

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

**Alteración de lípidos en la enfermedad de Alzheimer.
Estudio en tejido cerebral humano *postmortem*
mediante MALDI-IMS**

Autor:
Itziar Acha Andrés
Director:
Rafael Rodríguez Puertas
Codirectora:
Estibaliz González de San Román

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3.1. Preparación de la muestra para MALDI-IMS	4
3.1.1. Obtención de las muestras de tejido cerebral humano <i>postmortem</i>	4
3.1.2. Almacenamiento de las muestras de tejido cerebral humano <i>postmortem</i> .	4
3.1.3. Aplicación de la matriz sobre el tejido: Sublimación.....	5
3.1.4. MALDI-IMS.....	5
3.2. Análisis de datos	5
3.2.1. Procesado de datos y adquisición de imágenes.....	5
3.2.2. Asignación de picos	6
4. RESULTADOS.....	6
4.1. CA1	6
4.2. Giro dentado	7
4.3. Subiculum	10
5. DISCUSIÓN	10
6. CONCLUSIÓN	13
7. BIBLIOGRAFÍA	13

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común entre la población de mayor edad. El principal factor de riesgo es la edad, aunque la causa exacta de la enfermedad y el mecanismo patogénico de los procesos degenerativos en el cerebro todavía son desconocidos (Kosicek y Hecimovic, 2013).

La EA se caracteriza macroscópicamente por la atrofia cerebral que refleja la pérdida neuronal y sináptica, y microscópicamente por la presencia de placas amiloides (que contienen agregados de péptidos β -amiloide) y ovillos neurofibrilares (formados por la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada), que afectan en primer lugar, el lóbulo temporal medial y parte de la corteza frontal del cerebro (revisión en Querfurth y LaFerla, 2010). El péptido β -amiloide se produce por el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloidea (APP). Primero, la APP se parte mediante la α - o β -secretasa (BACE1) formando fragmentos solubles sAPP α o sAPP β y fragmentos C-terminales unidos a la membrana, CTF α o CTF β , respectivamente. Ambos CTFs pueden ser procesados por una γ -secretasa liberando el péptido p3 (si el sustrato es CTF α) o A β (si el sustrato es CTF β). La cantidad de A β producido se determina por la disponibilidad de APP para α -secretasa (vía no amiloidegénica) o β -secretasa (vía amiloidegénica) (Kosicek y Hecimovic, 2013). Tanto APP como las secretasas son proteínas integrales de membrana, de modo que el entorno lipídico desempeña un papel regulador importante en el procesamiento de APP y la formación de péptidos A β . Además, estudios genómicos han demostrado que el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (apoE), una proteína de transporte de lípidos, es un factor de riesgo importante para la aparición de la enfermedad, por lo que las alteraciones de lípidos mediadas por ApoE parecen ser un desencadenante de la EA (Bales, 2010).

La concentración de la mayoría de lípidos en el cerebro humano disminuye a partir de los 50 años de edad, por lo tanto, es imprescindible conocer los cambios de niveles de lípidos que ocurren en el cerebro durante el envejecimiento, para diferenciar entre envejecimiento normal y patógeno. Ya en los años 80, RJ Wurtmann, sugirió que tanto la disminución de fosfolípidos en cerebro como la alteración de su metabolismo podrían estar implicados en la etiopatogénia de la EA y se formuló la hipótesis del autocanibalismo de las células colinérgicas que degeneran específicamente en la EA (Blusztajn y Wurtman, 1983). Más tarde, la comparación de cerebro *postmortem* de individuos con EA y controles, describió una disminución de los niveles de fosfatidilinositol (PI) (Prasad et al., 1998) y fosfatidiletanolamina (PE) en el hipocampo (Nitsch et al., 1992; Wells et al., 1995; Prasad et al., 1998;). También se describió un aumento de fosfatidilserina (PS) en los pacientes con EA. Por otro lado, respecto a

las fosfatidilcolinas (PC) o bien no se han observado alteraciones significativas (Wells et al., 1995) o se ha detectado una disminución en los niveles de PC (Nitsch et al., 1992; Guan et al., 1999).

Además de los cambios de glicerofosfolípidos, también se han observado alteraciones en los niveles de esfingolípidos en pacientes con EA. Estudios de cerebro *postmortem* revelan datos contradictorios acerca de los niveles de esfingomielina (SM) en los cerebros de EA, dependiendo del tejido cerebral analizado y la técnica de análisis utilizada. El esfingolípido más afectado en el cerebro de EA es el sulfátido (Kosicek y Hecimovic, 2013).

Esta disparidad de resultados se ha debido en gran medida a que hasta hace pocos años no ha sido posible la localización anatómica precisa en cerebro de la gran diversidad de especies lipídicas posibles. El desarrollo de la espectrometría de masas ha proporcionado una gran herramienta para la lipidómica. En concreto, la imagen por espectrometría de masas (IMS) es una tecnología que ha aumentado su potencial para analizar la distribución de moléculas en los tejidos. Específicamente, la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-IMS) se está desarrollando para localizar fármacos y metabolitos en varios tejidos (Groseclose y Castellino, 2013), así como para entender la fisiología de la señalización por lípidos en el sistema nervioso central (CNS) (Fernández et al., 2011).

Las ventajas de la IMS sobre otras técnicas de imagen, como por ejemplo la autorradiografía de proteínas o inmunohistoquímica son evidentes. Esta técnica no requiere de un marcador previo, como por ejemplo un marcador fluorescente o un isótopo radiactivo. Además, un único experimento individual permite la construcción de imágenes anatómicas que permiten la identificación de cientos de compuestos a partir de su m/z . El tiempo requerido para la manipulación y preparación de muestras es reducido, aunque el tiempo de adquisición total en un experimento típico de MALDI-IMS puede ser de horas (Veloso, 2013).

En el presente estudio, se analizó la distribución lipídica de 3 áreas de hipocampo (CA1, subiculum y giro dentado) en muestras cerebrales de pacientes con enfermedad de Alzheimer y se comparó con muestras de sujetos sin patología neurológica. Las muestras de tejido de cerebro humano *postmortem* de la región de hipocampo, fueron procesadas mediante la técnica MALDI-IMS. El método se basa en la aplicación de una solución de matriz sobre una sección de tejido seguido de un análisis por MALDI-IMS. Cada muestra se escaneó utilizando la detección en positivo y negativo, observándose alteraciones significativas en una decena de especies lipídicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de la muestra para MALDI-IMS

La preparación de tejidos para experimentos IMS se puede dividir en diferentes pasos. En este apartado se explican cada uno de ellos empezando por la adquisición de las muestras humanas *postmortem*, su obtención y almacenamiento. Para finalizar, se desarrolla el método utilizado para la deposición de la matriz.

3.1.1. Obtención de las muestras de tejido cerebral humano *postmortem*

Las muestras de tejido humano *postmortem* fueron obtenidas del banco de tejido cerebral del Instituto de Neuropatología del Hospital Universitario de Bellvitge. La recogida de muestras, así como el rastreo de la historia clínica, se realizaron dentro de la más estricta confidencialidad y siguiendo en todo momento las normas éticas y los diversos protocolos aprobados para estudios *postmortem* (CEISH/244/2014/RODRIGUEZ PUERTAS).

Las muestras control, es decir, sin historia clínica de alteraciones neurológicas o neuropsiquiátricas, proceden de tejido cerebral *postmortem* procedente de 5 pacientes. La edad de los pacientes control osciló entre los 43 y los 59 años, y un periodo *postmortem* entre 5 y 10 horas.

Las muestras con enfermedad de Alzheimer cumplían los criterios clínicos, internacionalmente consensuados, para el diagnóstico tanto clínico (Khachaturian, 1985) como neuropatológico de esta enfermedad. Se empleó tejido cerebral *postmortem* procedente de 9 pacientes. La edad de los pacientes enfermos osciló entre los 43 y los 90 años, y un periodo *postmortem* entre 3 y 12 horas.

3.1.2. Almacenamiento de las muestras de tejido cerebral humano *postmortem*

Las muestras de tejido cerebral correspondiente al área de hipocampo se conservaron a una temperatura de -80°C y fueron envasadas herméticamente hasta el momento de su utilización.

Posteriormente, las piezas fueron cortadas en secciones de 20µm de grosor en criotomo a -20°C. A continuación, se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se mantuvieron a -25°C hasta su análisis.

3.1.3. Aplicación de la matriz sobre el tejido: Sublimación

El método utilizado en este experimento para la deposición de la matriz fue la sublimación de la matriz, en el cual se evita la migración lipídica. La deposición de la matriz es un paso limitante en la preparación de las muestras debido a que una distribución de la matriz no homogénea sobre el tejido podría provocar una gran diferencia en la intensidad de la señal entre un área y otra de la muestra, dificultando la normalización de la señal. Para la deposición uniforme de la matriz sobre las secciones del tejido se utiliza un sublimador (Hankin et al., 2011). La matriz química se volatiliza por calentamiento en vacío, pero tras ponerse en contacto con la superficie refrigerada (4°C) en la que se encuentra el tejido, pasa rápidamente a su estado sólido. La matriz utilizada en este experimento fue 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y el proceso se realizó manteniendo la temperatura a 125°C durante 25 minutos. Tras la aplicación de la matriz, se recristalizó.

3.1.4. MALDI-IMS

El análisis de MALDI-IMS se realizó mediante un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo, Berlin, Alemania) tanto en modo positivo como en negativo. Las muestras se ionizan con un láser de nitrógeno (337nm, 60Hz y tamaño del punto 80*120µm). El rango de m/z para los datos obtenidos en modo positivo fue de 500-1000, mientras que en negativo fue de 400-1100 m/z. Para la caracterización de los lípidos, los espectros fueron obtenidos mediante el analizador Orbitrap, y se recogieron unos 10500 espectros por tejido. Se utilizaron 10 disparos por punto con una energía de láser 15-35µJ y una resolución de 150µM.

3.2. Análisis de datos

3.2.1. Procesado de datos y adquisición de imágenes

Tras seleccionar las áreas de interés en la región de hipocampo (CA1, subiculum y giro dentado), el análisis de datos se realiza mediante el software OriginPro8. Los valores de cada caso se normalizan con el pico de máxima intensidad de la muestra y se promedian por separado los resultados de los casos control y los casos con EA. Posteriormente se vuelven a normalizar y se comparan los espectros promedio obtenidos del grupo control con los del grupo de pacientes con EA. Las comparaciones entre ambos grupos experimentales se analizaron estadísticamente mediante el test *t* de Student. Los cambios se consideraron estadísticamente significativos cuando la probabilidad era menor de 0,05. Para la realización de estos análisis se utilizaron los programas Microsoft Office Excel y Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU). Todos los valores obtenidos se expresan en porcentajes,

considerando 100% el pico de máxima intensidad. La visualización de imágenes se ha realizado con el software ImageQuest.

3.2.2. Asignación de picos

Las muestras analizadas en este trabajo son complejas, ya que contienen una gran variedad de lípidos que comparten masas similares. La asignación de especies lipídicas se realizó por comparaciones con una base de datos denominada Lipid MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) y artículos previamente publicados.

4. RESULTADOS

El objetivo fue identificar las especies lipídicas que mostraron cambios en la abundancia en las regiones de interés (CA1, subiculum y giro dentado) entre el grupo control y el grupo de pacientes con EA.

El análisis estadístico de las distintas regiones de interés entre los dos grupos de muestras en modo positivo mostraron cambios significativos en el área CA1 y giro dentado pero sin embargo, no se mostraron cambios significativos en el subiculum. Por otro lado, respecto al modo negativo, se observaron cambios en subiculum y giro dentado pero no en el área CA1.

4.1. CA1

En la figura 1 se comparan el espectro promedio obtenido del grupo control con el del grupo de pacientes con EA en el área CA1 en modo positivo. Por otro lado, en la tabla 1 se muestran las especies lipídicas en las que se encontraron cambios significativos en el área CA1 en modo positivo. Tanto la GlcCer (32:1) como la SM (d18:1/18:0) disminuyen en las muestras procedentes de pacientes con EA. Sin embargo, PA (36:2), PC (34:1) y PC (36:1) aumentan en el grupo de pacientes con EA (Tabla 1).

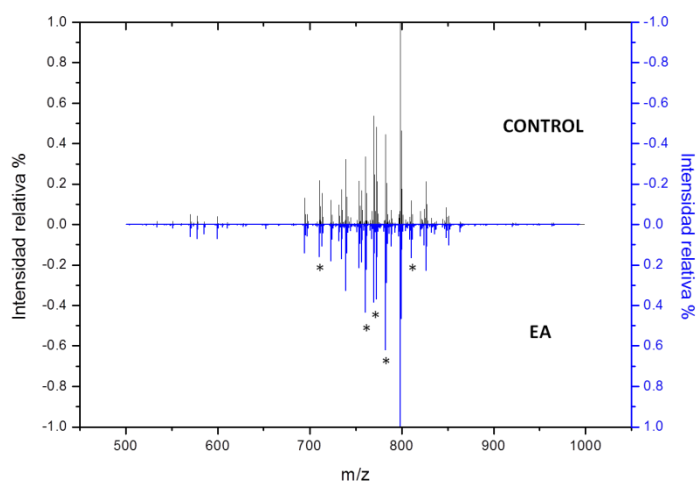


Figura 1. Comparación de los espectros promedio obtenidos de los casos control (negro) frente a los casos con EA (azul) en el área CA1 en modo positivo. Están indicadas con * las especies lipídicas que muestran alteraciones significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1. Especies de lípidos que se encuentran modificados en muestras de tejido cerebral de paciente con EA en modo positivo en el área CA1.

CA 1

Asignación	Cal m/z	Exp m/z	Control	EA	Referencia
GlcCer (32:1)+K	710.4968	710.4902	21.7 ± 3.0	15.0 ± 1.1 *	Lipid MAPS
PA (36:2)+K	739.4675	739.4693	22.6 ± 2.8	31.0 ± 1.7 *	Lipid MAPS
SM (d18:1/18:0)+K	769.5620	769.5639	54.0 ± 7.7	38.8 ± 3.9 *	(Berry et al., 2011)
PC (34:1)+Na	782.5670	782.5677	44.7 ± 4.0	62.1 ± 5.0 *	(Berry et al., 2011)
PC (36:1)+Na	810.5983	810.5990	12.4 ± 1.5	16.4 ± 0.8 *	(Berry et al., 2011)

En la tabla se muestra el lípido correspondiente asignado a cada m/z según la referencia correspondiente, la m/z teórica, la experimental y el valor medio (intensidad relativa %) y error estándar obtenido en los casos control y EA. Se han observado cambios significativos en 5 especies lipídicas diferentes. Entre ellos GlcCer (32:1) y SM (d18:1/18:0) muestran una disminución en pacientes con EA y PA (36:2), PC (34:1) y PC (36:1) muestran un aumento. Test t de Student *p<0,05.

En las imágenes (Figura 2) se puede observar en casos representativos la distribución e intensidad en código de color de las distintas especies lipídicas que han sufrido alteraciones significativas en pacientes con EA en el área CA1 del hipocampo.

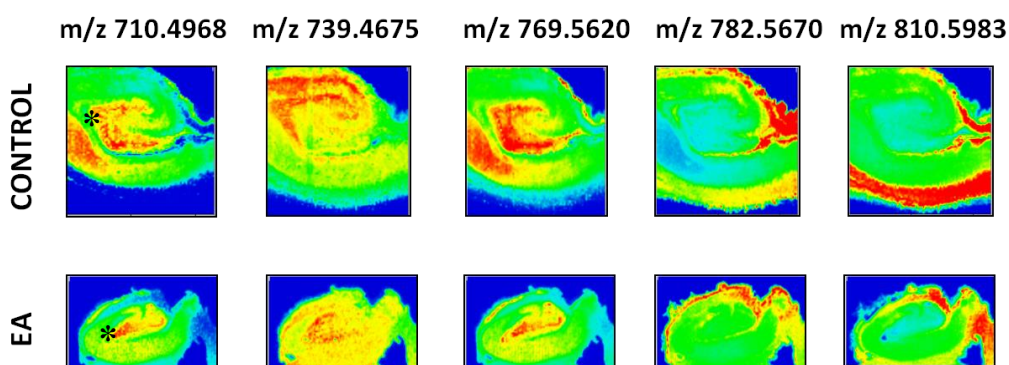


Figura 2. Diferencias en la intensidad de las especies lipídicas entre controles y EA en el área CA1. Los picos con m/z 710.4968 y m/z 769.5620 fueron significativamente más altos en los controles y los picos de m/z 739.4675, m/z 782.5670 y m/z 810.5983 fueron más altos en las muestras de pacientes con EA. El * indica el área que se ha analizado.

4.2. Giro dentado

En la figura 3 se comparan el espectro promedio obtenido del grupo control con los del grupo de pacientes con EA en el área del giro dentado en modo positivo (A) y modo negativo (B). En la tabla 2 se muestran las especies lipídicas en los que se encontraron cambios significativos en el área del giro dentado en modo positivo. En este caso, las 5 especies lipídicas disminuyen en

los pacientes con EA [GlcCer (32:1), PA (34:1), PC (32:0) y PS (37:3)]. La especie de m/z 771,5665 no se ha podido asignar en base a resultados previos (Tabla 2, Figura 5).

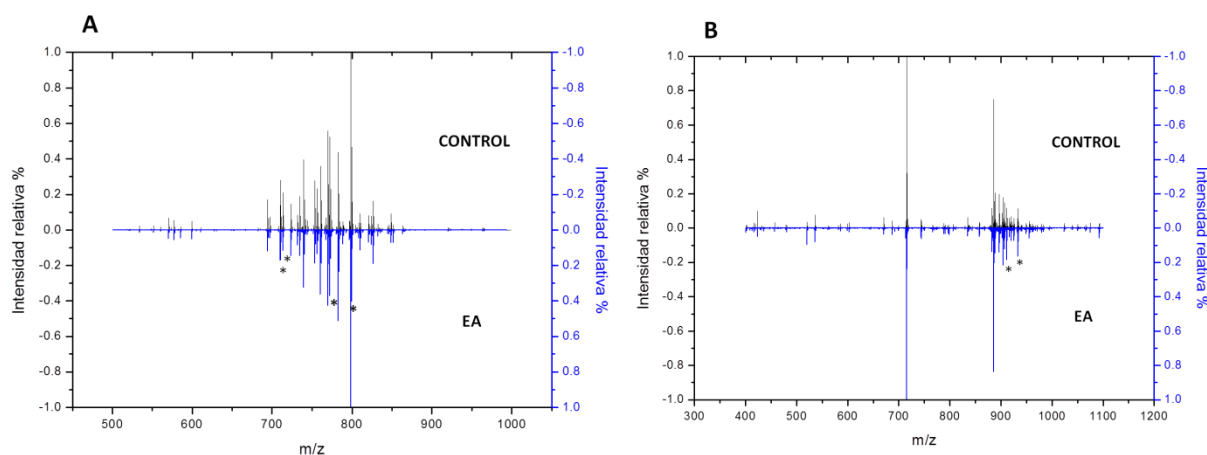


Figura 3. Comparación de los espectros promedio obtenidos de los casos control (negro) frente a los casos con EA (azul) en el área del giro dentado en modo positivo (A) y modo negativo (B). Están indicadas con * las especies lipídicas que muestran alteraciones significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2. Especies de lípidos que se encuentran modificados en muestras de tejido de cerebro humano postmortem en modo positivo en el área del giro dentado.

Giro dentado

Asignación	Cal m/z	Exp m/z	Control	EA	Referencia
GlcCer (32:1)+K	710.4968	710.4902	22.4 ± 1.7	16.5 ± 1.7 *	Lipid MAPS
PA (34:1)+K	713.4518	713.4533	17.0 ± 1.1	11.6 ± 1.1 *	Lipid MAPS
---	---	771.5665	6.9 ± 1.1	4.7 ± 0.4 *	---
PC (32:0)+K	772.5259	772.5271	52.7 ± 1.7	39.4 ± 3.5 *	(Berry et al., 2011)
PS (37:3)+H	800.5436	800.5485	15.3 ± 2.2	10.9 ± 0.6 *	Lipid MAPS

En la tabla se muestra el lípido correspondiente asignado a cada m/z según la referencia correspondiente, la m/z teórica, la experimental y el valor medio (intensidad relativa %) y error estándar obtenido en los casos control y EA. Se han observado cambios significativos en 5 especies moleculares diferentes, todos ellos disminuyen en las muestras de pacientes con EA. Test t de Student * $p < 0,05$.

En las imágenes (Figura 4) se puede observar en casos representativos la distribución e intensidad en código de color de las distintas especies lipídicas que han sufrido cambios significativos en el área del giro dentado en modo positivo. En este caso, en todos los picos se observa una disminución en los casos con EA.

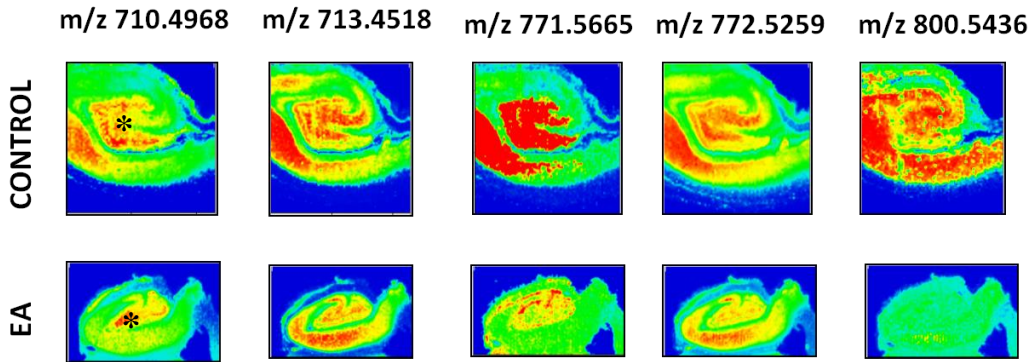


Figura 4. Diferencias en la intensidad de las especies lipídicas entre controles y pacientes con EA en el área del giro dentado en modo positivo. La intensidad relativa de todas las especies moleculares representadas es significativamente más baja en las muestras de pacientes con EA. El * indica el área que se ha analizado.

En el área del giro dentado en modo negativo, se observaron cambios significativos en las especies moleculares de m/z 911.5393 y m/z 933.5227, ambas especies lipídicas aumentan en los pacientes con EA (Figura 5). No fue posible asignar la especie lipídica correspondiente a cada pico en base a estudios previos.

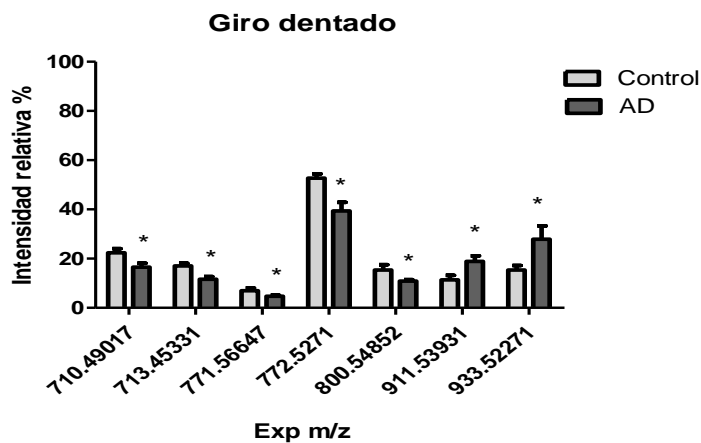
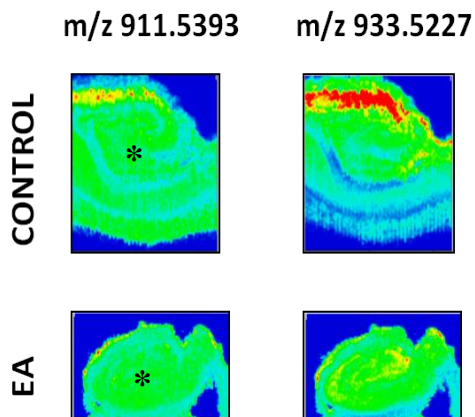


Figura 5. Especies de lípidos que muestran una alteración significativa (* $p < 0.05$) en el área del giro dentado en modo positivo y negativo. Representado en intensidad relativa. Las 5 primeras especies fueron detectadas en modo positivo y las dos últimas en modo negativo.



En las imágenes de la figura 6 se puede observar en casos representativos la distribución e intensidad en código de color de las distintas especies lipídicas que muestran un aumento en los enfermos de Alzheimer en el área del giro dentado.

Figura 6. Diferencia en la intensidad de las especies moleculares de m/z 911.5393 y m/z 933.5227 entre controles y pacientes con EA en el área del giro dentado en negativo. El * indica el área que se ha analizado.

4.3. Subiculum

En la figura 7 se compara el espectro promedio obtenido del grupo control frente a los del grupo de pacientes con EA en el área del subiculum en modo negativo. En la figura 8 se muestra la única especie molecular que mostró cambios significativos en el área del subiculum. Esta especie disminuye en los pacientes con EA. No fue posible asignar la especie lipídica correspondiente en base a resultados previos.

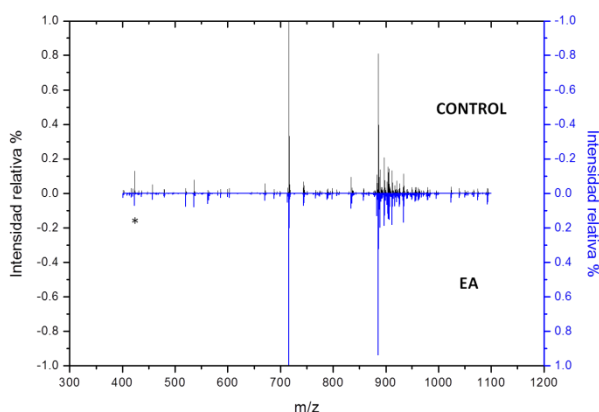


Figura 7. Comparación de los espectros promedio obtenidos de los casos control (negro) frente a los casos con EA (azul) en el área del subiculum en modo negativo. Está indicada con * la especie lipídica que muestra una alteración significativa (* $p < 0,05$).

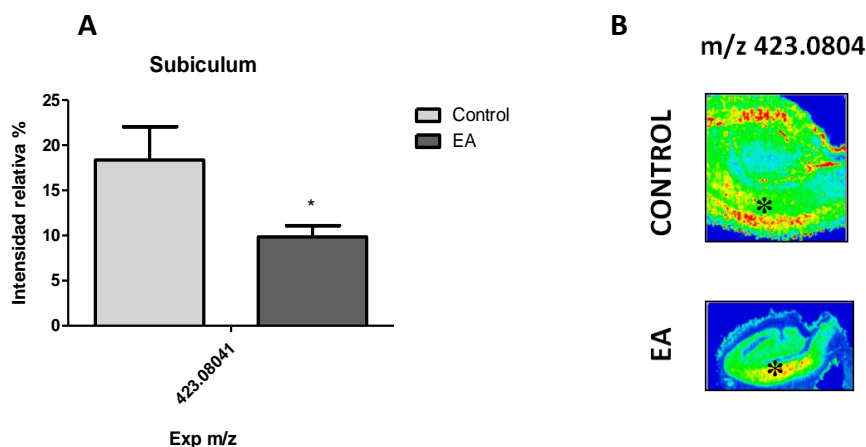


Figura 8. A: Especie lipídica que muestra una disminución significativa (* $p < 0.05$) en el subiculum. Representado en intensidad relativa. **B:** Distribución e intensidad en código de color de la especie molecular de m/z 423.0804 que muestra una disminución en los enfermos de Alzheimer. El * indica el área que se ha analizado.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han evaluado las diferencias en la composición lipídica en muestras control, comparados con pacientes con EA mediante MALDI-IMS. Los resultados, muestran una disminución de algunas especies de glucosilceramida [GlcCer (32:1)], esfingomielinea [SM (d18:1/18:0)] y fosfatidilserina [PS (37:3)] y una alteración en algunos ácidos fosfatídicos [PA

(34:1) y PA (36:2)] y fosfatidilcolinas [PC (32:0), PC (34:1) y PC (36:1)]. Así como otras especies moleculares que no ha sido posible asignar: m/z 771,5665; 911,5393; 933,52271; 423,0804.

En artículos previos, se ha descrito un aumento de los niveles de ceramidas en los tejidos cerebrales durante los estadios tempranos de EA (Han et al., 2002). Por un lado, estudios *in vitro* sugieren que la acumulación de A β activa la hidrólisis de esfingomielina mediante la esfingomielinasa (SMasa) provocando la acumulación de ceramidas (Lee et al., 2004). La activación de estas SMasas explicaría la disminución de los niveles de SM (d18:1/18:0) observados en los resultados del área CA1. Además, se ha descrito que el estrés oxidativo causado por la proteína A β también provoca un aumento de los niveles de ceramida y colesterol en cultivos celulares de neuronas del hipocampo (Cutler et al., 2004). Este aumento es debido a la inhibición de enzimas que la metabolizan como son la glucosilceramida sintasa (GCS) y la esfingomielina sintasa (SMS) (Sato et al., 2005). La inhibición de estas enzimas bloquearía la conversión de ceramida a GlcCer, y por lo tanto, esto explicaría la disminución de GlcCer (32:1) obtenida en el área CA1 y giro dentado de hipocampo en detección modo positivo. La acumulación de Cer provoca diversas consecuencias biológicas, incluyendo la desregulación de citoquinas, la generación de especies reactivas de oxígeno, y la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial y apoptosis (Hannun, 1996). También puede estabilizar la β -secretasa y producir el procesamiento amiloidegénico de APP (Horres y Hannun, 2012). Por lo tanto, el aumento del nivel de ceramida podría contribuir en la neurodegeneración que ocurre en la EA.

Puesto que todas las enzimas que participan en el procesamiento de APP (α , β y γ) son proteínas transmembranales, así como APP y su fragmento C-terminal (α CTF y β CTF), es lógico suponer que los lípidos dentro de la bicapa lipídica de la membrana pueden desempeñar un papel importante en el procesamiento de APP y la producción de A β . Las alteraciones lipídicas que se dan en la EA (especialmente en el metabolismo de colesterol y esfingolípidos) sugieren que las balsas o microdominios lipídicos pueden estar implicados en la enfermedad. Numerosos estudios sugieren que el procesamiento amiloidegénico de APP se produce en las balsas lipídicas, ya que APP, β -secretasa (BACE1) y γ -secretasa se localizan en estas balsas de lípidos (Kosicek y Hecimovic, 2013).

A pesar de que el proceso de eventos que dan lugar a la producción de agregados A β esté bien caracterizado, aún no está claro porque sólo una pequeña porción de la APP sigue la vía amiloidegénica. Además, la APP palmitoilada es un buen sustrato para la enzima BACE1, encargada de la proteólisis de APP en la vía amiloidegénica. La palmitoilación de una proteína consiste en formar un enlace tioéster entre un ácido palmítico de 16 carbonos y un residuo de

cisteína (Resh, 2006). Esta palmitoilación podría explicar la disminución en los niveles de PC (32:0) observados en el giro dentado, suponiendo que esta PC (32:0) esté formada por dos ácidos palmíticos. En la EA se da la formación de agregados amiloideos, por lo que podríamos suponer que se da un aumento de la palmitoilación de la APP y por lo tanto una disminución del ácido palmítico y también de PC (32:0). Los inhibidores de esta palmitoilación, perjudican el procesamiento de APP con las secretasas α y β . Lo mismo ocurre con los inhibidores de la acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa (ACAT), que redistribuyen el colesterol celular, y también inhiben la palmitoilación de APP y reducen la generación de A β (Bhattacharyya et al., 2013).

Por otro lado, la disminución de la PC (32:0) también puede deberse a la alteración en la actividad de las enzimas que catabolizan las PCs (PLD y PLA2) (Whiley et al., 2013). La PLA2 modifica la fluidez de las membranas, y dado que la APP es una proteína transmembranal, la fluidez de la membrana tendrá una gran importancia en la formación de placas amiloideas. Varios trabajos anteriores muestran que la actividad y la expresión de PLA2 en el cerebro y en el sistema nervioso central de los pacientes con EA están correlacionados con la progresión de la EA (Whiley et al., 2013).

Cabe destacar que un estudio reciente ha demostrado que los fosfolípidos aniónicos, principalmente PA, difosfatidilglicerol (PDG), PS y PI interactúan con el péptido A β , aumentando la formación de fibras de A β (Pettegrew et al., 2001). Es interesante que en nuestro estudio observamos una disminución de PA (34:1) y PS (37:3) en el área del giro dentado en modo positivo. Tal vez, la reducción de estos fosfolípidos esté relacionada con la formación de fibras de A β . Sin embargo, también hemos obtenido un aumento de la PA (36:2) en el área CA1. Este cambio puede deberse a la alteración en la actividad de la fosfolipasa D (PLD), enzima encargada de hidrolizar la PC a PA. El aumento de PA se ha relacionado con procesos neurodegenerativos (Whiley et al., 2013).

Por último, sería importante asignar las moléculas que se han encontrado modificadas en zonas del hipocampo concretas como el subiculum (m/z 423.0804). En este área se encuentran terminales de las células colinérgicas que inervan el hipocampo desde el prosencéfalo basal para el control de los procesos de memoria y aprendizaje.

También sería importante poder relacionar los cambios observados en el cerebro de pacientes con EA con la presencia de biomarcadores lipídicos de EA en el suero de pacientes en estadios preclínicos que ha sido recientemente descrita (Mapstone et al., 2014).

6. CONCLUSIÓN

La técnica MALDI-IMS permite caracterizar alteraciones lipídicas en tejido cerebral humano *postmortem* entre pacientes con EA y aquellos que no han sufrido ninguna enfermedad neurodegenerativa. Se observaron cambios significativos en diferentes especies lipídicas como GlcCer, PA, SM, PC y PS en áreas concretas del hipocampo. Los resultados obtenidos sugieren un origen multifactorial del metabolismo de estos lípidos, en el que podría participar la sobreactivación de las fosfolipasas, procesos de palmitoilación y el estrés oxidativo entre otros. Queda por determinar si las alteraciones lipídicas son causa o consecuencia del proceso neurodegenerativo que ocurre en la EA.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bales, K. R. (2010). Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 59, 295-302.
- Berry, K., Hankin, J., Barkley, R., Spraggins, J., Caprioli, R., & Murphy, R. (2011). MALDI Imaging of Lipid Biochemistry in Tissues by Mass Spectrometry. *Chemical Reviews*, 111, 6491–6512.
- Bhattacharyya, R., Barren, C., & Kovacs, D. (2013). Palmitoylation of Amyloid Precursor Protein Regulates Amyloidogenic Processing in Lipid Rafts. *The Journal of Neuroscience*, 33(27):11169-11183.
- Blusztajn, J., & Wurtman, R. (1983). Choline and Cholinergic Neurons. *Science*, 221, 614-620.
- Cutler, R., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W., Tammara, A., Hatanpaa, K., . . . Mattson, M. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Fernández, J., Ochoa, B., Fresnedo, O., Giralt, M., & Rodríguez-Puertas, R. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry in lipidomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 29-51.
- Groseclose, M., & Castellino, S. (2013). A Mimetic Tissue Model for the Quantification of Drug Distributions by MALDI Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85, 10099–10106.
- Guan, Z., Wang, Y., Cairns, N., Lantos, P., Dallner, G., & Sindelar, P. (1999). Decrease and Structural Modifications of Phosphatidylethanolamine Plasmalogen in the Brain With Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58, 740-747.
- Han, X., Holtzman, D., McKeel, D., Kelley, J., & Morris, J. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *Journal of Neurochemistry*, 82, 809-818.
- Hankin, J., Farias, S., Barkley, R., Heidenreich, K., Frey, L., Hamazaki, K., . . . Murphy, R. (2011). MALDI Mass Spectrometric Imaging of Lipids in Rat Brain Injury Models. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 22, 1014-1021.
- Hannun, Y. (1996). Functions of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress. *Sciences*, 274, 1855-1859.

- Horres, C., & Hannun, Y. (2012). The Roles of Neutral Sphingomyelinases in Neurological Pathologies. *Neurochemical Research*, 37, 1137-1149.
- Khachaturian, Z. (1985). Diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of neurology*, 42(11), 1097-105.
- Kosicek, M., & Hecimovic, S. (2013). Phospholipids and Alzheimer's Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers. *Molecular Sciences*, 14, 1310-1322.
- Lee, J., Xu, J., Lee, J., Ku, G., Han, X., Yang, D., & Chen, S. (2004). Amyloid- β peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *The Journal of Cell Biology*, 164, 123-131.
- Mapstone, M., Cheema, A., Fiandaca, M., Zhong, X., Mhyre, T., MacArthur, L., . . . Federoff, H. (2014). Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature Medicine*, 1-6.
- Nitsch, R. M., Blusztajn, J. K., Pittas, A. G., Slack, B. E., Growdon, J. H., & Wurtman, R. J. (1992). Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Medical Sciences*, 89, 1671-1675.
- Pettegrew, J., Panchalingam, K., Hamilton, R., & McClure, R. (2001). Brain Membrane Phospholipid Alterations in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 26, 771-782.
- Prasad, M., Lovell, M., Yatin, M., Dillon, H., & Markesbery, W. (1998). Regionail Membrane Phospholipid Alteration in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 23, 81-88.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 329-344.
- Resh, M. (2006). Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Science STKE*, :re14.
- Sato, H., Tomimoto, H., Ohtani, R., Kitano, T., Kondo, T., Watanabe, M., . . . Okazaki, T. (2005). Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience*, 130, 657-666.
- Veloso, A. (2013). Imagen por espectrometría de masas (MALDI-IMS) para la detección de biomoléculas y fármacos. Leioa.
- Wells, K., Farooqui, A., Liss, L., & Horrocks, L. (1995). Neural Membrane Phospholipids in Alzheimer Disease. *Neurochemical Research*, 20, 1329-1333.
- Whiley, L., Sen, A., Heaton, J., Proitsi, P., García-Gómez, D., Leung, R., . . . Legido-Quigley, C. (2013). Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology og Aging*, 1-8.