

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN  
INVESTIGACION BIOMÉDICA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

---

**CARACTERIZACIÓN LÍPIDICA EN TUMORES  
HEPÁTICOS DE RATÓN MEDIANTE MALDI-IMS**

---

**MEMORIA PRESENTADA POR  
FRANCISCO MIRANDA ADRADOS**

**DIRECTORES:** DR. JOSÉ ANDRÉS FERNÁNDEZ GONZÁLEZ Y DRA. PATRICIA  
ASPICHUETA CELAÁ

**DEPARTAMENTO:** QUÍMICA FÍSICA.

**CURSO ACADÉMICO:** 2020/2021

**FECHA DE DEFENSA:** JUNIO DE 2021

# ÍNDICE

<b>1. Resumen y palabras clave</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
2.1. Antecedentes .....	2
2.2. Lipidómica .....	4
2.3. Modelos tumorales en hígado de ratón .....	6
2.4. MALDI e imagen por espectrometría de masas .....	8
<b>3. Objetivos del trabajo</b> .....	10
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	10
4.1. Preparación de la muestra .....	10
4.2. Medidas por MALDI-IMS .....	12
4.3. Procesado de datos y adquisición de imágenes .....	12
4.4. Asignación de los picos .....	12
4.5. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) .....	13
4.6. Análisis estadístico .....	14
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	14
5.1. Identificación lipídica e imagen por EM.....	14
5.2. Análisis estadístico de datos .....	17
<b>6. Conclusiones</b> .....	21
<b>7. Bibliografía</b> .....	22

## **1. Resumen**

Los avances producidos durante los últimos años en el área de la espectrometría de masas y la sofisticación de los equipos utilizados han permitido el análisis de biomoléculas con elevada precisión. La técnica MALDI-IMS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Imaging Mass Spectrometry) permite combinar el análisis molecular con información espacial, generando imágenes de la distribución de los metabolitos estudiados en tejido. El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, y su estudio ha revelado que la reprogramación metabólica es un factor crítico en su desarrollo y progresión. En particular, se ha investigado el metabolismo de los lípidos como fuente de energía, adaptación al microambiente y señalización celular en las células neoplásicas. En el caso del hígado existen varias patologías y factores de riesgo que pueden derivar en cáncer hepático, que es de los tumores más frecuentes en los pacientes. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue comparar el lipidoma de muestras control con 2 tipos de tumor hepático con el fin de observar cambios en la huella lipídica de los diferentes grupos. Se han podido observar diferencias significativas para algunas familias de lípidos, lo que abre la posibilidad del uso de dichas moléculas como biomarcadores tumorales y la técnica MALDI-IMS como una herramienta de diagnóstico.

### **Palabras clave**

Hígado, tumor, ratón, lipidoma, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, esfingomiélin, MALDI-IMS, clústeres.

## 2. Introducción

### 2.1. Antecedentes

La obesidad es una enfermedad crónica, de alta prevalencia, que suele iniciarse en la infancia o la adolescencia y que se ha transformado rápidamente en un desorden importante para la humanidad en las últimas décadas, convirtiéndose en un problema sanitario de primer orden. Se produce como consecuencia de un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y gastadas. A nivel mundial se ha producido un aumento en la ingesta de alimentos con alto contenido calórico y ricos en grasa, y un descenso en la actividad física debido a la naturaleza, cada vez más sedentaria, del estilo de vida actual. Aunque esa es la causa fundamental del sobrepeso, en su origen también se involucran factores genéticos y ambientales, que determinan un trastorno metabólico sistémico que conduce a una excesiva acumulación de grasa corporal.<sup>1</sup>

Los estudios epidemiológicos realizados en diferentes países reflejan que el 5-10% de los niños en edad escolar presentan obesidad. En la población adolescente, este porcentaje aumenta hasta el 10-20%, y en adultos las cifras de obesidad oscilan entre el 7% en Suiza y el 32% en Estados Unidos. Más imponentes son las cifras aportadas por la Organización Mundial de la Salud, que estima que en el año 2016 el número de personas adultas obesas fue 650 millones, al tiempo que pronostica alrededor de 700 millones en el mundo si continúan las tendencias actuales.<sup>2</sup> En la tabla 1 se recogen los datos de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos de algunos países desarrollados.<sup>3</sup>

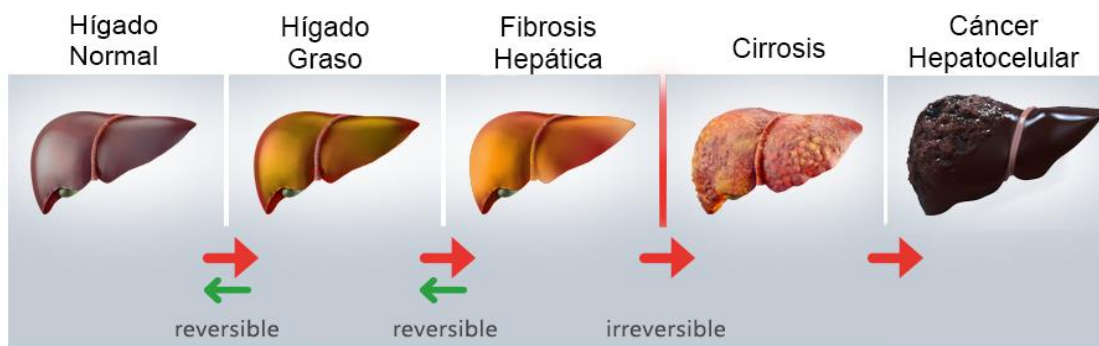
**Tabla 1.** Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos en países desarrollados.

País	Año de encuesta	Prevalencia de sobrepeso (%)			Prevalencia de obesidad (%)		
		Hombres	Mujeres	Total	Hombres	Mujeres	Total
Australia	2005	58,3	40	49	17,8	15,1	16,4
Canadá	2003	56,9	39,6	48,2	15,9	13,9	14,9
Estados Unidos	2004	70,8	61,8	66,3	31,1	33,2	32,2
Alemania	2003	57,7	41,2	49,2	13,6	12,3	12,9
Reino Unido	2002	66,3	56,6	61	22,3	23	22,7
Suiza	2002	45,4	29,3	36,6	7,9	7,5	7,7

En los últimos años, la evidencia clínica y epidemiológica ha puesto de manifiesto que la obesidad, además de ser un factor común de riesgo para diversas enfermedades como la diabetes tipo II, la enfermedad cardiovascular, la osteoartritis y determinados tipos de cáncer, se asocia a un mayor riesgo de presentar la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA).<sup>4</sup>

La EHGNA, caracterizada por el excesivo almacenamiento lipídico en el hígado, es la causa más común de enfermedad hepática en Asia y occidente, particularmente en las personas obesas, donde puede llegar a una incidencia del 98%.<sup>5</sup> Se trata de una

enfermedad relativamente benigna y de progresión lenta que no avanza igual en todos los pacientes. La acumulación de grasa puede causar inflamación, muerte celular y cicatrización del tejido, una enfermedad más agresiva denominada esteatohepatitis. Si no se trata y se prolonga en el tiempo, la esteatohepatitis puede derivar en fibrosis hepática, enfermedad caracterizada por una acumulación de tejido cicatricial, que reemplaza a los hepatocitos haciendo que el órgano pierda su arquitectura y funcionalidad. Esta distorsión de la estructura interna altera la circulación sanguínea hacia el interior del hígado, limitando la irrigación sanguínea hacia las células hepáticas provocando su muerte y la formación de más tejido cicatricial.<sup>6</sup> Por último, esta fibrosis generalizada y permanente puede derivar en cirrosis, que, a su vez predispone a carcinoma hepatocelular (CHC), el cáncer hepático más frecuente a nivel mundial.<sup>5</sup> El proceso se describe esquemáticamente en la Figura 1.



**Figura 1.** Evolución de la enfermedad del hígado graso no alcohólica o esteatosis.

Actualmente no existe ningún tratamiento específico aprobado por las agencias regulatorias para la EHGNA,<sup>7</sup> pero cualquier esquema terapéutico debe tener como eje central las medidas higiénico-dietéticas. Estas medidas, la reducción de peso, seguir una dieta variada como la mediterránea y realizar ejercicio físico, han demostrado eficacia incluso para mejorar la fibrosis, que como se ve en la Figura 1, puede ser reversible si se detecta en fases poco avanzadas.<sup>8</sup>

Como ya se ha mencionado, la EHGNA puede preceder a la aparición de tumor hepático, que es el tercer tipo de cáncer con mayor número de fallecimientos después de los cánceres de mama y pulmonar.<sup>9</sup> El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y por ello una de las enfermedades más estudiadas e investigadas, pero no es una enfermedad nueva. En el antiguo Egipto se conocía la existencia del cáncer en humanos y las autopsias de algunas momias han demostrado la existencia de tumores óseos así como la posibilidad de otros procesos neoplásicos.<sup>10</sup> En los tiempos de Hipócrates, allá por el siglo IV A.C., muchos tipos de tumores estaban reconocidos y descritos. El mismo Hipócrates introdujo el término carcinoma de *karkinos* (cangrejo), ya que observó el desarrollo descontrolado de estas lesiones ulcerosas crónicas expandiéndose por los tejidos semejando las patas de un cangrejo.<sup>10</sup> Las investigaciones continuaron a lo largo del tiempo, pero no fue hasta el siglo XVIII, con el

perfeccionamiento de los microscopios, cuando el cáncer empezó a ser estudiado sistemática e intensamente.<sup>11</sup>

Los avances científicos permitieron a partir del siglo XX comenzar a tratar los tumores no solo mediante la extirpación quirúrgica, como se venía realizando desde siglos atrás, si no con técnicas novedosas como la radioterapia y la quimioterapia. El término de quimioterapia, acuñado por Paul Ehrlich, se basa en el tratamiento de las enfermedades mediante fármacos. Los dos descubrimientos que espolearon el desarrollo de la quimioterapia anticancerosa fueron el uso de las mostazas nitrogenadas (gas militar utilizado en la primera guerra mundial) para el tratamiento de linfomas y el uso de antagonistas del ácido fólico para el tratamiento de leucemias.<sup>11</sup>

Después de más de medio siglo de investigaciones sobre la quimioterapia, el cáncer continúa siendo una de las enfermedades más complicadas de tratar, consecuencia de la gran heterogeneidad del propio tumor, derivada del continuo remodelado metabólico, y de la activación de distintas vías de señalización, todo ello asociado a distintas mutaciones genéticas, lo que en su conjunto genera al mismo tiempo resistencia a quimioterápicos. Además, aunque cada vez se dispone de más modelos animales para investigar los mecanismos implicados en cada cáncer, sigue habiendo limitaciones. Por otro lado, hoy en día los efectos secundarios de la terapia impiden su uso en ciertos pacientes.<sup>12</sup> Además, la quimioterapia es un tratamiento muy agresivo, por lo que los últimos estudios han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de alternativas innovadoras como por ejemplo la inmunoterapia. En la última década, el metabolismo del cáncer ha despertado un gran interés y se ha sugerido la modulación del suministro energético en las células cancerosas como un posible blanco para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas.<sup>12</sup> El incremento de la síntesis de lípidos se ha reconocido como una consecuencia de la reprogramación metabólica en el cáncer. En concreto, la mayoría de las células muestran una reactivación de la síntesis de ácidos grasos *de novo*, que son los constituyentes esenciales de todos los lípidos de las membranas biológicas, además de ser una importante fuente de energía.<sup>13</sup>

## 2.2. Lipidómica

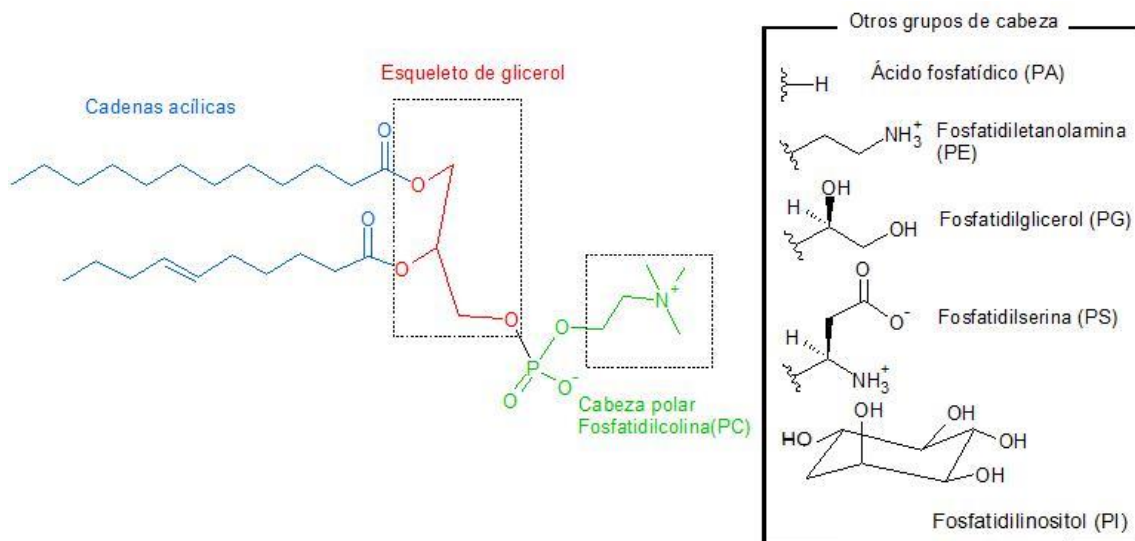
Si llamamos lipidoma a todo el espectro de lípidos de un sistema biológico, la cartografía de este espectro puede denominarse lipidómica. Así, esta nueva ciencia “ómica” puede definirse como la caracterización completa de las especies moleculares de lípidos y de sus papeles biológicos con respecto a la expresión de las proteínas implicadas en el metabolismo y la función de los lípidos, incluida la regulación de los genes.<sup>14</sup>

Los lípidos son moléculas indispensables para la vida celular, ya sea para la formación de membranas, para servir como fuente de energía o para realizar funciones de regulación y señalización.<sup>14</sup> Las membranas biológicas forman una barrera permeable, flexible y autosellante para las células y orgánulos debido al componente lipídico del que están formadas. Los lípidos proporcionan el complejo disolvente hidrofóbico-hidrofílico

dentro del cual las proteínas de membrana se pliegan y funcionan actuando de manera específica. Por lo tanto, la principal función de estas moléculas es el soporte de los procesos de membrana tanto integrales como periféricos.<sup>15</sup>

Los lípidos se clasifican en ocho grupos principales de acuerdo con su estructura química: ácidos grasos (FA), glicerolípidos (GL), glicerofosfolípidos (GP), esfingolípidos (SP), esteroides (ST), lípidos prenoles (PR), sacarolípidos (SL) y policétidos (PK).<sup>16</sup> En este trabajo el estudio se reducirá a dos familias lipídicas principalmente, GP y SP.

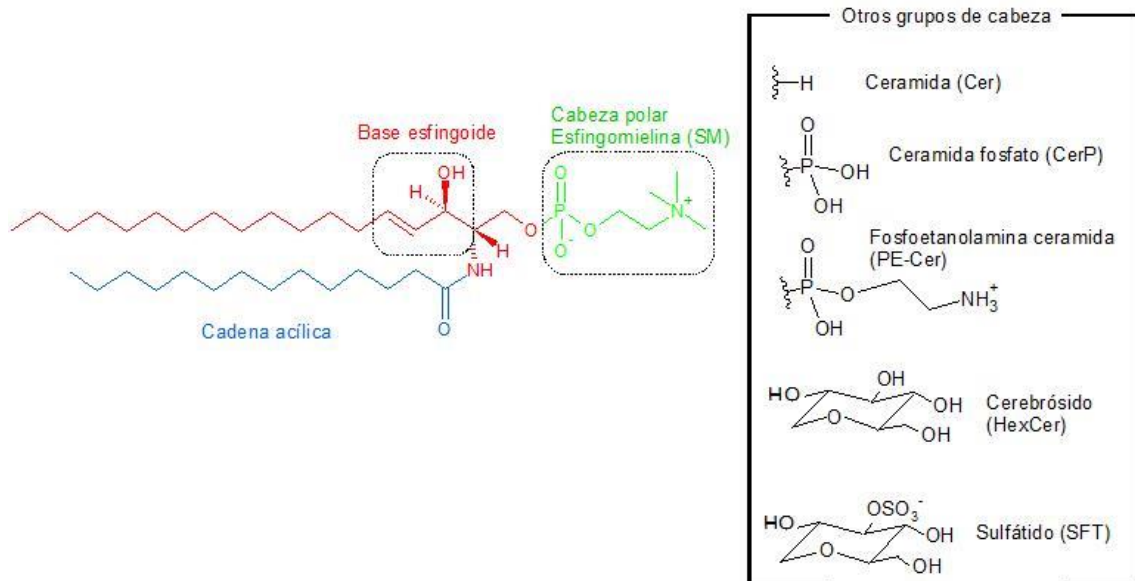
Los GP, también llamados fosfoglicéridos, son lípidos constituidos por un esqueleto de glicerol al que se le unen dos ácidos grasos por enlace éster al primer y segundo carbono y un grupo cabeza muy polar o cargado al tercer carbono por enlace fosfodiéster. En la Figura 2 se muestra la estructura química detallada de estas moléculas. Algunos tejidos animales, como el cardíaco de los vertebrados, son ricos en lípidos con uniones éter, en los que una de las cadenas acílicas está unida al glicerol mediante un enlace éter o vinil-éter en lugar de éster.<sup>17</sup> Estos lípidos son el resultado de una compleja transformación y suelen tener funciones más especializadas, poseyendo además propiedades antioxidantes.



**Figura 2.** Estructura general de los glicerofosfolípidos, poniendo como ejemplo una fosfatidilcolina. La base de glicerol (rojo) se encuentra unida a dos ácidos grasos por enlace éster y al fosfato de la cabeza polar. Según el grupo de la cabeza polar se distinguen las subclases del recuadro de la derecha.

Los esfingolípidos son lípidos con funciones relevantes en la transducción de señales y el reconocimiento celular.<sup>18</sup> Se caracterizan por poseer un esqueleto de aminoalcohol de cadena larga (generalmente 18 carbonos) llamado esfingosina o uno de sus derivados. Las principales bases esfingoides en las células de los mamíferos son la esfingosina y la esfinganina, diferenciadas en un doble enlace. A este esqueleto se le unen un ácido graso de cadena larga por enlace amida y un grupo polar por un enlace

glucosídico en algunos casos, o por un enlace fosfodiéster en otros. Esta estructura química se representa en la Figura 3.



**Figura 3.** Estructura general de los esfingolípidos, poniendo como ejemplo una esfingomielina. La base esfingoide representada (rojo) es una esfingosina a la que se le unen un ácido graso y una colina como cabeza polar. Según el grupo de cabeza polar unido se nombran las subespecies representadas en el recuadro de la derecha.

### 2.3. Modelos tumorales en hígado de ratón

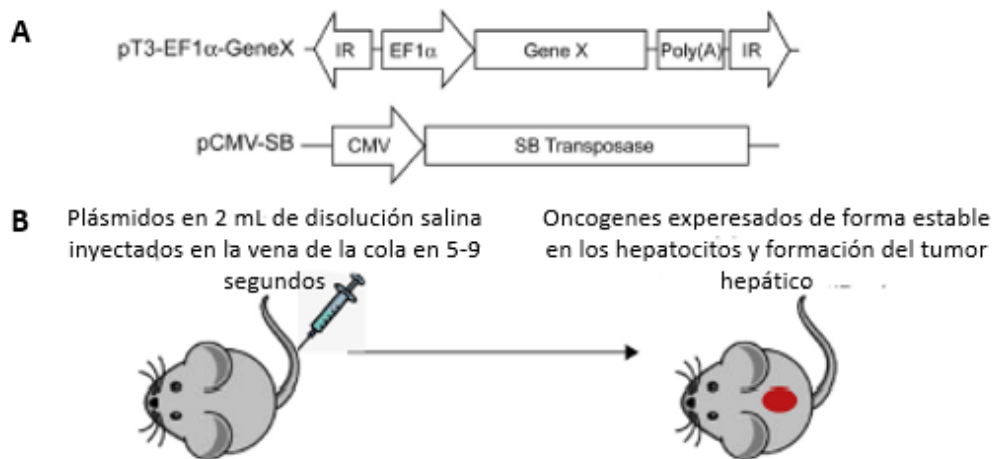
El establecimiento de modelos animales para la investigación del cáncer es esencial, tanto para los estudios básicos como para los traslacionales. Se han utilizado varios modelos de roedores a lo largo de los años para estudiar la patogénesis del CHC. La generación de modelos de CHC en ratones se considera uno de los mejores sistemas experimentales debido a las similitudes fisiológicas, moleculares y genéticas que presentan con los humanos, su capacidad de reproducción, su facilidad para ser criados y mantenidos en instalaciones de animales y su manipulación genética es relativamente sencilla.<sup>19</sup>

Los modelos de ratón modificados genéticamente, incluidos los ratones knockout o transgénicos, son necesarios para demostrar el potencial oncogénico o supresor de tumores de los genes diana y para ilustrar cómo estos genes contribuyen al inicio y la progresión de tumores. Sin embargo, estos modelos murinos modificados genéticamente tienen varias limitaciones. De hecho, la generación de los ratones knockout de la línea germinal o transgénicos es costosa, requiere tiempo y un alto nivel de experiencia. Además, oncogenes y genes supresores de tumores son críticos para el desarrollo embrionario fetal. Así, la sobreexpresión o la delección/inactivación de estos genes en la línea germinal suele provocar una letalidad precoz.<sup>20</sup>



Recientemente se ha desarrollado un nuevo método para la investigación del cáncer de hígado que combina las técnicas *Hydrodynamic gene delivery* y la integración somática de genes a largo plazo en los hepatocitos por *Sleeping Beauty* (SB).<sup>20</sup> Para entender esta tecnología es necesario introducir algunas cuestiones anatómicas. La razón principal por la que las células del parénquima son el objetivo de la transfección hidrodinámica es que las células del endotelio capilar y del parénquima están estrechamente asociadas. Esta característica anatómica permite el acceso inmediato del ADN en las células del parénquima una vez que se rompe la barrera endotelial. Esto se consigue mediante la fuerza hidrodinámica producida por la inyección a presión de un gran volumen de solución fisiológica (equivalente al 10% del peso corporal del animal) en la que se diluye ADN plasmídico.<sup>20</sup>

Una de las principales limitaciones de la transfección hidrodinámica es la rápida degradación de los genes transfectados en los hepatocitos. Sin embargo, los genes deben expresarse continuamente en los hepatocitos para inducir la formación de cáncer de hígado. Para superar este desafío técnico se aplica la integración somática mediada por la transposasa SB. De manera resumida, la transposasa SB es una enzima que reconoce y se une a repeticiones invertidas específicas que flanquean una secuencia de ADN, excluye la secuencia de ADN y la inserta en una nueva ubicación dentro de un dinucleótido TA.<sup>20</sup> En la Figura 4 se muestra un esquema de los dos plásmidos necesarios y el proceso que sigue la técnica.



**Figura 4.** Principios de la transfección hidrodinámica. **A)** Estructura de los plásmidos necesarios. El primero codifica el gen de interés bajo un promotor de mamífero, en este caso EF1α, y flanqueado por repeticiones invertidas. El segundo codifica la SB. **B)** Diagrama de la inyección donde la proporción de plásmidos SB/gen de interés suele ser entre 1:10 y 1:25. Adaptada de ref. 20.

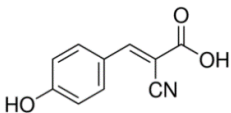
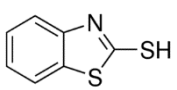
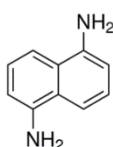
## 2.4. MALDI e imagen por espectrometría de masas

El estudio y caracterización de los lípidos ha experimentado un tremendo auge en los últimos años, debido a que se ha demostrado que la conexión entre genotipo y fenotipo no queda completa con el estudio del genoma o del proteoma, sino que requiere además del conocimiento del metaboloma.<sup>21</sup> El análisis de los lípidos, tradicionalmente basado en técnicas cromatográficas, ha evolucionado desde los estudios de cromatografía en capa fina (TLC) hasta los modernos cromatógrafos líquidos de ultra-alta presión (UHPLC) conectados a analizadores por espectrometría de masas (EM). Estos analizadores poseen una alta resolución y notable sensibilidad, por lo que se han convertido en un importante método establecido en química y biología y va adquiriendo cada vez más importancia en bioquímica, medicina e incluso análisis de rutina en laboratorios clínicos.<sup>21</sup>

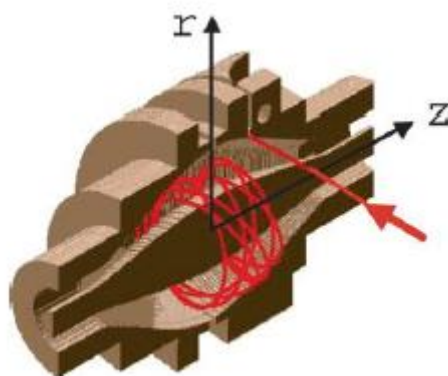
En este trabajo se utiliza un espectrómetro de masas que cuenta con una fuente de ionización MALDI (matrix-assisted laser desorption and ionization) y una trampa iónica de tipo Orbitrap como analizador.

La técnica MALDI se basa en la irradiación con un láser de una longitud fija sobre la muestra de interés mezclada con una matriz para facilitar su ionización. Hoy en día, el tipo de láseres más empleado es el de estado sólido, aunque también se pueden emplear otros distintos como el de N<sub>2</sub>, donde la longitud de onda es de 337 nm.<sup>22</sup> La matriz absorbe la mayoría de la energía de los fotones y en consecuencia preserva el analito de la irradiación directa del láser, que podría degradarlo. Por lo tanto, los requisitos que debe cumplir una buena matriz son presentar una buena absorción a la longitud de onda del láser y mezclarse fácilmente con el analito para dar una co-cristalización homogénea.<sup>23</sup> La matriz excitada pasa de fase sólida a gas arrastrando moléculas de analito en la cámara de vacío. El producto final es el analito ionizado, formado como resultado de la colisión de analito neutro con los iones de la matriz. En la Tabla 2 se recogen algunas de las matrices más empleadas en MALDI.

**Tabla 2.** Algunos ejemplos de los reactivos más empleados como matrices.

Nombre común	Estructura química
Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA)	
2-mercaptobenzotiazol (MBT)	
1,5-diaminonaftaleno (DAN)	

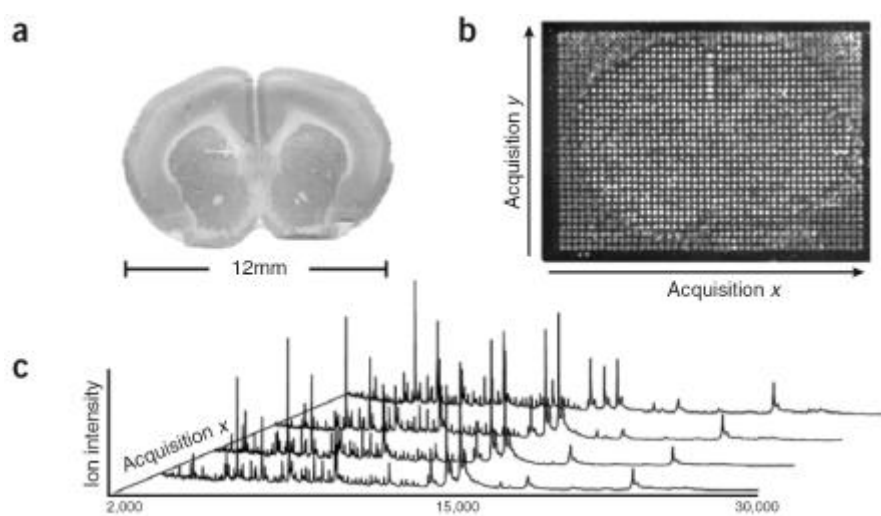
La trampa iónica de tipo Orbitrap deriva de las trampas de iones desarrolladas por Kingdom y Knight, que utilizaban dos electrodos, uno tubular externo y un filamento interno coaxial, para generar entre ellos un campo electrostático capaz de atraer iones.<sup>24</sup> En el Orbitrap, el filamento interno se ha transformado en una barra en forma de huso y las paredes del cilindro que lo contienen han adquirido la misma forma. Los iones introducidos perpendicularmente en el sistema adquieren un movimiento radial alrededor del huso, combinado con un movimiento axial periódico (Figura 5) cuya frecuencia es una función de su valor de  $m/z$ .<sup>25</sup> El electrodo externo está dividido perpendicularmente en su centro, de forma que el movimiento periódico de los iones de un lado a otro de la cavidad induce una señal, cuya frecuencia puede medirse para determinar el valor de  $m/z$  correspondiente. En la práctica, la señal registrada es compleja y está formada por las combinaciones senoidales de distintas frecuencias e intensidades de cada uno de los iones. El espectro de masas correspondiente se obtiene tras la aplicación de la transformada de Fourier a la señal obtenida.<sup>25</sup>



**Figura 5.** Movimiento que siguen los iones alrededor del electrodo en un analizador de masas tipo Orbitrap. Los iones se introducen tangencialmente por la flecha roja. Adaptada de ref. 25.

La mejora de las técnicas de espectrometría de masas, y en particular de la técnica MALDI, ha permitido el desarrollo de lo que se conoce como imagen por espectrometría de masas (IMS). Esta técnica genera imágenes de iones de las muestras, proporcionando así la capacidad de cartografiar la distribución de moléculas específicas en la muestra original.<sup>26</sup> IMS combina el análisis molecular con información espacial, de forma que cada píxel en una imagen de espectrometría de masas contiene un espectro de masas. La imagen obtenida en cada experimento es por tanto multidimensional. Mediante el empleo de herramientas de software adecuadas, es posible generar una distribución 2D de cada pico en el espectro de masas y obtener imágenes moleculares individuales.<sup>26</sup> En la Figura 6 se puede observar cómo se generan las imágenes de IMS. A menudo se utiliza un código de colores para simplificar el reconocimiento de patrones. Por ejemplo, un determinado color puede significar un compuesto y su brillo la abundancia. A partir de este enfoque solo se pueden mostrar unos pocos componentes a la vez y por eso a menudo los resultados se representan como un conjunto de imágenes, cada una con un

compuesto a destacar.<sup>26</sup> también es habitual agrupar los píxeles de la imagen en clústeres según la semejanza de su espectro de masas, dando a cada clúster un color específico.



**Figura 7.** Visión general de las imágenes obtenidas. **a)** Sección de tejido animal. **b)** Sección montada en la que se muestran cada uno de los píxeles donde incide el láser. **c)** Serie parcial de los espectros a lo largo del eje X. Adaptada de la ref. 26.

### 3. Objetivos del trabajo

El presente trabajo se encuentra dentro de una colaboración entre el Grupo de Espectroscopia, Departamento de Química física de la Facultad de Ciencia y tecnología, y el grupo de Lipids & Liver, Departamento de Fisiología. El objetivo principal de este estudio es utilizar la técnica MALDI-IMS para caracterizar la distribución lipídica en secciones de tejido de hígado de ratón sano (n=5), ratón con tumor hepático primario (n=4) y ratón con metástasis hepática de cáncer colorrectal (n=5). Las familias lipídicas que se pretenden estudiar son glicerofosfolípidos y esfingolípidos. Se pretende que el análisis de los cambios en los perfiles lipídicos permita la identificación precisa de los nódulos tumorales así como también su heterogeneidad tumoral y permita ahondar en la influencia del hígado graso en el desarrollo de tumores hepáticos.

### 4. Materiales y métodos

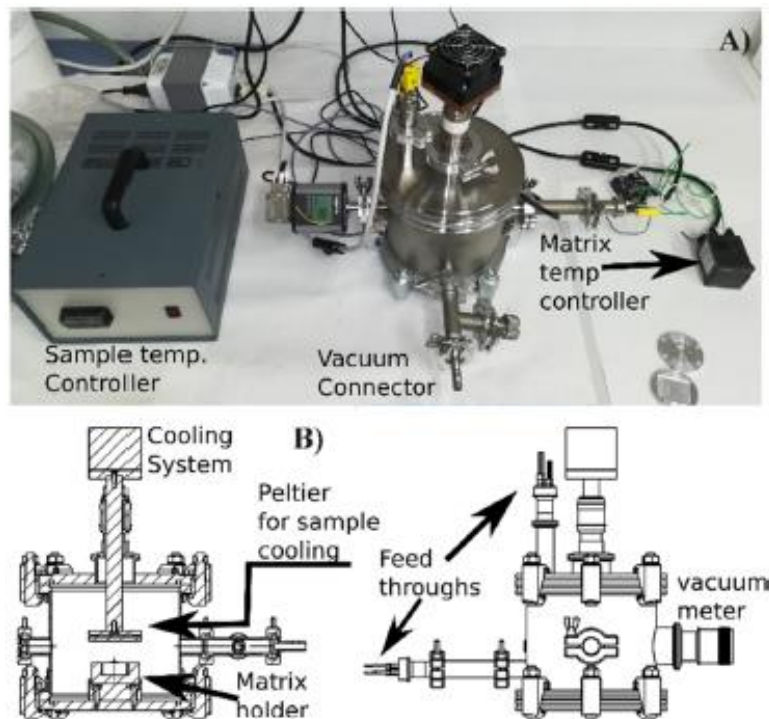
#### 4.1. Preparación de la muestra

La generación de los modelos animales se llevó a cabo con el Grupo de Lipids & Liver. Para el estudio se utilizó una cohorte de ratones dividida en tres grupos: un grupo control, otro grupo al que se generó un tumor hepático primario y un tercer grupo al que se generó un tumor secundario. Para crear el primer modelo tumoral en los animales, se utilizó la técnica combinada de Hydrodynamic gene delivery con Sleeping Beauty, en ratones de 6 a 8 semanas de edad, con una mezcla de plásmidos que combinan la sobreexpresión del oncogén MYC con la inhibición del supresor de tumores

PTEN. Por otro lado, para generar el segundo modelo tumoral, en ratones sanos de 6 a 8 semanas de edad se realizó una inyección, a través del bazo, de una solución de células tumorales de colon de la línea MC38 (Kerafast), para simular la invasión del hígado de las células viajando por el torrente sanguíneo. Se extrajeron los tejidos hepáticos, se recubrieron de OCT y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación. Posteriormente, se realizaron cortes de  $16\text{-}20\ \mu\text{m}$  de grosor con ayuda de un microtomo criostatizado y se depositaron en portas de microscopio, que se conservaron también a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis.

Para el análisis por MALDI se recubrieron las secciones de una de las matrices más utilizadas para el estudio de lípidos en modo negativo, el 1,5-diaminonaftaleno.<sup>27</sup> La deposición de la matriz se realizó mediante sublimación. Es una etapa crucial y determinante en la preparación de las muestras, dado que una distribución no homogénea podría provocar grandes diferencias en la intensidad de la señal entre diferentes zonas del tejido.<sup>28</sup>

Como sublimador se empleó un dispositivo diseñado por el propio Grupo de Espectroscopía (Figura 8), con todos los parámetros optimizados para obtener una deposición de la matriz homogénea y reproducible.<sup>29</sup> Estos parámetros son los siguientes: temperatura de la placa de enfriamiento,  $5^{\circ}\text{C}$ ; temperatura a la que se calienta la matriz,  $120^{\circ}\text{C}$ ; presión del sistema,  $0,4\ \text{mbar}$  y por último el tiempo de sublimación, 10 minutos.



**Figura 8.** A) Fotografía del prototipo. B) Esquemas de la cámara de acero inoxidable del sublimador. Adaptada de la ref. 29.

#### **4.2. Medidas por MALDI-IMS**

El estudio de MALDI-IMS y la obtención de los espectros de masas se realizó con la ayuda de un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher, MA, USA) equipado con una fuente de ionización MALDI que incorpora un láser de N<sub>2</sub> (337 nm, 60 Hz, hasta 100 µJ/pulso). La energía del láser se mantuvo lo más baja posible, en torno a 10 µJ/pulso para evitar el deterioro de la muestra, pero proporcionando una buena señal. Se promediaron 2 microescans de 10 disparos para generar el espectro final de cada píxel y se utilizó una resolución de masa de 60.000 FWHM a m/z=400 para registrar los datos en una ventana de observación de 550 a 100 Da. Finalmente, se estableció un tamaño de píxel de 50 µm para registrar el área completa o la mayoría del tejido en un tiempo razonable y obtener una descripción anatómicamente significativa.

#### **4.3. Procesado de datos y adquisición de imágenes**

Los espectros de las secciones de tejidos se analizaron usando el programa Xcalibur 2.0 (ThermoFisher, MA, USA). El posterior análisis de los datos, calibración, normalización, clustering y asignación de lípidos se llevó a cabo con el software desarrollado por el propio Grupo de Espectroscopia usando Matlab (Mathworks, MA, USA). La complejidad y cantidad de datos que se obtiene de cada experimento es enorme, por lo que se requiere una reducción de volumen para seleccionar los datos de interés. Primero se filtraron los datos y todos los picos con una intensidad menor al 0,5% de la intensidad del pico más intenso fueron descartados para eliminar las especies que introducen un mayor ruido estadístico y que son menos reproducibles. Después, la etapa de alineado se realizó utilizando el método de Xiong,<sup>30</sup> suponiendo un desalineado máximo de 0,02 Da, producido principalmente por variaciones en la posición de los picos entre espectros en un mismo experimento. Por último, se normalizaron los espectros dividiendo entre la corriente total de iones (TIC)<sup>31</sup> para que la intensidad fuera comparable.

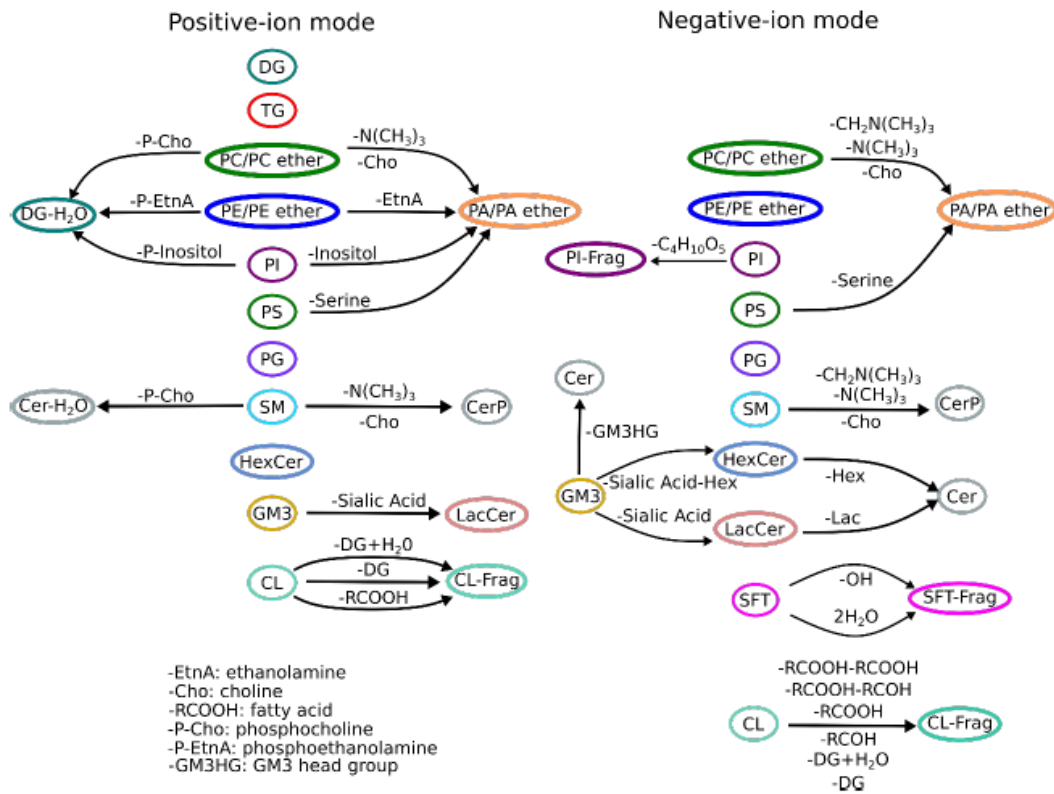
#### **4.4. Asignación de los picos**

La identificación de los lípidos se basó en una comparación entre los valores de las m/z obtenidos experimentalmente con los valores recogidos en la base de datos del software de Matlab (>33.000 especies más sus aductos) y se verificó su identificación por comparación con lo publicado en la bibliografía sobre la caracterización lipídica en hígado de ratón.<sup>32-34</sup>

Para la asignación de las especies detectadas es necesario tener en cuenta la interferencia de los fragmentos y la formación de múltiples los aductos.

La primera es debida a que, aunque la técnica MALDI es una técnica de ionización suave, las moléculas de la muestra también pueden sufrir degradación. Esto provoca que varias clases de fosfolípidos como por ejemplo las PC, PE y PS se degraden en fragmentos isobáricos de PA y podrían ser erróneamente identificados como dicha especie cuando se utiliza el modo de iones negativo.<sup>35</sup> Ocurre lo mismo con las SM, que interfieren en la

detección de CerP y las HexCer en la detección de Cer. Solo han de tenerse en cuenta dichas especies si se extraen los lípidos del tejido y se confirma su presencia en un experimento adicional de LC-MS/MS para evitar así una mala interpretación.<sup>35</sup> Por esta razón y porque las medidas se realizaron en modo negativo, en este experimento solo se asignaron lípidos de las siguientes clases PC, PE, PG, PS, PI, SM, HexCer y SFT.



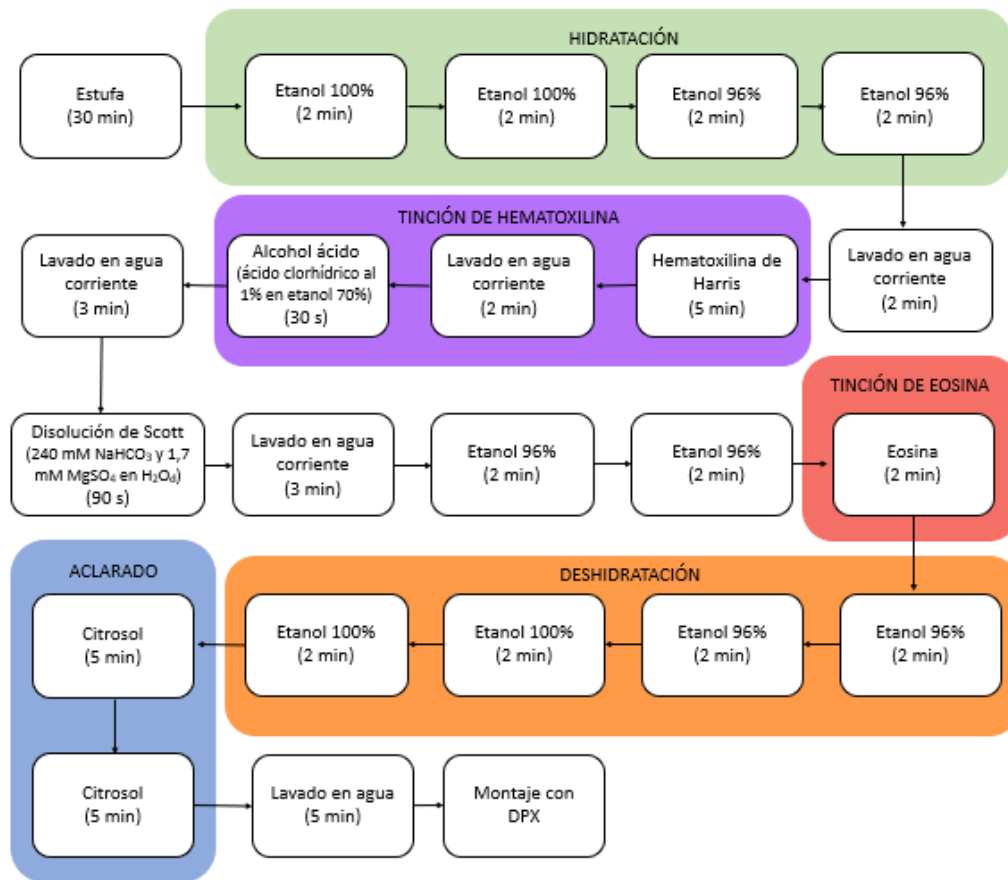
**Figura 9.** Esquema de las posibles fragmentaciones que pueden sufrir las diferentes especies lipídicas en su análisis por MALDI, tanto en modo positivo como negativo. Adaptada de ref. 35.

Por otro lado, también se debe tener en cuenta durante la asignación la capacidad que tienen los lípidos de formar aductos. Es conocido que los lípidos tienden a formar aductos de  $H^+/Na^+/K^+$ , metales alcalinos presente en los tejidos, y se detectan cuando se mide en polaridad positiva. Sin embargo, hay otras combinaciones que no son tan evidentes, como los formados con matriz, la pérdida de moléculas de agua, etc. Para eliminar el ruido estadístico que introducen estos datos se eliminaron todas las asignaciones que no fueran  $[M-CH_3]^-$  para PC y SM y  $[M-H]^-$  para PE, PG, PI, PS y HexCer ya que son los que proporcionan mayor intensidad.<sup>35</sup>

#### 4.5. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E)

Finalizado el experimento de obtención de imágenes, se realizó una tinción de H&E (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El protocolo de tinción se muestra esquemáticamente en la Figura 10.

La hematoxilina tiñe el ácido nucleico (núcleos) con un color azulado-púrpura intenso, y la eosina tiñe las proteínas de forma inespecífica de color rosa (citoplasma y matriz extracelular).



**Figura 10.** Representación esquemática del protocolo utilizado para realizar las tinciones de H&E

#### 4.6. Análisis estadístico

Se utilizó IBM SPSS Statistics para Windows (Versión 23.0; IBM, Chicago, IL, EE.UU) para la prueba de Levene, ANOVA de un factor y Tukey/Games-Howell para comparación múltiple. La prueba de Levene determina la homogeneidad de las variables ( $H_0$ = los grupos tienen varianzas equivalentes) para elegir el método post hoc correcto: Tukey si  $p > 0,05$  y Games-Howell si  $p \leq 0,05$ . Además, se utilizó el software de Orange (Versión 3.27.1, Bioinformatics Lab, Universidad de Ljubljana, Eslovenia) para la realización del análisis de PCA y el desarrollo de un modelo de clasificación con diferentes algoritmos.

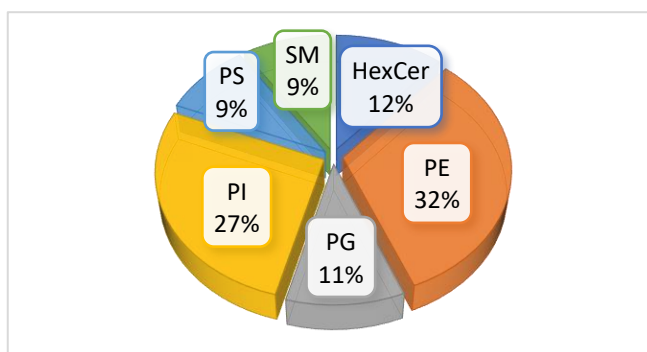
### 5. Resultados y discusión

#### 5.1. Identificación lipídica e imagen por espectrometría de masas

Se identificaron un total de 96 especies lipídicas en el conjunto de todas las muestras analizadas. Los resultados mostraron que, de las especies identificadas, las PE son las más numerosas (Figura 11). Es necesario aclarar que se decidió omitir las especies

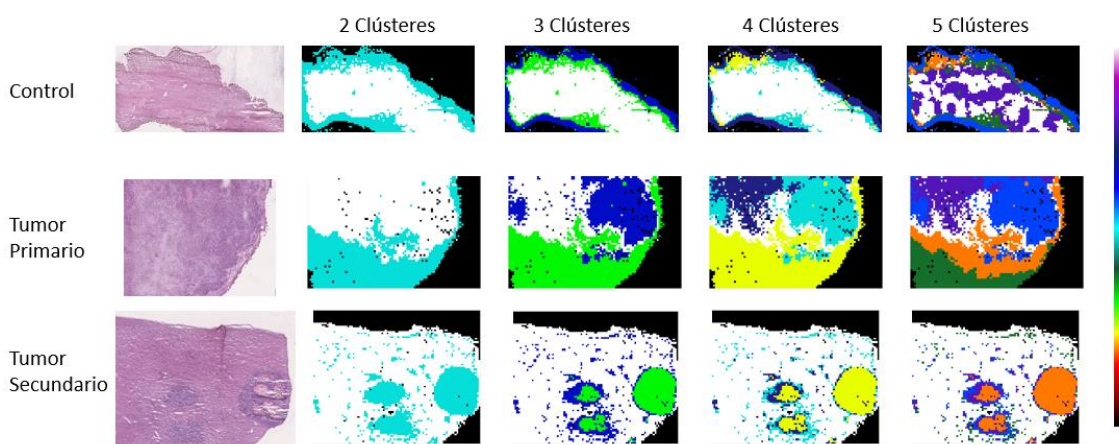


detectadas de PC ya que en el modo de ionización negativo las especies de PC que tienen mayor intensidad son  $[M-CH_3]^-$ , la pérdida de este metilo hace que estos fragmentos coincidan en masa con los fragmentos  $[M-H]^-$  de PE que tengan igual número de insaturaciones y 2 unidades carbonadas ( $-CH_2-$ ) más en las cadenas acíclicas. Es decir, las  $m/z$  detectadas en los espectros de masas seguramente tengan contribución de ambas especies, pero como la señal que proporcionan las PE en modo negativo es más intensa se decidió asignar estos picos a dichas especies. Además, en algunos casos tampoco se pudo determinar si la especie lipídica detectada poseía enlace éter o vinil-éter. Para determinar la contribución exacta que tienen las PC en la intensidad del pico y resolver las asignaciones problemáticas es necesario realizar un experimento adicional de MS/MS o MS<sup>3</sup>, que será realizado en los próximos meses.



**Figura 11.** Representación gráfica del porcentaje por número de especies de las familias lipídicas identificadas.

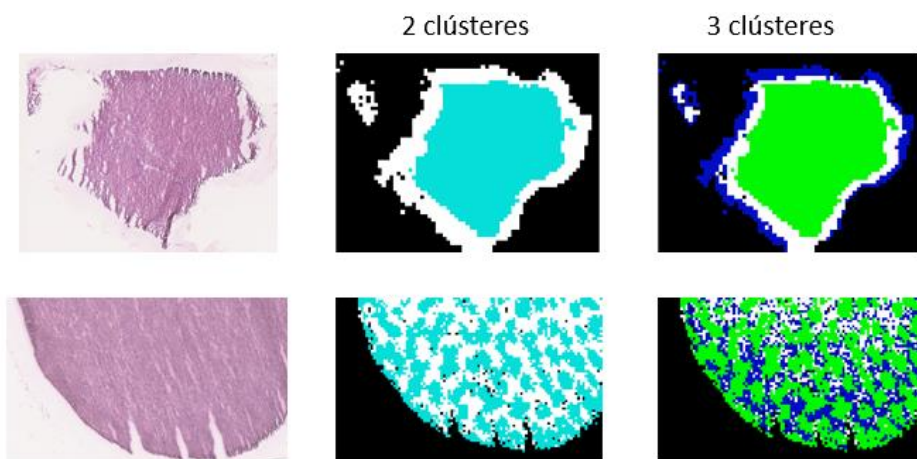
El análisis de segmentación o *clustering* de los experimentos de MALDI-IMS junto con la comparación con la imagen histológica permitió distinguir las diferentes zonas del tejido. El algoritmo *HC-RC clustering* agrupa los píxeles de acuerdo con la correlación de sus huellas lipídicas asignándoles un color determinado, como se muestra en la Figura 12. Cuando el número de clústeres se fija en 2, en el control se separa el borde del interior del tejido mientras que para las secciones con tumor se separan la zona sana de la tumoral. El aumento a 3 clústeres resalta la transición entre ambas zonas.



**Figura 12.** Comparación entre la imagen óptica de tres secciones de tejido hepático teñidas con H&E y la imagen obtenida por segmentación para diferentes niveles de *clustering*.

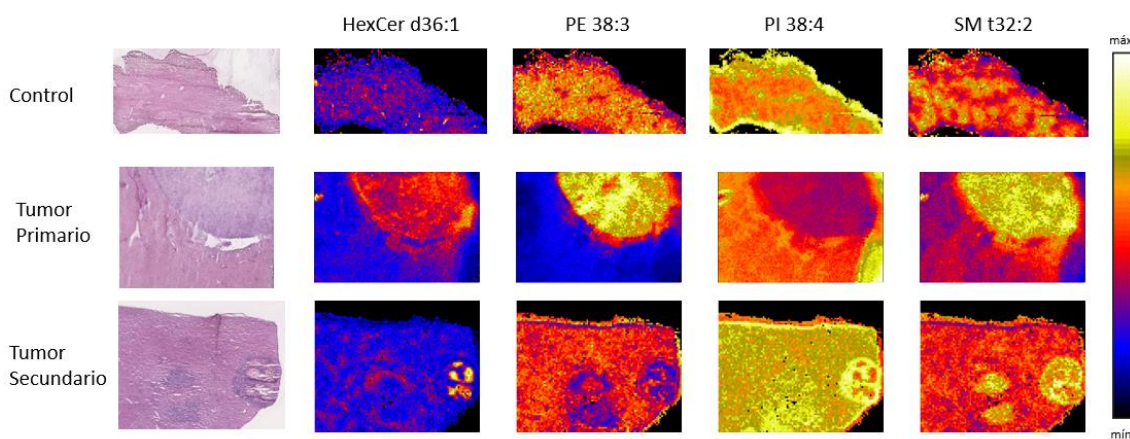
Esta potente herramienta permite dividir la muestra hasta en 300 clústeres diferentes. Sin embargo, el sucesivo aumento de clústeres genera imágenes en las que van apareciendo nuevas zonas que no son fáciles de identificar y que incluso pueden ser una división artificial del tejido. Por ello, siempre hay que tener en cuenta la imagen histológica para comprobar si realmente existen estas agrupaciones de células formando estructuras dentro del tejido o si, por el contrario, son divisiones artificiales de los datos. Sin la ayuda de un patólogo que identifique correctamente la histología del tejido resulta complicado asignar a qué población celular corresponde cada clúster. Por esta razón, en el presente estudio se cogió un único clúster que abarca todo el corte para los controles y dos clústeres para los tejidos con tumor, el primero abarca la zona sana del tejido y el segundo la zona neoplásica.

Siguiendo este criterio, se obtuvieron los espectros de masa promedio de los clústeres seleccionados, menos en las secciones de tejido del modelo de ratón con tumor secundario. De cinco muestras, salvo en la que aparece en la Figura 12, ni por medio de la imagen óptica ni por medio de las imágenes generadas por *clustering* se pudo identificar la presencia de zona tumoral. En la Figura 13 se ilustra un ejemplo de dos de estas muestras. La primera se asemeja a los tejidos de control donde los primeros niveles de *clustering* separan el interior del corte del exterior. La segunda forma unas estructuras más peculiares que quizá se asemejan a los controles con un nivel de *clustering* mayor, pero no se observa la presencia de ningún nódulo tumoral claro y bien delimitado.



**Figura 13.** Ejemplo de las imágenes histológicas y generadas por *clustering* para 2 muestras del modelo de metástasis hepática donde no se consigue distinguir la zona de tejido afectada.

El software también permite reconstruir la distribución de las especies lipídicas identificadas a lo largo del tejido utilizando una escala de falso color dependiendo de la intensidad registrada. En la Figura 14 se representa la distribución de cuatro lípidos sobre las secciones de hígado de ratón.



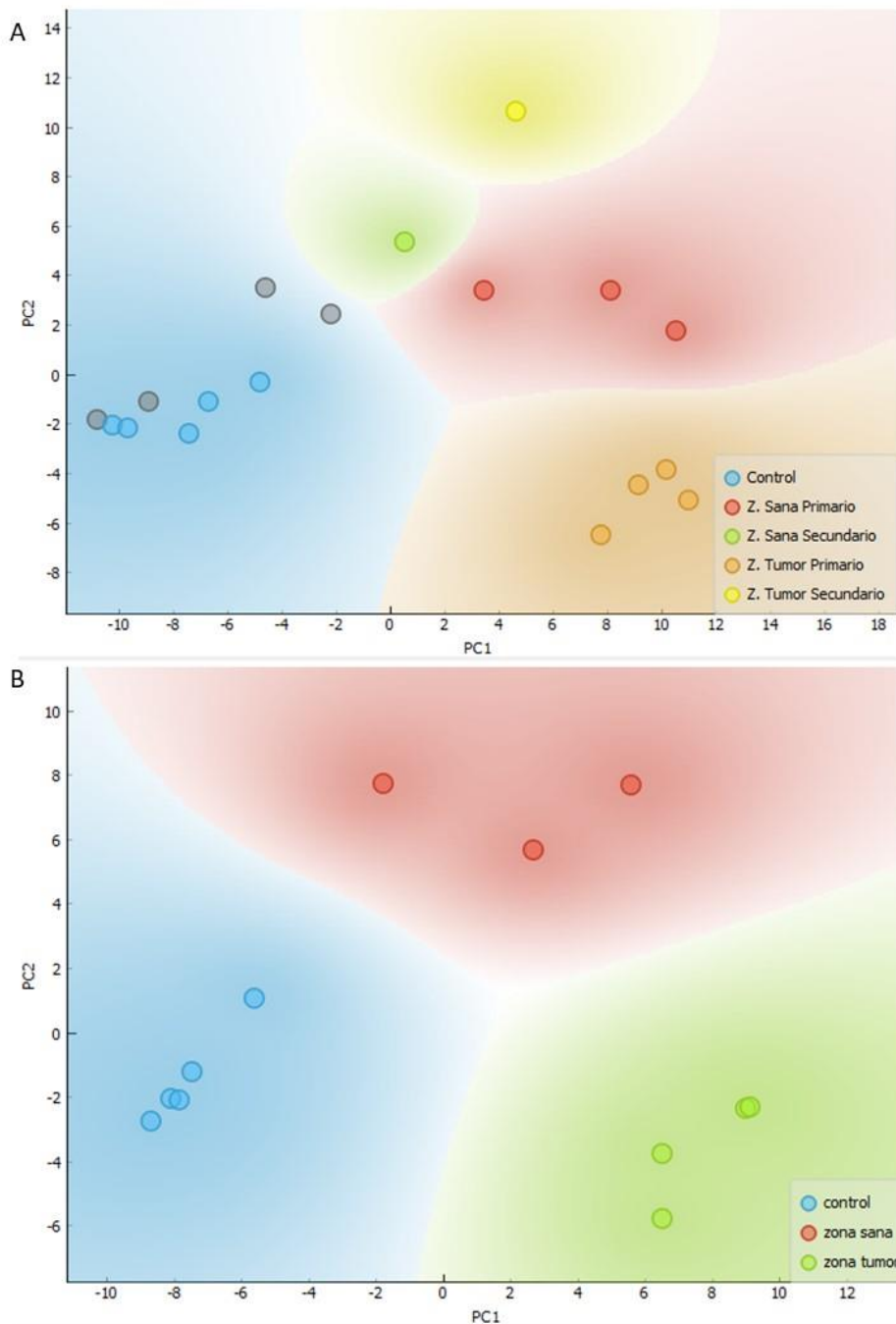
**Figura 14.** Comparación entre las imágenes ópticas de tres secciones de tejido hepático teñidas con H&E y la distribución de cuatro especies lipídicas detectadas en el modo de iones negativos.

Se observa que cada lípido presenta una distribución característica que depende de las poblaciones celulares presentes a lo largo del corte. Por ejemplo, la HexCer d36:1 se encuentra distribuida de forma bastante homogénea por todo el tejido control, mientras que en las zonas tumorales su abundancia aumenta. La PE 38:3 sigue una tendencia diferente entre el tumor primario y el tumor secundario. Para el primero se produce un aumento considerable en la intensidad al pasar de la zona sana a la zona tumoral, mientras que para el segundo se produce un pequeño descenso. La situación contraria se observa en el PI 38:4, que corresponde con la especie dominante en los espectros de masas, y se encuentra bien distribuida por todo el tejido control. En las muestras de tumor primario se produce un ligero descenso al cambiar de la zona sana a la tumoral mientras que para el secundario ocurre al revés. Por último, la SM t32:2 se encuentra concentrada en algunas regiones del control, pero también está aumentada de forma considerable en las dos regiones neoplásicas.

## 5.2. Análisis de datos estadístico

Como se ha comentado en el apartado anterior, no se pudieron encontrar tumores medibles y visibles macroscópicamente por las tinciones de H&E, ni en las imágenes generadas por MALDI-IMS salvo en uno de los cortes del modelo metastático. Para comprobarlo estadísticamente se realizó un análisis de las huellas lipídicas de las regiones de interés en cada tejido mediante PCA.

Para el análisis mostrado en la Figura 15.A se introdujeron los grupos control (azul) y zona sana y zona tumoral del modelo de tumor primario (rojo y naranja) y la zona sana y zona tumoral de la única muestra del modelo de metástasis (verde y amarillo) en la que se podía distinguir la existencia de ambas poblaciones celulares. El resto de las muestras de metástasis se introdujeron en el análisis sin añadirse a ningún grupo (puntos grises) para ver en qué zona del gráfico las incorporaba el programa y así poder clasificarlas en función de los grupos conocidos.



**Figura 15.** Análisis por PCA de los espectros promedio de los segmentos encontrados en las secciones de tejido. **A)** PCA de todos los grupos: control, tumor primario y tumor secundario. **B)** PCA sin tener en cuenta las muestras del modelo de metástasis hepática.

Como se puede observar, efectivamente el análisis PCA separa las muestras dudosas en la región de los controles, limitando con la zona sana del modelo metastático. Por ello, se decidió eliminar estos grupos del análisis ya que solamente se dispondría de una única muestra válida del modelo, lo que imposibilita la realización de pruebas estadísticas adecuadas. En la Figura 15.B no se tiene en cuenta el modelo tumoral secundario y se muestra una buena separación de los 3 grupos estudiados.

Para evaluar la buena separación y clasificación de los grupos se utilizaron tres modelos estadísticos diferentes: *Logistic Regression*, *Naïve Bayes* y *Support Vector Machine* (SVM). La Figura 16.A muestra que los tres modelos ofrecen resultados excelentes en la clasificación de las muestras, con una sensibilidad y precisión de 1,0 para SVM y regresión logística y algo menor para el método Naïve Bayes. Además, los tres modelos presentan una curva de operador de 1,0. Analizando la matriz de confusión (Figura 16.B) para los dos mejores modelos se observa un muy buen resultado ya que todas las muestras quedan clasificadas correctamente en sus correspondientes grupos.

A)

Model	AUC	CA	F1	Precision	Recall
SVM	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Logistic Regression	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Naive Bayes	1.000	0.917	0.917	0.938	0.917

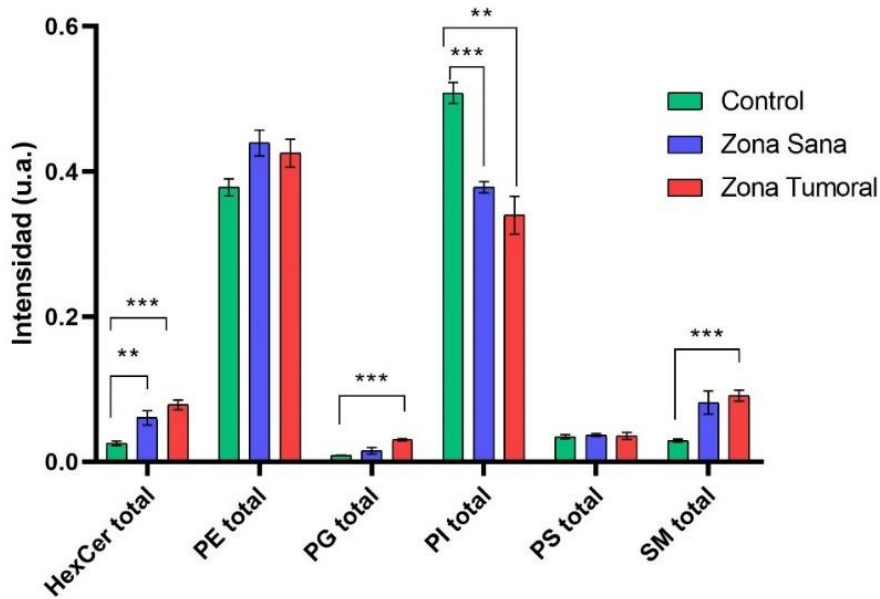
  

B)

		Predicted			$\Sigma$
		control	zona sana	zona tumor	
Actual	control	5	0	0	5
	zona sana	0	3	0	3
	zona tumor	0	0	4	4
$\Sigma$		5	3	4	12

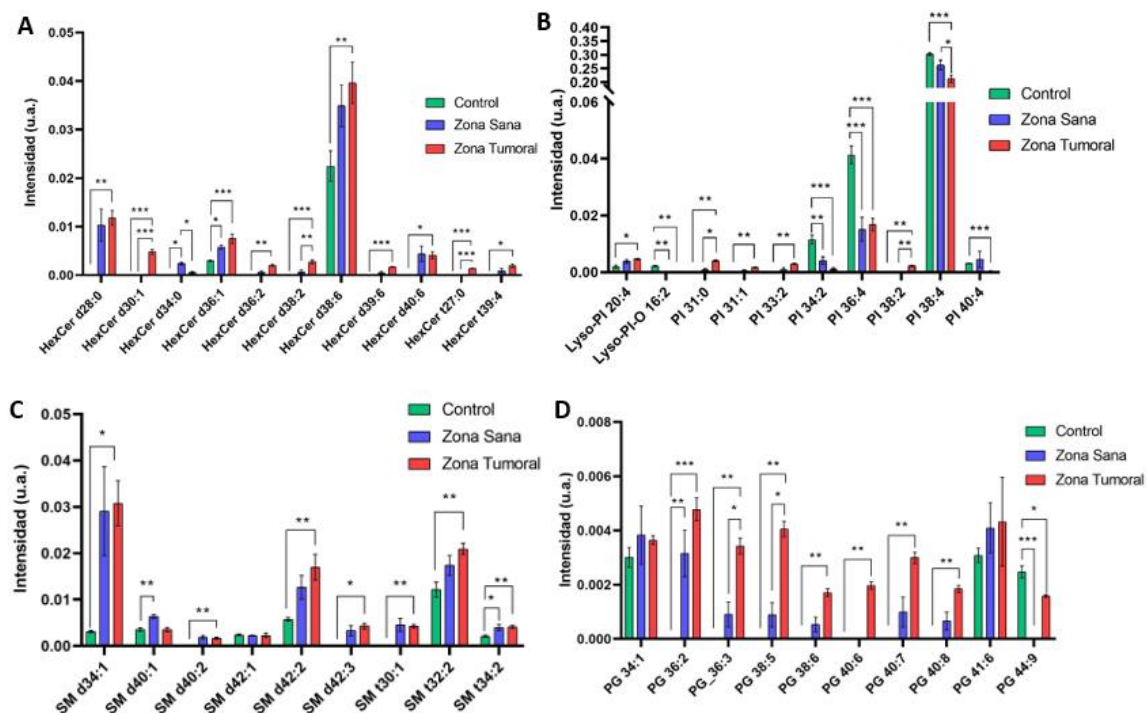
**Figura 16.** Rendimiento de la validación externa de los tres modelos de clasificación. **A)** Resumen del rendimiento de los modelos para la clasificación en tres clases. **B)** Matriz de confusión para los modelos SVM y regresión logística (con una exactitud del 100%).

Una vez demostrado que la huella lipídica de cada grupo es estadísticamente distinta y propia de cada grupo, se realizó un análisis de ANOVA de un solo factor para estudiar la tendencia que siguen los lípidos en los diferentes grupos. En la Figura 17 se muestra cómo la abundancia relativa de las familias de HexCer, PG y SM experimenta un aumento significativo entre el grupo control y la zona tumoral. Además, este aumento también es significativo en las HexCer entre el grupo control y el grupo de la zona sana. Por último, también se observa un descenso significativo en la abundancia relativa de la familia de los PI.



**Figura 17.** Comparación de la abundancia relativa de diferentes familias lipídicas para los tres grupos de estudio. Los valores están expresados como la media  $\pm$  SEM, n=5 (control), n=3 (zona sana), n=4 (zona tumoral). La significatividad estadística se evaluó mediante ANOVA de un factor: \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ).

El posterior análisis del contenido en distintas especies de lípidos representado en la Figura 17, muestra que en cuanto a las especies de HexCer, se produce un aumento progresivo del control a la zona sana y de ésta a la tumoral para la HexCer d36:1 (Figura 17.A). Para la familia de los PI se observan descensos significativos en la abundancia de PI 34:2, PI 36:4 y PI 38:4 entre los controles y las zonas sana y tumoral (Figura 17.B). También se produce un aumento en diferentes especies de SM como por ejemplo la SM d42:2 y SM 32:2 (Figura 17.C). Por último, también se observa un llamativo aumento en la cantidad de especies de PG encontradas en los grupos del hígado afectado, como la PG 38:2 o la PG 40:7, tanto en la zona sana como en la tumoral con respecto al control (Figura 17.D). Aunque para las familias de PE y PS también se observan cambios significativos entre los grupos estudiados en especies individuales de lípidos como la PE 34:0, PE 34:2, PE 36:1, PE 38:3, PE-P 36:4, PS 38:4, PS 40:6 o PS-P 38:1 entre muchas otras, a continuación, solo se muestran los gráficos de las familias con diferencias significativas en su abundancia relativa (Figura 18).



**Figura 18.** Comparación de la abundancia relativa de diferentes lípidos agrupados por familias. **A) HexCer. B) PI. C) SM D) PG.** Los valores están expresados como la media  $\pm$  SEM,  $n=5$  (control),  $n=3$  (zona sana),  $n=4$  (zona tumoral). La significatividad estadística se evaluó mediante ANOVA de un factor: \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ).

Salvo alguna excepción, se puede observar como por norma general las especies lipídicas de estas familias sufren un aumento considerable al pasar del grupo control, donde muchas veces su presencia es prácticamente inexistente, a los grupos de zona sana y, sobre todo, zona tumoral.

## 6. Conclusiones

Se han analizado 14 cortes de hígado de ratón divididos en tres grupos diferentes (control, tumor primario y tumor secundario) mediante la técnica MALDI-IMS, obteniéndose la huella lipídica de cada una de las muestras. Con la ayuda de la base de datos generada *in silico* mediante una aplicación creada en Matlab y la base de datos de Lipid Maps, además de la bibliografía publicada sobre estudios similares<sup>32-34</sup>, se han logrado identificar 96 especies lipídicas de 6 familias diferentes, siendo las PE y PI las familias más abundantes en cuanto a número de especies detectadas.

Los análisis realizados han determinado que existe una huella lipídica diferencial entre los estados de las células hepáticas. Se ha confirmado que existen diferencias significativas en los niveles totales de HexCer, PG, PI y SM entre el grupo control y el grupo de tumor primario, siendo significativa también esta diferencia con respecto a la zona sana del órgano con tumor. Salvo para las PI donde se produce un descenso, en las otras tres familias se puede observar cómo hay un aumento general de los niveles de

estos lípidos. Aunque el número total de muestras medidas aún es escaso y requiere de un aumento de la cohorte para dar una mayor solidez a los resultados.

El análisis de las huellas lipídicas utilizando PCA, así como su clasificación mediante los modelos SVM o regresión logística, que muestran una alta especificidad y precisión, abren la puerta a la aplicación de la tecnología MALDI-IMS para la ayuda del diagnóstico en esta enfermedad hepática. Aunque en este estudio las muestras se obtuvieron por cortes del órgano ya extraído del animal, en las secciones de un modelo de ratón no se consiguió identificar la región con tumor. Esto demuestra la complejidad de la realización de una biopsia donde existen muchas más limitaciones y el corte debe ser preciso para realizar un diagnóstico correcto.

Además, en investigaciones futuras sería interesante optimizar un método con la matriz adecuada para el estudio en modo de iones positivos y obtener más información sobre otras familias lipídicas y así entender de forma precisa los cambios metabólicos que se producen en cada tipo de muestra.

## 7. Bibliografía

1. Miquilena, M. E.; García-Monzón, Carmelo. Obesidad Y Enfermedad Hepática. *Gastroenterología Y Hepatología* **2010**, 33 (8), 591–604 DOI: 10.1016/j.gastrohep.2009.12.009
2. World Health Organisation. Fact sheet: Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (consultado 2/5/2021)
3. Prentice, A. M. The Emerging Epidemic of Obesity in Developing Countries. *International Journal of Epidemiology* **2006**, 35 (1), 93–99 DOI: 10.1093/ije/dyi272
4. Yu, J. *Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer*; Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology, Volume 1061; Springer: Singapore, **2018**.
5. Calle, E. E.; Kaaks, R. Overweight, Obesity and Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms. *Nature Reviews Cancer* **2004**, 4 (8), 579–591 DOI: 10.1038/nrc1408.
6. Wang, S.; Friedman, S. L. Hepatic Fibrosis: A Convergent Response to Liver Injury That Is Reversible. *Journal of Hepatology* **2020**, 73 (1), 210–211 DOI: 10.1016/j.jhep.2020.03.011.
7. Vilar-Gomez, E.; Martinez-Perez, Y.; Calzadilla-Bertot, L.; Torres-Gonzalez, A.; Gra-Oramas, B.; Gonzalez-Fabian, L.; Friedman, S. L.; Diago, M.; Romero-Gomez, M. Weight Loss through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **2015**, 149 (2), 367–378 DOI: 10.1053/j.gastro.2015.04.005.
8. Mann, J. P.; Tang, G. Y.; Nobili, V.; Armstrong, M. J. Evaluations of Lifestyle, Dietary, and Pharmacologic Treatments for Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver



- Disease: A Systematic Review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2019**, 17 (8), 1457–1476 DOI: 10.1016/j.cgh.2018.05.023.
9. World Health Organisation. Fact sheet: Cancer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (consultado 5/5/2021)
  10. Silva Isabel dos Santos. Epidemiología Del Cáncer: Principios Y Métodos. Lyon, Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, **1999**
  11. Papac, R. J. Origins of cancer therapy. *The Yale journal of biology and medicine*, **2001**; Vol. 74,6, pp 391-398.
  12. Bradbury, R. H.; Angibaud, P. *Cancer*; Topics in Medicinal Chemistry, Vol. 1; Springer: Berlin, **2007**.
  13. Menendez, J. A.; Lupu, R. Fatty Acid Synthase and the Lipogenic Phenotype in Cancer Pathogenesis. *Nature Reviews. Cancer* **2007**, 7 (10), 763–777 DOI: 10.1038/nrc2222.
  14. Spener, F.; Lagarde, M.; Geloën, A.; Record, M. What Is Lipidomics? *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, 105, 481–482.
  15. Vance, D. E.; Vance, J. E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed.; Elsevier: Amsterdam, **2008**.
  16. Fahy E; Subramaniam S; Brown HA; Glass CK; Merrill AH Jr; Murphy RC; Raetz CR; Russell DW; Seyama Y; Shaw W; et al. A Comprehensive Classification System for Lipids. *Journal of Lipid Research* **2005**, 46 (5), 839–861.
  17. Magnusson CD; Haraldsson GG. Ether Lipids. *Chemistry and Physics of Lipids* **2011**, 164 (5), 315–340 DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2011.04.010.
  18. Futerman AH. Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. **2016**. 6th Edition: 297-326.
  19. Bakiri, L.; Wagner, E. F. Mouse Models for Liver Cancer. *Molecular Oncology* **2013**, 7 (2), 206–223 DOI: 10.1016/j.molonc.2013.01.005.
  20. Chen X; Calvisi DF. Hydrodynamic Transfection for Generation of Novel Mouse Models for Liver Cancer Research. *The American Journal of Pathology* **2014**, 184 (4), 912–923 DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.12.002.
  21. Bestard-Escalas J; Maimó-Barceló A; Pérez-Romero K; Lopez DH; Barceló-Coblijn G. Ins and Outs of Interpreting Lipidomic Results. *Journal of Molecular Biology* **2019**, 431 (24), 5039–5062 DOI: 10.1016/j.jmb.2019.08.006.
  22. Pasch, H.; Schrepp, W. *Maldi-Tof Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*; Springer Laboratory; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2003**.
  23. Schiller, J.; Süß R; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Leßig, J.; Müller M; Petković M; Spalteholz, H.; Zschörnig 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 DOI: 10.1016/j.plipres.2004.08.001.
  24. Knight, R. D. Storage of Ions from Laser-produced Plasmas. *Applied Physics Letters* **1981**, 38 (4), 221–223 DOI: 10.1063/1.92315.

25. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. The Orbitrap: A New Mass Spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40* (4), 430–443 DOI: 10.1002/jms.856.
26. Pól Jaroslav; Strohalm, M.; Havlíček Vladimír; Volný Michael. Molecular Mass Spectrometry Imaging in Biomedical and Life Science Research. *Histochemistry and Cell Biology* **2010**, *134* (5), 423–443 DOI: 10.1007/s00418-010-0753-3.
27. Garate, J.; Fernández Roberto; Lage, S.; Bestard-escalas, J.; Lopez, D. H.; Reigada, R.; Khorrami, S.; Ginard, D.; Reyes José; Amengual, I.; et al. Imaging Mass Spectrometry Increased Resolution Using 2-Mercaptobenzothiazole and 2,5-Diaminonaphthalene Matrices: Application to Lipid Distribution in Human Colon. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407* (16), 4697–4708 DOI: 10.1007/s00216-015-8673-7.
28. Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. Sublimation As a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (9), 1646–1652 DOI: 10.1016/j.jasms.2007.06.010
29. Fernández Roberto; Garate, J.; Martín-Saiz Lucia; Galetich, I.; Fernández José A. Matrix Sublimation Device for Maldi Mass Spectrometry Imaging. *Analytical Chemistry* **2019**, *91* (1), 803–803 DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04765.
30. Xiong, X.; Xu, W.; Eberlin, L. S.; Wiseman, J. M.; Fang, X.; Jiang, Y.; Huang, Z.; Zhang, Y.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. Data Processing for 3d Mass Spectrometry Imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23* (6), 1147–1156 DOI: 10.1007/s13361-012-0361-7
31. Deininger SO; Ebert MP; Fütterer A; Gerhard M; Röcken C. Maldi Imaging Combined with Hierarchical Clustering As a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers. *Journal of Proteome Research* **2008**, *7* (12), 5230–5236 DOI: 10.1021/pr8005777.
32. Taguchi R; Ishikawa M. Precise and Global Identification of Phospholipid Molecular Species by an Orbitrap Mass Spectrometer and Automated Search Engine Lipid Search. *Journal of Chromatography. A* **2010**, *1217* (25), 4229–4239 DOI: 10.1016/j.chroma.2010.04.034.
33. Park S.M; Byeon S.K; Moon M.H; Sung H; Cho S.Y; Seong J.K. Lipidomic Perturbations in Lung, Kidney, and Liver Tissues of P53 Knockout Mice Analyzed by Nanoflow Uplc-Esi-Ms/ms. *Journal of Proteome Research* **2016**, *15* (10), 3763–3772 DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00566.
34. Jain, M.; Ngoy, S.; Sheth, S. A.; Swanson, R. A.; Rhee, E. P.; Liao, R.; Clish, C. B.; Mootha, V. K.; Nilsson, R. A Systematic Survey of Lipids Across Mouse Tissues. *American Journal of Physiology* **2014**, *306* (8), 854.
35. Garate J; Lage S; Martín-Saiz L; Perez-Valle A; Ochoa B; Boyano MD; Fernández R; Fernández JA. Influence of Lipid Fragmentation in the Data Analysis of Imaging Mass Spectrometry Experiments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2020**, *31* (3), 517–526 DOI: 10.1021/jasms.9b00090.