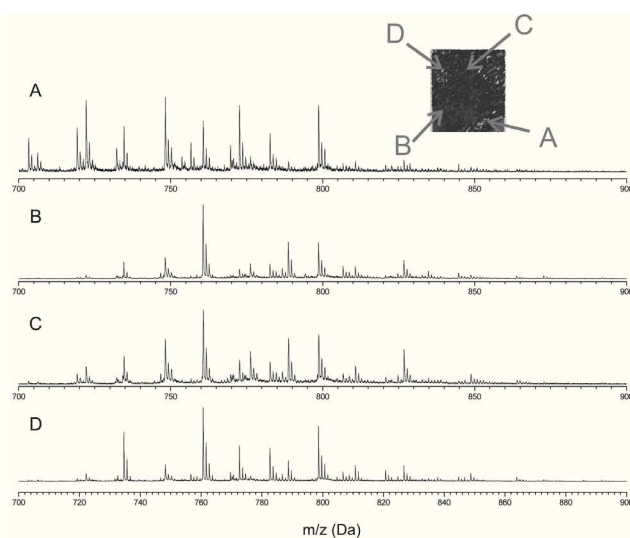


Figura 7. Espectros de masas tomados en cuatro puntos diferentes de un corte de cerebro de rata, cuya imagen se muestra en la inserción.

El desarrollo de la IMS permite la obtención hoy en día de espectros directamente de cortes de tejido, con una intensidad de señal y una resolución comparables a las obtenidas en extractos, evitando así la parte laboriosa de la extracción de lípidos, y añadiendo el dato de la localización anatómica, que hasta ahora se perdía. En la **Figura 6** se muestran las imágenes obtenidas por espectrometría de masas de un corte de cerebro de rata de 5x5 mm, construidas representando los canales másicos correspondientes a PC 32:0+H⁺, PC 34:3+H⁺, PC 34:1+H⁺, PC 32:0+K⁺, SPM 40:7+H⁺, PC 36:1+H⁺, PS 34:4+K⁺ y PC 34:1+K⁺. mientras que la **Figura 7** muestra cuatro espectros obtenidos en cuatro puntos distintos del corte. Cabe destacar la excelente relación señal/ruido, comparable a la obtenida en extractos, permitiendo identificar el cambio en composición lipídica entre las diferentes regiones identificadas en el corte. Por ejemplo, es significativo el cambio de intensidad en PC 32:0, y 36:1 y en PS 36:2 entre los distintos espectros. Los experimentos en cortes, tienen la ventaja añadida de que al no existir procedimientos de extracción de lípidos y separación previos, se evita la pérdida de analitos durante el proceso de análisis, o incluso el cambio en la concentración relativa de las especies, debido a las características inherentes del protocolo preparativo. Además, el corte ofrece la posibilidad de identificar las áreas de distribución de las distintas especies, posibilitando asociar cada área de distribución con su espectro de masas, siendo de especial importancia en órganos como el cerebro donde existe una gran variabilidad regional. La sobreabundancia de información en los espectros IMS puede llegar a convertirse en un problema, ya que la identificación de los picos resulta en muchos casos difícil, precisamente porque al no existir un paso

previo de purificación, la composición molecular es mucho más compleja. En esos casos, la comparación con espectros de extractos es de gran ayuda.

Los lípidos han sido clásicamente conocidos como combustibles y moléculas de reserva, y como componentes estructurales de las membranas. La descripción, entre otros, de subdominios membranales así como de las funciones de los lípidos en la señalización primaria y secundaria ha dado un nuevo empuje a la investigación en lipídica. Es bien conocido que la síntesis y metabolización de los lípidos ocurre bajo un estricto control regulatorio; sus desajustes conducen al desarrollo de patologías ampliamente distribuidas en las poblaciones humanas como las enfermedades cardiovasculares o la diabetes tipo 2, asociada a obesidad. En otras no menos importantes como el cáncer o la enfermedad de Alzheimer también están implicados los lípidos. Además, se conocen alteraciones hereditarias de enzimas metabólicos, receptores, transportadores, etc. que son la causa directa de diversas patologías. Los nuevos desarrollos tecnológicos y el incremento en el conocimiento de los cambios en los patrones lipídicos asociados a enfermedades proporcionan nuevas posibilidades de diagnóstico y abren vías a la implementación de sistemas de prevención. En el contexto de la terapia molecular, la disección de vías patogénicas mediante técnicas analíticas de alto rendimiento está posibilitando identificar dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas estrategias.

CONCLUSIONES

Este trabajo presenta un avance metodológico, la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la caracterización de composiciones diferenciales de especies moleculares lipídicas empleando extractos de lípidos de hígado sin y con esteatosis. La aplicación del MALDI-TOF al análisis de mapas moleculares en cortes de cerebro supone un gran avance en la lipídica ya que permite una localización anatómica mucho más precisa de las diferentes especies lipídicas que la obtenida con las técnicas

clásicas. Esta propiedad permitirá la realización de mapas de lípidos que ayuden a comprender mejor su distribución y por tanto, las funciones que regulan a nivel cerebral dado el gran número de mecanismos de señalización en los que participan.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thomson, J. J. Cathode Rays (Reprinted from The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, Fifth Series, October 1897). *Philosophical Magazine Letters* 2007, 87 (5), 303-326.
2. Thomson, J. J. Cathode rays. *Philosophical Magazine* 1897, 44, 293-316.
3. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization-Principles and Practice. *Mass Spectrom. Rev.* 1990, 9 (1), 37-70.
4. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 1989, 246 (4926), 64-71.
5. Abate, R.; Ballistreri, A.; Montaudo, G.; Garozzo, D.; Impallomeni, G.; Critchley, G.; Tanaka, K. Quantitative Applications of Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization with Time-Of-Flight Mass-Spectrometry - Determination of Copolymer Composition in Bacterial Copolyesters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7 (11), 1033-1036.
6. Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422 (6928), 198-207.
7. Palmblad, M.; Tiss, A.; Cramer, R. Mass spectrometry in clinical proteomics - from the present to the future. *Proteomics Clinical Applications* 2009, 3 (1), 6-17.
8. Sekhon, B. S. Metallomics - an overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B-Biological Sciences* 2008, 78, 299-313.
9. Chan, E. C. Y.; New, L. S.; Yap, C. W.; Goh, L. T. Pharmaceutical metabolite profiling using quadrupole/ion mobility spectrometry/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23 (3), 384-394.
10. Schiller, J.; Suss, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Lessig, J.; Muller, M.; Petkovic, M.; Spalteholz, H.; Zschornig, O.; Arnold, K. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research* 2004, 43 (5), 449-488.
11. Astigarraga, E.; Barreda-Gomez, G.; Lombardero, L.; Fresnedo, O.; Castano, F.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Rodriguez-Puertas, R.; Fernandez, J. A. *Anal. Chem.* 2008, 80, 9105-14.
12. Higgins, G. M.; Anderson, R. M. Experimental pathology of the liver I Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology* 1931, 12 (2), 186-202.
13. Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 1959, 37 (8), 911-917.